

**UNTERSUCHUNGEN ZUR NEUROTOXIZITÄT  
ENDOGEN GEBILDETER SUBSTANZEN  
UND VERBESSERUNG DER SCHUTZMECHANISMEN**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Natalia Wszelaki  
aus Warschau, Polen

Berlin 2012

Die Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2008 bis Dezember 2011 unter Anleitung von Prof. Dr. Matthias F. Melzig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
2. Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Disputation am: 08. August 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Neurodegenerative Krankheiten.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Morbus Alzheimer.....	2
1.1.2 Morbus Parkinson.....	4
<b>1.2 Dysfunktion der Mitochondrien und oxidativer Stress.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Rolle der Mitochondrien in der Zelle.....	6
1.2.2 Mitochondriale DNA.....	7
1.2.3 Oxidativer Stress.....	8
<b>1.3 Apoptose.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Endogene Neurotoxine.....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Metaboliten des Kynureninwegs.....	15
1.4.2 Salsolinol.....	19
<b>1.5 Behandlungsstrategien.....</b>	<b>21</b>
1.5.1 Einsatz von Radikalfängern.....	22
1.5.2 Neuroprotektion durch Einfluss auf mitochondriale Funktionen.....	23
<b>1.6 Zielsetzung.....</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Allgemeine Hinweise.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Chemikalien.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Puffer und weitere Lösungen.....</b>	<b>27</b>
2.3.1 Lösungen der Testsubstanzen.....	27
2.3.2 Lösungen für Immunfluoreszenz.....	27
<b>2.4 Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>27</b>
2.4.1 Untersuchungsmaterialien.....	27
2.4.2 Zellkultur.....	28
2.4.3 Pflanzenmaterial.....	30
2.4.4 Flavonoid-Nanokristalle.....	30
2.4.5 Antikörper.....	30
<b>2.5 Geräte.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Herstellung der Pflanzenextrakte.....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.7.1 Zelllinien.....	32
2.7.2 Kultivieren und Passagieren von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.....	32

2.7.3	Zellzahlbestimmung.....	33
2.7.4	Auftauen von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.....	33
2.7.5	Einfrieren von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.....	34
2.7.6	Differenzierung von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.....	34
2.7.6.1	Differenzierung mit all-trans-Retinsäure.....	34
2.7.6.2	Differenzierung mit Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	34
2.7.7	Induzierung einer Stoffwechselumstellung von Glykolyse auf oxidative Phosphorylierung.....	35
<b>2.8</b>	<b>Zellkultur-Assays.....</b>	<b>35</b>
2.8.1	MTT-Test.....	35
2.8.1.1	Prinzip des MTT-Tests.....	35
2.8.1.2	Durchführung des MTT-Tests.....	35
2.8.2	ATP-Lumineszenz-Assay.....	36
2.8.2.1	Prinzip des ATP-Lumineszenz-Assays.....	36
2.8.2.2	Durchführung des ATP-Lumineszenz-Assays.....	36
2.8.3	Caspase-3/7-Homogenous Assay.....	37
2.8.3.1	Prinzip des Caspase-3/7-Assays.....	37
2.8.3.2	Durchführung des Caspase-3/7-Assays.....	37
2.8.4	Bcl-2 ELISA.....	38
2.8.4.1	Prinzip des Bcl-2 ELISA.....	38
2.8.4.2	Durchführung des Bcl-2 ELISA.....	38
<b>2.9</b>	<b>Immunfluoreszenzfärbung.....</b>	<b>39</b>
<b>2.10</b>	<b>Untersuchungen mittels HPLC.....</b>	<b>40</b>
2.10.1	Vorbereitungen der Proben für die HPLC-Analyse.....	40
2.10.2	Bedingungen der HPLC-Analyse.....	40
<b>2.11</b>	<b>Statistische Beurteilung.....</b>	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Neuronale Differenzierung.....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die neuronale Differenzierung.....	42
3.1.2	Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ auf die neuronale Differenzierung.....	43
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Tests.....</b>	<b>44</b>
3.2.1	Zytotoxische Wirkung von 6-Hydroxydopamin.....	44
3.2.1.1	Einfluss von 6-Hydroxydopamin auf undifferenzierte und differenzierte SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.....	44
3.2.1.2	Einfluss von 6-Hydroxydopamin auf im Galaktose-Medium inkubierte SH-SY5Y-Zellen.....	45

3.2.2	Zytotoxische Wirkung von Salsolinol.....	46
3.2.2.1	Einfluss von Salsolinol auf undifferenzierte und differenzierte SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.....	46
3.2.2.2	Einfluss von Salsolinol auf im Galaktose-Medium inkubierte SH-SY5Y-Zellen.....	47
3.2.3	Zytotoxische Wirkung von 3-Hydroxykynurenin.....	48
3.2.3.1	Einfluss von 3-Hydroxykynurenin auf undifferenzierte und differenzierte SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.....	48
3.2.3.2	Einfluss von 3-Hydroxykynurenin auf im Galaktose-Medium inkubierte SH-SY5Y-Zellen.....	49
3.2.4	Zytotoxische Wirkung von Quinolinsäure und Kynureninsäure.....	50
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der Toxizität von Neurotransmitter-Metaboliten mittels ATP-Lumineszenz-Assays.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Polyphenolen auf die Neurotransmitter-Metaboliten- induzierte Zytotoxizität.....</b>	<b>52</b>
3.4.1	Einfluss von Polyphenolen auf die Neurotransmitter-Metaboliten- vermittelte Abnahme der Zellproliferation.....	56
3.4.2	Einfluss von Polyphenolen auf die Neurotransmitter-Metaboliten- vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.....	57
<b>3.5</b>	<b>Einfluss von weiteren Stoffen auf die Neurotransmitter-Metaboliten- induzierte Zytotoxizität.....</b>	<b>58</b>
3.5.1	Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten- vermittelte Abnahme der Zellproliferation.....	59
3.5.2	Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten- vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.....	59
3.5.3	Einfluss von Glutathion auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme der Zellproliferation.....	61
3.5.4	Einfluss von Glutathion auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.....	62
3.5.5	Einfluss von Glutathion auf die Salsolinol-vermittelte Abnahme der Zellproliferation.....	63
3.5.6	Einfluss von Glutathion auf die Salsolinol-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.....	64
<b>3.6</b>	<b>Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Neurotransmitter- Metaboliten-induzierte Zytotoxizität.....</b>	<b>65</b>
3.6.1	Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Neurotransmitter-Metaboliten- vermittelte Abnahme der Zellproliferation.....	65

3.6.2	Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Neurotransmitter-Metaboliten- vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.....	66
<b>3.7</b>	<b>Einfluss von Flavonoid-Nanokristallen auf die Neurotransmitter- Metaboliten-induzierte Zytotoxizität.....</b>	<b>66</b>
3.7.1	Einfluss von Flavonoid-Nanokristallen auf die Neurotransmitter- Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.....	67
<b>3.8</b>	<b>Untersuchung von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die Zellproliferation.....</b>	<b>70</b>
3.8.1	Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme der Zellproliferation.....	70
3.8.2	Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP- Gehaltes.....	71
<b>3.9</b>	<b>Untersuchungen zu den Wirkmechanismen der untersuchten Naturstoffen.....</b>	<b>72</b>
3.9.1	Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Caspase-3/7-Aktivität.....	72
3.9.1.1	Einfluss von Neurotransmitter-Metaboliten auf die Caspase-3/7- Aktivität.....	72
3.9.1.2	Einfluss von Luteolin und Natriumpyruvat auf die Caspase-3/7- Aktivität.....	75
3.9.1.3	Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat und Glutathion in Kombination mit Salsolinol auf die Caspase-3/7-Aktivität.....	77
3.9.2	Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Expression von Bcl-2.....	78
3.9.2.1	Einfluss von Neurotransmitter-Metaboliten auf die Expression von Bcl-2..	79
3.9.2.2	Einfluss von Luteolin und Natriumpyruvat auf die Expression von Bcl-2..	79
3.9.2.3	Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat und Glutathion in Kombination mit Salsolinol auf die Expression von Bcl-2.....	81
<b>3.10</b>	<b>Bestimmung von Salsolinol und Glutathion mittels HPLC-Analyse.....</b>	<b>83</b>
<b>4. DISKUSSION.....</b>		<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen mittels all-trans-Retinsäure und Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> in neuronale Zellen.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2</b>	<b>Beeinflussung der Toxizität von Metaboliten des Kynureninwegs und anderen Neurotoxinen.....</b>	<b>86</b>

4.3 Einfluss von Polyphenolen auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt.....	88
4.4 Einfluss ausgewählter Pflanzenextrakte auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt.....	95
4.5 Einfluss von Quercetin- und Rutin-Nanokristallen auf den ATP-Gehalt.....	96
4.6 Einfluss von Naturstoffen auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt.....	97
4.7 Einfluss einer Kombination von Luteolin und Natriumpyruvat auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt.....	101
4.8 Einfluss auf die Caspase-3/7-Aktivität.....	102
4.9 Vermittlung der Neuroprotektion durch Wirkung auf Bcl-2.....	104
4.10 Untersuchungen zur Kombination von Glutathion und Salsolinol..	106
5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	108
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	109
7. SUMMARY.....	111
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	113
9. LEBENS LAUF.....	134
10. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	135
11. DANKSAGUNG.....	137
12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	138

## Abkürzungsverzeichnis

3-HK	3-Hydroxykynurenin
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
AIDS	engl. <i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AIF	engl. <i>apoptosis-inducing factor</i>
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
APAF-1	engl. <i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	engl. <i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
Bak	engl. <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer protein</i>
Bax	engl. <i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	engl. <i>B-cell lymphoma-2</i>
Bcl-w	engl. <i>Bcl-2-like-2 protein</i>
Bcl-xL	engl. <i>B-cell lymphoma xl (long isoform)</i>
Bid	engl. <i>Bcl-2 interacting domain death agonist</i>
BSA	bovines Serumalbumin
DED	engl. <i>death effector domain</i>
DISC	engl. <i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGCG	Epigallocatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FADD	engl. <i>Fas associated protein with death domain</i>
Fas/CD95/Apo-1	engl. <i>fibroblast associated</i>
FasL	Fas Ligand
FBS	engl. <i>fetal bovine serum</i> – fetales Kälberserum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
KYNA	Kynureninsäure
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
Mcl-1	engl. <i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-pyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD <sup>+</sup>	oxidierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Noxa	engl. <i>BH3 only protein</i>
Nrf2	engl. <i>nuclear factor erythroid related factor 2</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
QUIN	Quinolinsäure
RA	all-trans-Retinsäure
RLU	engl. <i>relative luminescence units</i>
RFU	engl. <i>relative fluorescence units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
tBid	engl. <i>truncated Bid</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UV	Ultraviolettstrahlung

VDAC	engl. <i>voltage-dependet anion channel</i>
Z-DEVD-R110	Z-Asp-Glu-Val-Asp-Rhodamin110
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Neurodegenerative Krankheiten

Aufgrund der Verlängerung der Lebenszeit der Bevölkerung wächst auch das Interesse an den Krankheiten, die mit fortgeschrittenem Alter verbunden sind. Zu den Erkrankungen, welche die alternde Gesellschaft in den entwickelten Ländern betreffen, gehören vor allem neurodegenerative Krankheiten mit der Alzheimer-Krankheit und Parkinson-Krankheit an der Spitze. Neurodegenerative Krankheiten werden zu einer heterogenen Gruppe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems gezählt, die zu einer zunehmenden Schädigung oder zum Verlust von neuronalen Zellen in bestimmten Hirnregionen führen. Für die Alzheimer-Krankheit ist ein zunehmender Untergang von neuronalen Zellen im zerebralen Kortex charakteristisch. Die Parkinson-Krankheit ist durch das Absterben der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra gekennzeichnet. Das klinische Erscheinungsbild ist abhängig von der betroffenen Nervenzellpopulation.

Die Huntington-Krankheit, die Multisystem-Atrophie und die Amyotrophe Lateralsklerose führen hauptsächlich zu Bewegungsstörungen. Die Alzheimer-Krankheit und die frontotemporale Demenz (Pick-Krankheit) verlaufen vorwiegend mit kognitiven Einschränkungen. Es gibt auch neurodegenerative Krankheiten, die eine Kombination von Bewegungsstörungen und Abnahme der kognitiven Funktion darstellen, wie z.B. Morbus Parkinson und Lewy-Körper-Krankheit.

Alle genannten Krankheiten haben gemeinsam, dass sie durch chronisch-entzündliche Vorgänge, oxidativen Stress, Proteinablagerungen innerhalb oder außerhalb der Nervenzellen, gestörtes Gleichgewicht von Kupfer- Eisen- und Zink-Ionen im Gehirn und mitochondriale Dysfunktion charakterisiert sind (Sayre et al., 2008). Die Protein-Ablagerungen entstehen durch fehlerhafte posttranslationale Veränderungen von Proteinen durch Glykolysierung oder Phosphorylierung (Ishiguro et al., 1999; Shuvaew et al., 2001). Die glykolysierten oder phosphorylierten Proteine sind stabiler und vor Abbau geschützt (Monnier und Cerami, 1981; Guevara et al., 1998). Infolgedessen können solche Proteine neurotoxische Effekte ausüben und zum neuronalen Zelltod führen. Warum unterschiedliche Nervenzellen anfälliger für die toxische Wirkung bestimmter Ablagerungen sind, steht noch nicht fest. Großen Einfluss bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen hat das Alter und damit veränderte Stoffwechselfvorgänge. Zahlreiche Studien zeigen auch, dass die

antioxidativen Schutzmechanismen des neuronalen Gewebes im fortgeschrittenen Alter nicht mehr ausreichend funktionieren (Pallardo et al., 1998; Venkateshappa et al., 2012). Ferner nimmt die neuronale Exzitotoxizität durch übererregte Rezeptoren des N-Methyl-D-Aspartats (NMDA) zu. Es wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Stimulation des NMDA-Rezeptors durch Glutamat zu einem Einstrom der Calcium-Ionen führt, was eine Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bedingt (Gerlach et al., 1994).

Im Mittelpunkt der Diskussionen über mögliche Faktoren, die an der Entstehung neurodegenerativer Leiden beteiligt sind, stehen auch endogen gebildete Neurotoxine, die zu Fehlfunktionen von Mitochondrien und schließlich zum Absterben der Nervenzellenpopulationen führen. Die genaue Ätiologie der neurodegenerativen Erkrankungen ist noch unbekannt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass sich mehrere Faktoren gegenseitig beeinflussen und zur Verstärkung des zellulären oxidativen Stresses beitragen.

### **1.1.1 Morbus Alzheimer**

Die Alzheimer-Krankheit ist die am häufigsten auftretende Demenzform, von deren ca. 5 % Menschen im Alter von über 65 Jahren betroffen sind (Ritchie und Lovestone, 2002). Man unterscheidet zwei grundlegende Typen der Alzheimer-Krankheit, eine erbliche Form, bei der die ersten Symptome zwischen dem 35. und 60. Lebensjahr auftreten und nicht-erbliche späte Form, die meistens weit nach dem 65. Lebensjahr einsetzt.

Diese neurodegenerative Erkrankung ist eine heterogene Krankheit in klinischer, neuropathologischer, biochemischer und molekularer Hinsicht. Morbus Alzheimer zeichnet sich durch einen zunehmenden Niedergang der cholinergen Neuronen im Vorderhirn sowie durch synaptische Schäden im zerebralen Kortex und im Hippocampus aus (Law et al., 2001). Für den Nervenzellverlust werden sowohl extrazelluläre Proteinablagerungen, Amyloid-Plaques in Form von  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ), als auch intrazelluläre von den Tau-Proteinen verantwortlich gemacht, die im geschädigten Gehirn von Alzheimer-Erkrankten gefunden werden (Brion et al., 1986; Burdick et al., 1992; Jarret et al., 1993).  $A\beta$  ist ein Peptid, das aus 40 oder 42 Aminosäuren besteht und infolge der vermehrten Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch die Enzyme  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen entsteht. Neuere

Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass diesem Prozess solche Ursachen zugrunde liegen können wie eine vermehrte A $\beta$ -Produktion, besondere des 42 Aminosäuren-Fragmentes, und die Neigung des Proteins zur Aggregation sowie Bildung der senilen Plaques (Friedrich et al., 2010). Andere Studien belegten, dass es in der unmittelbaren Umgebung der senilen Plaques zur Mikrogliaaktivierung, Zytokinfreisetzung, Astrozytendegeneration, inflammatorischen Reaktionen und Aktivierung des Komplementsystems kommt (Mattson, 2002; Fuller et al., 2010; Ferretti et al., 2011). Dieses Ergebnis steht im Zusammenhang mit einer Untersuchung von Abramov et al. (2005), die feststellten, dass A $\beta$  in Astrozyten, die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) induziert und es infolgedessen zur vermehrten ROS-Bildung, Veränderung des Calcium-Ionen-Gleichgewichts und indirekt zum Absterben der Neuronen durch Apoptose kommt. Eine Untersuchung in N2a-Maus-Neuroblastomzellen zeigte, dass A $\beta$  seine toxische Wirkung direkt in Mitochondrien durch abnormale Genexprimierung, eine Verhinderung des Neuritenauswuchses und eine vermehrte Bildung von freien Radikalen entfaltet (Keeley et al., 2001; Manczak et al., 2010).

Eine Bedeutung für die Pathogenese von Morbus Alzheimer hat auch das Tau-Protein. Das Tau-Protein dient unter physiologischen Bedingungen zur Stabilisierung der Mikrotubuli, die den intrazellulären Organellentransport vermitteln (Stamer et al., 2002). In höheren Konzentrationen kann das Tau-Protein den Kinesin-abhängigen Transport inhibieren, was zur Abnahme der Mitochondrien- und Peroxisomenzahl in der Nervenzelle führt. Diese Prozesse machen die Zelle anfälliger für Folgen des oxidativen Stresses. Infolgedessen wird wahrscheinlich auch das Tau-Protein hyperphosphoryliert, so dass dieses Protein nicht mehr an die Mikrotubuli binden kann und das Cytoskelett der Zelle zerstört wird. Ferner ist der Transport von APP gestört, wodurch APP in der Zelle akkumuliert (Stamer et al., 2002). Ein Zusammenhang zwischen APP und Tau-Protein konnte auch in der von Mudher und Lovestone (2002) durchgeführten Studie gezeigt werden. Es wurde belegt, dass die Anwesenheit des A $\beta$  die abnormale Phosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins zur Produktion der Alzheimer-Demenz fibrillen anregt.

Wie es zur Entstehung des A $\beta$ - und Tau-Proteins kommt, ist noch nicht völlig aufgeklärt. Ergebnisse mehrerer Studien weisen auf Veränderungen auf den Chromosomen 1, 14 und 21 hin (Goate et al., 1991; Levy-Lahad et al., 1995;

Sherrington et al., 1995; Nanzeen und Dewji-Singer, 1996). 5 bis 10 % der Alzheimer-Patienten zeigen eine familiäre Häufung, die durch Mutationen in drei Genen verursacht werden können. Duplikationen im Gen des APP (Goate et al., 1991) und in Presenilin 1- sowie Presenilin 2-Genen (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995; Barton et al., 1996). Mutationen in den eben genannten Genen werden mit verstärkter A $\beta$ -Bildung assoziiert (De Strooper, 1998). Genetische Veränderungen wurden auch bei der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit beobachtet (Retz et al., 2001). Das Apolipoprotein E ist ein Ligand des LDL-Rezeptors und spielt somit eine wesentliche Rolle im Lipid-Metabolismus. Das Apolipoprotein E-Gen kommt bei Menschen am häufigsten in den drei Allelen  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4 vor. Nach Analyse von Gehirnproben mehrerer Patienten zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Vorkommen des  $\epsilon$ 4-Allels und der erhöhten Zahl sowie Dichte der senilen Plaques, die typisch für Alzheimer-Krankheit und Demenz sind (Rebeck et al., 1993; Schmechel et al., 1993; Stone et al., 2010). Das  $\epsilon$ 2-Allel trägt dagegen zur protektiven Wirkung bei (Corder et al., 1994). Ramassamy et al. (1999) zeigten einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit des  $\epsilon$ 4-Allels und der Membranlipidperoxidation bei Alzheimer-Patienten. Die gesteigerte Lipoproteinoxidation im Liquor und im Plasma sowie ein veränderter Antioxidantien-Status im Plasma wurde im Verlauf der Krankheit auch beobachtet (Schippling et al., 2000; Bourdel- Marchasson et al., 2001; Rinaldi et al., 2004).

Es gibt in der Literatur viele Hinweise darauf, dass die Verminderung des mitochondrialen antioxidativen Schutzes vor den Folgen des oxidativen Stresses an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit beteiligt ist. Untersuchungen an transgenen Mäusen Tg2576, die humane A $\beta$ -Peptide bilden, ergaben, dass die verminderte Aktivität der Superoxiddismutase, eines mitochondrialen antioxidativen Enzyms, die A $\beta$ -Ablagerungen, die Dysfunktion der Mitochondrien und die oxidativen Schäden begünstigen (Esposito et al., 2006; Murakami et al., 2011). Bei Mäusen mit einer erhöhten Expression der Superoxiddismutase wurde hingegen eine Reduktion des oxidativen Stresses und A $\beta$ -Ablagerungen festgestellt (Dumont et al., 2009; Massad et al., 2009).

### **1.1.2 Morbus Parkinson**

Die Parkinson-Krankheit, die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach

Morbus Alzheimer, zeichnet sich vor allem durch Neuropathie von dopaminergen Nervenzellen in der Substantia nigra aus, die lediglich 1-2 % der Nervenzellpopulation bilden, und durch reduzierte Aktivierung von Basalganglien in der Großhirnrinde (Jenner, 2001). Aufgrund der Störungen des Gehirnstoffwechsels mangels Botenstoff Dopamin ist ein Parkinson-Erkrankter unfähig, zielgerichtete Bewegungen auszuführen (Litvan, 1998). Zu anderen wichtigen Symptomen gehören Ruhetremor, Muskelsteifheit und Haltungsinstabilität, die wahrscheinlich aufgrund eines Überschusses an aktivierendem Glutamat entstehen. Nur ungefähr 10 % der Parkinson-Fälle kann durch genetische Faktoren erklärt werden. Eine Mutation im  $\alpha$ -Synuklein-Gen, was die Aggregation der Proteine  $\alpha$ -Synuklein und Ubiquitin zu Lewy-Körpern begünstigt, wird als Ursache für diese Parkinson-Form angesehen (Polymeropoulos et al., 1997; Spillantini et al., 1997). Die Mehrzahl der Erkrankten leidet an der idiopathischen Form der Parkinson-Krankheit, der solche Risikofaktoren wie Toxine oder das Alter zugrunde liegen (Jenner, 2001; Li et al., 2003; Hindle, 2010). Nachdem in den 80-er Jahren nachgewiesen wurde, dass ein aktiver Metabolit von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) – 1-Methyl-4-phenylpyridinium ( $MPP^+$ ) durch eine Hemmung des mitochondrialen Komplexes I typische Symptome für Parkinson-Krankheit bei Drogenabhängigen auslöste (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983), wurde ein Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Dysfunktion und Morbus Parkinson festgestellt. Im Jahre 1989 zeigten Parker et al., dass für die Abnahme der Aktivität des Komplexes I Mutationen in der mitochondrialen DNA (Desoxyribonukleinsäure) zuständig sind. Infolge einer Inhibierung des Komplexes I bei Parkinson-Betroffenen kommt es zu Störungen des oxidativen Metabolismus und Abnahme der Konzentration von reduziertem Glutathion (GSH) (Schapira et al., 1990; Fahn und Cohen, 1992). Eine Reduktion der Komplex I-Aktivität führt dagegen zur unzureichenden Energieversorgung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und zur Erhöhung der Anfälligkeit der dopaminergen Zellen gegenüber endogenen oder exogenen toxisch wirkenden Substanzen (Nakamura et al., 1997; Beal, 1998). Für die Hypothese zum oxidativen Stress (Fahn und Cohen, 1992) sprechen auch die Befunde von Jenner und Olanow (1998), die feststellten, dass es während des Dopamin-Abbaus zur ROS-Bildung, Lipidperoxidation und Freisetzung neurotoxischer Substanzen kommt. Ferner führt eine erhöhte Stickstoffmonoxid-Bildung zur vermehrten  $O_2^-$  Produktion, zur Störung

der mitochondrialen Komplex I-Aktivität und im Endeffekt zur Auflösung der proapoptotischen Signale (Carreras et al., 2004). Charakteristisch für die Parkinson-Krankheit ist eine deutliche Abnahme des GSH-Gehaltes in der Substantia nigra, was die Folgen des oxidativen Stresses verstärkt. Bei anderen neurodegenerativen Krankheiten war dieses Phänomen nicht zu beobachten (Sian et al., 1994).

## **1.2 Dysfunktion der Mitochondrien und oxidativer Stress**

Mitochondrien sind die für die Energiegewinnung einer Zelle verantwortlichen Zellenorganellen. Das Organ, das die meiste Energie benötigt, ist das menschliche Gehirn mit ca. 20 % des gesamten Energiebedarfs. Weitere Schlüsselfunktionen der Mitochondrien bestehen in der Kontrolle über den programmierten Zelltod (die Apoptose), die Regulation der Signalwege und das Calciumgleichgewicht. Die Anzahl der Mitochondrien innerhalb einer Zelle ist von den Energieerfordernissen abhängig. Da Nervenzellen viel Energie verbrauchen, stehen ihnen ca. 10000/Zelle Mitochondrien zur Verfügung im Vergleich zu menschlichen Spermien, die im Besitz von ca. 16/Zelle Mitochondrien sind (Szewczyk und Wojtczak, 2002). Der vollständige Verlust der Mitochondrien ist gleichbedeutend mit dem Zelltod.

Die Dysfunktion der Mitochondrien verursacht die Verminderung in der Energiebereitstellung in Form von ATP sowie oxidativen Stress und Apoptose einer Zelle, die an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt sind. In der Literatur gibt es viele verschiedene Daten bezüglich mitochondrialer Dysfunktion und dem Auftreten der unterschiedlichen neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit, Huntington-Krankheit und vieler anderer (Schapira et al., 1990; Lin und Beal, 2006; Sayre et al., 2008).

### **1.2.1 Rolle der Mitochondrien in der Zelle**

Eine der wichtigsten Aufgaben der Mitochondrien besteht in der Versorgung der Zelle mit Energie in Form von ATP hauptsächlich über den Citratcyklus und die Atmungskette. Im Citratcyklus werden durch den oxidativen Abbau von Acetyl-Coenzym A energiereiche Verbindungen bereitgestellt. Über die Atmungskette kommt es zur Reduktion des Sauerstoffs zur Energiegewinnung in Form von ATP unter Bildung von Wasser. An der Atmungskette sind fünf Enzymkomplexe beteiligt: Komplex I (NADH+H<sup>+</sup>-Ubichinon-Reduktase), Komplex II (Succinat-Ubichinon-

Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinon-Cytochrom-c-Reduktase), Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) und Komplex V (ATP-Synthase). Bei der Atmungskette wird der Wasserstoff aus Substraten z.B. Glukose schrittweise auf Sauerstoff übertragen. So gewonnene Energie wird dazu verwendet, einen Protonengradienten aufzubauen, der die Bildung von ATP aus Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat stimuliert.

Ungefähr 1 bis 4 % des Sauerstoffs entgehen der Reduktion in der mitochondrialen Atmungskette zu Wasser (Chance et al., 1979). Während mehrerer in Mitochondrien ablaufender aerober enzymatischer Prozesse entstehen in Nebenreaktionen Superoxid-Radikale (Shigenaga et al., 1994). Besonders die NADPH-Oxidase und der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, ein Enzym des Citratzykluses, gelten unter physiologischen Bedingungen als eine wichtige Quelle für die ROS-Bildung (Lambeth, 2004; Starkov et al., 2004). Auch die mit spezifischen Inhibitoren vermittelte Abnahme der Aktivität des mitochondrialen Komplexes I und Komplexes III trägt wesentlich zum Anstieg der ROS-Produktion bei (Cadenas et al., 1977; Turrens und Boveris, 1980). Aus diesem Grund kann die mitochondriale Atmungskette als Hauptquelle für ROS angesehen werden.

Innerhalb der Mitochondrien sind auch endogene antioxidative Schutzmechanismen vorhanden, welche die permanent gebildeten ROS unschädlich machen. Um zellulären Schäden, die durch Oxidation entstehen können, zu verhindern, steht der Zelle ein ganzes Arsenal von antioxidativ wirkenden Enzymen, wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase, Peroxidase, Metallothionein, Proteine des Haemoxygenase-1/Ferritin-Systems und Substanzen mit geringem Molekulargewicht, so genannte Radikalfänger, wie GSH, Bilirubin, Carnosin, Harnsäure, Liponsäure, Coenzym Q, Natriumpyruvat, Vitamin C und E sowie NADPH zur Verfügung.

### **1.2.2 Mitochondriale DNA**

Zwar sind die meisten mitochondrialen Proteine im nuklearen Genom kodiert, aber Mitochondrien beherbergen auch eigene mitochondriale DNA, kurz mtDNA zur Herstellung von Ribonukleinsäure (RNA) und Proteinen. Die mtDNA des Menschen ist ringförmig und besteht aus 16 569 Basenpaaren, die 13 Polypeptide der Atmungskette sowie die mitochondriale Proteinsynthese unterstützende ribosomale RNA und Transfer-RNA kodieren (Lin und Beal, 2006). Die in der mtDNA

gespeicherte genetische Information samt Mutationen kann nur mütterlicherseits vererbt werden. Es wird geschätzt, dass ca. 1 % der gesamten genetischen Information in der mtDNA gespeichert wird. Die Mutationen in der mtDNA werden als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung der neurodegenerativen Krankheiten angesehen (Parker et al., 1989; Kato, 2001).

Wie bereits erwähnt, sind Mitochondrien die Hauptquelle für ROS, die entlang der Atmungskette bei der ATP-Synthese entstehen. Jedoch verfügt die mtDNA über kein effizientes Reparatursystem und ist aus diesem Grund sehr anfällig für den schädlichen Einfluss der freien Radikale. Aufgrund der Abwesenheit von Reparaturmechanismen ist die Mutationsrate 10-20-fach höher als in der DNA im Zellkern, was zu Polymorphismus aber auch zu verschiedenen Erkrankungen führen kann. Eine der Hypothesen besagt, dass sich Mutationen in der mtDNA durch das Altern summieren können und zur Abnahme der physiologischen Funktionen der Atmungskette und ATP-Produktion in Mitochondrien führen sowie zum Entstehen der altersbedingten neurodegenerativen Krankheiten beitragen. Diese Hypothese wird mit Daten aus der Literatur unterstützt. Pallardo et al. (1998) wiesen nach, dass eine Verabreichung von Antioxidantien teilweise vor oxidativen Schäden in der mtDNA alter Mäuse schützte. In einer anderen experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des Energiestoffwechsels bei transgenen Mäusen, die das humane APP-Gen überexprimieren, die Aktivität und die Konzentrationen von  $\beta$ -Sekretase und A $\beta$  erhöhte (Velliquette et al., 2005).

### **1.2.3 Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress wird durch ein Missverhältnis zwischen der ROS-Bildung und endogener Verstoffwechselung der reaktiven Intermediate in Mitochondrien erzeugt. Sein Auftreten wird als eine der Ursachen und auslösender Faktor des Zelltodes bei mehreren Krankheiten angesehen. Es ist gut belegt, dass die ROS-Konzentration mit steigendem Zellalter zunimmt (Sohal et al., 2002). Die ROS-Akkumulation bei gleichzeitiger reduzierter antioxidativer Kapazität kann zur Reaktion der freien Radikale des Sauerstoffs mit anderen zellulären Molekülen führen und deren Funktion stark beeinträchtigen. Infolgedessen kommt es zur Störung der mitochondrialen Funktionen (Stadtman et al., 1997), was schließlich im Zelltod durch Apoptose oder Nekrose endet.

ROS sind äußerst reaktive und zytotoxische Sauerstoffverbindungen wie

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder kurzlebige Radikale des Sauerstoffs mit ungepaarten Elektronen wie Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) und Hydroxyl-Radikal ( $OH^\cdot$ ) und werden kontinuierlich als unerwünschte Nebenprodukte bei Oxidationsprozessen in der mitochondrialen Atmungskette gebildet. Intrazelluläre ROS-Bildung ist auch auf mehrere sowohl endogen in Übermaß gebildete als auch exogene Substanzen zurückzuführen wie z.B. Salsolinol, 6-OHDA (6-Hydroxydopamin), 3-HK (3-Hydroxykynurenin), A $\beta$ , MPTP oder Rotenon (Behl et al., 1994, Galindo et al., 2003, Li et al., 2003, Wu et al., 2003, Wanpen et al., 2004). Bei ROS besteht die Gefahr einer Oxidation der zellulären Moleküle. Insbesondere können Lipide, Proteine und Nukleinsäuren von Oxidationsprozessen betroffen sein.

Bei der Proteinoxidation kommt es zu Veränderungen in der Struktur von Proteinen, so dass diese Stoffe nicht länger in der Lage sind, ihre Funktion zu erfüllen (Stadtman, 1992; Forsmark-Andree et al., 1997). Als besonders empfindlich gegenüber ROS gelten Thiolgruppen von Cystein-, Histidin- und Tryptophanresten. Oxidierte Proteine werden grundsätzlich durch Proteasomen erkannt und im weiteren Verlauf durch intrazelluläre Proteasen abgebaut. Wenn die Bildung der oxidativ veränderten Proteine die Aktivität der Proteasomen in der Zelle übersteigt, können solche Proteine akkumulieren und nach Ablagerung viele Signalwege beeinflussen.

Der Angriff von Radikalen des Sauerstoffs auf Bestandteile der Zellmembranen führt zu Veränderungen an zellulären Phospholipiden durch Lipidperoxidation. Im Verlauf einer autokatalytischen Kettenreaktion von ROS mit polyungesättigten Fettsäuren entstehen zunächst instabile Lipidhydroperoxide, die sich in der Zellmembran sammeln. Sie besitzen die Fähigkeit, die Eigenschaften der Zellmembranlipide zu verändern und so werden die betroffenen Membranen für hydrophile Moleküle, wie Wasser, durchlässig. Sobald sich die Lipidhydroperoxide auf beiden Seiten der Doppelmembran befinden, kommt es zur Bildung einer Pore, durch die vermehrt Calcium-Ionen in die Zelle eindringen, was tiefgreifende Konsequenzen für die zelluläre Funktion bereitet (Niki et al., 2005). Ergänzend wurde gefunden, dass bei älteren Patienten mit Alzheimer-Erkrankung im Liquor Lipidperoxidationsprodukte wie 4-Hydroxynonenal und Malondialdehyd identifiziert wurden (Pratico, 2002). Das 4-Hydroxynonenal weist toxische Eigenschaften auf und zeichnet sich durch Hemmung der Glykolyse, Synthese der Nukleinsäuren und Proteine sowie Induktion der Apoptose aus (Pratico, 2002). Infolge der Lipidperoxidation kommt es zu Zellmembranschäden, einer Störung des

Ionengleichgewichts, der Zellfunktion und der Integrität von Organellen, wie Mikrosomen, Mitochondrien und Lysosomen.

Eine Reaktion von ROS mit DNA kann zur Bildung DNA-DNA- und DNA-Protein-Addukten führen (Croteau und Bohr, 1997). Im Zellkern gibt es wirkungsvolle Reparaturmechanismen, welche die Schäden in der oxydierten DNA beheben. Somit wird die Expression von Enzymen, der Ablauf vieler Signalwege sowie die Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren verändert.

Neuronen sind insbesondere anfällig für eine erhöhte ROS-Konzentration oder den verringerten ATP-Gehalt, weil sie reich an Mitochondrien sind und viel ATP verbrauchen (Scott und Gray, 2000). Darüber hinaus ist in neuronalen Membranen große Menge an polyungesättigten Fettsäuren enthalten, die besonders empfindlich gegenüber Lipidperoxidation sind (Floyd, 1999; Smith et al., 1999). Es wurde nachgewiesen, dass eine Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in fetalen Neuronen von Meerschweinchen in einer vermehrten Bildung von A $\beta$  resultierte (Ohyagi et al., 2000).

### **1.3 Apoptose**

Damit die intrazelluläre Homöostase im menschlichen Organismus erhalten bleibt, muss das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Elimination von Zellen garantiert werden. Wenn einer dieser Prozesse außer Kontrolle gerät, kann das ein Zeichen für einen pathologischen Zustand sein.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Formen des Zelltodes, die Apoptose und die Nekrose. Unter dem Begriff Apoptose versteht man den so genannten programmierten Selbstmord einer Zelle. Bei dem Prozess handelt es sich um eine selektive Eliminierung einzelner geschädigter, nicht funktionstüchtiger oder potentiell gefährlicher Zellen aus dem Organismus. Die Apoptose wurde zuerst von Kerr et al. im Jahre 1972 als ein aktives und physiologisch reguliertes Verfahren beschrieben, das durch mehrere morphologische und biochemische Ereignisse im Zellkern, im Zytoplasma und in unterschiedlichen Organellen in der Zelle gekennzeichnet ist (Wyllie et al., 1992; Green und Reed, 1998). Die Apoptose kann z.B. durch Ultraviolettstrahlung (UV) oder Einsatz von Chemotherapeutika ausgelöst werden. Charakteristisch für einen apoptotischen Zelltod ist eine Verringerung des Zellvolumens ohne Erzeugung einer Entzündungsreaktion (Arends et al., 1990; Kerr

et al., 1994). Dieses Suizid-Programm kann ohne Inflammation stattfinden, weil hierbei die Zellmembranintegrität erhalten bleibt. Somit ist der programmierte Zelltod schonend für die Zellen in der unmittelbaren Umgebung. Weiterhin ist die Apoptose durch Kondensation des Chromatins im Zellkern gekennzeichnet. Danach wird die nukleare DNA in gleichmäßige Fragmente durch spezifische Endonukleasen zerteilt. Abschließend sind in der Zelle aus zerkleinerten Zellbestandteilen und Teilen des Zellkerns bestehende apoptotische Körperchen zu beobachten, die von Makrophagen oder dendritischen Zellen erkannt und phagozytiert werden (Kerr et al., 1994). Bis zum Schluss bleibt die Zellmembran mit Zellkomponenten intakt, so dass inflammatorische Signalwege nicht ausgelöst werden.

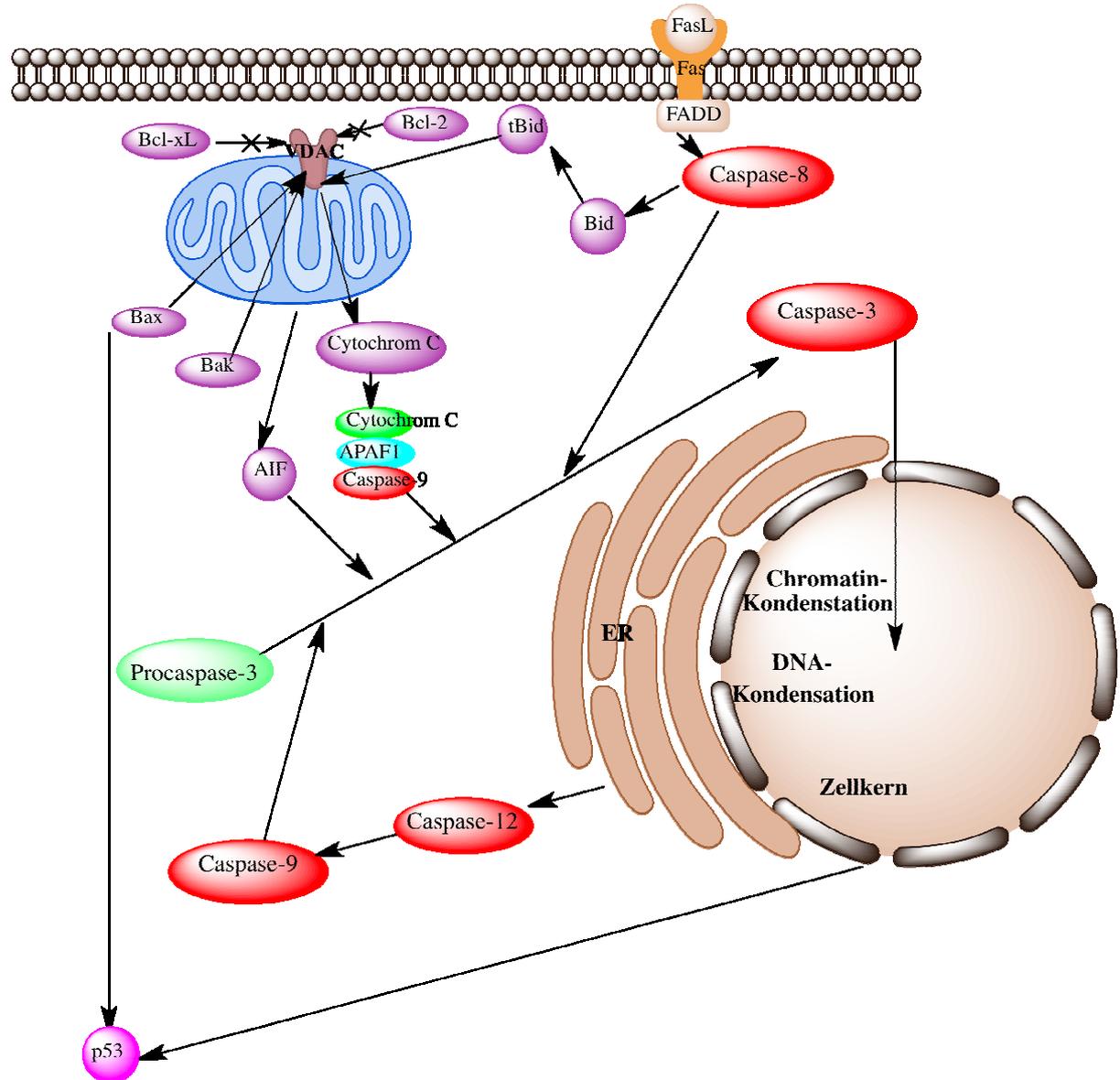
Die Nekrose, auch passiver Zelltod genannt, wird dagegen als ein pathologischer Prozess angesehen, weil er durch physikalische oder chemische Faktoren wie mechanische Verletzungen, Strahlung oder Vergiftungen hervorgerufen wird. Im Unterschied zur Apoptose ist die Nekrose ein unkontrollierter Prozess. Außerdem zeigt Nekrose einen anderen morphologischen Verlauf als Apoptose und wird durch frühe Schwellung der Zellen aufgrund eines Einflusses von Natrium- und Calcium-Ionen und Zerstörung der Zellmembran charakterisiert (Darzynkiewicz et al., 1997). Infolge des Austretens der Zellorganellen in die Umgebung kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion des umliegenden Gewebes (Golstein et al., 1991).

Normalerweise ist der Zelltod eine Mischform von Apoptose und Nekrose. Eine geschädigte Zelle begeht nicht ausschließlich Apoptose. Ergebnisse einer Studie von Nicotera et al. (1998) zeigten, dass eine Form des Zelltodes von der verfügbaren Energiezufuhr abhängig ist. Bei unzureichender Energieversorgung kommt es vorwiegend zu Nekrose. Apoptose wird dagegen bei ausreichendem Energiegehalt auslöst.

Eine erhöhte Zellteilungsrate mit verringerter Apoptose und Resistenz gegen Apoptose-Induktion hat tiefgreifende pathophysiologische Folgen und kann an der Entstehung von Tumoren, Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen beteiligt sein. Bei neurodegenerativen Erkrankungen tritt dagegen eine deutlich erhöhte Apoptoserate auf, die zum massiven Untergang neuronaler Zellen in bestimmten Hirnregionen führt.

Der Ablauf des programmierten Zelltodes und damit verbundene Veränderungen in der Zelle werden hauptsächlich durch Enzyme aus einer Gruppe von Cystein-Proteasen, den Caspasen reguliert. Caspasen aktivieren kaskadenartig das Suizid-

Programm, in dem sie bestimmte Proteine gezielt spalten. Man kann Caspasen funktionell in zwei Gruppen einteilen, die Initiator- und die Effektor-Caspasen. Im Verlauf des programmierten Selbstmordes kommen die Effektor-Caspasen zum Einsatz, nachdem sie durch Initiator- und andere Effektor-Caspasen aktiviert wurden.



**Abb.1:** Apoptose- Auslösung

Intrazellulär kann die Apoptose auf zwei unterschiedliche Signalwege ausgelöst werden. Der extrinsische Signalweg ist mit der Zellmembran verbunden und der intrinsische Signalweg mit den Mitochondrien. Unabhängig von der Apoptoseart werden die Signalwege durch Anwesenheit von Caspasen charakterisiert.

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird hauptsächlich durch spezifische Membranrezeptoren und ihre Liganden vermittelt. Ein apoptotischer

Zelltod auf extrinsischem Weg erfolgt durch Todesrezeptoren, die außerhalb der Zelle auf der Zellmembranoberfläche lokalisiert sind. Zu Todesrezeptoren werden Mitglieder der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Familie (TNF- $\alpha$ -Familie) gezählt, wie TNF-Rezeptor 1, TNF-Rezeptor 2 oder Fas/CD95/Apo-1 (*fibroblast associated*), die aus extrazellulären, transmembranen und zyttoplasmatischen Domänen aufgebaut sind (LeBlanc et al., 2003; Peter, 2003; Locksley et al., 2001). Nachdem ein Todesligand wie TNF- $\alpha$  oder FasL (*Fas ligand*) an einen Todesrezeptor bindet, kommt es zur Übertragung eines Signals auf ein Adapterprotein FADD (*Fas-associated protein with death domain*), das am C-terminalen Ende Death-Domäne besitzt und mit der Death-Domäne des Rezeptors bindet. Am N-terminalen Ende des FADD-Proteins befindet sich eine DED (*death effector domain*), die eine Assoziierung mit der DED von Procaspasen-8 oder -10 ermöglicht (Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995). Der aus Todesrezeptor, FADD und Procaspase-8 bestehende Komplex DISC (*death inducing signaling complex*) aktiviert Caspase-8 und setzt eine Kaskade der Effektor-Caspasen wie Caspase-3 in Gang, die zum Zelltod führt. Der extrinsische Signalweg kann sich mit dem intrinsischem Signalweg durch Bid-Protein (*Bcl-2 interacting domain death agonist-Protein*) verbinden, das durch Caspase-8 zu tBid (*truncated Bid*) gespalten wird. Das Spaltprodukt wird im weiteren Verlauf zum Mitochondrium transloziert, wo tBid die Freisetzung von Cytochrom c begünstigt und somit den intrinsischen Weg der Apoptose aktiviert (Li et al., 1998).

Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird über unterschiedliche Signalwege, wie Anstieg der ROS-Konzentration, Einfluss der Calcium-Ionen im Zytosol, zytotoxische Substanzen oder DNA-Schädigungen aktiviert (Daniel, 2000; Ockner, 2001). Im Unterschied zum extrinsischen Signalweg wird der intrinsische Signalweg über die Mitochondrien vermittelt. Daran ist die Familie der Bcl-2 Proteine (*B-cell lymphoma 2-Proteine*) beteiligt. Zu den Mitgliedern der Bcl-2-Familie gehört u.a. neben Bax (*Bcl-2 associated X protein*) auch Bid, das sich im Zytoplasma befindet und mit Hilfe der Caspase-8 zum proapoptotischen tBid gespalten werden kann. Die Expression von Bax und Bid mit VDAC, einem spannungsabhängigen Anionenkanal, begünstigt die Bildung einer Pore in der äußeren Membran des Mitochondriums und die Freisetzung des Cytochroms c in das Zytosol. Eine Öffnung der Pore verursacht einen Verlust des Elektrolytgleichgewichts an der mitochondrialen Membran und damit eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials sowie eine Reduzierung des ATP-Gehaltes. Über diese Pore kann Cytochrom c aus dem

Mitochondrium ins Zytosol gelangen. Wenn sich Cytochrom c im Zytoplasma befindet, ist es in der Lage, an APAF-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und Procaspase-9 zu binden (Kroemer, 2003). Der entstandene Komplex, Apoptosom, führt zur Aktivierung der Caspase-3, die anschließend charakteristische Apoptoseprozesse wie Kondensation des Chromatins und Abbau der DNA im Zellkern initiiert (Enari et al., 1998). Alternativ können aktivierte Mitochondrien einen Faktor namens AIF (*apoptosis-inducing factor*) freisetzen, der in den Zellkern transportiert wird und Apoptoseprozesse wie Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung initiiert (Susin et al., 1996).

Das intrinsische Suizid-Programm wird durch ca. 40 Proteine reguliert. Darunter haben einige einen Einfluss erst im weiteren Verlauf des Zelltodes. Am besten untersucht sind die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Bcl-2, Bcl-xL (*B-cell lymphoma xl (long isoform)*), Bcl-w (*Bcl-2-like-2 protein*), Mcl-1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*) gelten als antiapoptotische Proteine, wobei Bid, Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*), Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer protein*), Bax, Noxa (*BH3 only protein*) die Apoptose initiieren (Borner, 2003; Lucken-Ardjomande et al., 2005). Protein p35 hemmt die Aktivität der Caspase-1 und -3, wohingegen Produkte des p53-Gens die Freisetzung von Cytochrom c vermitteln (Yonish et al., 1991). Ebenfalls entscheidend für die Freisetzung von Cytochrom c ist das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax.

Im Jahre 2000 wurde ein neuer Ablauf des programmierten Zelltodes über das endoplasmatische Retikulum (ER) dargestellt. Der sogenannte „endoplasmatische Retikulum stressinduzierter Weg“ wird durch Störung der Calcium-Ionen-Homöostase, Ischämie und Ablagerungen falsch gefalteter Proteine, die nicht korrekt entsorgt werden, ausgelöst. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung der im ER anwesenden Caspase-12. Caspase-12 spaltet im nächsten Schritt die Procaspase-9 zu Caspase-9, welche die Effektor-Caspase-3 initiiert und zum Zelltod führt. Auf diesem Weg verläuft die Apoptose, die durch A $\beta$  verursacht wird (Nakagawa et al., 2000). ER ist verantwortlich für die Faltung unterschiedlicher Proteine.

## **1.4 Endogene Neurotoxine**

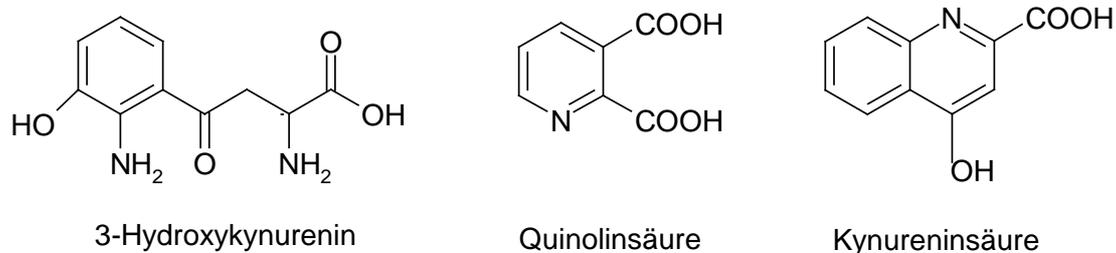
Im menschlichen Körper können unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen große Mengen Metaboliten entstehen, die Schädigungen des Hirngewebes und den Nervenzellenuntergang hervorrufen können. Eine Gruppe

Substanzen, die neurotoxische Eigenschaften besitzen und in humanen Zellen hergestellt werden, bezeichnet man endogene Neurotoxine.

In den meisten Fällen kann die Zelle die schädigenden Faktoren ohne weitere Folgen beseitigen. Wenn jedoch die Schädigungen des Nervensystems zu stark ausgeprägt sind, zeigen sie sich als neurodegenerative Krankheiten. In diesem Kapitel werden Stoffwechselprodukte des Kynureninwegs und das Dopamin-Derivat Salsolinol ausführlicher charakterisiert.

#### 1.4.1 Metaboliten des Kynureninwegs

Die physiologische Funktion des Kynureninwegs besteht im Abbau der Aminosäure L-Tryptophan zu  $\text{NAD}^+$  (oxidierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid), das u.a. zur Energiegewinnung benötigt wird. Im Verlauf des Wegs entstehen bei Menschen in Makrophagen, Mikrogliazellen (Guillemin, 2003; Guillemin, 2003a) und teilweise in Astrozyten (Guillemin, 2001a) Kynurenine, die unterschiedliche sowohl physiologische als auch pathologische Effekte in humanen Nervenzellen hervorrufen. Die Funktion des Kynureninwegs spielt eine wichtige Rolle bei solchen Körperfunktionen wie Schlaf, Thermoregulation oder Verhalten (Stone, 1993; Curzon, 1996).



**Abb.2:** Strukturformeln der Kynurenine

Zahlreiche Forschungsergebnisse zeigen, dass Schwankungen entlang des Kynureninwegs das zentrale Nervensystem (ZNS) und das Immunsystem negativ beeinflussen können (Heyes et al., 1992; Pemberton et al., 1997; Ryu et al., 2004; Guillemin et al., 2005; Guillemin et al., 2005a). Es wurde nachgewiesen, dass sogar kleine Veränderungen im Kynureninweg von Bedeutung bei der Entwicklung einer Vielzahl neurodegenerativer Krankheiten sind. Ein Anstieg von Tryptophanabbauprodukten wurde bei Parkinson- (Ogawa et al., 1992), Alzheimer-

(Baran et al., 1999; Widner et al., 2000), Huntington-Krankheit (Pearson und Reynolds, 1992), AIDS-Demenz (*acquired immune deficiency syndrome*-Demenz) (Achim et al., 1993; Heyes et al., 2001) und anderen degenerativen Erkrankungen des ZNS beobachtet. Es wird vermutet, dass dieser Weg ein neues Ziel in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen sein könnte.

Im ZNS wird L-Tryptophan im ersten Schritt mit Hilfe der Indolamin-2,3-Dioxygenase zu L-Kynurenin verstoffwechselt. Unter physiologischen Bedingungen wird L-Kynurenin zu neuroprotektiver Kynureninsäure (KYNA) gespalten. Wenn die Aktivität von Indolamin-2,3-Dioxygenase durch verschiedene Faktoren induziert wird, wird der Abbau von L-Tryptophan verstärkt. Infolgedessen wird L-Kynurenin durch Kynureninaminotransferase in größeren Mengen zu neurotoxischen 3-HK, 3-Hydroxyanthranilsäure und weiter zu Quinolinsäure (QUIN) umgewandelt (Guidetti, 1997). Einige Faktoren konnten identifiziert werden, welche die Aktivität von Indolamin-2,3-Dioxygenase beeinflussen. Die Aktivität von Indolamin-2,3-Dioxygenase kann durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. Interferon- $\gamma$  (Pemberton et al., 1997; Guillemin et al., 2001; Yamada et al., 2009), TNF- $\alpha$  (Pemberton et al., 1997; Robinson et al., 2003), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Zunszain et al., 2012), aber auch durch A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Guillemin et al., 2003) erhöht werden. Einen inhibitorischen Einfluss auf die IDO-Aktivität weisen antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 (Musso et al., 1994; MacKenzie et al., 1999), IL-10 (MacKenzie et al., 1999) und Stickstoffmonoxid (ausgenommen Mikrogliazellen) (Thomas et al., 1994; Alberati-Giani und Cesura, 1998) auf. Durch gesteigerte Aktivität von Indolamin-2,3-Dioxygenase kommt es zum Anstieg an Konzentrationen von neurotoxischen Zwischenmetaboliten, QUIN, 3-HK, KYNA und 3-Hydroxyanthranilsäure.

Die toxischen Effekte der Kynurenine wurden bisher nicht ausreichend untersucht. QUIN scheint jedoch das wichtigste Abbauprodukt des Stoffwechselforgangs zu sein. Die Neurotoxizität von QUIN wurde in mehreren Untersuchungen bestätigt. In einer der ersten Studie zeigte sich QUIN vor allem als NMDA-Agonist an der Glutamat-Bindungsstelle des Rezeptors und somit als ein Exzitotoxin (Stone und Perkins, 1981). Exzitotoxine lösen eine chronische Exzitotoxizität aus, bei dem Glutamat-Rezeptor-tragende Neuronen durch lang anhaltende Übererregung geschädigt werden (Schwarcz et al., 1984). In einer von Kerr et al. (1995) durchgeführten Studie zeigte sich QUIN in unphysiologisch hohen Konzentrationen als toxisch in kultivierten humanen fetalen Gehirnzellen. Die

toxische Wirkung von QUIN ist auf eine Schwächung der antioxidativen Abwehr über die Abnahme des GSH-Gehaltes und steigerte Lipidperoxidation zurückzuführen (Behan et al., 1999; Leipnitz et al., 2005). Guillemin et al. (2005) beschrieben vier Mechanismen, wodurch QUIN zum akuten Zelltod oder zur chronischen und progressiven Dysfunktion der neuronalen Zelle führen kann:

- 1) durch die Aktivierung des NMDA-Rezeptor-vermittelten Einflusses von Calcium-Ionen (Kerr et al., 1995);
- 2) durch die Verstärkung der Glutamat-Freisetzung in Neuronen und die Inhibierung der Aufnahme von Glutamat in Astrozyten (Tavares et al., 2000);
- 3) durch die Erhöhung der Lipidperoxidationsrate (Rios und Santamaria, 1991);
- 4) durch die Verstärkung der Exzitotoxizität oder der von anderen Exzitotoxinen induzierte Energiemangel.

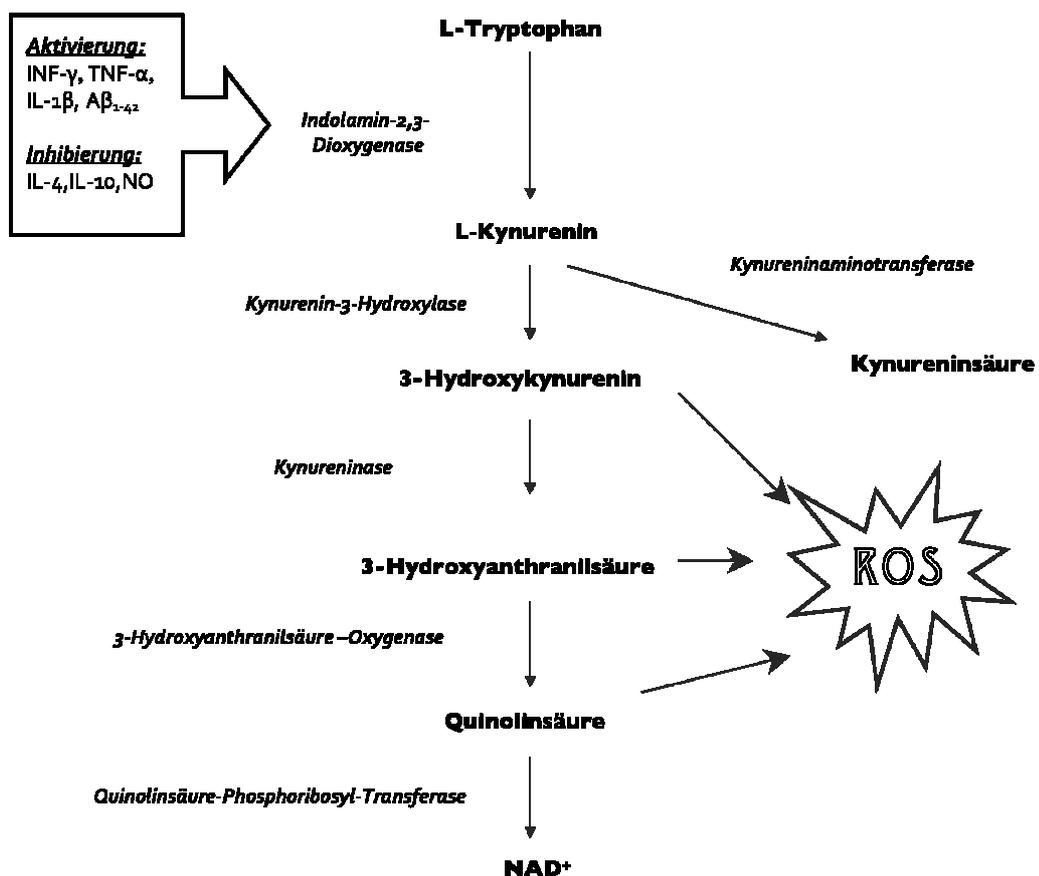


Abb.3: Kynurenin-Metabolismus

Pathologische Effekte, die bei dem erhöhten QUIN-Spiegel manifestiert werden, wie die Exzitotoxizität, oxidativer Stress und die Lipidperoxidation lassen die

Schlussfolgerung zu, dass der Kynureninmetabolit QUIN an der Alzheimer-Pathologie beteiligt sein kann (Ramassamy et al., 1999; Butterfield et al., 2002). Zudem wurde es nachgewiesen, dass der QUIN-Gehalt im ZNS mit dem Alter ansteigt (Moroni et al., 1984). Von Bedeutung ist auch das Ergebnis von Harkany et al. (2000), die feststellten, dass A $\beta$  die Folgen der Exzitotoxizität verstärkt. Gleichzeitige Anwesenheit von QUIN und A $\beta$  lösen eine neurotoxische Glutamat-Freisetzung aus. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren die Produktion von A $\beta$ <sub>1-42</sub> fördert (Lesne et al., 2005).

Ein weiteres Kynurenin KYNA, deren Konzentration im Gehirn physiologisch im nanomolaren Bereich liegt (Moroni et al., 1988), wird hauptsächlich in Astrozyten durch die Kynurenintransaminase aus L-Kynurenin produziert (Guillemin et al., 2001a). KYNA ist im Gegenteil zu QUIN ein Antagonist an der Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors für Glycin (Guidetti et al., 1997). Zudem erwies sich KYNA ab millimolaren Konzentrationen als ein Antagonist an der Glutamat-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors (Stone et al., 2002) und als ein AMPA-Rezeptor-Antagonist ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure) (Prescott et al., 2006). Außerdem wurde in einer Untersuchung von Rassoulpour et al. (2005) beobachtet, dass KYNA in nanomolaren Konzentrationen den extrazellulären Dopamin-Gehalt im Striatum von wachen Ratten über Verringerung der Glutamat-Freisetzung reduzieren kann. In einer Untersuchung von Lugo-Huitron et al. (2011) erwies sich KYNA als Antioxidans bei durch 3-Nitropropionsäure ausgelöster Lipidperoxidation in Kleinhirn- und Vorderhirn-Homogenaten. Aufgrund der aufgeführten Eigenschaften gilt KYNA daher als teilweise schützend vor QUIN- und Glutamat-induzierter Exzitotoxizität und Konvulsionen (Perkins und Stone, 1982; Forster et al., 1984). Die ausgeübten Effekte sind aber abhängig von der verfügbaren Menge. Es wurde nachgewiesen, dass KYNA eine Doppelfunktion hat und bei niedrigen Konzentrationen als Antagonist mit hoher Affinität zu der Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors für Strychnin sowie zum AMPA-Rezeptor (Prescott et al., 2006) und Kainat-Rezeptor (Kessler et al., 1989) bindet und somit als Neurotoxin betrachtet werden kann. Beim Vergleich der QUIN und KYNA-Konzentrationen fällt auf, dass der Gehalt an QUIN im Liquor und Gehirn bis zu 15 Mal höher als KYNA ist (Heyes et al., 1992; Heyes et al. 1993). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen Morbus Alzheimer und einer Abnahme des KYNA-Gehaltes im Blut bzw. Serum festgestellt werden (Hartai et al., 2007). Aufgrund der antagonistischen Effekte von KYNA auf

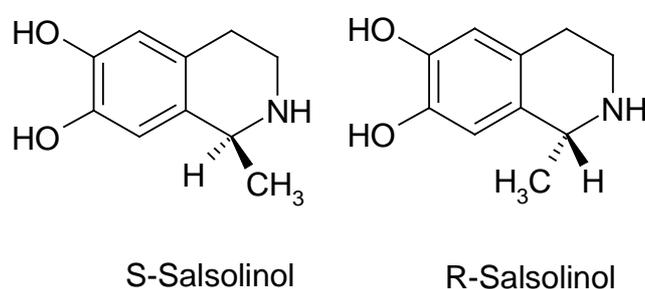
den nikotinergeren  $\alpha 7$ -Acetylcholinrezeptor wird jedoch der erhöhte KYNA-Spiegel im Liquor mit Schizophrenie verbunden (Erhardt et al., 2001; Hilmas et al., 2007).  $\alpha 7$ -Rezeptoren kommen in Hirnregionen vor, die wichtig für kognitive Fähigkeiten sind wie Großhirnrinde und Hippocampus. Die hier dargestellten Daten weisen darauf hin, dass KYNA eine neuromodulierende Rolle im ZNS besitzt und, abhängig von der Konzentration, einen inhibierenden oder aktivierenden Effekt ausüben kann.

3-HK, das metabolisch vor QUIN gebildet wird, trägt bei mikromolaren Konzentrationen auch wesentlich zum neuronalen Zelltod bei. Die neurotoxische Wirkung von 3-HK beruht auf einer intrazellulären Akkumulation von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff-Superoxid (Eastman und Guilarte, 1990). 3-HK unterliegt der Autooxidation (Ishii et al., 1992), bei der abrupt der Anstieg des ROS-Spiegels auftritt und es damit zum oxidativen Stress kommt. Infolgedessen kommt es zum Untergang neuronaler Zellen über Apoptose (Nakagami et al., 1996; Okuda et al., 1996; Okuda et al., 1998). Einen Nachweis für die neurotoxische Wirkung liefert eine Studie von Lapin, in der durch eine intracerebroventrikuläre Injektion von 3-HK Konvulsionen ausgelöst wurden (Lapin, 1980; Lapin, 1981). Ein interessantes Ergebnis wurde in einer Studie von Leinitz et al. (2007) dargestellt, wo Eigenschaften von 3-HK bei Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  in Ratten-C6-Gliomazellen und im zerebralen Kortex der Ratte getestet wurden. In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass eine einstündige Behandlung mit 3-HK bei mikromolaren Konzentrationen vor Lipidperoxidation schützt und sogar schädliche freie Radikale abfängt. Unter pathologischen Bedingungen kann 3-HK von physiologischen nanomolaren Konzentrationen auf mikromolare erhöht werden (Okuda et al., 1998). Die dargestellten Daten aus der Literatur weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen dem Kynureninweg und neurodegenerativen Krankheiten hin.

#### **1.4.2 Salsolinol**

Salsolinol (1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin) zählt zur weit verbreiteten Gruppe der Isochinolin-Alkaloide, zu denen auch MPTP und sein Derivat MPP<sup>+</sup> sowie Morphin gehören. Salsolinol ist ein Tetrahydroisochinolin-Derivat, das endogen in geringen Mengen auch im Nervensystem von Säugetieren gebildet wird (Sjöquist und Magnuson, 1980; Sjöquist et al., 1981). Zudem wurde Salsolinol in Pflanzenprodukten wie Kakaobohnen (Riggin und Kissinger, 1976) und

Bananen gefunden (Riggin et al., 1976). *In vivo* kann die Salsolinol-Bildung durch eine nicht-enzymatische Pictet-Spengler-Kondensation von Dopamin mit Aldehyden zu (R)-Salsolinol und (S)-Salsolinol, eine nicht-enzymatische Kondensation von Dopamin mit Pyruvat zu (R)-Salsolinol und eine enantioselektive Bildung von (R)-Salsolinol aus Dopamin und Acetaldehyd durch das Enzym (R)-Salsolinol-Synthase erfolgen (Naoi et al., 1996). Zur Bildung von (R)-Salsolinol kommt es überwiegend bei Menschen, worauf die Befunde von Sjöquist (1981; 1982) hinweisen. In der Natur kommt hauptsächlich (S)-Salsolinol vor, welches weniger wirksam ist als das Enantiomer mit (R)-Konfiguration (Duncan et al., 1984; Rommelspacher et al., 1985).



**Abb.4:** Strukturformeln der Salsolinol-Enantiomere

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu MPTP/MPP<sup>+</sup> steht Salsolinol im Verdacht, eine wichtige Rolle bei der Degeneration der dopaminergen Nervenzellen bei der Parkinson-Krankheit zu spielen. Ein erhöhter Salsolinol-Spiegel wurde im Gehirn bei Parkinson-Patienten und auch bei Alkoholmissbrauchenden nachgewiesen. (Sjöquist et al., 1980; Moser und Kömpf, 1992; Antkiewicz-Michaluk et al., 1997). Antkiewicz-Michaluk et al. (1997) assoziierten den gestiegenen Salsolinol-Gehalt im Liquor der Parkinson-Kranken mit einer Demenz. Die Konzentration des Salsolinols im Urin steigt direkt nach Alkoholkonsum und nimmt mit der Verstoffwechslung des Alkohols wieder ab (Collins et al., 1979). Es wird postuliert, dass Salsolinol und andere Tetraisoquinolinderivate eine körperliche und psychische Abhängigkeit hervorrufen. Darauf weisen Ergebnisse einer Studie von Xie et al. (2012) hin, die von einer Wirkung des Salsolinols auf  $\mu$ -opioid Rezeptoren in dopaminergen Zellen einer Ratte berichteten.

Zahlreiche *in vitro* Experimente zeigten, dass Salsolinol und sein Derivat N-Methyl-Salsolinol Apoptose in dopaminergen Zellen auslösten (Willets et al., 1996; Akao et al., 1999; Storch et al., 2000; Naoi et al., 2002; Wanpen et al., 2004). Der

genaue molekulare Wirkmechanismus von Salsolinol ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch gut belegt, dass Salsolinol die Funktion der mitochondrialen Atmungskette hauptsächlich des  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes und der Komplexe I und II inhibiert (Moser und Kömpf, 1992; McNaught et al., 1995; McNaught et al., 1995a; Morikawa et al., 1998), was zur Abnahme des ATP-Gehaltes und somit Energieverlust in der dopaminergen Zelle führt (Storch et al., 2000). Außerdem wird die Aktivität von Tyrosinhydroxylase, dem Schlüsselenzym bei der Dopaminbiosynthese und der Monoaminoxidase beeinträchtigt (Yamada, 1971; Bembek et al., 1983). Man nimmt an, dass die neurotoxische Wirkung von Salsolinol hauptsächlich auf einer vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und dadurch bedingten oxidativen Stress beruht. Auf die Erhöhung der ROS-Bildung in durch Salsolinol geschädigten dopaminergen Zellen weisen Ergebnisse von Wanpen et al. (2004), Kim et al. (2001), Jung und Surh (2001) hin. Darüber hinaus wurde vor kurzem davon berichtet, dass Salsolinol Eigenschaften eines Proteasom-Inhibitors besitzt (Nagasawa et al., 2011) und aus diesem Grund auch auf diese Weise an der Anreicherung der zytotoxischen ROS beteiligt sein kann (Papa et al., 2007). Die Entstehung von oxidativem Stress wird auch durch Verminderung der endogenen Schutzmechanismen von Salsolinol gefördert. Salsolinol kann eine Reduktion der Konzentration von GSH in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen induzieren (Wanpen et al., 2004). Auch die Aktivität von Superoxiddismutase wurde während der Behandlung mit Salsolinol stark beeinträchtigt (Kang, 2007).

## **1.5 Behandlungsstrategien**

Derzeit gibt es keine effektive Behandlungsmethode für neurodegenerative Krankheiten. Man kann entweder die Symptome durch Ausgleich des bestehenden cholinergen Defizits bei Morbus Alzheimer oder des dopaminergen Defizits bei Morbus Parkinson behandeln oder das Voranschreiten der Krankheiten verlangsamen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien mit pflanzlichen Extrakten oder Substanzen pflanzlicher Herkunft durchgeführt, die von neuroprotektiven Eigenschaften berichteten. Hohe Interesse und Hoffnung für die Therapie der neurodegenerativen Krankheiten wecken besonders pflanzliche Polyphenole wie Flavonoide.

Auf Grundlage der bisher dargestellten Beobachtungen werden einige Angriffspunkte als mögliche Therapieansätze oder Präventionsmaßnahmen von neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. Als Hauptkonzepte für Neuroprotektion wurden eine Reduktion des oxidativen Stresses und der Schutz der mitochondrialen Funktionen vorgeschlagen.

### **1.5.1 Einsatz von Radikalfängern**

Im Verlauf der meisten neurodegenerativen Krankheiten tritt während mehrerer pathophysiologischer Prozesse oxidativer Stress auf. Es ist gut in der Literatur dokumentiert, dass die durch oxidativen Stress verursachten Veränderungen mit dem Absterben der neuronalen Zellen assoziiert sind. Um das pathologische Ungleichgewicht zwischen antioxidativem Schutz und einer ROS-Bildung zu reduzieren und somit neuronale Funktion zu erhalten, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Man nimmt an, dass oxidativer Stress auf zwei Weisen reduziert werden kann. Das ist einerseits durch Abfangen der ROS und andererseits durch eine Verbesserung der geschädigten antioxidativen Abwehr.

Eine der Behandlungsmethoden basiert auf der Einnahme von Antioxidantien, also Stoffe, die direkt mit den freien Radikalen reagieren und die den Ablauf von Kettenreaktionen und deren oxidativen Folgen blockieren können. Zu solchen antioxidativen Substanzen gehören Vitamin C, Vitamin E und Natriumpyruvat. Natriumpyruvat, ein endogenes Energiesubstrat, zeigte sich als Neuroprotektant durch Verminderung der ROS-Generierung und Entgiftung des mitochondrialen Membranpotentials (Wang et al., 2007). In anderen experimentellen Studien lieferte Natriumpyruvat zusätzlich einen Schutz vor A $\beta$ - (Alvarez et al., 2003) und 6-OHDA-induzierter Toxizität (Fernandez-Gomez et al., 2006). Vitamin C und E tragen zur Stabilisierung von Superoxidanionen und Hydroxylradikalen bei. Vitamin E verhindert als fettlösliches Vitamin zudem die Lipidperoxidation der Zellmembrane. Darüber hinaus sind auch natürliche Radikalfänger bekannt. Flavonoide sind weit verbreitete, in Pflanzen vorkommende, Polyphenole und besitzen wichtige Eigenschaften für die menschliche Gesundheit. Ihre direkte antioxidative Wirkung ist seit mehreren Jahren bekannt (Chen et al., 1990; Manach et al., 1996; Rice-Evans et al., 1996) und beruht wahrscheinlich auf der Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen OH-Gruppen, welche die freien Radikale abfangen (McPhail et al., 2003). Ihre antioxidative Wirksamkeit hängt mit ihrer Struktur zusammen (Rice-

Evans et al., 1996). Zu den effektivsten Radikalfängern unter Flavonoiden zählen Quercetin und sein Glykosid Rutin (Pietta, 2000; Ishige et al., 2001).

### **1.5.2 Neuroprotektion durch Einfluss auf mitochondriale Funktionen**

Die Ergebnisse neuerer experimenteller Studien weisen darauf hin, dass eine Neuroprotektion durch direkte Beeinflussung der Mitochondrien und ihre Funktionen erreicht werden kann.

Durch Erhöhung der intrazellulären GSH-Konzentration kann die Empfindlichkeit der Neuronen gegen Faktoren, die einen oxidativen Stress auslösen erniedrigt werden. Exogen verabreichtes GSH wird bei Menschen durch Dipeptidasen im Magen-Darm-Trakt hydrolysiert. Intravenös verabreichtes GSH wird auch schnell eliminiert mit einer Plasmahalbwertszeit von 7 Minuten (Aebi et al., 1991). Dokumentiert ist jedoch die hohe Bioverfügbarkeit von Glutathionester wie Ethylglutathion oder Methylglutathion, die durch Veresterung der Carboxygruppe des Glycylrestes synthetisiert wurden (Anderson et al., 1985) und im menschlichen Organismus zu GSH hydrolysiert werden. Im Jahre 2002 wurden Flavonoide als Substanzen identifiziert, die den intrazellulären GSH-Gehalt erhöhen (Myhrstad et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur Neuroprotektion gegenüber ROS besteht in der Erhöhung der mitochondrialen antioxidativen Superoxiddismutase- und Katalase-Aktivität. Auch hier wurde diese Fähigkeit für pflanzliche Polyphenole beschrieben. Scutellarin war in der Lage, durch Ischämie induzierte Abnahme der Superoxiddismutase- und Katalase-Aktivität in Hirnzellen von Ratten wiederherzustellen (Guo et al., 2011). Fisetin, Sulfuretin, Butein und Butin, Bestandteile des methanolischen Extraktes aus *Rhus verniciflua* Stokes, schützten hippokampale HT22-Zellen der Maus vor Glutamat-induzierter Toxizität, in dem sie die GSH-Konzentration sowie Superoxiddismutase- und Katalase-Aktivität erhöhten (Cho et al., 2012).

Einen Schutz gegen die pathogene Aktivierung der NMDA-Rezeptoren und so vermittelte ROS-Produktion sowie den Verlust der neuronalen Zellen, kann das Abschalten von NMDA-Rezeptoren bedeuten. Wenn NMDA-Rezeptoren dauerhaft erregt sind, kann es zum Einstrom von Calcium-Ionen und Störungen verschiedener Signalwege kommen, die mit dem Tod neuronaler Zellen verbunden sind. Memantine ist zurzeit der einzige zugelassene Wirkstoff für die Behandlung moderater bis

schwerer Form der Alzheimer-Krankheit, der den NMDA-Rezeptor blockiert, so dass die Übertragung von Nervensignalen über den NMDA-Rezeptor normalisiert wird. Kawakami et al. (2011) berichteten, dass Isoliquiritigenin Eigenschaften eines NMDA-Antagonisten besitzt. Eine Glutamat-vermittelte Neurotoxizität kann auch durch Bindung von Hyperosid an den NMDA-Rezeptoren blockiert werden (Zhang et al., 2010).

Ein indirekter Schutz vor den Folgen des oxidativen Stresses kann durch eine Hemmung der entzündlichen Prozesse im Hirngewebe erreicht werden. Im Hirngewebe der Patienten mit einer neurodegenerativen Erkrankung laufen offensichtlich chronische lokale Entzündungsvorgänge ab. Ein Zeichen dafür ist die Aktivierung der Mikroglia. Eine Inflammation im Gehirn wird von einer Störung der Blut-Hirn-Schranke begleitet, was das Eindringen unerwünschter Zellen des Immunsystems sowie Substanzen wie Xenobiotika begünstigt. Bei der Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten werden proinflammatorische Substanzen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Prostaglandine, Chemokine, ROS und Stickstoffmonoxid freigesetzt (Aloisi, 2001). Für die Generierung von ROS bei Mikroglia und Astrozyten, den Gliazellen, ist die NADPH-Oxidase verantwortlich (Sankarapandi et al., 1998; Abramov und Duchan, 2005), deren Aktivität in Gliazellen z.B. durch A $\beta$  erhöht wird (Abramov und Duchan, 2005). In einer Studie von Sun et al. (2007) ergab sich, dass NADPH-Oxidase auch in anderen Zellen exprimiert ist. Die Enzymaktivität wurde auch in Neuronen nachgewiesen. Versuche, in denen die Überaktivität der NADPH-Oxidase in Astrozyten oder mesencephalischen dopaminergen Zellen mittels Inhibitoren wie Apocynin, Diphenyleniodonium und 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid reduziert wurde, zeigten, dass auf diese Weise die Produktion von ROS und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verhindert werden konnten (Abramov und Duchan, 2005; Anantharam et al., 2007; Choi et al., 2012). Somit stellt die Inhibierung der NADPH-Oxidase einen interessanten Angriffspunkt bei der Therapie von Patienten mit neurodegenerativen Krankheiten dar. Als Inhibitor der NADPH-Oxidase wurde beispielsweise im Jahre 2010 Resveratrol identifiziert (Zhang et al., 2010a).

Da neurodegenerative Krankheiten durch eine erhöhte Apoptoserate gekennzeichnet sind, ist es auch von Vorteil, einen im Übermaß ausgelösten programmierten Zelltod zu blockieren. Eine Erniedrigung der Apoptoserate kann z.B. durch Expression von Bcl-2 oder Unterdrückung von Bax sowie durch Hemmung der

Caspasen-Aktivität erreicht werden. Die antiapoptotische Wirkung wurde auch bei zahlreichen Flavonoiden nachgewiesen. In einer Untersuchung von Li et al. (2012) zeigte Resveratrol einen neuroprotektiven Effekt. Resveratrol war in der Lage, die durch Ischämie induzierten Gehirnschäden bei Ratten zu verhindern, indem es den Bcl-2-Gehalt erhöhte. Das Flavonoid Hyperosid reduzierte die durch A $\beta$ -ausgelöste Apoptose in primären kortikalen Neuronen der Ratte, indem es die Aktivität der Caspase-3 und -9 verminderte (Zeng et al., 2011). Auch für Puerarin, ein Phytoöstrogen aus *Pueraria lobata* Willdenow, wurde eine antiapoptotische Wirkung gegen A $\beta$ -Toxizität in PC12-Zellen beschrieben (Xing et al., 2011). Isoliquiritigenin, ein Bestandteil aus *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., lieferte einen Schutz vor 6-OHDA-induzierter Apoptose (Hwang et al., 2012).

## 1.6 Zielsetzung

Viele Daten weisen darauf hin, dass endogen gebildete Substanzen wie Metaboliten des Kynureninwegs QUIN, 3-HK und KYNA sowie Salsolinol an der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sein können und dass sie zum oxidativen Stress, zu Fehlfunktionen der Mitochondrien und zum Zelltod führen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein *in vitro* Zellmodell zu entwickeln, welches neuronale Eigenschaften besitzt und sich zur Untersuchung des QUIN-, 3-HK- und KYNA-vermittelten Zelltodes eignet. Um optimale Zellkulturbedingungen zu erhalten, sollte eine Differenzierung mit verschiedenen Differenzierungsfaktoren sowie Modulation der Stoffwechselforgänge durch Änderung der Zusammensetzung vom Zellkulturmedium durchgeführt werden. Zur Bestimmung des Zelltodes sollten der MTT-Test und die Messung des ATP-Gehaltes mittels eines ATP-Lumineszenz-Assays genutzt werden, um den Einfluss der Neurotoxine auf die mitochondriale Funktion zu untersuchen.

In dem Zellmodell sollten die schützenden Effekte von pflanzlichen Polyphenolen, Pflanzenextrakten und anderen Naturstoffen auf den durch endogen gebildete Neurotoxine induzierten Zelltod untersucht werden. Außerdem sollten experimentelle Hinweise auf Mechanismen zur Beeinflussung der Apoptose durch Bestimmung der Aktivität der Caspasen-3/7 und der Konzentration des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Hinweise

Alle Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, unter Verwendung von frisch demineralisiertem Wasser angesetzt. Die für die Zellkultur und die molekularbiologischen Methoden verwendeten Materialien waren entweder vom Hersteller steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Verwendung in einem Autoklaven bei 121°C 20 min dampfsterilisiert. Sofern bei einigen der folgenden Methoden und Inkubationsschritte keine Temperatur angegeben ist, wurde bei RT gearbeitet.

### 2.2 Chemikalien

- bovines Serumalbumin (BSA); Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Merck, Darmstadt, Deutschland
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Ethanol absolut; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycerol; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Isopropanol; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methanol; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumazid; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Natriumchlorid; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Paraformaldehyd; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)-Dulbecco, unsteril; Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Phosphorsäure 85 %; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Schwefelsäure 95-98 %; Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton-X-100 10 %; Perbio Science, Bonn, Deutschland

## 2.3 Puffer und weitere Lösungen

### 2.3.1 Lösungen der Testsubstanzen

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die in dem Assay benötigten Konzentrationen durch Verdünnung mit Zellkulturmedium hergestellt. In den Kontrollexperimenten wurden entsprechende Lösungsmittelmengen eingesetzt. Flavonoide sowie Rosmarinsäure wurden mit einer Stammkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  in DMSO gelöst und als Stammlösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. All-trans-Retinsäure (RA) wurde in absolutem Ethanol gelöst und als 10  $\mu\text{M}$  Lösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. TNF- $\alpha$  wurde aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2 Lösungen für Immunfluoreszenz

#### Puffer

0,01 M	PBS-Dulbecco, unsteril
1 %	BSA
0,09 %	Natriumazid

#### Fixierlösung

4 %	Paraformaldehyd
in	PBS-Dulbecco, unsteril

#### Triton-X-100-Lösung

0,2 %	Triton-X-100
in	Puffer

#### Blockierlösung

5 %	BSA
in	PBS-Dulbecco, unsteril

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

### 2.4.1 Untersuchungsmaterialien

- 3-HK; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- 6-OHDA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Amentoflavon; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Apigenin; Roth, Karlsruhe, Deutschland

- Chrysin; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Epigallocatechingallat (EGCG); Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- D-(+)-Galaktose; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Isorhamnetin; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Kämpferol; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- KYNA; Serva Entwicklungslabor Heidelberg, Deutschland
- GSH; Lancaster Synthesis, Eastgate, England
- Luteolin; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Luteolin-7-O-Glucosid; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Myricetin; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Naringenin; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumpyruvat; Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Quercetin; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- QUIN; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- RA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Rosmarinsäure; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Rutin; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- ( $\pm$ ) Salsolinol; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Saponarin; wurde freundlicherweise von Frau Maya Yotova aus dem Institut für Pharmakognosie der Medizinischen Universität zu Sofia in Bulgarien erhalten
- Sinensetin; Roth, Karlsruhe, Deutschland
- TNF- $\alpha$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

#### **2.4.2 Zellkultur**

- Casy@Clean Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland, Roche diagnostics
- Casy@ton Lösung; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland, Roche diagnostics
- Casy@cup; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland, Roche diagnostics
- Cellstar® Filter Top Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>; 75 cm<sup>2</sup>), steril; Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland

- Cellstar® Pipetten (2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml), steril; Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland
- Deckgläser (AL); Menzel-Gläser, VWR International, Ulm, Deutschland
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- DMEM mit Natriumpyruvat; Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Einmal-Injektionskanülen Gr. 1, Sterican; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- fetales Kälberserum (FBS); Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Kryoröhrchen 2 ml, steril; Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland
- L-Alanyl-L-Glutamin; Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Nalgene Cryo 1° Freezing Container; Nalge Nunc International, Großbritannien
- Objektträger; Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
- Omnifix-Einmalspritzen 1 ml/ 2ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Pasteurpipetten aus Glas; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- PBS-Dulbecco-Puffer; Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Pipettenspitzen (0,1-10 µl; 100-5000 µl); Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen (10-100 µl; 100-1000 µl); VWR, Darmstadt, Deutschland
- Plastikreaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml); Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland
- Spritzenvorsatzfilter DMSO-Safe Acrodisc®; VWR, Darmstadt, Deutschland
- Spritzenvorsatzfilter für wässrige Medien Whatman®, steril; VWR, Darmstadt, Deutschland
- Trypsin/EDTA-Lösung 0,05 %/ 0,02 % in PBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) (w/v); Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Zellkultur-Microplatten (96-Well), steril; Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland
- Zellkultur-Microplatten-Weiß (96-Well), steril; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkultur-Multiwell-Platten (24-Well), steril; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

- Zellkultur-Multiwell-Platten (6-Well), steril; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
- Zellschaber; Greiner bio-One, Frickenhausen, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml), steril; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

### 2.4.3 Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde über die angegebenen Quellen bezogen:

- *Apium graveolens* L. – *Apium folium* – Galke, Gittelde, Deutschland
- *Cynara cardunculus ssp. flavescens* Wikl. – Lipophiler Extrakt- Lichtwer AG, Berlin, Deutschland
- *Euphrasia officinalis* L. – *Euphrasiae herba* - Galke, Gittelde, Deutschland

### 2.4.4 Flavonoid-Nanokristalle

Die Flavonoid-Nanokristalle wurden freundlicherweise bei Herrn Prof. Dr. R. Müller von Herrn Run Chen in der Abteilung Pharmazeutische Technologie des Institutes für Pharmazie der Freien Universität Berlin hergestellt. Die Konzentration an Rutin betrug 2 % und an Quercetin 2 %; 0,2 % und 0,02 %. Quercetin- und Rutin-Nanokristalle wurden in einer Lösung (Compound-Formulierung): Poloxamer 188 0,2 %, Kochsalzlösung (0,9 %) 95,3 %, Glycerol (85 %) 2,5 % suspendiert, bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht. Als Kontrolle diente folgende Lösung Poloxamer 188 0,2 %, Kochsalzlösung (0,9 %) 97,3 %, Glycerol (85 %) 2,5 %.

### 2.4.5 Antikörper

#### 2.4.5.1 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

- Primärantikörper: monoklonal Maus anti-Mikrotubuli assoziiertes Protein 2 (MAP-2) (1:200 in Blockierlösung); Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland
- Sekundärantikörper: Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-Ziege-Anti-Maus (1:50 in Blockierlösung); Abnova Corporation, Taipei, Taiwan

## 2.5 Geräte

- Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage; Osterode, Deutschland

- Analysenwaage BP211D; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Auflichtfluoreszenzsystem; Olympus, Hamburg, Deutschland
- Auflichtmikroskop, TMS-F; Nikon, Japan
- Auswertungssoftware, ACT-1; Nikon, Japan
- Brutschrank Mini Galaxy A; Nunc, Wiesbaden, Deutschland
- CASY®1 Cell Counter + Analyser System, Modell TTC; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop BX41; Olympus, Japan
- Gasbrenner Schütt Flamy S; Schütt GmbH, Göttingen, Deutschland
- Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)-Anlage: Hewlett Packard, Series II, 1090 Liquid Chromatograph Säule YMC-Pack C-18, 100 x 3,0 mm, 3 µm; Japan
- Mikroplattenreader Tecan Spectra Fluor; Tecan, Österreich
- Mikroplattenreader Tecan Infinite F200; Tecan, Österreich
- Nikon Digitalkamera DXM1200 für Fluoreszenzmikroskopie; Nikon, Japan
- pH-Meter 766 Calimatic; Knick, Berlin, Deutschland
- Präzisionsheizplatte PZ28-1; Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- Rundschüttler, SLT Shaker; Elmech GmbH, Celle, Deutschland
- Schüttelgerät (Vortex Genie 2 ); Scientific Industries, New York, USA
- SpeedVac Concentrator; ThermoScientific, USA
- Sterilbank Hera safe; Heraeus-Christ, Hanau, Deutschland
- Tischzentrifuge 200R; Hettich Zentrifuger, Deutschland
- Tischzentrifuge Medifuge 200S; Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
- Ultraschallgerät Sonifer 250; Branson Danbury, USA
- Vakuumpumpe Vacusafe; Integra Biosciences, Schweiz
- Varioklav® Dampfsterilisator; H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
- Werkbank Clean Air CLF 360; Woerden, Niederlande

## 2.6 Herstellung der Pflanzenextrakte

10 g gepulverte getrocknete Drogen wurden in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben

mit 250 ml Lösungsmittel versetzt. Als Lösungsmittel für den Augentrost-Extrakt dienten Wasser und Methanol (100 %). Für den Sellerie-Extrakt wurden drei unterschiedliche Lösungsmittel verwendet Methanol 80 %, Methanol 100 % und Ethylacetat 100 %. Der Kolben wurde für 24 Stunden bei RT im Dunkeln gehalten. Danach wurde die Mischung für 15 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde der Extrakt durch einen Faltenfilter abfiltriert und das Filtrat am Rotavapor zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde unter sterilen Bedingungen in wenig Zellkulturmedium oder DMSO aufgelöst. Die erhaltene Lösung wurde durch einen 0,2 µm Membranfilter filtriert und zum Zellkulturmedium zugegeben. Die Extrakte wurden bei 4°C aufbewahrt und innerhalb einer Woche aufgebraucht.

## **2.7 Zellbiologische Methoden**

Die Arbeit mit Zellen erfolgte in einem Zellkulturlabor. Medien und Lösungen wurden bei -20°C bzw. 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt. Es wurde stets unter einer Sterilbank gearbeitet und nur autoklavierte Materialien oder sterile Einmalware genutzt. Um die Wahrscheinlichkeit für eine Kontamination zu verringern, wurden immer Einmalhandschuhe und Laborkittel getragen und die Arbeitsfläche desinfiziert.

### **2.7.1 Zelllinien**

Die in dieser Arbeit verwendeten zwei humanen Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) erworben, nach der Kultivierung aliquotiert und bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.7.2 Kultivieren und Passagieren von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen**

Die Zelllinie SK-N-SH wurde von J. Heikkilä, University of Turku, Turku, Finnland aus dem Knochenmarksmetastasen (Neuroblastom) eines vierjährigen Mädchens gewonnen. Die Zelllinie SH-SY5Y ist eine klonale Sublinie der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, die von Biedler im Jahre 1973 isoliert wurde (Biedler et al., 1973). Als Zellkulturmedium für beide Neuroblastomzelllinien wurde DMEM mit 15 %igem FBS verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm<sup>2</sup> in 15 ml im Brutschrank unter 95 %

Wasserdampfsättigung und einem 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt bei 37°C als Monolayer kultiviert.

Zum Passagieren wurde zuerst das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und dann mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert, was zum vollständigen Ablösen der adhären Zellen vom Untergrund führte. Durch intermittierendes Klopfen gegen den Zellkulturflaschenboden wurden sie von der Zellkulturflasche abgespült. Um die proteolytische Wirkung des Trypsins zu inhibieren, wurden zu der Zellsuspension 6 ml Zellkulturmedium zugegeben, da die enthaltenen Serumproteine die restliche Enzymaktivität abfangen. Die Zellen wurden dann durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren suspendiert. Die benötigte Menge an Zellen wurde je nach Bedarf nach Zellzahlbestimmung entweder in eine entsprechende Well-Plate ausgesät oder zum Weiterkultivieren in neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, in denen 13 ml Zellkulturmedium vorgelegt worden war, resuspendiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und Weiterkultivierung bis zu einer Konfluenz von 90 %. Die SK-N-SH-Zellen wurden in einer Zelldichte von 3x10<sup>5</sup> Zellen/Zellkulturflasche passagiert, die SH-SY5Y-Zellen in einer Dichte von 3,5x10<sup>5</sup> Zellen/Zellkulturflasche.

Für die Durchführung von Toxizitätsversuchen wurden die Zellen eine Stunde vor der jeweiligen Behandlung mit serumarmen Zellkulturmedium (DMEM mit 1 %igem FBS) inkubiert. Danach erfolgte entweder eine einstündige Vorinkubation mit Naturstoffen oder eine Zugabe von jeweiligen Neurotoxinen.

### **2.7.3 Zellzahlbestimmung**

Für Zellzahlbestimmungen wurde eine Zellsuspension mit CASY@ton (Schärfe System GmbH, Reutlingen) 1:100 verdünnt. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels CASY®1 Cell Counter + Analyser System, Modell TTC (Schärfe System) durchgeführt.

### **2.7.4 Auftauen von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen**

Die Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen und bei 37°C im Wasserbad so schnell wie möglich aufgetaut. Das Einfriermedium (Zellkulturmedium, 10 % FBS, 10 % DMSO) mit den darin suspendierten Zellen wurde in ein 15 ml Zentrifugeröhrchen mit 10 ml Medium überführt und die Zellen wurden resuspendiert. Nach schonender Zentrifugation (200 x g, 5 min) wurde das

DMSO-haltige Einfriermedium abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml Medium mit 20 %igem FBS resuspendiert und in zwei 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen zu bereits sich darin befindlichem Medium pipettiert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **2.7.5 Einfrieren von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen**

Die Zellen wurden trypsinisiert und in frischem Medium resuspendiert. Nach dem Abzentrifugieren (200 x g, 5 min) und Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (siehe Abschnitt 2.7.4) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und langsam über Nacht im Nalgene Cryo Freezing Container in Isopropanol auf -80°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte nach 24 h in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

### **2.7.6 Differenzierung von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen**

#### **2.7.6.1 Differenzierung mit all-trans-Retinsäure**

Eine der Methoden zur Kultivierung der SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen wurde von Sidell et al. (1982), Pahlman et al. (1984) und Trillo-Pazos et al. (2000) übernommen. Um die Differenzierung beider humanen Neuroblastomzelllinien zu neuronalen Zellen anzuregen, wurde dem Zellkulturmedium RA beigefügt. 24 Stunden nachdem die Zellen nach 2.7.2 kultiviert wurden, wurden die Zellen mit RA in einer Konzentration von 10 µM behandelt. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen innerhalb von 7 Tagen differenziert.

Für die Durchführung des MTT-Tests erfolgte die Differenzierung der Zellen in 96-Well-Platten. Die Zellen wurden wie in 2.7.2 beschrieben resuspendiert und in einer Zelldichte von 5x10<sup>4</sup> bei SK-N-SH-Zellen und 3x10<sup>4</sup> bei SH-SY5Y-Zellen pro Well ausgesät. Nach 24 Stunden wurde dem Zellkulturmedium RA (10 µM) zugesetzt. Das Zellkulturmedium mit RA wurde alle drei Tage gewechselt bis die Zellen nach 7 Tagen ausdifferenziert waren.

#### **2.7.6.2 Differenzierung mit Tumornekrosefaktor-α**

Die beiden Zelllinien wurden wie unter 2.7.2 ausgesät und am nächsten Tag für 24 Stunden mit TNF-α 500 U/ml als Differenzierungsfaktor versetzt. Obregon et

al. (1997) beschrieben, dass unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  Neuroblastomzelllinien neuronale Eigenschaften entwickeln.

### **2.7.7 Induzierung einer Stoffwechselumstellung von Glykolyse auf oxidative Phosphorylierung**

Marroquin et al. (2007) beschrieben ein Zellmodell, in dem als Energiequelle für Tumorzellen Galaktose statt üblicherweise Glukose verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen sollte die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber mitochondrialen Noxen steigen. Als Zellkulturmedium für SH-SY5Y-Zellen diente DMEM, dem 10 mM Galaktose, 4 mM L-Glutamin-L-Alanin und 15 % FBS zugesetzt wurde. Um die Zellen an neue Bedingungen zu gewöhnen und eine Stoffwechselumstellung zu induzieren, wurden sie vor dem Testeinsatz mindestens bis zur zehnten Passage kultiviert.

## **2.8 Zellkultur-Assays**

### **2.8.1 MTT-Test**

#### *2.8.1.1 Prinzip des MTT-Tests*

Der Nachweis der Toxizität von Substanzen auf die Zellen erfolgte mittels MTT-Tests. Beim MTT-Test handelt es sich um einen kolorimetrischen Test, der auf der Reduktion des gelben wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT durch membrangebundene, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen in Zellen beruht. In vitalen Zellen entstehen als Produkt blau-violette wasserunlösliche Formazankristalle, die in einem weiteren Schritt solubilisiert und spektrophotometrisch vermessen werden können. Da nur lebendige Zellen mit einem aktiven Stoffwechsel und solche, die sich in der Frühphase der Apoptose befinden, in der Lage sind, MTT umzuwandeln, wird die gemessene Absorption als Maß für die Anzahl und metabolische Aktivität der Zellen angesehen (Mosmann, 1983).

#### *2.8.1.2 Durchführung des MTT-Tests*

Um Zytotoxizität oder schützende Wirkung einer Substanz zu testen, wurden die SK-N-SH-Zellen in eine 96 Well-Platte in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  pro Well und die SH-SY5Y-Zellen in einer Zelldichte von  $8 \times 10^4$  pro in einem Volumen von 200  $\mu$ l ausgesät. Das Vorgehen mit differenzierten Zellen wurde in 2.7.6.1 beschrieben. Nach 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch

200 µl Zellkulturmedium mit nur 1 %igem FBS ersetzt. Nach weiteren 2 Stunden wurde das Zellkulturmedium wiederum abgenommen. Als nächstes wurde zu den Zellen ein Zellkulturmedium mit 1 %igem FBS zugegeben, welches zusätzlich die potentiell zytotoxische Substanz in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Um protektive Eigenschaften der ausgewählten Naturstoffe zu untersuchen, wurde die zytotoxische Substanz entweder nach einer Stunde oder nach 24 Stunden nach der Zugabe der potenziellen schützenden Substanz zugegeben. Nach einer festgelegten Inkubationszeit von 24 oder 48 Stunden wurde der Zellkulturüberstand aus den Wells durch Umdrehen der Platten entfernt. Im weiteren Schritt wurde die 96-Well-Platte auf einem saugfähigen Papiertuch vorsichtig ausgeklopft. Danach wurde in jedes Well mit einer Multikanalpipette 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS-Dulbecco) zugesetzt und die Zellen nach dem 5-minütigen Schütteln in den Brutschrank gestellt. Innerhalb der nächsten zwei Stunden bildeten sich intrazellulär mikroskopisch gut erkennbare lila Farbstoffkristalle. Es wurde nach der Inkubationszeit wiederum das Medium mit MTT entfernt und dann zur Solubilisierung der Formazankristalle aus den Zellen 100 µl DMSO pro Well zugegeben. Anschließend wurde die Platte für 15 Minuten auf dem Schüttler geschüttelt. Die Absorption des gebildeten Formazans in jedem Well wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplattenphotometers (Tecan) bei einer Testwellenlänge von 580 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt. Die Werte unbehandelter Zellen entsprachen dabei 100 %. Für jede Konzentration wurden drei bis sechs Parallelproben angesetzt. Zur Sicherung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt.

## **2.8.2 ATP-Lumineszenz-Assay**

### ***2.8.2.1 Prinzip des ATP-Lumineszenz-Assays***

Als Methode zur Bestimmung der ATP-Konzentrationen in Zellen wurde das CellTiter-Glo Lumineszenz Viability Assay (Promega) eingesetzt. Das Prinzip des CellTiter-Glo Lumineszenz Viability Assays (ATP-Lumineszenz-Assays) beruht auf der Messung der Lichtemission, welche bei der katalytischen und ATP-abhängigen Oxidation von Luciferin durch Luciferase entsteht. Das gemessene Lumineszenzsignal ist direkt proportional zu dem ATP-Gehalt der Zellen und gibt Auskunft über die Funktion und Leistungsfähigkeit der Mitochondrien.

### ***2.8.2.2 Durchführung des ATP-Lumineszenz-Assays***

Der Vorgang mit Zellen erfolgte wie im 2.8.1.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass die Zellen in weißen 96-Well-Platten ausgesät wurden. Der ATP-Lumineszenz-Assay wurde gemäß der vom Hersteller mitgelieferten Anweisungen durchgeführt. Vor und während der Messung wurde die weiße 96-Well-Platte vor dem Licht geschützt auf 22°C temperiert. Nachdem die Zellen mit entsprechenden Substanzen inkubiert wurden, wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen wurden mit frischem Zellkulturmedium 50 µl pro Well versetzt. Dann erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl CellTiter-Glo Reagenz, was zur Lyse der Zellen führte. Nachdem die Zellen 30 Minuten inkubiert wurden, erfolgte die Lumineszenzmessung am Mikrotiterplatten-Luminometer (Tecan). Die Angabe der Messwerte erfolgte in RLU (*relative luminescence units*).

### **2.8.3 Caspase-3/7-Homogenous Assay**

#### 2.8.3.1 Prinzip des Caspase-3/7-Assays

Zu überprüfen, ob die zu testenden Substanzen am Schutz vor Apoptose beteiligt sind, wurde der Apo-ONE-Homogeneous Caspase-3/7-Assay der Firma Promega verwendet. Bei dem Caspase-3/7-Assay handelt es sich um einen fluorimetrischen Test, mit dessen Hilfe Enzymaktivität der Caspase-3 und -7 gemessen werden kann. Die Caspasen-3 und -7 gehören zur Familie der Cysteinproteasen und spielen eine sehr wichtige Rolle bei dem programmierten Zelltod, indem sie entscheidende Zellproteine schneiden. In dem Assay wird die Fluoreszenzintensität, die nach spezifischer Abspaltung eines fluoreszenz-markierten Pentapeptid Z-Asp-Glu-Val-Asp-Rhodamin110 (Z-DEVD-R110) Substrates durch die Caspasen-3 und -7 zu Rhodamin110 entsteht, bestimmt. Die Enzymaktivität der Caspasen-3 und -7 wird als Maß der Apoptoserate angesehen.

#### 2.8.3.2 Durchführung des Caspase-3/7-Assays

Die Zellen wurden in weißen 96-Well Platten ausgesät und wie im 2.8.1.2 beschrieben mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Nach der Behandlung wurde zum Zellkulturmedium das Apo-One-Caspase-3/7-Reagenz im Verhältnis eins zu eins zugegeben. In dem Schritt findet die Zelllyse statt, was die Freisetzung der Caspasen ins Zellkulturmedium ermöglicht. Nachdem die Zellen eine Stunde unter Schütteln und vor Licht geschützt inkubiert wurden, erfolgte die Fluoreszenzmessung mittels des Mikrotiterplatten-Fluoreszenzspektrometers (Tecan) bei einer

Anregungswellenlänge von 499 nm und einer Emissionswellenlänge von 521 nm in RFU (*relative fluorescence units*). Die Berechnung der Caspase-3/7-Aktivität erfolgte in % der ungehandelten Kontrolle.

## **2.8.4 Bcl-2 ELISA**

### **2.8.4.1 Prinzip des Bcl-2 ELISA**

Bcl-2 ist ein antiapoptotisches Protein, das vor allem auf der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Die Überexpression von Bcl-2 verhindert den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, die Freisetzung von Cytochrom c und die Aktivierung der Caspasen. Für die Messung der Bcl-2-Konzentration wurde der Bcl-2 ELISA Kit von Abnova (Taipei, Taiwan) verwendet. ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein Assay, womit man einzelne Proteine, wie Bcl-2, nachweisen und quantitativ bestimmen kann. Die Berechnung der Bcl-2 Konzentration erfolgte in ng/ml im Überstand.

### **2.8.4.2 Durchführung des Bcl-2 ELISA**

Die SH-SY5Y-Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Zelldichte von  $10^5$  pro Well ausgesät und am nächsten Tag mit ausgewählten Substanzen 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von Lysispuffer, was nach einer Stunde Behandlung zur Freisetzung von Bcl-2 führte. Im weiteren Schritt wurden die Proben in eine von den Herstellern des Kits bereits mit einem monoklonalen anti-Bcl-2-Antikörper-beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation der Proben in vorbeschichteten Wells wurde ein mit Biotin-konjugierter anti-Bcl-2-Antikörper hinzugefügt und es erfolgte eine Bindung mit Bcl-2 Protein für 2 Stunden im Schüttler bei RT. Nach Entfernung des ungebundenen Antikörpers durch dreimaliges Waschen (PBS mit 1 %igem Tween 20) wurde eine Streptavidin-HRP-Lösung, in der das Enzym Peroxidase chemisch gebunden ist, zugegeben und erneut erfolgte eine Inkubation für 2 Stunden im Schüttler bei RT. Anschließend wurden die Wells erneut drei Mal gewaschen und das Enzymsubstrat (Tetramethylbenzidin) zugegeben, das von dem Enzym Peroxidase umgesetzt wird und einen Farbumschlag bewirkt. Nach 10 Minuten konnte eine intensive dunkelblaue Färbung beobachtet werden und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M Phosphorsäure gestoppt. Die Messung erfolgte mittels des Mikrotiterplatten-Spektrophotometers (Tecan) bei 450 nm. Anhand der Farbintensität errechnete sich mit Hilfe der Kalibriergleichung die zugrunde liegende Konzentration des Bcl-2-

Proteins.

## 2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzmessung ist eine Methode, welche die Visualisierung der spezifischen Bindung des Antikörpers an sein Antigen, was üblicherweise ein Protein ist, innerhalb der Zelle ermöglicht. Für die Immunfluoreszenzversuche wurden Deckgläschen, die vor dem Aussäen mit 50 %iger Schwefelsäure entfettet wurden, mit Ethanol gewaschen und zum Sterilisieren abgeflammt wurden, in 6-Well-Platten vorgelegt und die benötigte Menge an SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen auf die Glasoberfläche gebracht. Die Zellen adhärten auf den Deckgläschen im Brutschrank über die nächsten drei Stunden. Die SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen wurden dann bis zum gewünschten Zeitpunkt mit den verschiedenen Medien mit entsprechenden Differenzierungsfaktoren inkubiert. Als nächstes wurden die differenzierten Zellen nach zweimaligem Waschen je 5 Minuten mit PBS-Dulbecco mit 1 ml Fixierlösung (siehe 2.3.2) für 15 Minuten bei RT fixiert. Das Verfahren dient zur Stabilisierung der Zellproteine durch Vernetzen und Abtöten der Zellen, um eine eventuelle Veränderung zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen je 5 Minuten in PBS-Dulbecco, wurden die fixierten Zellen mit Triton-X-100-Lösung (siehe 2.3.2) für 40 Minuten permeabilisiert, um die Zellmembranen für Antikörper durchlässig zu machen. Nach dieser Zeit wurden je 40 µl Blockierlösung (siehe 2.3.2), um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren, auf ein Deckgläschen gegeben und bei RT unter sanftem Schütteln für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS-Dulbecco gewaschen. Als nächstes wurde 50 µl Primärantikörper: MAP-2 (1:200) für über Nacht bei 4°C auf den Zellen belassen. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS-Dulbecco erfolgte die Inkubation mit 50 µl Sekundärantikörper: FITC-Ziege-Anti-Maus (1:50) für 60 Minuten bei RT im Dunkeln, um den primären Antikörper sichtbar zu machen. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Deckgläschen auf Objektträger mit Hilfe von ca. 40 µl Glycerol in PBS-Dulbecco, pH 8,4 befestigt. Anschließend wurden die Objektträger mit präparierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln betrachtet. Die Präparate wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Betrachtung erfolgte an dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41 mit einer Kamera von Nikon – Digital Still DXM1200 und einem Objektiv von Olympus (Vergrößerung 40x). Als

Lichtquelle diente eine Xenon Lampe mit einer Leistung von 75 W. Die Auswertung und Bildbearbeitung wurde mit dem Programm ACT-1 der Firma Nikon software (Tokyo, Japan) durchgeführt.

## **2.10 Untersuchungen mittels HPLC**

### **2.10.1 Vorbereitungen der Proben für die HPLC-Analyse**

Für die HPLC-Analyse wurden ausgewählte Proben im Zellkulturmedium gelöst. Weiterhin wurden sie in einem Brutschrank 24 Stunden inkubiert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) lyophilisiert. So erhaltene Proben wurden in mobiler Phase A gelöst. Die Proben wurden demnächst bei 4°C im Kühlschrank aufbewahren.

### **2.10.2 Bedingungen der HPLC-Analyse**

Um zu untersuchen, ob eine Inkubation von Salsolinol und GSH in der untersuchten Konzentrationen zur Entstehung anderer Substanzen führen kann, wurde es mittels HPLC nach folgendem Protokoll überprüft:

Apparatur:	Hewlett Packard, Series II, 1090 Liquid Chromatograph, Japan
Stationäre Phase:	YMC-Pack C-18, 100 x 3,0 mm, 3 µm Säule, Japan
Mobile Phase:	A: Aqua demin. /Methanol /Phosphorsäure: 975,5 : 19,5 : 1 (v/v), pH 2 B: Methanol 70%
Gradient:	0-12 min: 100% A, 0% B 12-17 min- 0% A, 100% B 17-22 min- 100% A, 0% B
Flußrate:	1,2 ml/min
Aufgabevolumen:	20 µl (in mobiler Phase A)
Detektion:	UV-Spektrum 210 nm, 280 nm
Temperatur:	RT

Die Tetrahydroisochinolinderivaten-Analytik mittels HPLC stützte sich auf dem in der Publikation von Siddhuraju und Becker (2001) beschriebenen Protokoll. Die HPLC-Konditionen wurden jedoch leicht modifiziert.

## 2.11 Statistische Beurteilung

Für die Berechnung der Ergebnisse der Assays wurden die Daten der Mehrfachdurchführungen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichung (SD) von mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Es wurde der *Student's-t*-Test angewandt, um die statistischen Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und den unbehandelten Kontrollen zu belegen. \*\*  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikantes Ergebnis angenommen.

### **3. Ergebnisse**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente lassen sich in drei Abschnitte einteilen. Der erste Abschnitt umfasst die Suche nach einem optimalen Zellkultursystem, das möglichst gut ein neuronales Gewebe unter pathologischen Bedingungen bei verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten widerspiegelt. Im zweiten Abschnitt wurden ausgewählte Naturstoffe auf ihre neuroprotektive Wirkung untersucht. Im dritten Abschnitt wurde überprüft, welche potentielle Wirkmechanismen der Substanzen mit nachgewiesener Wirksamkeit für die Wirkung verantwortlich sind.

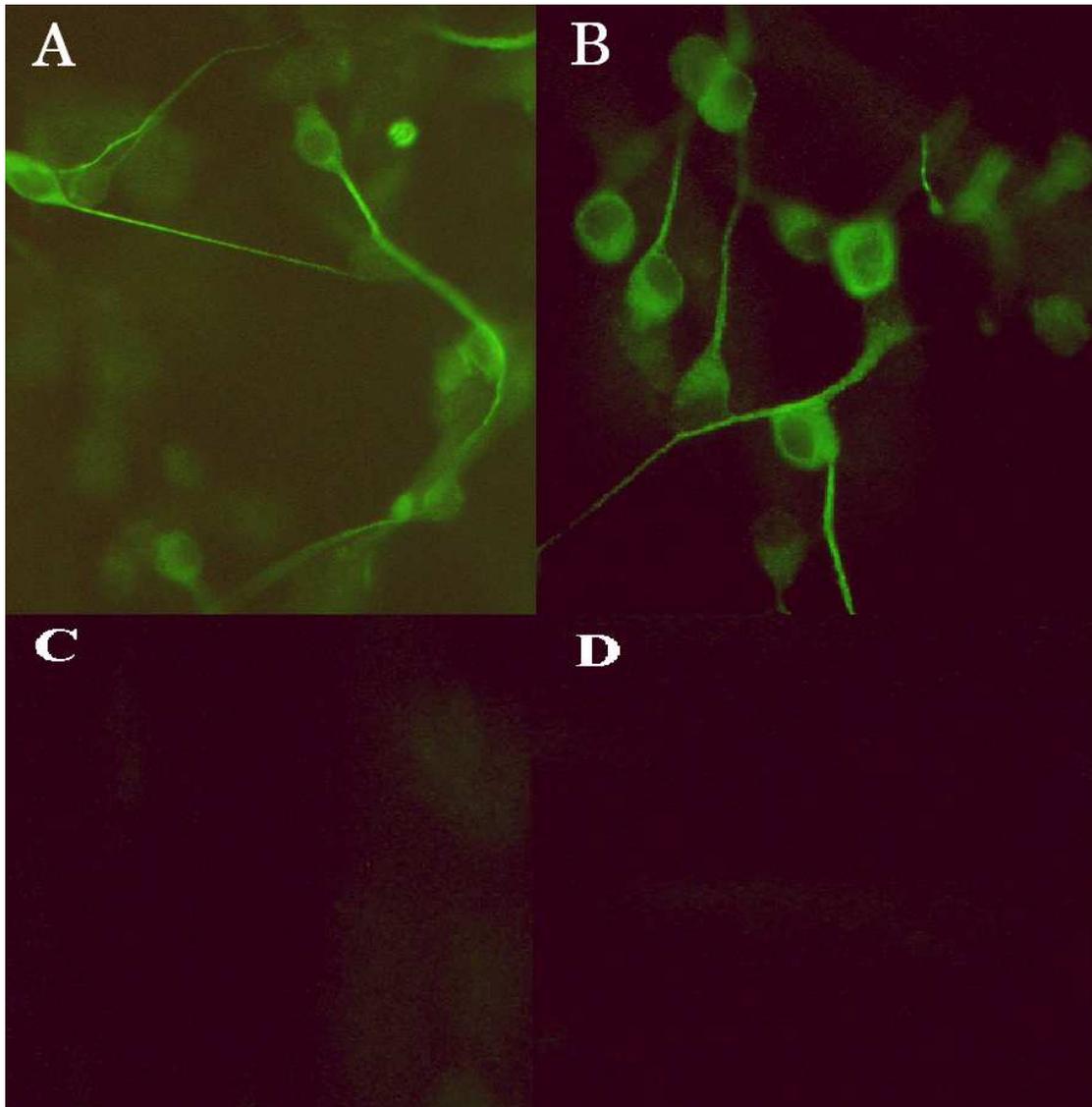
#### **3.1 Neuronale Differenzierung**

Um die neuronalen Eigenschaften in humanen Neuroblastomzelllinien SK-N-SH und SH-SY5Y zu entwickeln und damit die Reaktion auf bestimmte Neurotoxine zu modulieren, wurden die Zelllinien mit zwei verschiedenen Faktoren zur neuronalen Differenzierung angeregt. Eine der Differenzierungsmethoden für Neuroblastomzellen wurde von Obregon et al. (1997) beschrieben. Als Differenzierungsfaktor für die SK-N-SH-Zellen wurde in dieser Studie TNF- $\alpha$  verwendet. Es wird jedoch berichtet, dass eine Differenzierung von Neuroblastomzellen auch durch RA induziert werden kann (Sidell et al., 1982; Pahlmann et al., 1984;). In einem parallel laufenden Versuch wurde dem Zellkulturmedium entweder 500 U/ml TNF- $\alpha$  oder 10  $\mu$ M RA zugesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, zu denen nur Zellkulturmedium zugegeben wurde. Der Differenzierungsvorgang mit TNF- $\alpha$  wurde in 2.7.6.2 und mit RA in 2.7.6.1 beschrieben. Der Differenzierungsnachweis wurde mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Als Marker für neuronale Dendriten gilt MAP-2. Anhand seiner Expression kann überprüft werden, ob eine neuronale Differenzierung der verwendeten Zellen erfolgreich stattfand.

##### **3.1.1 Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die neuronale Differenzierung**

Durch Zugabe von 10  $\mu$ M RA nach ca. 48 Stunden begannen die beiden Neuroblastomzelllinien, an mehreren Stellen neuritenähnliche Ausläufer zu bilden und die Zellen schienen sich teilweise untereinander zu „berühren“ im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Eine Differenzierung konnte mit Hilfe der

Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Nach 6 Tagen wurde ein Immunfluoreszenzversuch (wie in 2.9 beschrieben) durchgeführt, der eine Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp bestätigte. In Abb.5 ist ein deutliches Fluoreszenzsignal für MAP-2 (grün) dargestellt. Somit konnten die mit RA-differenzierten Zellen für weitere Versuche genutzt werden.



**Abb.5:** Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen MAP-2 in SK-N-SH-Zellen (A) und in SH-SY5Y-Zellen (B), die 6 Tage mit RA (10  $\mu$ M) differenziert wurden. Die MAP-2-Immunreaktivität (grün gefärbt) konnte nur in den mit RA-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten undifferenzierten SK-N-SH-Zellen (C) und SH-SY5Y-Zellen (D). Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

### 3.1.2 Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$ auf die neuronale Differenzierung

Die für diese Arbeit verwendeten Neuroblastomzellen wurden auch in einem Zellkulturmedium, dem als Differenzierungsfaktor TNF- $\alpha$  zugesetzt wurde, inkubiert.

Danach erfolgte eine Immunfluoreszenzanalyse. Die Differenzierung von SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 500 U/ml TNF- $\alpha$  stellte sich als erfolglos heraus. Beim Betrachten der Zellen nach dem Immunfluoreszenzversuch war kein Fluoreszenzsignal zu beobachten, so dass kein Hinweis auf die neuronale Differenzierung der Neuroblastomzellen geliefert werden konnte (Abbildung nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde diese Differenzierungsmethode nicht weiter verwendet.

## **3.2 Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Tests**

Die Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften der Testsubstanzen wurde an undifferenzierten und mit RA-differenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen entsprechend dem Abschnitt 2.8.1.2 mittels MTT-Tests durchgeführt.

Zunächst wurden Wachstumsreihen angesetzt, um die optimale Zelldichte auf den 96-Well-Platten zu ermitteln. Dazu wurden Zellen in verschiedenen Konzentrationen pro Well ausgesät und auf die Platten für 24 Stunden in 200  $\mu$ l Zellkulturmedium vorinkubiert, damit eine Adhäsion erfolgen kann. Anschließend wurde nach weiteren 24 Stunden der MTT-Test durchgeführt und somit die optimale Zelldichte anhand der resultierenden Absorption bestimmt. Es wurde die Zellzahl  $8 \times 10^4$ /Well für undifferenzierte SK-N-SH-Zellen,  $3 \times 10^4$ /Well für differenzierte SK-N-SH-Zellen,  $5 \times 10^4$ /Well für undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen und  $2 \times 10^4$ /Well für differenzierte SH-SY5Y-Zellen bestimmt.

In dieser Studie wurde der Einfluss von 6-OHDA, 3-HK, QUIN, KYNA und Salsolinol auf SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen quantitativ durch die Messung der Absorption im MTT-Test untersucht. Es wurden jeweils die Mittelwerte und SD aus drei unabhängigen Experimenten mit drei parallelen Proben ermittelt.

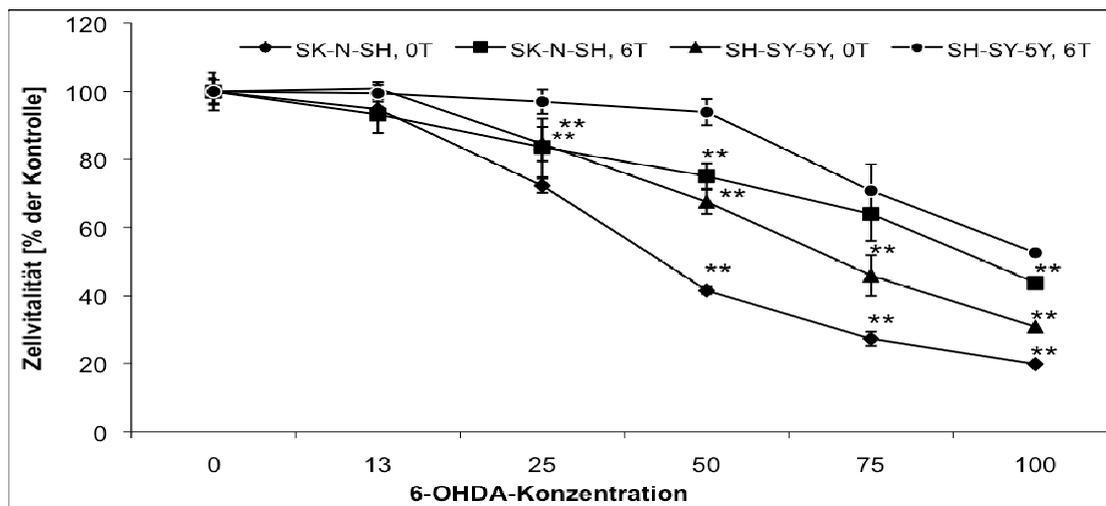
### **3.2.1 Zytotoxische Wirkung von 6-Hydroxydopamin**

#### **3.2.1.1 Einfluss von 6-Hydroxydopamin auf undifferenzierte und differenzierte SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen**

Um Zytotoxizität von 6-OHDA zu untersuchen, wurden zunächst die beiden undifferenzierten und differenzierten Neuroblastomzelllinien mit ansteigender 6-OHDA-Konzentration im Bereich von 13  $\mu$ M bis 100  $\mu$ M inkubiert.

Es konnte festgestellt werden, dass der durch 6-OHDA induzierte Zelluntergang sowohl in differenzierten als auch undifferenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen

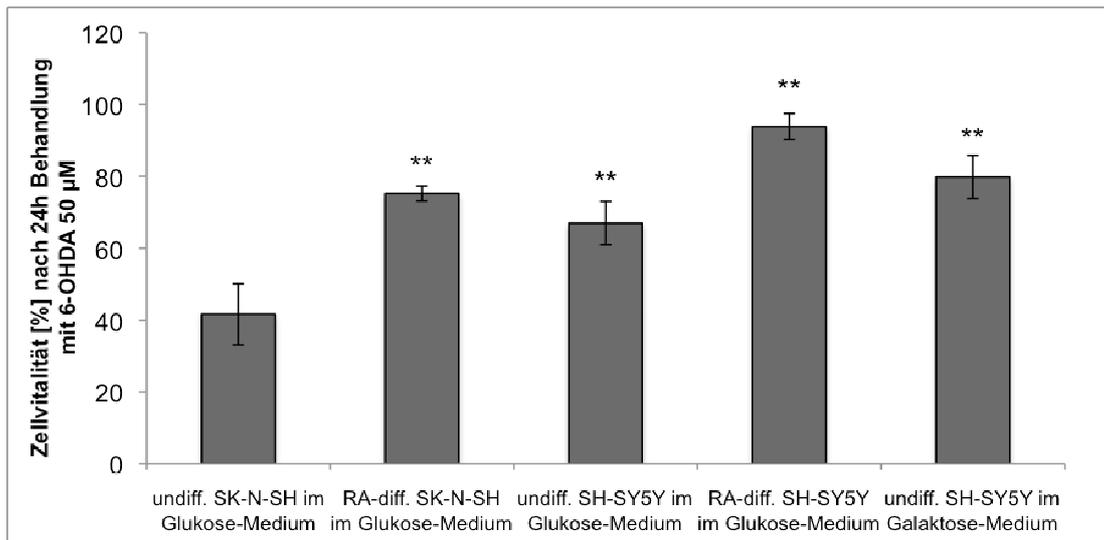
konzentrationsabhängig war. Dabei zeigte sich, dass der toxische Effekt von 6-OHDA, insbesondere auf die undifferenzierte SK-N-SH-Zellen am deutlichsten zu sehen war. Nach der Differenzierung mit RA und der Behandlung mit 6-OHDA zeigten die differenzierten SK-N-SH Zellen eine gesteigerte Resistenz gegenüber den undifferenzierten SK-N-SH-Zellen. Jedoch sind die undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen sensitiver gegenüber 6-OHDA als die differenzierten Zellen. In Abb.6 ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von 6-OHDA im MTT-Test für das entsprechende Zellmodell aufgeführt.



**Abb.6: Zytotoxische Effekte von 6-OHDA in RA-differenzierten und undifferenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 6-OHDA 24 h inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. Signifikant erniedrigte Zellvitalität ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu undifferenzierten SK-N-SH-Zellen wurde mit \*\* gekennzeichnet.

### 3.2.1.2 Einfluss von 6-Hydroxydopamin auf im Galaktose-Medium inkubierte SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Zellen wurden nach 2.7.7 im Galaktose-Medium vor der Behandlung mit 6-OHDA vorinkubiert. 6-OHDA wurde in Konzentrationen von 13  $\mu$ M bis 100  $\mu$ M auf Zelltoxizität untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Zelltoxizität in Zellen, die im Galaktose-Medium inkubiert wurden, im Vergleich zu den im Glukose-Medium inkubierten Zellen, reduziert wurde. In Abb.7 ist der Vergleich des Einflusses von 50  $\mu$ M 6-OHDA auf die Zellvitalität in verschiedenen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellmodellen gezeigt.

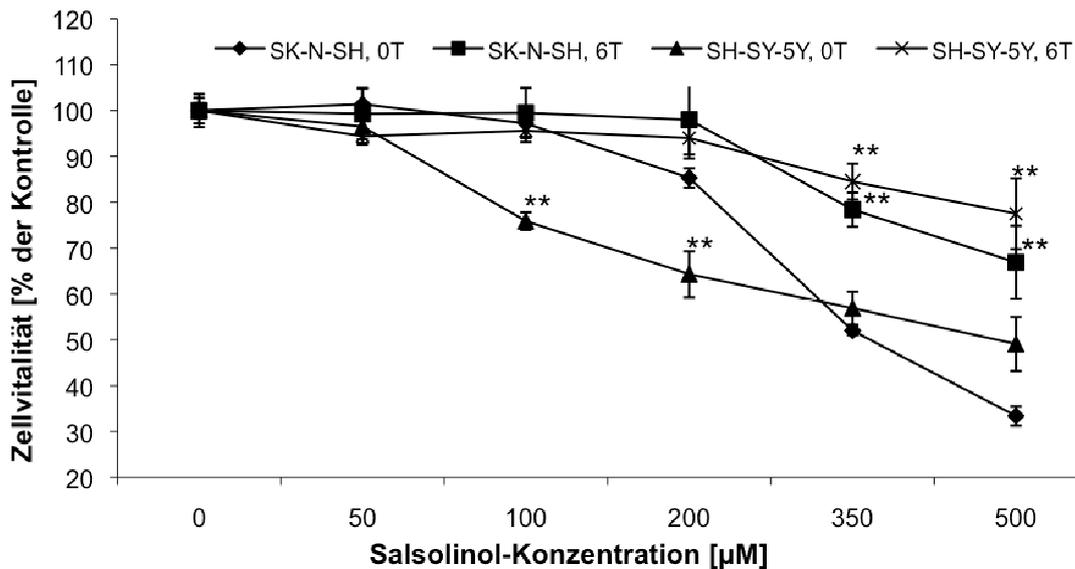


**Abb.7: Vergleich der zytotoxischen Effekte von 6-OHDA (50 µM) in im Glukose-Medium inkubierten RA-differenzierten, undifferenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen sowie im Galaktose-Medium inkubierten SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit 50 µM 6-OHDA 24 h inkubiert, anschließend wurde die Zellviitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. Signifikant erniedrigte Zellviitalität ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu undifferenzierten SK-N-SH-Zellen wurde mit \*\* gekennzeichnet.

### 3.2.2 Zytotoxische Wirkung von Salsolinol

#### 3.2.2.1 Einfluss von Salsolinol auf undifferenzierte und differenzierte SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen

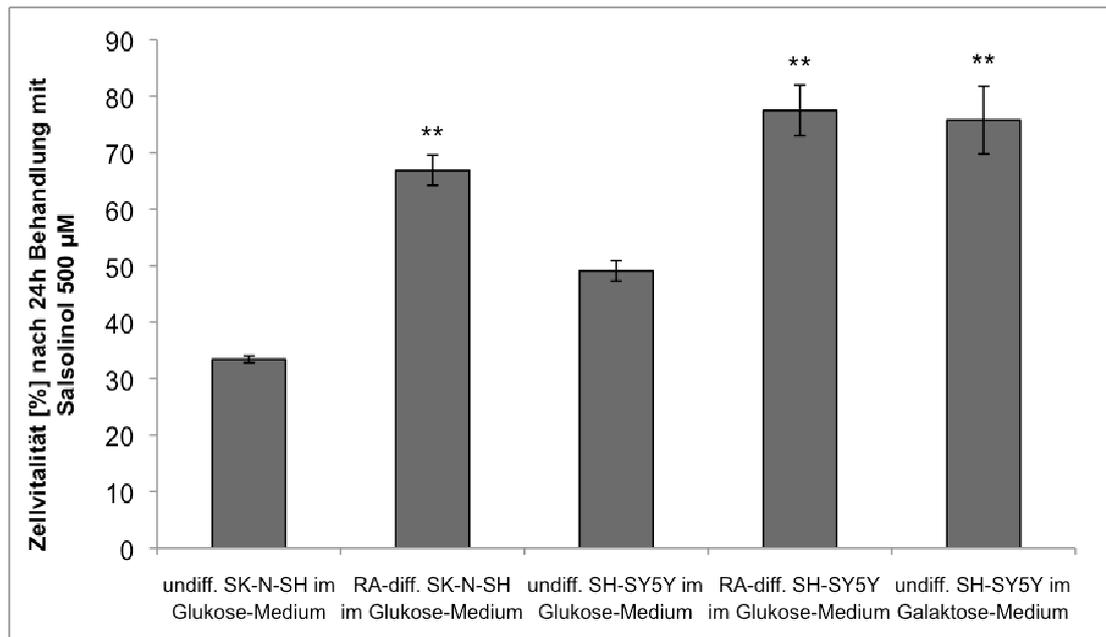
Der Effekt von Salsolinol auf die Zellproliferation wurde nach 24 Stunden Inkubation in Konzentrationen von 10 µM bis 500 µM untersucht. Das Zellwachstum wurde bei der Salsolinol-Behandlung konzentrationsabhängig in allen Zellmodellen reduziert (Abb.8). Bei der Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften des Salsolinols auf die undifferenzierten SK-N-SH-Zellen ergab sich, dass Salsolinol bei 350 µM die Zellviitalität um die Hälfte reduzierte, während die Zellproliferation bei den differenzierten Zellen nur um 20 % abnahm. Somit wies Salsolinol eine höhere Toxizität in undifferenzierten SK-N-SH-Zellen auf, so dass um die gleiche Zellproliferationsabnahme zu erreichen, niedrigere Konzentrationen von Salsolinol notwendig waren als beim differenzierten Zellmodell. Ähnliche Beobachtungen wurden bei undifferenzierten und differenzierten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen gemacht.



**Abb.8: Zytotoxische Effekte von Salsolinol in RA-differenzierten und undifferenzierten SK-N-SH- sowie SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Salsolinol 24 h inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. Signifikant erniedrigte Zellvitalität ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu undifferenzierten SK-N-SH-Zellen wurde mit \*\* gekennzeichnet.

### 3.2.2.2 Einfluss von Salsolinol auf im Galaktose-Medium inkubierte SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wurden, wie in Kapitel 2.7.7 beschrieben, vor der Behandlung mit Salsolinol inkubiert. Salsolinol wurde in Konzentrationen von 50  $\mu$ M bis 500  $\mu$ M auf Zelltoxizität untersucht. Beim Vergleich der Salsolinol-Toxizität der in Galaktose- und Glukose-Medium inkubierten SH-SY5Y-Zellen stellte sich heraus, dass der zytotoxische Effekt von Salsolinol (500  $\mu$ M) bei den im Glukose-Medium inkubierten Zellen stärker war als bei den im Galaktose-Medium inkubierten Zellen. Wie in Abb.9 zu erkennen ist, betrug die Zellviabilität der im Galaktose-Medium wachsenden SH-SY5Y-Zellen 70 % bei der Behandlung mit 500  $\mu$ M Salsolinol. Bei den im Glukose-Medium wachsenden Zellen lag die Zellviabilität bei 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

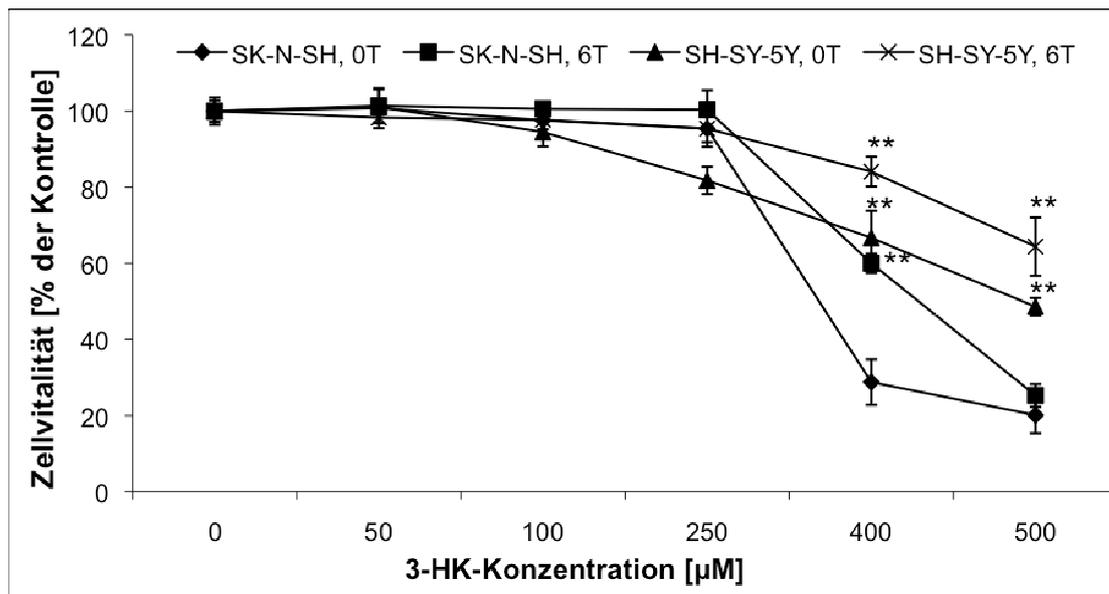


**Abb.9: Vergleich der zytotoxischen Effekte von Salsolinol (500 µM) in im Glukose-inkubierten RA-differenzierten, undifferenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen sowie im Galaktose-Medium inkubierten SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit 500 µM Salsolinol 24 h inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. Signifikant erniedrigte Zellvitalität ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu undifferenzierten SK-N-SH-Zellen wurde mit \*\* gekennzeichnet.

### 3.2.3 Zytotoxische Wirkung von 3-Hydroxykynurenin

#### 3.2.3.1 Einfluss von 3-Hydroxykynurenin auf undifferenzierte und differenzierte SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen

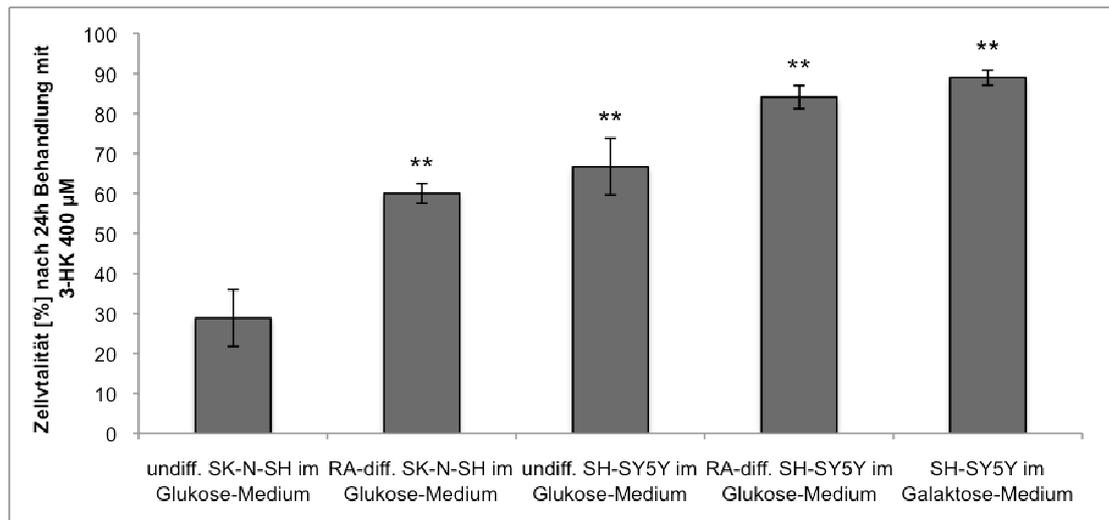
Für die undifferenzierten und differenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen wurde 3-HK bis zur Konzentration von 500 µM eingesetzt. Eine Inkubation mit 3-HK führte nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg des Zelltodes in allen untersuchten Zellmodellen und war abhängig von der Konzentration. Es ist jedoch ersichtlich, dass 3-HK eine höhere Zytotoxizität auf undifferenzierte SK-N-SH-Zellen besitzt. Bei SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen zeigten sich größere Differenzen zwischen der  $IC_{50}$  (mittlere inhibitorische Konzentration) von 3-HK. Bei undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen machte sich bei 400 µM ein Anstieg des Zellwachstums bemerkbar. In differenzierten SH-SY5Y-Zellen setzte bei 400 µM eine starke Hemmung der Zellvitalität ein. In Abb.10 ist der Vergleich des Einflusses von 400 µM 3-HK auf die Zellvitalität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellmodelle gezeigt.



**Abb.10: Zytotoxische Effekte von 3-HK in RA-differenzierten und undifferenzierten SK-N-SH- sowie SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 3-HK 24 h inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. Signifikant erniedrigte Zellvitalität ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu undifferenzierten SK-N-SH-Zellen wurde mit \*\* gekennzeichnet.

### 3.2.3.2 Einfluss von 3-Hydroxykynurenin auf im Galaktose-Medium inkubierte SH-SY5Y-Zellen

Die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wurden im Galaktose-Medium vor der Behandlung mit 3-HK vorinkubiert. 3-HK wurde in Konzentrationen von 50  $\mu$ M bis 500  $\mu$ M auf Zelltoxizität untersucht. Es wurde festgestellt, dass die durch 3-HK-vermittelte Zelltoxizität in SH-SY5Y-Zellen, die im Galaktose-Medium inkubiert wurden, reduziert ist, verglichen mit den in Glukose-Medium kultivierten Zellen. Es wurde jedoch registriert, dass in der gleichen Konzentration von 3-HK in den im Glukose-Medium kultivierten SH-SY5Y-Zellen eine Hemmung der Zellproliferation in Höhe von 35 % gemessen wurde.



**Abb.11: Vergleich der zytotoxischen Effekte von 3-HK (400 µM) in im Glukose-Medium inkubierten RA-differenzierten, undifferenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen sowie in Galaktose-Medium inkubierten SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit 400 µM 3-HK 24 h inkubiert, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. Signifikant erniedrigte Zellvitalität ( $P < 0,05$ ) im Vergleich zu undifferenzierten SK-N-SH-Zellen wurde mit \*\* gekennzeichnet.

### 3.2.4 Einfluss von Quinolinsäure und Kynureninsäure auf die Zellproliferation

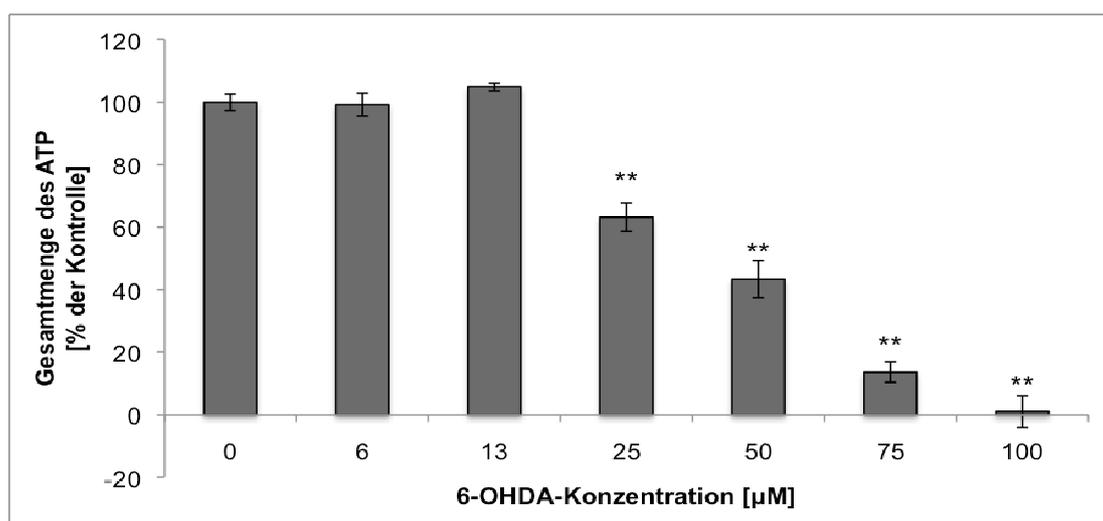
Unter den ermittelten optimierten Versuchsbedingungen wurden die Toxizitätsversuche mit weiteren Metaboliten des Kynureninwegs QUIN und KYNA, in undifferenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen, differenzierten SK-N-SH- und SH-SY5Y-Zellen sowie im Galaktose-Medium kultivierten SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Die aufgeführten Zellmodelle wurden einer seriellen Konzentrationsreihe des QUIN von 10 µM bis 500 µM, beziehungsweise der KYNA von 0,25 µM bis 500 µM exponiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zellproliferation mittels MTT-Tests gemessen. Kein signifikanter Abfall des Zellwachstums war bei den getesteten Konzentrationen zu beobachten. Ebenfalls stellte sich das Ersetzen von Glukose durch Galaktose als erfolglos heraus und es wurde damit kein Zelltod erreicht (Daten nicht aufgeführt). Da die beiden Metaboliten keinen Einfluss auf die Zellproliferation der untersuchten Zellmodelle hatten, wurde auf den Einsatz dieser Substanzen im weiteren Verlauf der Versuche verzichtet.

### 3.3 Bestimmung der Toxizität von Neurotransmitter-Metaboliten mittels ATP-Lumineszenz-Assays

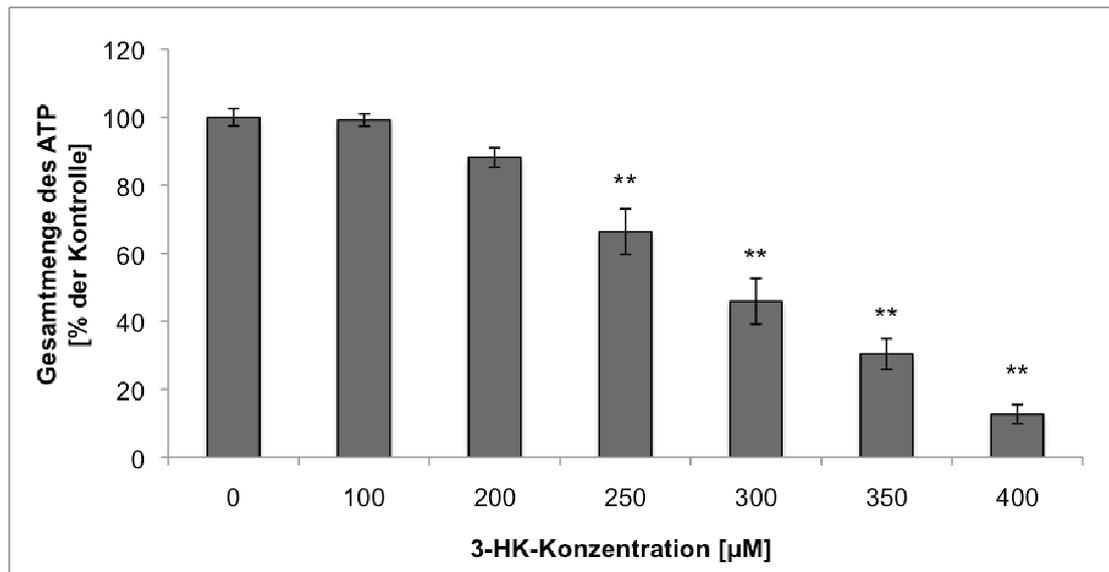
Um die Effekte von Neurotransmitter-Metaboliten (6-OHDA, 3-HK und Salsolinol) auf den intrazellulären ATP-Gehalt in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu messen, wurde der ATP-Lumineszenz-Assay nach 24-stündiger Behandlung

durchgeführt. 3-HK wurde in Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$ ; 6-OHDA in Konzentrationen von 6  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  und Salsolinol in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  untersucht.

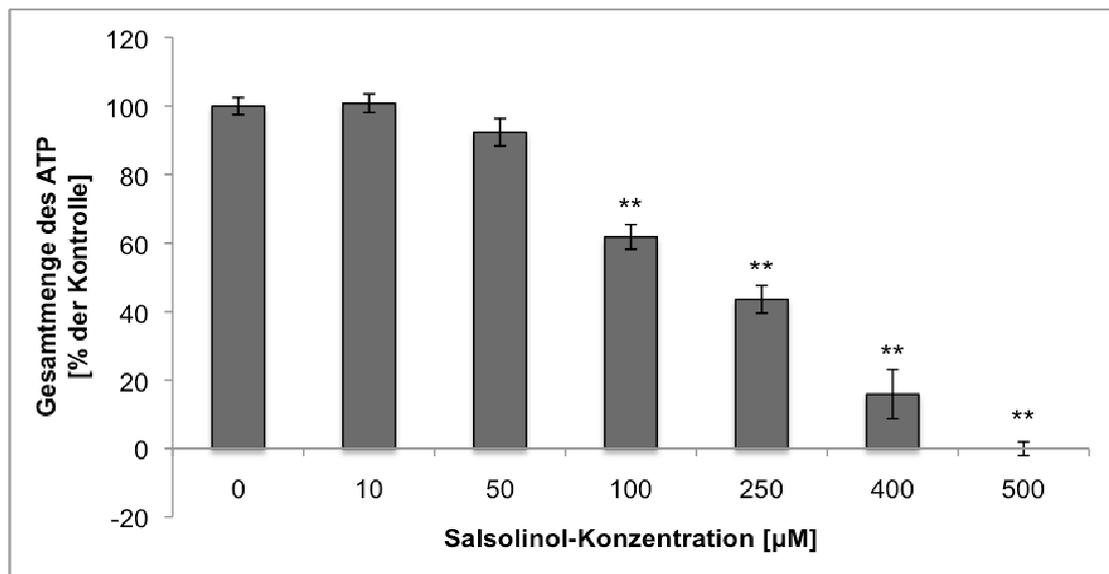
Ähnlich wie im MTT-Test ergab sich, dass Neurotransmitter-Metaboliten einen dosisabhängigen Einfluss auf SH-SY5Y-Zellen ausüben können. Neurotransmitter-Metaboliten waren in der Lage, eine intrazelluläre Senkung des ATP-Gehaltes in Neuroblastomzellen hervorzurufen. Nach 24-stündigen Inkubation mit 6-OHDA ergab sich bei Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  eine signifikant erhöhte Abnahme des ATP-Gehaltes der Zellen im Vergleich zu den Proben, die ohne 6-OHDA inkubiert wurden (Abb.12). Ebenfalls zeigte sich eine signifikant höhere Senkung des ATP-Gehaltes nach der 24-stündigen Behandlung mit 3-HK bei Konzentrationen von 250  $\mu\text{M}$  bis 400  $\mu\text{M}$  (Abb.13). Um die Gesamtmenge des ATP-Gehaltes auf 50 % zu reduzieren, wurde eine 3-HK-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  benötigt. Bei der Untersuchung von Salsolinol in Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  nach 24-stündiger Inkubation wurde auch eine signifikante Erniedrigung des ATP-Gehaltes festgestellt. Salsolinol in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  war in der Lage, den ATP-Gehalt der SH-SY5Y-Zelllinie auf 50 % zu senken. Die Ergebnisse wurden graphisch in Abb.14 dargestellt. Für die weiteren Versuche wurden solche Konzentrationen der zytotoxisch wirkenden Substanzen ausgewählt, die im Bereich der  $\text{IC}_{50}$ -Konzentrationen lagen.



**Abb.12: Effekt von 6-OHDA auf undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von 6-OHDA 24 h inkubiert, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )



**Abb.13: Effekt von 3-HK auf undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von 3-HK 24 h inkubiert, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )



**Abb.14: Effekt von Salsolinol auf undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen.** Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Salsolinol 24 h inkubiert, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.4 Einfluss von Polyphenolen auf Neurotransmitter-Metaboliten-induzierte Zytotoxizität

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse der Experimente mit folgenden Substanzen pflanzlicher Herkunft dargestellt: Amentoflavon, Apigenin, Chrysin, EGCG, Isorhamnetin, Kämpferol, Luteolin, Luteolin-7-O-Glucosid, Myricetin, Naringenin, Quercetin, Rosmarinsäure, Rutin, Saponarin, Sinensetin. Es wurde untersucht, ob die aufgeführten Polyphenole einen Einfluss auf den Neurotransmitter-

Metaboliten-vermittelten Zelltod oder auf diese Weise induzierte Senkung des ATP-Gehaltes auf die SH-SY5Y-Zellen haben. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des MTT-Tests oder des ATP-Lumineszenz-Assays ermittelt.

Zunächst wurden die Neuroblastomzellen 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Polyphenols inkubiert, um einen Konzentrationsbereich zu bestimmen, indem sie keine zytotoxische Wirkung haben. Im Folgenden wurden die Zellen nach Zusatz des ausgewählten pflanzlichen Polyphenols in Konzentrationen bis zu 50  $\mu\text{M}$  einem Vitalitätstest (MTT-Test) oder ATP-Lumineszenz-Assay unterworfen. Nachdem der Konzentrationsbereich bestimmt wurde, wurde untersucht, ob die ausgesuchten Polyphenole nach 24 Stunden gemeinsamer Behandlung mit Noxen die Fähigkeit besitzen, zytotoxische und ATP-Gehalt senkende Effekte von Neurotransmitter-Metaboliten zu reduzieren und somit protektiv auf die Zellproliferation und den ATP-Gehalt von SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wirken. Die untersuchten Konzentrationen von Polyphenolen, die für den Versuch ausgewählt wurden sowie ihrer Einfluss auf die durch Behandlung mit Neurotransmitter-Metaboliten-induzierte Zytotoxizität und Abnahme des ATP-Gehaltes, wurden in Tab.1 für den MTT-Test und Tab.2 für den ATP-Lumineszenz-Assay zusammengefasst.

**Tab.1. Einfluss von Polyphenolen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Zytotoxizität.**

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	Zellproliferation in % zur Kontrolle			
		<i>Kontrolle</i>	<i>3-HK 500 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>6-OHDA 75 <math>\mu\text{M}</math></i>	<i>Salsolinol 500 <math>\mu\text{M}</math></i>
<b>Kontrolle</b>	0	100	48,6 $\pm$ 2,3	45,9 $\pm$ 3,6	49,1 $\pm$ 1,8
<b>Apigenin</b>	1	101,2 $\pm$ 2,2	41,8 $\pm$ 0,7	46,2 $\pm$ 3,3	46,6 $\pm$ 3,2
	10	100,6 $\pm$ 0,8	43,3 $\pm$ 4,2	46,6 $\pm$ 3,7	45,9 $\pm$ 3,2
	25	87,7 $\pm$ 2,2	36,9 $\pm$ 2,6	39,9 $\pm$ 2,3	39,2 $\pm$ 1,5
	40	79,2 $\pm$ 5,3	-	-	-
<b>Amentoflavon</b>	5	105,4 $\pm$ 2,6	46,7 $\pm$ 5,4	50,2 $\pm$ 2,5	48,9 $\pm$ 1,0
	10	104,4 $\pm$ 2,5	44,6 $\pm$ 1,4	45,4 $\pm$ 2,4	51,3 $\pm$ 1,0
	25	100,4 $\pm$ 2,4	47,9 $\pm$ 4,2	47,4 $\pm$ 2,4	52,1 $\pm$ 1,0
	50	92,6 $\pm$ 2,3	-	-	-
<b>Chrysin</b>	0,5	99,8 $\pm$ 3,2	48,8 $\pm$ 1,9	44,9 $\pm$ 2,4	44,7 $\pm$ 1,5
	1	98,2 $\pm$ 5,2	51,4 $\pm$ 3,6	46,6 $\pm$ 2,5	43,1 $\pm$ 3,3
	5	93,0	40,5 $\pm$ 1,8	40,5 $\pm$ 1,2	40,4 $\pm$ 1,3
<b>EGCG</b>	5	98,6 $\pm$ 4,7	46,8 $\pm$ 1,4	47,6 $\pm$ 3,8	46,8 $\pm$ 1,9
	10	94,1 $\pm$ 6,3	40,6 $\pm$ 4,6	39,6 $\pm$ 2,0	43,0 $\pm$ 1,7
	25	75,8 $\pm$ 3,8	-	-	-

<b>Isorhamnetin</b>	0,5	102,9 ± 4,0	41,4 ± 2,6	43,4 ± 2,1	47,5 ± 2,3
	1	102,9 ± 4,0	40,7 ± 1,6	45,9 ± 1,0	47,2 ± 1,1
	5	81,8 ± 4,4	-	-	-
<b>Kämpferol</b>	5	103,1 ± 5,8	48,5 ± 2,8	48,7 ± 1,4	46,7 ± 5,4
	10	100,8 ± 1,1	49 ± 2,4	46 ± 3,6	49,7 ± 2,3
	25	98,1 ± 2,6	41,5 ± 1,8	41,2 ± 3,7	49,5 ± 2,7
	50	118,5 ± 3,6	43,9 ± 1,4	43,6 ± 3,9	50,2 ± 4,9
<b>Luteolin</b>	1	105,6 ± 6,7	49,7 ± 3,2	44,5 ± 2,8	47,4 ± 2,6
	3	106,0 ± 2,7	45,8 ± 2,3	45,4 ± 4,1	51,1 ± 5,6
	6	103,4 ± 5	<b>60,9 ± 1</b>	<b>63 ± 3,1</b>	50,6 ± 1,8
	13	102,3 ± 3,4	<b>69,1 ± 5,1**</b>	<b>74,3 ± 9,4**</b>	50,7 ± 1,7
	25	105,6 ± 3,4	<b>72,5 ± 3,2**</b>	<b>68,7 ± 4,7**</b>	45,4 ± 2,8
	50	87,1 ± 3,3	-	-	-
<b>Luteolin-7-O-Glucosid</b>	5	99 ± 2,25	47 ± 3,1	49,6 ± 2,7	46,5 ± 2,5
	10	101,1 ± 2,3	49,2 ± 3,2	52,2 ± 2,9	45,8 ± 2,5
	25	104,9 ± 2,4	50,5 ± 2,7	47,2 ± 2,6	50,8 ± 3,2
	50	96,4 ± 2,4	49,3 ± 2,8	52,3 ± 3,0	48,7 ± 4,2
<b>Myricetin</b>	5	101,3 ± 5,1	45,4 ± 2,4	47,5 ± 2,5	46,3 ± 1,9
	10	97,2 ± 4,5	43,4 ± 2,6	46,1 ± 3,8	46,9 ± 1,9
	25	86,2 ± 3,7	-	-	-
<b>Naringenin</b>	1	99,7 ± 3,6	44,1 ± 1,3	47,9 ± 1,5	49,1 ± 1,6
	5	102,0 ± 1,6	44,4 ± 2,7	51,7 ± 2,4	46,0 ± 4,6
	10	99,6 ± 2,8	42,4 ± 2,4	51,5 ± 1,2	47,0 ± 1,6
	25	102,7 ± 5,4	44,4 ± 3,8	48,6 ± 5,3	45,7 ± 4,9
	50	94,7 ± 3,4	40,2 ± 2,3	45,5 ± 5,7	39,9 ± 3,8
<b>Rosmarinsäure</b>	5	98,3 ± 3,3	50,4 ± 3,9	44,7 ± 1,6	53,2 ± 1,8
	10	100,3 ± 3,4	46,1 ± 3,8	47,5 ± 1,6	48,6 ± 1,7
	25	98,7 ± 3,7	47,0 ± 2,9	42,3 ± 1,4	48,8 ± 1,7
	50	103,6 ± 3,6	46,8 ± 3,5	44,1 ± 1,5	51,6 ± 1,8
<b>Quercetin</b>	5	100,1 ± 3,2	49,0 ± 1,2	48,8 ± 1,1	45,5 ± 1,4
	10	94,0 ± 0,5	43,2 ± 2,2	41,2 ± 1,1	40,6 ± 0,8
	20	86,8 ± 1,6	33,8 ± 1,3	32,7 ± 2,1	29,3 ± 2,1
	50	68,5 ± 6,7	-	-	-
<b>Rutin</b>	5	102,5 ± 2,2	48,7 ± 4,1	50,8 ± 3,5	44,7 ± 4,5
	10	103,1 ± 2,3	48,3 ± 1,8	50,4 ± 4,1	47,2 ± 7,7
	25	99,9 ± 2,7	47,6 ± 3,8	49,6 ± 3,5	46,0 ± 7,7
<b>Saponarin</b>	5	101,8 ± 5,5	46,9 ± 2,2	47,8 ± 2,6	48,5 ± 2,6
	10	103,8 ± 5,6	44,1 ± 2,9	48,5 ± 2,6	47,1 ± 2,0
	25	97,6 ± 5,2	43,6 ± 2,9	47,1 ± 2,6	49,5 ± 2,7
	50	92,5 ± 5	-	-	-
<b>Sinense-tin</b>	5	97,6 ± 5,2	46,7 ± 1,7	46,2 ± 2,6	49,8 ± 3,2
	10	100,6 ± 5,4	47,2 ± 3,8	47,3 ± 1,6	48,7 ± 1,5
	20	99,5 ± 5,3	44,8 ± 2,9	46,5 ± 2,9	46,6 ± 4,7

SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Polyphenolen für 1 h vorinkubiert, dann wurde der Zelltod mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

Tab.2: Einfluss von Polyphenolen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.

Substanz	Konz. [ $\mu$ M]	Gesamtmenge des ATP in % zur Kontrolle			
		<i>Kontrolle</i>	<i>3-HK 300 <math>\mu</math>M</i>	<i>6-OHDA 50 <math>\mu</math>M</i>	<i>Salsolinol 250 <math>\mu</math>M</i>
<b>Kontrolle</b>	0	100	45,9 $\pm$ 4,5	43,4 $\pm$ 2,0	43,6 $\pm$ 1,8
<b>Apigenin</b>	1	100,7 $\pm$ 1,8	43,8 $\pm$ 1,7	40,3 $\pm$ 2,9	48,2 $\pm$ 4,8
	10	101,1 $\pm$ 1,2	45,3 $\pm$ 3,2	39,5 $\pm$ 2,9	45,2 $\pm$ 4,3
	25	83,8 $\pm$ 5,6	32,2 $\pm$ 4,7	30,9 $\pm$ 5,1	35,3 $\pm$ 3,8
	40	74,1 $\pm$ 7,0	-	-	-
<b>Amento- flavon</b>	5	100,2 $\pm$ 1,3	44,6 $\pm$ 3,7	43,2 $\pm$ 3,1	46,0 $\pm$ 3,0
	10	98,6 $\pm$ 3,9	41,9 $\pm$ 7,3	40,9 $\pm$ 3,8	43,2 $\pm$ 1,9
	25	99,4 $\pm$ 2,4	45,0 $\pm$ 5,2	46,2 $\pm$ 4,9	42,1 $\pm$ 5,0
	50	85,6 $\pm$ 6,7	-	-	-
<b>Chrysin</b>	0,5	101,8 $\pm$ 1,9	45,8 $\pm$ 4,9	40,8 $\pm$ 3,5	43,7 $\pm$ 2,5
	1	98,5 $\pm$ 5,0	41,5 $\pm$ 2,6	41,5 $\pm$ 3,7	43,7 $\pm$ 5,3
	5	90,2 $\pm$	43,9 $\pm$ 2,8	44,6 $\pm$ 5,9	45,9 $\pm$ 6,8
<b>EGCG</b>	5	97,1 $\pm$ 5,4	39,8 $\pm$ 4,6	42,7 $\pm$ 4,3	44,9 $\pm$ 2,9
	10	93,8 $\pm$ 5,7	36,7 $\pm$ 3,9	38,1 $\pm$ 5,2	38,1 $\pm$ 7,2
<b>Isorha- mnetin</b>	0,5	100,1 $\pm$ 3,0	44,8 $\pm$ 1,7	46,4 $\pm$ 3,7	49,1 $\pm$ 4,5
	1	98,9 $\pm$ 3,6	42,9 $\pm$ 6,0	44,3 $\pm$ 4,7	44,1 $\pm$ 5,2
	5	83,0 $\pm$ 5,8	-	-	-
<b>Kämpfe- rol</b>	5	105,2 $\pm$ 6,2	41,1 $\pm$ 6,7	45,1 $\pm$ 5,1	43,4 $\pm$ 5,9
	10	102,2 $\pm$ 4,1	45,5 $\pm$ 3,8	43,3 $\pm$ 4,0	46,1 $\pm$ 7,8
	25	99,9 $\pm$ 3,9	45,9 $\pm$ 2,8	46,9 $\pm$ 7,0	46,6 $\pm$ 3,1
	50	116,9 $\pm$ 7,2	48,1 $\pm$ 3,5	45,0 $\pm$ 4,7	47,0 $\pm$ 6,0
<b>Luteolin</b>	1	107,1 $\pm$ 5,5	47,9 $\pm$ 4,8	48,9 $\pm$ 4,0	48,3 $\pm$ 3,8
	3	112,5 $\pm$ 4,9	50,2 $\pm$ 1,7	39,9 $\pm$ 4,9	41,6 $\pm$ 4,1
	6	116,6 $\pm$ 3,8	<b>66,1 <math>\pm</math> 4,8**</b>	<b>59,0 <math>\pm</math> 3,9**</b>	44,3 $\pm$ 4,7
	13	105,5 $\pm$ 3,4	<b>68,9 <math>\pm</math> 5,8**</b>	<b>64,3 <math>\pm</math> 4,0**</b>	48,4 $\pm$ 6,0
	25	91,4 $\pm$ 3,0	60,0 $\pm$ 1,0	52,3 $\pm$ 4,0	45,8 $\pm$ 3,2
<b>Luteolin- 7-O- Glucosid</b>	5	98,2 $\pm$ 3,9	44,0 $\pm$ 3,8	42,8 $\pm$ 3,6	45,4 $\pm$ 4,5
	10	100,6 $\pm$ 1,9	46,9 $\pm$ 5,6	43,8 $\pm$ 5,4	42,2 $\pm$ 5,9
	25	98,9 $\pm$ 4,3	45,8 $\pm$ 1,8	45,3 $\pm$ 3,9	46,7 $\pm$ 2,8
	50	94,8 $\pm$ 3,6	47,0 $\pm$ 3,4	49,1 $\pm$ 5,4	45,2 $\pm$ 5,3
<b>Myrice- tin</b>	5	98,1 $\pm$ 4,8	44,8 $\pm$ 3,8	42,8 $\pm$ 3,9	47,0 $\pm$ 3,9
	10	95,0 $\pm$ 6,9	43,2 $\pm$ 4,9	48,3 $\pm$ 4,0	44,7 $\pm$ 2,6
	25	83,6 $\pm$ 5,3	-	-	-
<b>Naringe- nin</b>	1	98,9 $\pm$ 1,6	43,8 $\pm$ 3,2	44,9 $\pm$ 6,0	44,7 $\pm$ 6,8
	5	100,0 $\pm$ 2,6	43,1 $\pm$ 4,0	49,2 $\pm$ 4,7	46,3 $\pm$ 3,8
	10	98,3 $\pm$ 1,8	47,3 $\pm$ 5,1	50,1 $\pm$ 8,2	43,1 $\pm$ 5,3
	25	101,2 $\pm$ 3,4	48,4 $\pm$ 2,0	48,2 $\pm$ 5,0	46,3 $\pm$ 3,2
	50	90,6 $\pm$ 5,8	39,0 $\pm$ 5,1	40,5 $\pm$ 7,3	38,8 $\pm$ 2,8
<b>Rosma- rinsäure</b>	5	99,2 $\pm$ 2,9	47,1 $\pm$ 2,9	47,2 $\pm$ 5,6	43,2 $\pm$ 3,8
	10	103,1 $\pm$ 5,0	44,7 $\pm$ 2,8	45,0 $\pm$ 3,9	46,8 $\pm$ 3,2
	25	99,8 $\pm$ 2,0	44,1 $\pm$ 5,2	43,0 $\pm$ 5,1	42,1 $\pm$ 2,2
	50	101,8 $\pm$ 4,0	43,1 $\pm$ 2,7	43,8 $\pm$ 3,9	44,8 $\pm$ 4,8
<b>Querce- tin</b>	5	102,9 $\pm$ 3,2	51,9 $\pm$ 2,7	53,3 $\pm$ 3,2	50,4 $\pm$ 1,9
	10	97,3 $\pm$ 1,9	47,6 $\pm$ 1,0	40,1 $\pm$ 2,4	42,7 $\pm$ 1,9
	20	86,1 $\pm$ 2,5	45,9 $\pm$ 1,3	35,8 $\pm$ 3,1	35,4 $\pm$ 3,1
<b>Rutin</b>	5	97,6 $\pm$ 1,8	45,7 $\pm$ 2,3	45,2 $\pm$ 2,5	48,2 $\pm$ 2,9
	10	99,1 $\pm$ 2,2	47,8 $\pm$ 2,8	38,5 $\pm$ 3,1	47,8 $\pm$ 4,7
	25	92,3 $\pm$ 4,2	45,5 $\pm$ 2,6	42,3 $\pm$ 3,3	41,7 $\pm$ 6,1

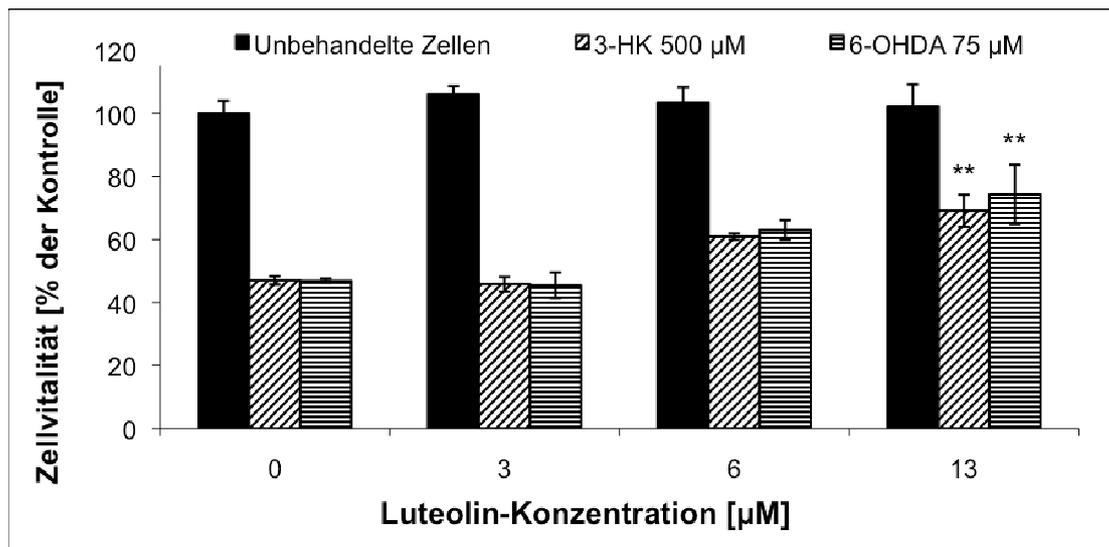
<b>Saponarin</b>	5	103,1 ± 2,5	48,1 ± 4,0	48,8 ± 5,2	43,6 ± 1,9
	10	100,6 ± 2,8	47,5 ± 4,0	44,6 ± 3,2	41,8 ± 5,2
	25	96,8 ± 4,8	42,8 ± 3,9	40,3 ± 4,0	38,4 ± 4,9
	50	90,9 ± 6,1	-	-	-
<b>Sinensetin</b>	5	102,7 ± 4,2	40,7 ± 3,1	43,1 ± 2,9	39,8 ± 6,1
	10	98,2 ± 1,1	44,3 ± 2,8	40,3 ± 3,6	40,9 ± 3,0
	20	99,9 ± 2,4	44,0 ± 1,5	42,8 ± 1,8	44,1 ± 4,7

SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Polyphenolen für 1 h vorinkubiert, dann wurde der Zelltod mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.4.1 Einfluss von Polyphenolen auf die Neurotransmitter-vermittelte Abnahme der Zellproliferation

Die Ergebnisse aus dem MTT-Test mit verschiedenen Polyphenolen zeigten, dass Luteolin in den Konzentrationen von 6  $\mu\text{M}$  bis 13  $\mu\text{M}$  das einzige Polyphenol war, das gegen die durch 6-OHDA- und 3-HK-vermittelte Abnahme der Zellproliferation wirkte. Luteolin bei einer Konzentration von 6  $\mu\text{M}$  konnte die Toxizität von 6-OHDA (75  $\mu\text{M}$ ) und 3-HK (500  $\mu\text{M}$ ) auf SH-SY5Y-Zellen aufheben und erhöhte somit die Zellproliferation. Ein signifikant schützender Effekt von Luteolin ergab sich bei einer Konzentration von 13  $\mu\text{M}$ , wo die gemessene Zellproliferation um 30 % höher war im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Eine protektive Wirkung von Luteolin gegenüber 6-OHDA- und 3-HK-induziertem Zelltod in SH-SY5Y-Zellen wurde in Abb.15 dargestellt. Der mit Salsolinol (500  $\mu\text{M}$ ) induzierte Zelluntergang konnte überraschenderweise durch Luteolin in keiner der untersuchten Konzentrationen reduziert werden.

Um feststellen zu können, ob die Polyphenole Zeit brauchen um in die Zelle einzudringen, um den protektiven Effekt zu entfalten, wurde noch ein zusätzlicher Versuch durchgeführt, indem ein Polyphenol 24 Stunden vor der Zugabe von einer toxisch wirkenden Substanz der Zellkultur zugesetzt wurde. Die Vorinkubation der SH-SY5Y-Zellen mit den ausgewählten Polyphenolen in variablen Konzentrationen hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der Zytotoxizität von Neurotransmitter-Metaboliten. Ferner konnte die protektive Wirkung von Luteolin bei keiner der untersuchten Konzentrationsstufen bei der Vorinkubation der SH-SY5Y-Zellen festgestellt werden (Daten nicht aufgeführt).



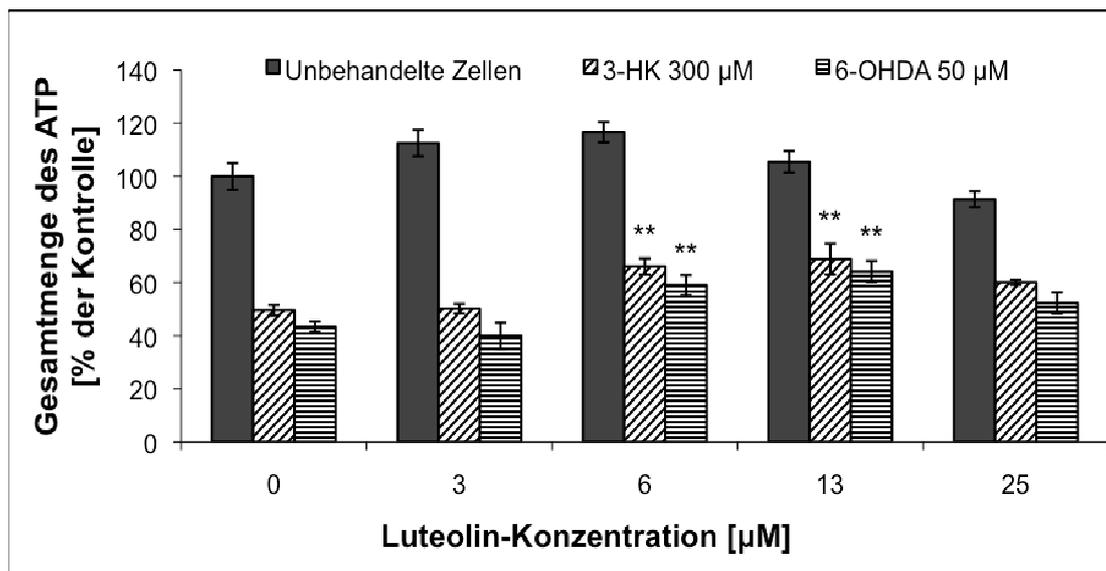
**Abb.15: Einfluss von Luteolin auf die 6-OHDA- und 3-HK-vermittelte Zytotoxizität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Luteolin für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit 6-OHDA oder 3-HK für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.4.2 Einfluss von Polyphenolen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes

Die im ATP-Lumineszenz-Assay erhaltenen Ergebnisse bestätigten, dass Luteolin als einziges Flavonoid in der Lage war, die Toxizität von 6-OHDA (50  $\mu$ M) und 3-HK 300  $\mu$ M zu unterdrücken. Für Luteolin bei einer Konzentration ab 6  $\mu$ M ergab sich ähnlich wie im MTT-Test, dass die mit 6-OHDA vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes reduziert werden konnte. Jedoch konnte für Luteolin in Konzentrationen geringer als 6  $\mu$ M keine signifikante Wirkung festgestellt werden. Eine Koinkubation mit Luteolin (6  $\mu$ M) und 6-OHDA (50  $\mu$ M) führte zum Anstieg des ATP-Gehaltes. Eine Zugabe von Luteolin in einer Konzentration von 13  $\mu$ M verstärkte sogar die schützende Wirkung. Die Abnahme des ATP-Gehaltes, die durch 3-HK in einer Konzentration von 300  $\mu$ M ausgelöst wurde, konnte auch durch Zusatz von Luteolin in einer Konzentration von 6  $\mu$ M und 13  $\mu$ M signifikant reduziert werden. Bei 3  $\mu$ M Luteolin war kein schützender Effekt gegenüber der von 6-OHDA und 3-HK-ausgelösten Abnahme des ATP-Gehaltes zu beobachten. Luteolin konnte in keiner der untersuchten Konzentrationen, ebenfalls wie im MTT-Test, die toxischen Effekte von Salsolinol vermindern.

Es konnte auch beobachtet werden, dass selbst die Zugabe von Luteolin in verschiedenen Konzentrationen einen Anstieg des mitochondrialen ATP-Gehaltes im Vergleich zu unbehandelten SH-SY5Y-Zellen bewirkt. Für Luteolin in

Konzentrationen von 3 bis 6  $\mu\text{M}$  wurde der ATP-Gehalt von 113 % und 117 % gemessen. Jedoch normalisierte sich der ATP-Gehalt nach der Behandlung mit Luteolin in einer Konzentration von 13  $\mu\text{M}$ . Auch in diesem Experiment war die Wirkung von anderen untersuchten Polyphenolen auf die ATP-Konzentration nicht auffindbar. Die erfolgreiche Wirkung von Luteolin auf 6-OHDA- und 3-HK-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen wurde in Abb.16 dargestellt.



**Abb.16: Einfluss von Luteolin auf die 3-HK- und 6-OHDA-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Luteolin für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit 3-HK oder 6-OHDA für 24 h ausgelöst, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.5 Einfluss von weiteren Stoffen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-induzierte Zytotoxizität

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst, die den Einfluss von ausgewählten physiologischen Stoffen darstellen: GSH und Natriumpyruvat auf die protektive Wirkung gegen die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Zellproliferationsenkung und die Abnahme des ATP-Gehaltes. Die Einflüsse von Natriumpyruvat und GSH auf die Reduktion der Zytotoxizität von Neurotransmitter-Metaboliten wurden in unterschiedlichen Konzentrationen bis zu 1000  $\mu\text{M}$  für 24 Stunden auf SH-SY5Y-Neuroblastomzellen untersucht.

### 3.5.1 Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme der Zellproliferation

Zunächst wurde geprüft, ob die vom Körper selbst produzierte Substanz Natriumpyruvat einen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt. Der MTT-Test zeigte keine Erhöhung der Zelltodrate nach 24 Stunden Behandlung mit Natriumpyruvat bis einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$ .

Es konnte gezeigt werden, dass Natriumpyruvat in der Lage war, die Zytotoxizität von Neurotransmitter-Metaboliten konzentrationsabhängig zu reduzieren. Die Abb. 17 zeigt, dass Natriumpyruvat in den Konzentrationen 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  einen signifikant Schutz vor Neurotransmitter-Metaboliten-induziertem Zelltod liefert. Der schützende Effekt von Natriumpyruvat war deutlicher zu sehen nach der Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit 6-OHDA und 3-HK als mit Salsolinol. Für Natriumpyruvat in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  war kein Einfluss auf die durch Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Zytotoxizität zu beobachten.

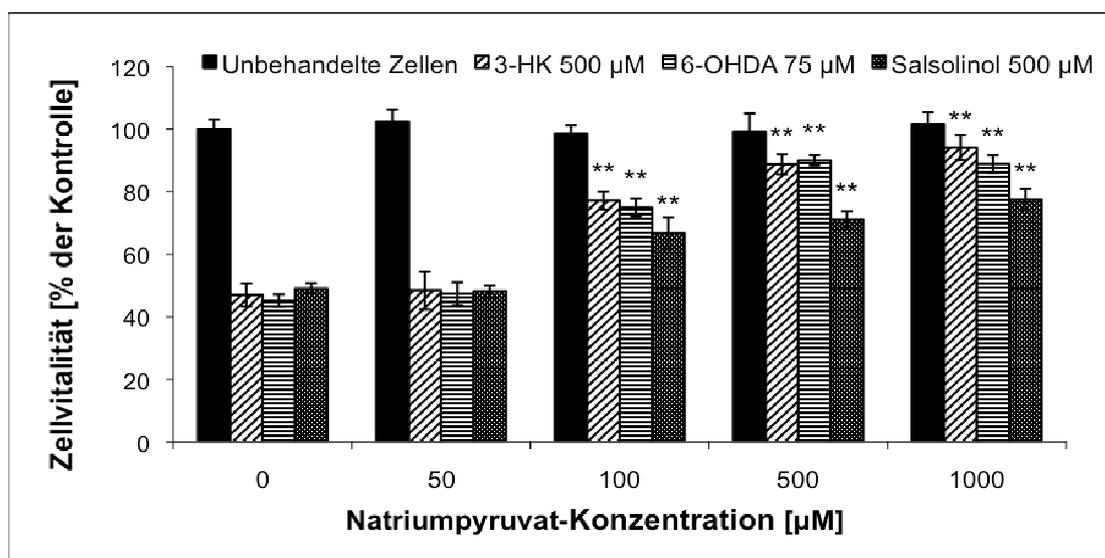
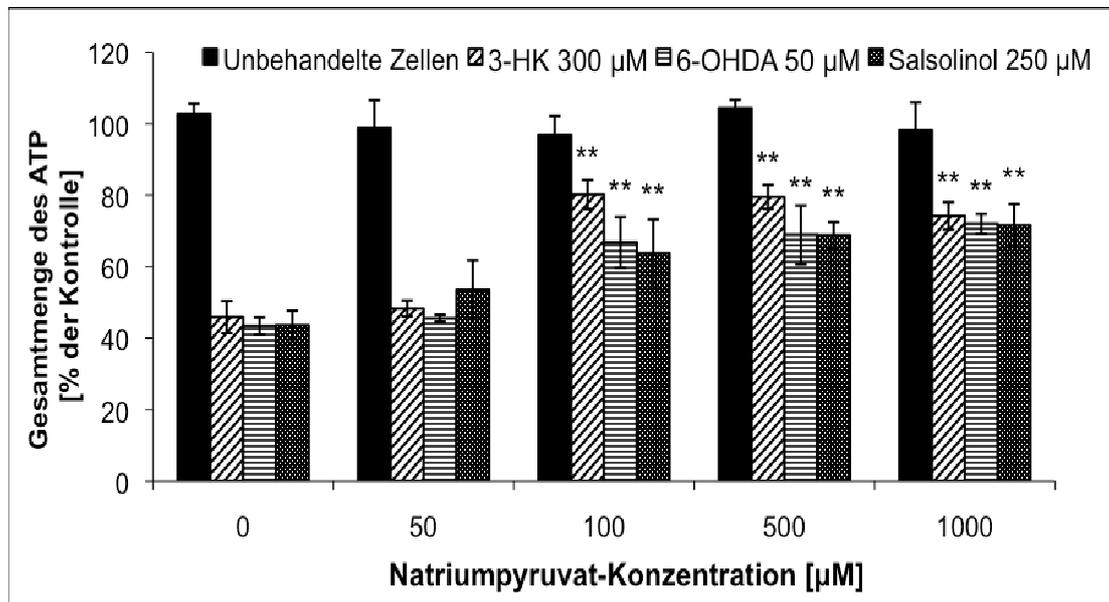


Abb.17: Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten vermittelte Zytotoxizität. SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.5.2 Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes

Zunächst wurde getestet, ob Natriumpyruvat selber in der Lage ist, den ATP-Gehalt in SH-SY5Y-Zellen zu modulieren. Mittels ATP-Lumineszenz-Assays wurde auf Änderungen des ATP-Gehaltes geprüft.

Die Ergebnisse, die mittels des ATP-Luminenz-Assays ermittelt wurden, zeigten, dass die Behandlung mit Natriumpyruvat ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ebenfalls zur Minderung der Toxizität von Neurotransmitter-Metaboliten führte. Natriumpyruvat inhibierte signifikant in den Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  die toxischen Effekte von 6-OHDA (50  $\mu\text{M}$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der ATP-Gehalt stieg signifikant bei Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat in Anwesenheit von 3-HK (300  $\mu\text{M}$ ). Hingegen hatte Natriumpyruvat (50  $\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss auf die 3-HK-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes in SH-SY5Y-Zellen. Interessantweise führte eine Steigerung der Natriumpyruvat-Konzentration nicht zu einer entsprechenden Erhöhung des ATP-Gehaltes. Bereits eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat reichte aus, um einen leichten Schutz gegen Salsolinol hervorzurufen. Eine Steigerung der Konzentration von Natriumpyruvat bewirkte weiteren Rückgang der Salsolinol-Toxizität. Ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  scheint Natriumpyruvat eine maximale Wirkung erreicht zu haben. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Neurotransmitter-Metaboliten in Anwesenheit von Natriumpyruvat ist in Abb.18 dargestellt.

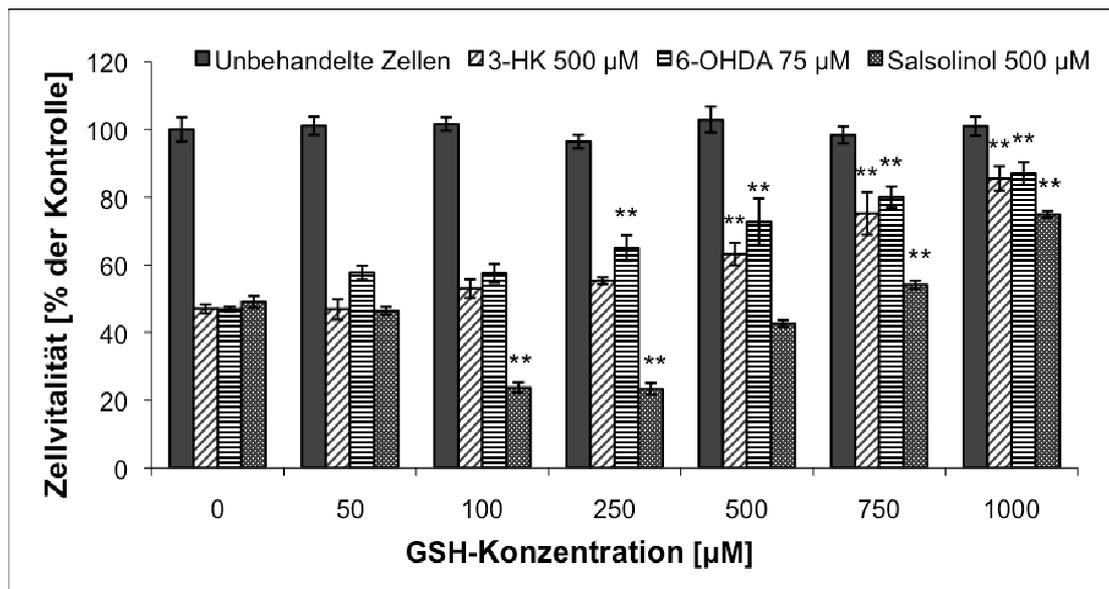


**Abb.18: Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### **3.5.3 Einfluss von Glutathion auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme der Zellproliferation**

Zuerst wurde geprüft, ob GSH selber in den ausgewählten Konzentrationen eine statistisch relevante Wirkung auf das Proliferationsverhalten der SH-SY5Y-Zellen zeigt. Bei den Versuchsansätzen wurden GSH-Konzentrationen von 0; 50; 100; 250; 500; 750; 1000  $\mu\text{M}$  eingesetzt. In den aufgeführten Konzentrationen konnte kein Einfluss auf die Zellvitalität beobachtet werden.

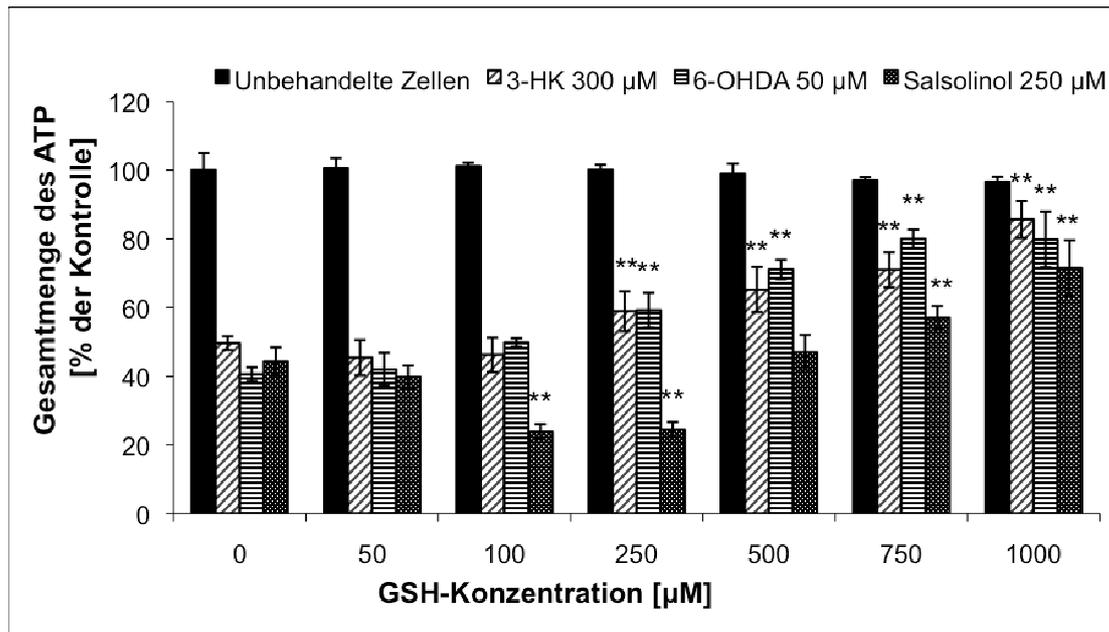
Interessanterweise verstärkte sich die Senkung der Zellproliferation nach 24 Stunden gemeinsamer Behandlung von Salsolinol 500  $\mu\text{M}$  und GSH im Konzentrationsbereich 100-250  $\mu\text{M}$  (Abb.19). Salsolinol inhibierte die Formazanbildung in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle, während nach der Zugabe von GSH (100-250  $\mu\text{M}$ ) der toxischen Effekt noch deutlicher in Erscheinung trat. Im Gegensatz zu niedrigen GSH-Konzentrationen (100-250  $\mu\text{M}$ ) machte sich bei der Salsolinol-Behandlung (500  $\mu\text{M}$ ) und GSH von 750 bis 500  $\mu\text{M}$  ein Anstieg der Zellproliferation bemerkbar. Unter Verwendung von 6-OHDA (75  $\mu\text{M}$ ) und 3-HK (500  $\mu\text{M}$ ) wurde getestet, ob GSH den zytotoxischen Effekt von Neurotransmitter-Metaboliten und damit die MTT-Umsetzung beeinflussen kann. Es ergab sich, dass die Behandlung mit 3-HK oder 6-OHDA in Anwesenheit von GSH keine verstärkte Toxizität gegenüber den Einzelsubstanzen bei keiner der untersuchten Konzentrationen verursachte. Ferner setzte ab einer GSH-Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  eine starke Hemmung der Toxizität ein. Die Koinkubation von 3-HK oder 6-OHDA mit GSH in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  verhinderte signifikant den Abfall des Zellwachstums. Im MTT-Test zeigte sich, dass GSH konzentrationsabhängig vor 3-HK- und 6-OHDA-induziertem Zelltod schützte.



**Abb.19: Einfluss von GSH auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Zytotoxizität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von GSH für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.5.4 Einfluss von Glutathion auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes

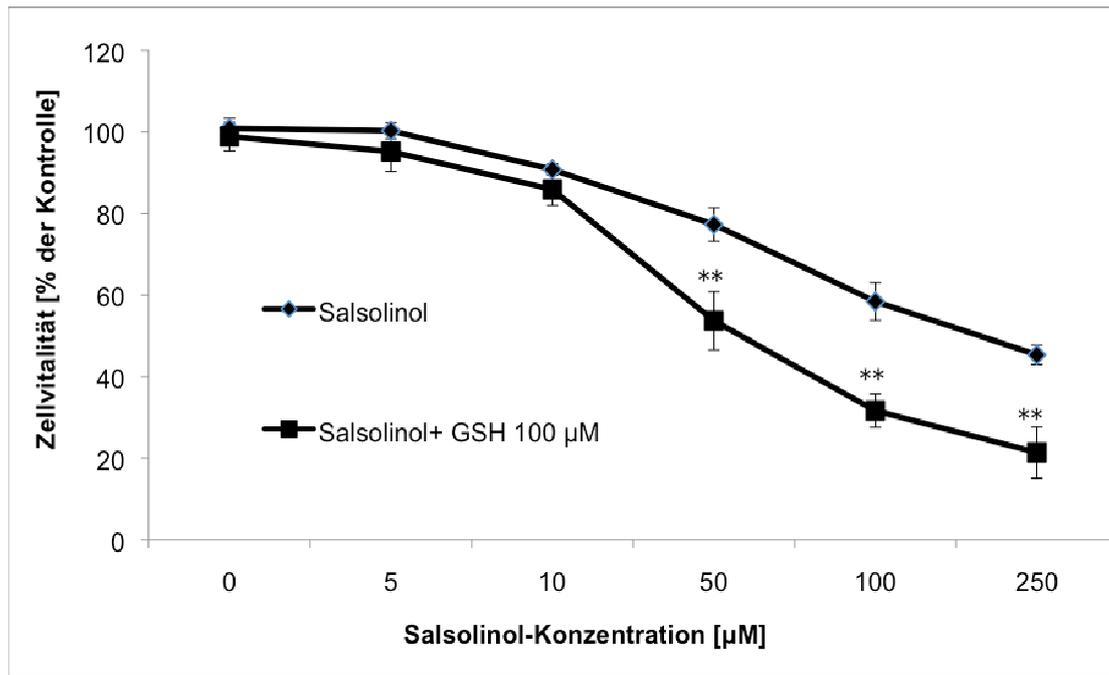
Eine Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von GSH (0; 50; 100; 250; 500; 750; 1000  $\mu$ M) konnte den ATP-Gehalt in SH-SY5Y-Zellen nicht beeinflussen und die Gesamtmenge an ATP blieb unverändert. Der durch 3-HK in einer Konzentration von 300  $\mu$ M reduzierte ATP-Gehalt konnte während der Behandlung mit GSH beginnend mit 250  $\mu$ M erhöht werden. Signifikant nahm der ATP-Gehalt nach der Inkubation mit GSH in einer Konzentration von 1000  $\mu$ M in Anwesenheit von 3-HK (300  $\mu$ M) zu. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Inkubation mit 50  $\mu$ M 6-OHDA gemacht. Der Zusatz von GSH in einer Konzentration von 250  $\mu$ M hob den ATP-Gehalt an. Sowohl bei der 3-HK- als auch bei der 6-OHDA-Behandlung wurde der ATP-Gehalt durch GSH auf vergleichbarem Niveau wieder hergestellt. Der Effekt von verschiedenen Konzentrationen von GSH auf den ATP-Gehalt in 3-HK- und 6-OHDA-behandelten SH-SY5Y-Zellen wird in Abb.20 gezeigt. Ähnlich wie im MTT-Test war deutlich zu erkennen, dass die Inkubation mit Salsolinol (250  $\mu$ M) und GSH in Konzentrationen zwischen 100-250  $\mu$ M eine deutliche Abnahme an ATP-Gehalt verursachte. Weiterhin bewirkte eine Steigerung der GSH-Konzentration auf 1000  $\mu$ M eine deutliche Erhöhung des ATP-Gehaltes in den Salsolinol-induzierten SH-SY5Y-Zellen auf 72 % der Kontrolle.



**Abb.20: Einfluss von 100 µM GSH auf die Salsolinol vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit GSH 100 µM für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Salsolinol für 24 h ausgelöst, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.5.5 Einfluss von Glutathion auf die Salsolinol-vermittelte Abnahme der Zellproliferation

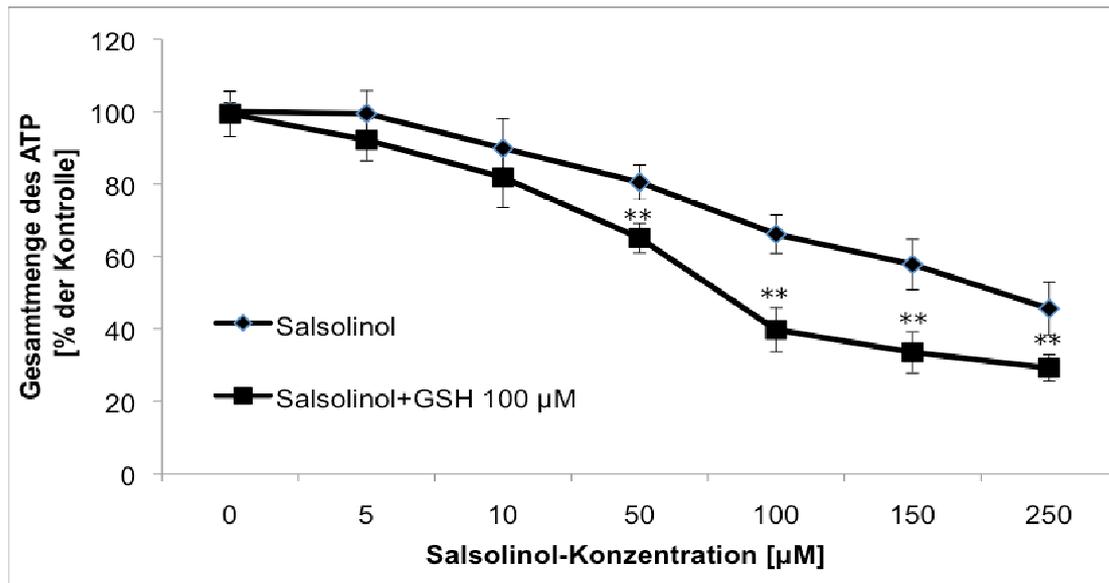
Aus den in Abschnitten 3.5.3 und 3.5.4 dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass GSH in der Lage ist, die Salsolinol induzierte Zytotoxizität zu verstärken. Als nächstes sollte untersucht werden, ob eine Zugabe von GSH (100 µM) auch bei niedrigeren Konzentrationen von Salsolinol zur Verstärkung der zytotoxischen Effekte führt. Aus diesem Grund wurden die SH-SY5Y-Zellen mit Salsolinol im Konzentrationsbereich von 5 µM bis 250 µM in Anwesenheit von GSH (100 µM) und ohne Zugabe von GSH behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zellproliferation mittels MTT-Tests gemessen und danach eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt (Abb.21). Es konnte beobachtet werden, dass das Exponieren der Zellen gegenüber niedrigeren Konzentrationen von Salsolinol mit Zusatz von GSH (100 µM) zum deutlichen Abfall des Zellwachstums führt. Bei steigenden Salsolinol-Konzentrationen in Anwesenheit von GSH (100 µM) zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Zellproliferation. Eine signifikante zytotoxische Wirkung in SH-SY5Y-Zellen war schon bei Salsolinol in einer Konzentration von 100 µM zu beobachten.



**Abb.21: Einfluss von GSH (100 µM) auf Salsolinol vermittelte Zytotoxizität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit GSH (100 µM) für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Salsolinol für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.5.6 Einfluss von Glutathion auf die Salsolinol-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Salsolinol im Konzentrationsbereich von 5 µM bis 250 µM in Anwesenheit von GSH (100 µM) und in Abwesenheit von GSH behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Gesamtmenge an ATP mittels ATP-Lumineszenz-Assays gemessen und danach eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt (Abb.22). Beim ATP-Lumineszenz-Assay ergab sich, dass auch niedrige Konzentrationen von Salsolinol in Anwesenheit von GSH (100 µM) verstärkte Effekte auf den ATP-Gehalt in SH-SY5Y-Zellen ausüben. Eine deutliche zytotoxische Wirkung setzte schon bei 50 µM Salsolinol in Anwesenheit von 100 µM GSH ein.



**Abb.22: Einfluss von GSH auf die Salsolinol-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von GSH für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Salsolinol für 24 h ausgelöst, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.6 Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Neurotransmitter-Metaboliten-induzierte Zytotoxizität

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse der Experimente mit ausgewählten Pflanzenextrakten auf die Zellproliferation zusammengefasst. Für die Versuche wurden solche Pflanzen ausgewählt, denen entweder in der Volksmedizin eine positive Wirkung auf ZNS oder auf Gedächtnis zugeschrieben wird oder solche, die Luteolin enthalten (Adams et al., 2007). Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Pflanzenextrakten, die entsprechend dem Abschnitt 2.6 hergestellt wurden, inkubiert und auf mögliche toxische Wirkungen überprüft. Von den Augentrostkraut-Extrakten wurden Konzentrationen von 5-1000 µg/ml, vom Artischockenextrakt Konzentrationen von 1-500 µg/ml verwendet. Der Sellerieblätter-Extrakt wurde im Konzentrationsbereich 5-500 µg/ml untersucht.

#### 3.6.1 Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme der Zellproliferation

Das Zellüberleben wurde mit dem MTT-Test ausgewertet. Aufgrund der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für die erhaltenen Pflanzenextrakte wurde die Absorption für DMSO-behandelte Zellen als negative Kontrolle gemessen, der

Mittelwert davon berechnet und als 100 % festgelegt. Keiner der Extrakte hatte einen toxischen Einfluss im untersuchten Konzentrationsbereich auf die Zellproliferation in SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit entsprechenden Extrakten in Anwesenheit von 3-HK (500  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA (75  $\mu\text{M}$ ) oder Salsolinol (500  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und im Anschluss wurde die MTT-Reduktion gemessen. Es ergab sich, dass die Toxizität, welche durch 3-HK (500  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA (75  $\mu\text{M}$ ) oder Salsolinol (250  $\mu\text{M}$ ) in Neuroblastomzellen induziert wurde, durch keinen Extrakt in keiner der untersuchten Konzentrationen aufgehoben werden konnte (Daten nicht aufgeführt).

### **3.6.2 Einfluss von Pflanzenextrakten auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes**

Der ATP-Gehalt wurde mit dem ATP-Lumineszenz-Assay ausgewertet. Als negative Kontrolle wurde die Lumineszenz für DMSO-behandelte Zellen vermessen, der Mittelwert davon berechnet und als 100 % festgelegt. Keiner der Extrakte hatte einen toxischen Einfluss auf den ATP-Gehalt im untersuchten Konzentrationsbereich in SH-SY5Y-Zellen aufgewiesen. Als nächstes wurden die Zellen 24 Stunden mit entsprechenden Extrakten in Anwesenheit von 3-HK (300  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA (50  $\mu\text{M}$ ) oder Salsolinol (250  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und im Anschluss wurde der ATP-Lumineszenz-Assay durchgeführt. Es ergab sich, dass die Toxizität, welche durch 3-HK (300  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA (50  $\mu\text{M}$ ) oder Salsolinol (250  $\mu\text{M}$ ) in Neuroblastomzellen induziert wurde, durch keinen Extrakt in keiner der untersuchten Konzentrationen verringert werden konnte (Daten nicht aufgeführt).

## **3.7 Einfluss von Flavonoid-Nanokristallen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-induzierte Zytotoxizität**

Um eine Verbesserung der Zufuhr von Flavonoiden in die Zellen zu schaffen, wurden in dieser Arbeit auch Experimente mit Flavonoid-Nanokristallen durchgeführt. Der Grund dafür ist die Tatsache, dass unter Verwendung der Nanotechnologie es möglich ist, eine erhöhte Löslichkeit, Stabilität und eine kleinere Partikelgröße von Flavonoiden zu bekommen. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass eine Untersuchung auf Zellproliferation mittels MTT-Tests unmöglich ist. Vermutlich störten die untersuchten Flavonoid-Nanokristalle bei der Bestimmung mit dem MTT-Test. Aus diesem Grund wurde ausschließlich der Einfluss auf den ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays durchgeführt.

### **3.7.1 Einfluss von Flavonoid-Nanokristallen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes**

Für die folgenden Versuche wurden zwei Flavonoide ausgewählt, die laut der Literatur einen signifikanten Zellschutz liefern. Es wurden Nanokristalle mit verschiedenen Partikelgrößen hergestellt. Für Rutin betrug ein Partikeldurchmesser 1500 nm. Für Quercetin betrug ein Partikeldurchmesser 1500 nm; 602 nm; 489 nm; 275 nm; 217 nm und 172 nm. Nanokristalle von Rutin wurden in einer Konzentration von 2 % hergestellt. Nanokristalle von Quercetin wurden dagegen in Konzentrationen von 0,02 %; 0,2 % und 2 % hergestellt. Beide Nanokristalle wurden zu SH-SY5Y-Zellen in folgenden Volumen zugesetzt: 1 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl.

Zunächst wurden die Nanokristalle 24 Stunden inkubiert. Danach wurde anhand des ATP-Lumineszenz-Tests überprüft, ob die Nanokristalle in den untersuchten Konzentrationen zytotoxische Effekte aufweisen. Auch die Compound-Formulierung, deren Zusammensetzung im Abschnitt 2.4.4 beschrieben wurde, in der die Nanokristalle suspendiert wurden, wurde auf zytotoxische Effekte untersucht. Es ergab sich, dass der Abfall des ATP-Gehaltes schon bei 100 µl der Compound-Formulierung (ca. 10 %) auftrat.

Rutin-Nanokristalle (2 %), die mit Zellkulturmedium verdünnt wurden, wiesen in keiner der untersuchten Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt auf Neuroblastomzellen auf. Eine Senkung des ATP-Gehaltes trat nur bei 100 µl der Nanokristalle von Rutin auf (ca. 11 %). Die Ergebnisse wurden in Tab.3 dargestellt. Die Nanokristalle von Quercetin (2 %, Partikeldurchmesser 1500 nm) zeigten sich als toxischer im Vergleich zu Nanokristallen von Rutin. Die Nanokristalle von Quercetin (2 %) mit Partikeldurchmesser 602 nm; 489 nm; 275 nm; 217 nm und 172 nm zeigten sich als nicht weniger zytotoxisch (Tab.4). Weiterhin wurden verdünnte Nanokristalle von Quercetin untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich, dass die verdünnten Nanokristalle von Quercetin (0,2 %; 0,02 %) keine signifikante Zunahme des ATP-Gehaltes bewirkten.

Als nächstes wurde untersucht, ob Nanokristalle von Quercetin und Rutin einen Schutz vor Neurotransmitter-Metaboliten-induziertem Zelltod liefern können. Keine der Nanokristalle konnte in den getesteten Konzentrationen eine Senkung des ATP-Gehaltes durch Zugabe von Neurotransmitter-Metaboliten aufheben. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, dass die festgestellte Abnahme des ATP-Gehaltes mit der Partikelgröße zusammenhängte.

**Tab.3: Einfluss von Rutin-Nanokristallen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.**

Partikel-Größe [nm]	V [µl]	Konz.	Gesamtmenge des ATP in % zur Kontrolle			
			<i>Kontrolle</i>	<i>3-HK 300 µM</i>	<i>6-OHDA 50 µM</i>	<i>Salsolinol 250 µM</i>
<b>Kontrolle</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	100	47,5 ± 3,7	46,3 ± 5,7	44,8 ± 3,0
<b>Comp.-Form.</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	100,0 ± 3,1	-	-	-
	<b>20</b>	<b>0</b>	98,1 ± 5,0	-	-	-
	<b>50</b>	<b>0</b>	101,4 ± 1,2	-	-	-
	<b>100</b>	<b>0</b>	87,9 ± 3,1	-	-	-
<b>1500</b>	<b>0,5</b>	<b>80 µM</b>	103,1 ± 2,5	45,6 ± 2,8	42,1 ± 4,9	45,7 ± 4,9
	<b>1</b>	<b>0,16mM</b>	100,7 ± 1,5	44,3 ± 5,4	41,4 ± 4,9	41,2 ± 5,7
	<b>20</b>	<b>3,3mM</b>	101,5 ± 5,6	45,3 ± 4,3	44,2 ± 1,9	44,1 ± 3,9
	<b>50</b>	<b>8,2mM</b>	94,9 ± 6,3	43,1 ± 4,5	43,1 ± 4,0	42,4 ± 5,4
	<b>100</b>	<b>16,4mM</b>	84,2 ± 7,1	<b>29,4 ± 6,1**</b>	<b>31,0 ± 0,3**</b>	<b>27,5 ± 2,7**</b>

SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Rutin-Nanokristallen für 1 h vorinkubiert und dann die Abnahme des ATP-Gehaltes mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. V-Zugegebene Menge von Compound-Formulierung; Konz.-Rutin-Konzentration; Comp.-Form.-Compound-Formulierung. \*\* ( $P < 0,05$ )

**Tab.4: Einfluss von Quercetin-Nanokristallen auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.**

Partikel-Größe [nm]	V [µl]	Konz.	Gesamtmenge des ATP in % zur Kontrolle			
			<i>Kontrolle</i>	<i>3-HK 300 µM</i>	<i>6-OHDA 50 µM</i>	<i>Salsolinol 250 µM</i>
<b>Kontrolle</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	100	47,5 ± 3,7	46,3 ± 5,7	44,8 ± 3,0
<b>Comp.-Form.</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	100,0 ± 3,1	-	-	-
	<b>20</b>	<b>0</b>	98,1 ± 5,0	-	-	-
	<b>50</b>	<b>0</b>	101,4 ± 1,2	-	-	-
	<b>100</b>	<b>0</b>	87,9 ± 3,1	-	-	-
<b>183</b>	<b>1</b>	<b>3 µM</b>	101,3 ± 3,2	49,3 ± 3,9	43,1 ± 5,8	52,1 ± 2,7
	<b>20</b>	<b>60 µM</b>	99,2 ± 2,1	47,2 ± 2,6	43,9 ± 6,6	43,7 ± 5,4
	<b>50</b>	<b>150 µM</b>	95,3 ± 0,9	46,8 ± 2,3	42,7 ± 6,1	45,8 ± 2,9
	<b>100</b>	<b>300 µM</b>	<b>62,3 ± 6,3**</b>	<b>4,6 ± 1,6**</b>	38,6 ± 7,5	46,1 ± 4,3
<b>183</b>	<b>1</b>	<b>30 µM</b>	100,0 ± 3,2	50,0 ± 2,3	38,1 ± 6,2	45,7 ± 0,9
	<b>20</b>	<b>600 µM</b>	96,2 ± 1,0	48,9 ± 1,9	38,9 ± 8,8	45,4 ± 7,8

	50	1,5mM	92,5 ± 2,7	<b>27,9 ± 4,9**</b>	45,6 ± 9,9	45,4 ± 1,5
	100	3mM	69,3 ± 8,4	49,9 ± 1,1	41,7 ± 7,2	29,4 ± 6,7
172	1	0,3mM	99,5 ± 4,1	43,4 ± 4,5	63,7 ± 4,6	<b>23,8 ± 2,9**</b>
	20	6mM	91,5 ± 1,4	<b>29,0 ± 8,9**</b>	53,8 ± 11,9	<b>11,9 ± 6,9**</b>
	50	15mM	75,5 ± 5,6	<b>10,0 ± 6,2**</b>	39,6 ± 20,2	<b>7,13 ± 1,5**</b>
	100	30mM	9,9 ± 2,1	0	<b>2,9 ± 3,1**</b>	0
217	1	0,3mM	95,9 ± 5,7	48,0 ± 4,3	47,8 ± 5,3	<b>24,4 ± 2,6**</b>
	20	6mM	94,1 ± 3,3	46,1 ± 5,4	45,2 ± 8,3	<b>15,2 ± 1,7**</b>
	50	15mM	85,0 ± 3,2	38,6 ± 2,3	<b>17,7 ± 2,7**</b>	<b>5,9 ± 0,9**</b>
	100	30mM	69,1 ± 7,1	31,4 ± 1,0	<b>6,7 ± 1,8**</b>	<b>6,6 ± 3,1**</b>
286	1	3µM	99,7 ± 1,6	50,0 ± 3,6	38,1 ± 4,3	47,1 ± 3,5
	20	60µM	99,5 ± 5,3	47,2 ± 3,1	52,8 ± 2,9	44,55 ± 6,3
	50	150µM	94,3 ± 2,1	42,1 ± 5,0	45,2 ± 7,2	43,3 ± 0,2
	100	300µM	77,7 ± 7,2	33,7 ± 2,1	<b>20,4 ± 3,8**</b>	32,9 ± 1,5
286	1	30µM	99,7 ± 1,6	34,1 ± 3,0	41,8 ± 2,6	54,7 ± 8,2
	20	600µM	98,2 ± 0,4	47,1 ± 3,0	43,8 ± 6,0	43,3 ± 4,5
	50	1,5mM	96,1 ± 0,8	54,2 ± 5,9	50,7 ± 5,8	47,5 ± 3,6
	100	3mM	91,1 ± 1,9	52,6 ± 7,0	44,3 ± 8,7	44,0 ± 1,4
275	1	0,3mM	100,7 ± 5,2	63,1 ± 4,9	45,1 ± 2,0	<b>31,3 ± 1,9**</b>
	20	6mM	90,3 ± 8,2	47,3 ± 5,3	40,9 ± 3,3	<b>20,9 ± 1,3**</b>
	50	15mM	92,7 ± 4,5	42,4 ± 1,6	<b>41,1 ± 2,5</b>	<b>13,2 ± 1,3**</b>
	100	30mM	80,1 ± 9,1	43,7 ± 4,8	<b>29,6 ± 2,4**</b>	<b>3,4 ± 2,4**</b>
426	1	3µM	99,6 ± 2,5	49,6 ± 5,8	41,8 ± 2,8	58,1 ± 5,9
	20	60µM	97,7 ± 1,6	45,0 ± 2,4	36,6 ± 1,6	46,53 ± 6,5
	50	150µM	89,1 ± 4,3	40,6 ± 4,1	38,1 ± 1,0	46,3 ± 2,2
	100	300µM	82,1 ± 2,0	37,4 ± 0,8	38,0 ± 1,2	37,6 ± 1,1
426	1	30µM	98,4 ± 1,5	48,6 ± 2,4	42,7 ± 3,9	48,5 ± 1,1
	20	600µM	97,2 ± 2,7	48,6 ± 0,7	42,6 ± 3,0	43,1 ± 4,3
	50	1,5mM	102,2 ± 1,7	49,1 ± 2,1	47,6 ± 3,9	51,4 ± 7,6
	100	3mM	88,6 ± 7,3	37,4 ± 4,5	38,9 ± 3,4	43,2 ± 6,2
489	1	0,3mM	99,3 ± 3,6	61,1 ± 4,9	42,6 ± 1,9	34,3 ± 2,8
	20	6mM	87,5 ± 5,5	55,1 ± 8,0	40,7 ± 1,4	<b>13,5 ± 1,3**</b>
	50	15mM	87,6 ± 6,6	42,7 ± 1,7	<b>23,5 ± 3,1**</b>	<b>5,5 ± 2,2**</b>
	100	30mM	84,6 ± 2,1	43,6 ± 3,9	<b>23,2 ± 2,2**</b>	<b>1,3 ± 0,1**</b>
602	1	0,3mM	96,4 ± 1,0	55,3 ± 9,6	43,8 ± 3,1	32,6 ± 5,4
	20	6mM	80,9 ± 4,5	44,0 ± 7,5	44,7 ± 3,8	<b>26,6 ± 11,5**</b>
	50	15mM	81,3 ± 4,4	45,3 ± 8,3	42,3 ± 2,8	<b>10,3 ± 6,7**</b>
	100	30mM	82,1 ± 2,3	35,1 ± 2,8	43,3 ± 2,6	<b>6,4 ± 4,0**</b>

<b>1500</b>	<b>0,5</b>	<b>0,15mM</b>	100,1 ± 1,0	43,5 ± 3,1	39,4 ± 2,6	48,7 ± 1,9
	<b>1</b>	<b>0,3mM</b>	93,2 ± 1,4	44,7 ± 1,7	39,6 ± 5,3	38,4 ± 11,2
	<b>20</b>	<b>6mM</b>	74,8 ± 2,1	35,7 ± 7,2	31,9 ± 6,6	<b>30,8 ± 7,6**</b>
	<b>50</b>	<b>15mM</b>	67,5 ± 0,9	<b>25,7 ± 2,8**</b>	35,6 ± 11,4	<b>29,8 ± 8,1**</b>
	<b>100</b>	<b>30mM</b>	60,8 ± 2,3	<b>26,1 ± 3,1**</b>	<b>27,0 ± 3,5**</b>	<b>24,9 ± 0,8**</b>

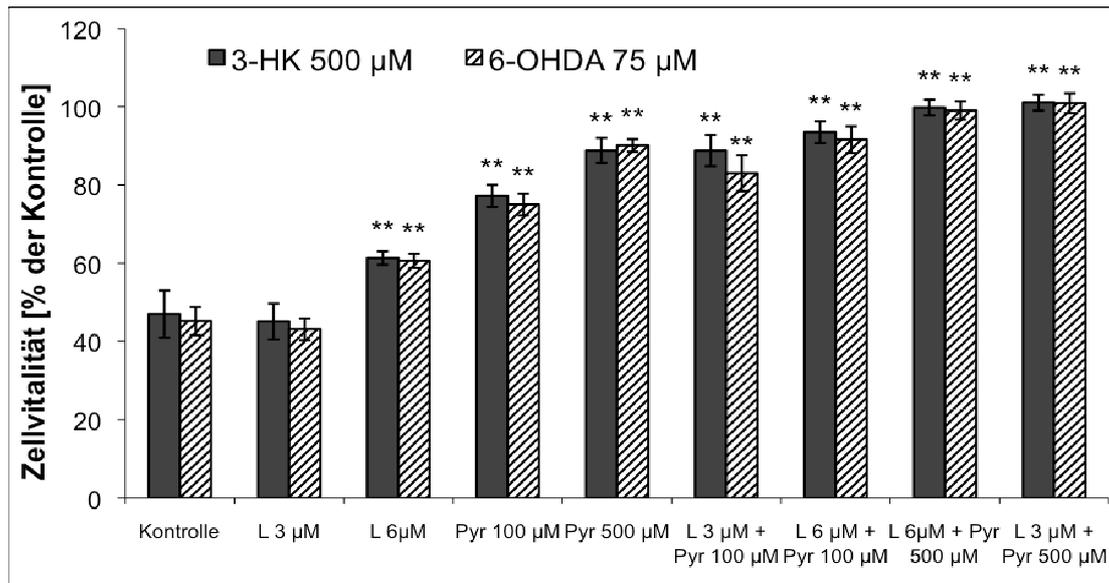
SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Quercetin-Nanokristallen für 1 h vorinkubiert und dann die Abnahme des ATP-Gehaltes mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben ± SD. V-Zugegebene Menge von Compound-Formulierung; Konz. –Quercetin-Konzentration; Comp.-Form.-Compound-Formulierung. \*\* ( $P < 0,05$ )

### **3.8 Untersuchung von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die Zellproliferation**

#### **3.8.1 Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metabolite-vermittelte Abnahme der Zellproliferation**

Im Zusammenhang mit oben beschriebenen Ergebnissen wurden Natriumpyruvat und Luteolin für die nächsten Versuche gewählt. Es sollte herausgefunden werden, ob sich die beiden Substanzen in ihrer Wirkung gegenseitig unterstützen. Für diese Untersuchungen wurde Natriumpyruvat in den Konzentrationen 100 µM und 500 µM und Luteolin in den Konzentrationen 3 µM und 6 µM auf SH-SY5Y-Zellen untersucht.

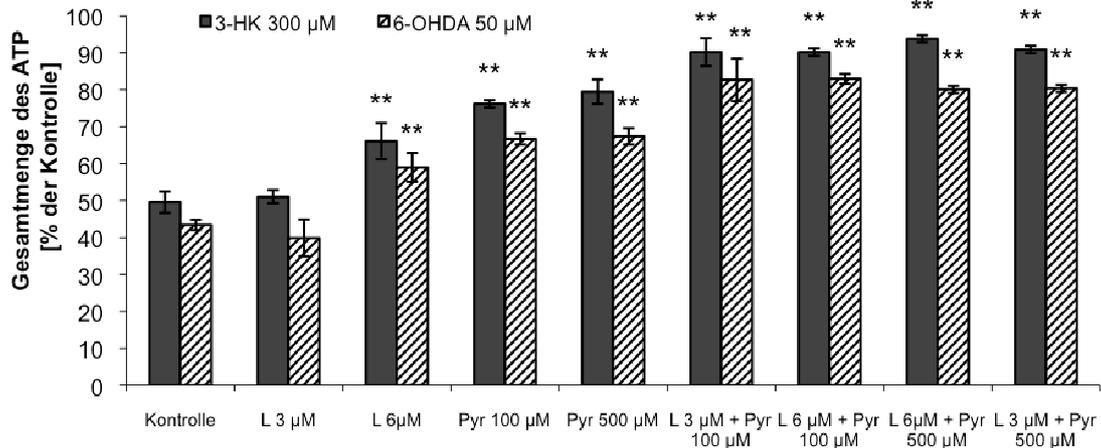
Die Ergebnisse zeigten, dass eine Koinkubation von Luteolin und Natriumpyruvat in Anwesenheit von 3-HK (500 µM), 6-OHDA (75 µM) oder Salsolinol (500 µM) den schützenden Effekt erhöhte (Abb.23). Die Verwendung von 3-HK (500 µM) führte zur signifikanten Abnahme der Vitalität. Die Zugabe von Luteolin (3 µM) und Natriumpyruvat (100 µM) bewirkte einen Zellproliferationsanstieg zu 89 %, wobei Natriumpyruvat allein 77 % des Zellwachstums bewirkte. Bei der Verwendung von höheren Konzentrationen von Natriumpyruvat (500 µM) und Luteolin (6 µM) wurde die Zellviabilität behandelter SH-SY5Y-Zellen normalisiert.



**Abb.23: Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die 3-HK- und 6-OHDA-vermittelte Zytotoxizität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Luteolin und Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit 3-HK oder 6-OHDA für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. L-Luteolin; Pyr-Natriumpyruvat. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.8.2 Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes

Mittels ATP-Lumineszenz-Assays wurde getestet, ob eine Koinkubation von Natriumpyruvat und Luteolin in verschiedenen Konzentrationen die toxischen Effekte von 6-OHDA (50  $\mu$ M) und 3-HK (300  $\mu$ M) auf den ATP-Gehalt reduzieren kann. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Natriumpyruvat und Luteolin koinkubiert und im Anschluss wurde der ATP-Gehalt gemessen. Es ergab sich, dass die 24-stündige Behandlung von 6  $\mu$ M Luteolin mit 100  $\mu$ M Natriumpyruvat die ATP-Konzentration in Anwesenheit von 6-OHDA (50  $\mu$ M) und 3-HK (300  $\mu$ M) erhöhte (Abb.24). Ferner normalisierten 6  $\mu$ M Luteolin und 500  $\mu$ M Natriumpyruvat den ATP-Gehalt in SH-SY5Y-Zellen auf fast 100 % der unbehandelten Kontrolle. Somit wurde die Toxizität von 3-HK und 6-OHDA vollständig inhibiert.



**Abb.24: Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat auf die 3-HK- und 6-OHDA-vermittelte Abnahme des ATP-Gehaltes.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Luteolin und Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit 3-HK oder 6-OHDA für 24 h ausgelöst, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. L-Luteolin; Pyr-Natriumpyruvat. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.9 Untersuchungen zu den Wirkmechanismen der untersuchten

#### Naturstoffen

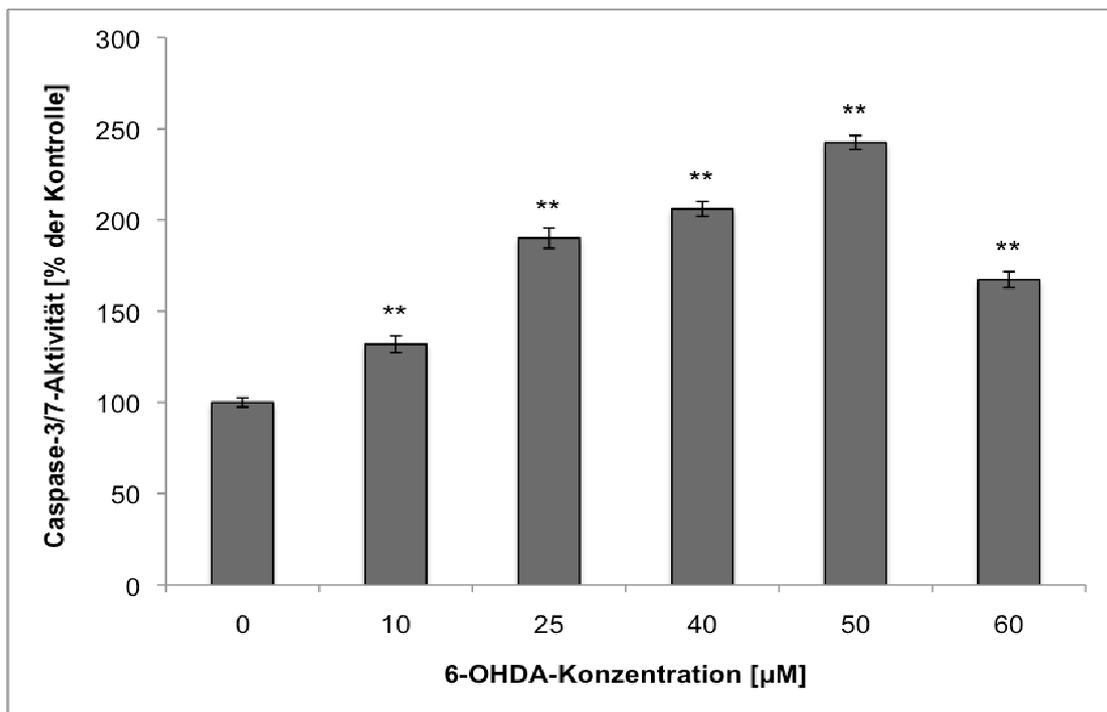
Es stellte sich nun die Frage, welche Wirkmechanismen den protektiven Effekten von Naturstoffen gegen Neurotransmitter-Metaboliten-induzierter Zytotoxizität und den toxischen Effekten von GSH und Salsolinol in SH-SY5Y-Zellen zugrunde liegen. Für die weiteren Versuche wurden Substanzen oder Kombinationen ausgewählt, die vor dem Zelltod schützten und den ATP-Gehalt erhöhten wie Luteolin, Natriumpyruvat, GSH, Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat oder solche, die den Zelltod verstärkten und den ATP-Gehalt erniedrigten wie Salsolinol in Kombination mit GSH. Um die Wirkmechanismen aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Parameter der mitochondrialen Funktion untersucht.

#### 3.9.1 Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Caspase-3/7-Aktivität

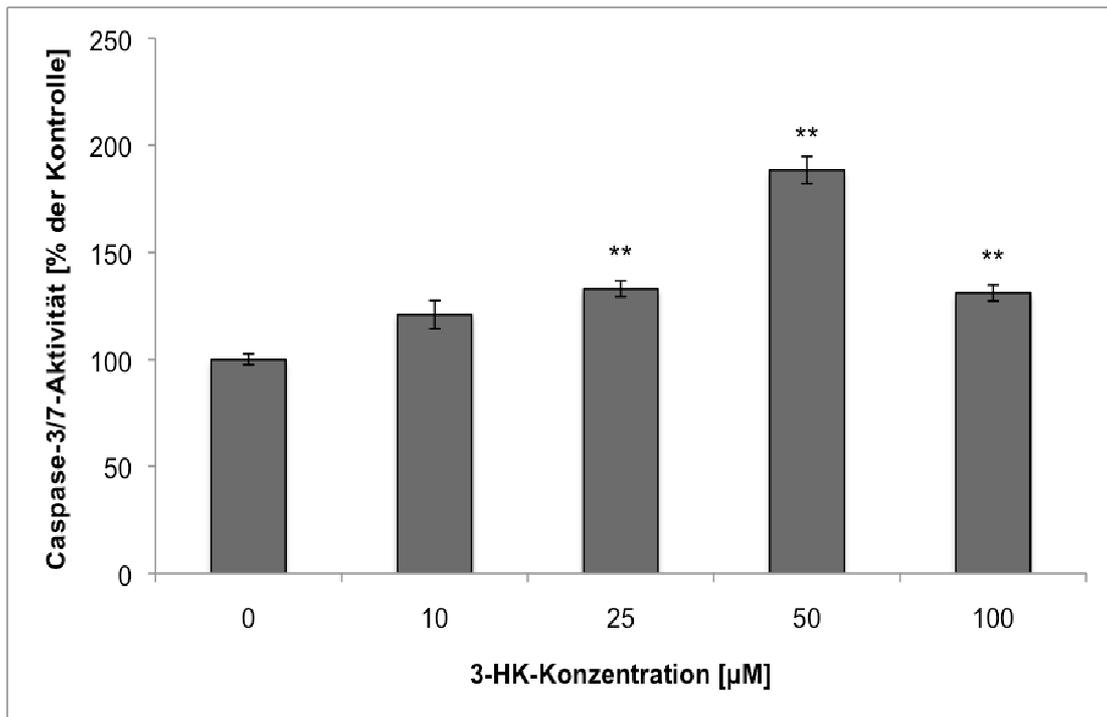
##### 3.9.1.1 Einfluss von Neurotransmitter-Metaboliten auf die Caspase-3/7-Aktivität

Die Caspasen-3 und -7 sind als Effektorcaspasen ein zentrales Element für die Vermittlung von Apoptose. Deshalb sollte mittels Caspase-3/7-Assays überprüft werden, ob die ausgewählten Substanzen die erhöhte Aktivität der Caspasen in SH-SY5Y-Zellen reduzieren können und somit vor dem programmierten Zelltod schützen.

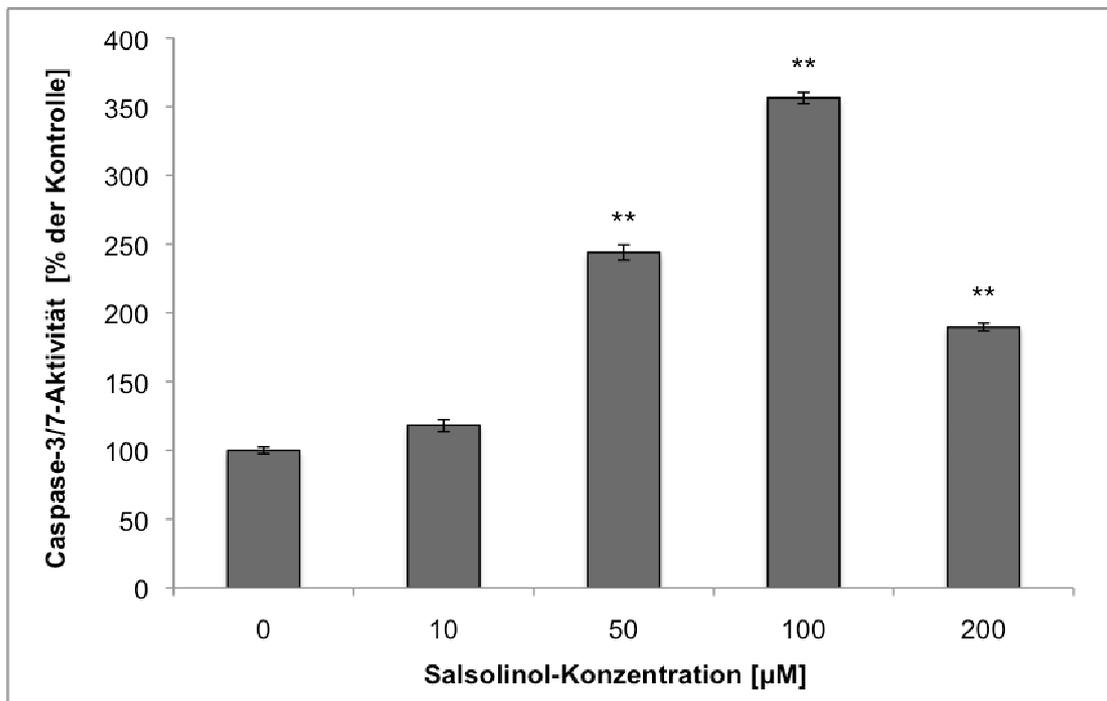
Zuerst musste herausgefunden werden, welchen Einfluss die Neurotoxine selbst auf die Caspase-3/7-Aktivität haben, ob sie Apoptose auslösen und welche Konzentrationen optimal sind, um sie in Kombination mit Naturstoffen untersuchen zu können. 6-OHDA wurde im Konzentrationsbereich von 25  $\mu\text{M}$  bis 75  $\mu\text{M}$  untersucht; 3-HK von 50  $\mu\text{M}$  bis 350  $\mu\text{M}$ ; Salsolinol von 50  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$ . Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  konnte 6-OHDA die Caspase-3/7-Aktivität auf 276 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöhen (Abb.25). Für 3-HK ergab sich, dass bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  die Caspase-3/7-Aktivität auf 211 % erhöht wurde (Abb.26). Weiterhin konnte Salsolinol (100  $\mu\text{M}$ ) die Caspase-3/7-Aktivität auf 366 % erhöhen (Abb.27). Die im Caspase-3/7-Assay eingesetzten Konzentrationen von Neurotransmitter-Metaboliten sind niedriger als bei dem MTT-Test und ATP-Lumineszenz-Assay, was auf hohe Empfindlichkeit des Assays hinweist.



**Abb.25: Effekt von 6-OHDA auf die Caspase-3/7-Aktivität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von 6-OHDA für 24 h inkubiert, anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )



**Abb.26: Effekt von 3-HK auf die Caspase-3/7-Aktivität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von 3-HK für 24 h inkubiert, anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

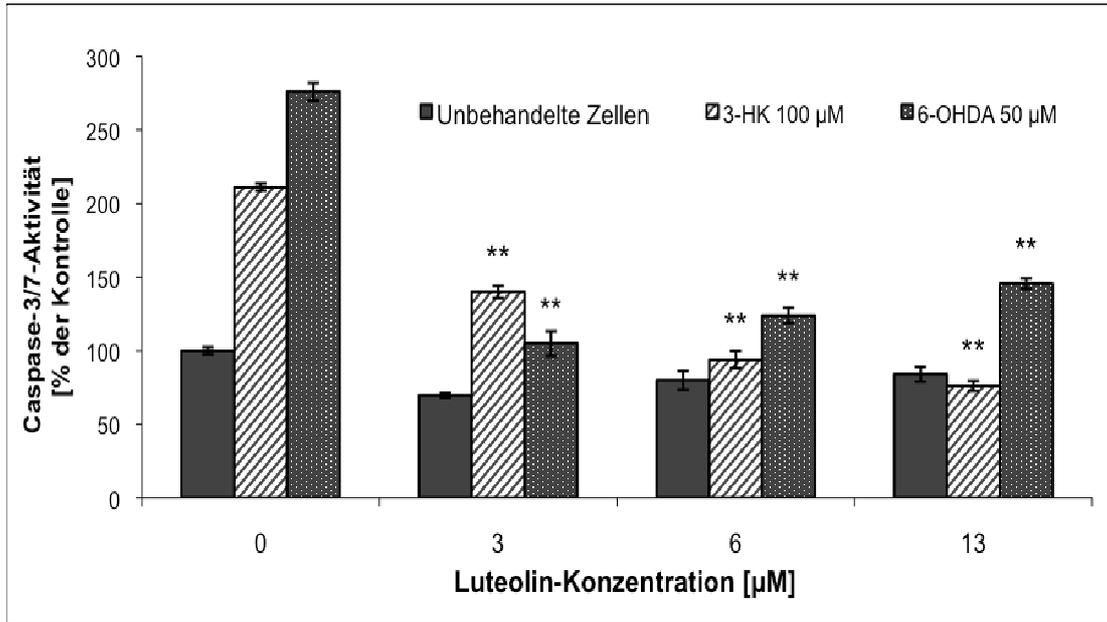


**Abb.27: Effekt von Salsolinol auf die Caspase-3/7-Aktivität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Salsolinol für 24 h inkubiert, anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

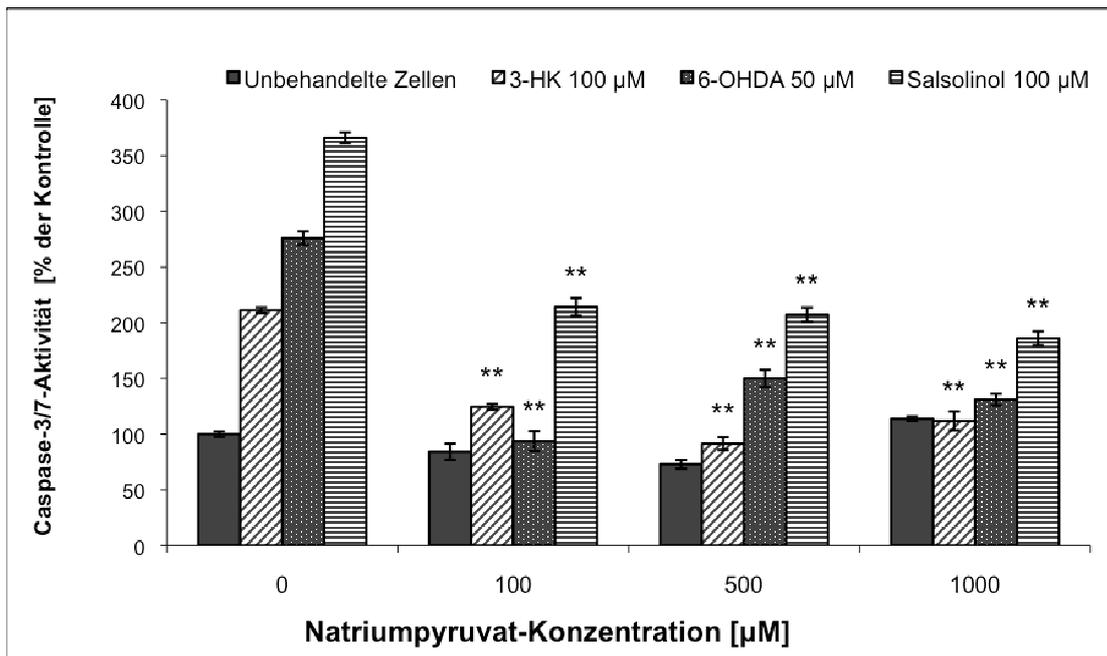
### 3.9.1.2 Einfluss von Luteolin und Natriumpyruvat auf die Caspase-3/7-Aktivität

Luteolin wurde in Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  bis 13  $\mu\text{M}$  getestet, während Natriumpyruvat in Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  und GSH in Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden. Abb.28 zeigt, dass Luteolin schon ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  in der Lage war, die durch 6-OHDA- (50  $\mu\text{M}$ ) und 3-HK- (100  $\mu\text{M}$ ) induzierte Zunahme der Caspase-3/7-Aktivität signifikant zu reduzieren, was sich nach 24 Stunden Behandlung in SH-SY5Y-Zellen ergab. Eine Behandlung mit höheren Konzentrationen von Luteolin zeigte einen noch besseren Schutz vor Apoptose bei 3-HK-behandelten SH-SY5Y-Zellen, dagegen nicht bei 6-OHDA-Behandlung.

In einer Konzentration von 13  $\mu\text{M}$  konnte Luteolin die durch 3-HK-induzierte Caspase-3/7-Aktivität um 135 % reduzieren. Interessant scheint auch die Tatsache, dass während Luteolin-Behandlung in Abwesenheit von Neurotoxinen die Caspase-3/7-Aktivität um ca. 20 % reduziert werden konnte im Vergleich zur Kontrolle. Auch nach Natriumpyruvat-Behandlung konnte man eine vor Apoptose schützende Wirkung beobachten. Die Zugabe von Natriumpyruvat (100  $\mu\text{M}$ ) bewirkte bereits eine signifikante Abnahme an Caspase-3/7-Aktivität, die durch Neurotransmitter-Metaboliten induziert wurde. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von Natriumpyruvat verstärkte die Reduktion der Caspase-3/7-Aktivität. Für Natriumpyruvat in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  wurde eine Senkung der Caspase-3/7-Aktivität um 150 % nach 6-OHDA-, um 91,5 % nach 3-HK- und um 186 % nach Salsolinol-Behandlung beobachtet.



**Abb.28: Einfluss von Luteolin auf die 3-HK- und 6-OHDA-vermittelte Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Luteolin für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit 3-HK oder 6-OHDA für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

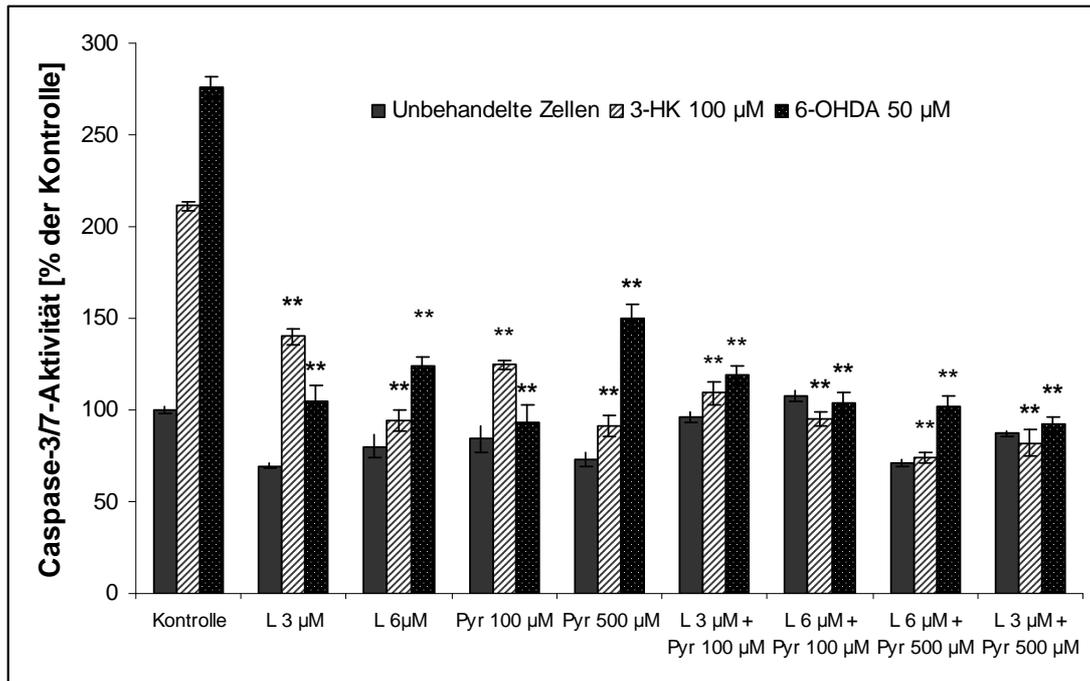


**Abb.29: Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität.** SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

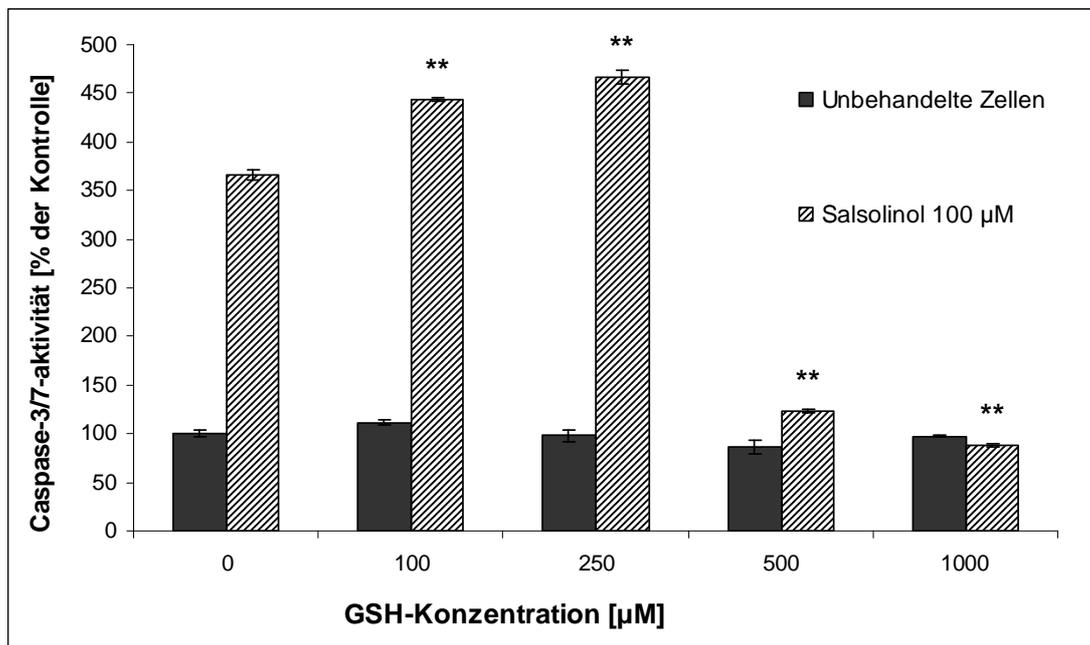
### 3.9.1.3 Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat und Glutathion in Kombination mit Salsolinol auf die Caspase-3/7-Aktivität

Für den Versuch wurden SH-SY5Y-Zellen gleichzeitig mit Luteolin und Natriumpyruvat in folgenden Konzentration untersucht: 100  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat + 3  $\mu\text{M}$  Luteolin; 100  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat + 6  $\mu\text{M}$  Luteolin; 500  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat + 3  $\mu\text{M}$  Luteolin; 500  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat + 6  $\mu\text{M}$  Luteolin. Zu den Zellen wurden auch, außer Naturstoffen, zwei Neurotoxine zugegeben: 3-HK (100  $\mu\text{M}$ ) und 6-OHDA (50  $\mu\text{M}$ ). Es ergab sich, dass eine 24-stündige Koinkubation von Luteolin und Natriumpyruvat die Caspase-3/7-Aktivität in Neuroblastomzellen, die mit 3-HK (100  $\mu\text{M}$ ) und 6-OHDA (50  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, normalisierte und vor Apoptose schützte. Ein signifikanter Schutz vor dem Zelluntergang konnte schon bei einer Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat und 3  $\mu\text{M}$  Luteolin beobachtet werden, was durch einen synergischen antiapoptotischen Effekt von Luteolin und Natriumpyruvat erklärt werden kann. Die Wirkung von Luteolin und Natriumpyruvat gegen 3-HK- und 6-OHDA-induzierte Apoptose in SH-SY5Y-Zellen wurde in Abb.30 dargestellt.

Eine parallele Zugabe von Salsolinol und GSH zu SH-SY5Y-Zellen bewirkte einen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität. Salsolinol allein war in der Lage, die Caspase-3/7-Aktivität bis zu 366 % zu erhöhen, während Salsolinol in Anwesenheit von GSH (100  $\mu\text{M}$ ) eine Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität auf 444 % bewirkte. GSH in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  in Anwesenheit von Salsolinol in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  stellte sich als noch toxischer heraus, da die nach 24 Stunden vermessene Aktivierung der Caspase-3/7 bei 466,1 % lag. Es wurde ähnlich wie in vorherigen Assays beobachtet, dass die höheren Konzentrationen von GSH nicht zum Zelltod führten, wie es bei niedrigeren Konzentrationen zu beobachten war, sondern vor dem Zelltod schützten. Nachdem GSH in den Konzentrationen 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  mit Salsolinol (100  $\mu\text{M}$ ) kombiniert wurde, zeigte sich, dass die Caspase-3/7-Aktivität um 214 % und um 272 % abnahm und die Kontrollwerte erreicht wurden.



**Abb.30: Einfluss von Luteolin und Natriumpyruvat auf die 3-HK- und 6-OHDA-vermittelte Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Luteolin und Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Salsolinol für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. L-Luteolin; Pyr-Natriumpyruvat. \*\* ( $P < 0,05$ )



**Abb.31: Einfluss von GSH auf die Salsolinol-vermittelte Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von GSH für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Salsolinol für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Caspase-3/7-Aktivität mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit drei parallelen Proben  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.9.2 Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Expression von Bcl-2

Proteine der Bcl-2-Familie sind in Mitochondrien lokalisiert und in der Lage,

den Ablauf von Apoptose zu hemmen. Bcl-2 kann die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien regulieren und damit die Apoptose blockieren. Außerdem wird Bcl-2 eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben. Aufgrund dessen wurde ein zusätzlicher Versuch durchgeführt, bei dem die Menge an Bcl-2 in Neuroblastomazellen nach 24 Stunden Behandlung mit Testsubstanzen gemessen wurde. Die Bestimmung des Bcl-2-Proteins in den Neuroblastomzellen erfolgte mittels Bcl-2 ELISA.

### 3.9.2.1 Einfluss von Neurotransmitter-Metaboliten auf die Expression von Bcl-2

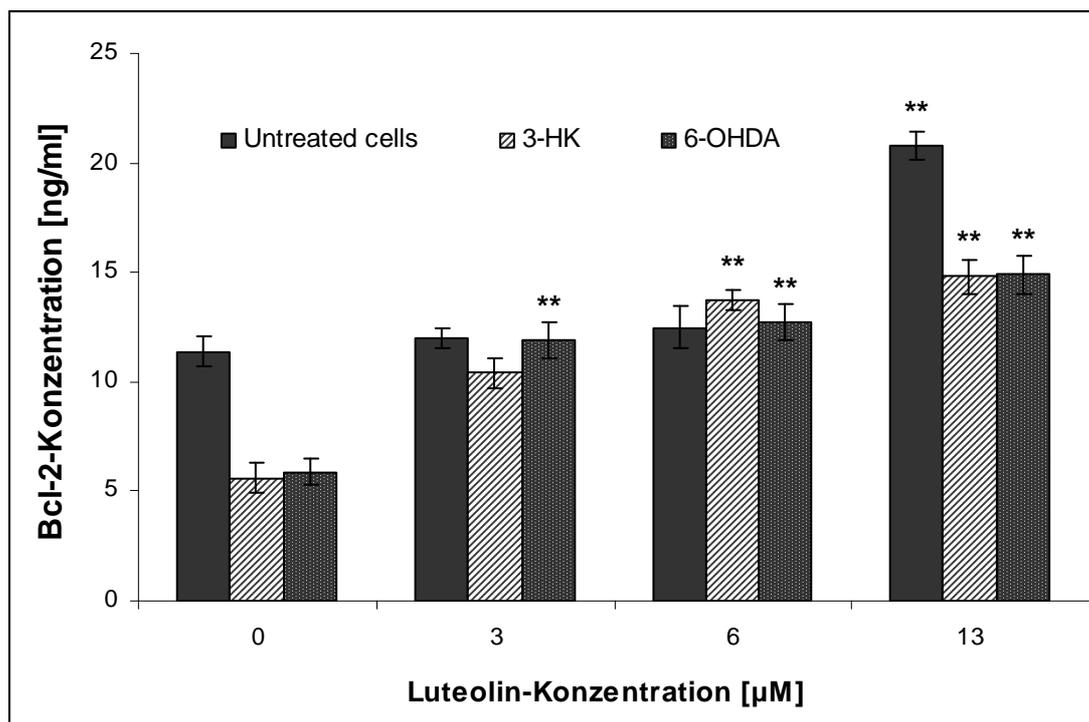
Die SH-SY5Y-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an 3-HK (50-350  $\mu\text{M}$ ), 6-OHDA (25-75  $\mu\text{M}$ ) und Salsolinol (50-500  $\mu\text{M}$ ) für 24 Stunden inkubiert und Apoptose-spezifische Veränderungen des Bcl-2-Gehaltes wurden untersucht. Eine apoptoseinduzierende Wirkung von Neurotransmitter-Metaboliten zeigte sich ähnlich wie bei Caspase-3/7-Assay bei den Konzentrationen 100  $\mu\text{M}$  für 3-HK, 50  $\mu\text{M}$  für 6-OHDA und 100  $\mu\text{M}$  für Salsolinol. Die Bcl-2-Konzentrationen nach der Behandlung mit den aufgeführten Neurotoxinen betragen  $5,6 \pm 0,7$  ng/ml,  $5,9 \pm 0,6$  ng/ml bzw.  $5,9 \pm 1,0$  ng/ml, als Vergleich der unbehandelten Kontrolle:  $11,4 \pm 0,7$  ng/ml.

### 3.9.2.2 Einfluss von Luteolin und Natriumpyruvat auf die Expression von Bcl-2

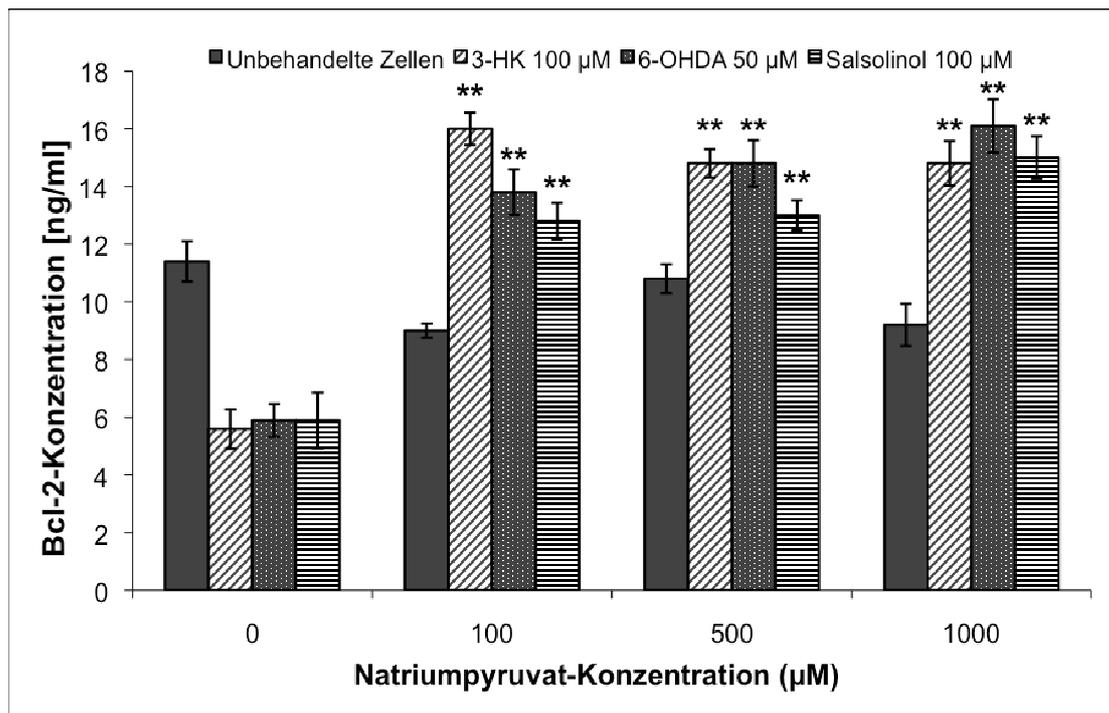
Zunächst wurde der Einfluss von Einzelsubstanzen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Luteolin in einer Konzentration von 13  $\mu\text{M}$  die Bcl-2-Konzentration auf 20,8 ng/ml deutlich erhöhte im Vergleich zur Kontrolle (11,4 ng/ml). Luteolin in den Konzentrationen 3  $\mu\text{M}$  und 6  $\mu\text{M}$  bewirkte nur eine leichte Änderung des Bcl-2-Gehaltes um 1 ng/ml. Als nächstes wurde die Konzentration von Bcl-2 nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 3-HK (100  $\mu\text{M}$ ) und 6-OHDA (50  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von Luteolin (3-13  $\mu\text{M}$ ) gemessen. Es zeigte sich bei 3-HK und 6-OHDA eine konzentrationsabhängige Zunahme der Bcl-2-Konzentration nach Luteolin-Behandlung. (Abb.32). Eine Zugabe von Luteolin in einer Konzentration von 13  $\mu\text{M}$  nach 24 Stunden Behandlung mit 3-HK bewirkte einen deutlichen Anstieg der Bcl-2-Menge auf 14,8 ng/ml. Derselbe Einfluss von Luteolin auf die Bcl-2-Konzentration wurde bei 6-OHDA-Behandlung beobachtet. Für Luteolin in einer Konzentration von 13  $\mu\text{M}$  in Anwesenheit von 6-OHDA (50  $\mu\text{M}$ ) wurde der Bcl-2-Gehalt in Höhe von 14,9 ng/ml gemessen. Jede der untersuchten Luteolin-

Konzentrationen war in der Lage, einen Schutz vor dem programmierten Zelltod bei Behandlung mit 3-HK und 6-OHDA zu liefern.

Wenn Natriumpyruvat im Konzentrationsbereich von 100-1000  $\mu\text{M}$  zu SH-SY5Y-Zellen zugegeben wurde, wurde keine signifikante Änderung von Bcl-2-Menge beobachtet. Eine Zugabe von Natriumpyruvat nicht nur normalisierte die Bcl-2-Konzentration, sondern auch erhöhte die Bcl-2-Menge nach Behandlung mit Neurotransmitter-Metaboliten. Schon ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  konnte festgestellt werden, dass Natriumpyruvat die mit Neurotransmitter-Metaboliten ausgelöster Toxizität reduzieren kann. Besonders deutlich war die Minderung der Toxizität von 3-HK (100  $\mu\text{M}$ ) durch Natriumpyruvat. Natriumpyruvat in Anwesenheit von 3-HK erhöhte signifikant die Bcl-2-Menge auf 16 ng/ml. Höhere Konzentrationen von Natriumpyruvat konnten die Bcl-2-Menge nicht weiter erhöhen. Für 6-OHDA und Salsolinol ergab sich, dass eine weitere Erhöhung der Natriumpyruvat-Konzentrationen besser vor Apoptose schützte.



**Abb.32: Einfluss von Luteolin auf 3-HK- und 6-OHDA-vermittelte Abnahme der Bcl-2-Konzentration.** SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Luteolin für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit 3-HK und 6-OHDA für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Bcl-2-Konzentration mittels Bcl-2 ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )



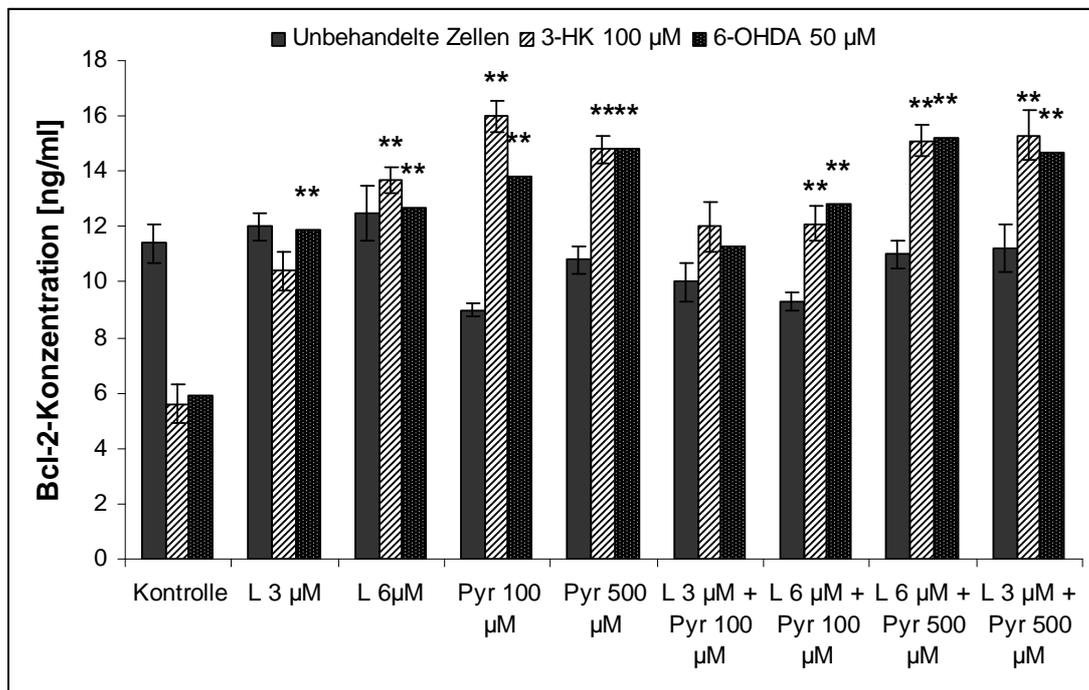
**Abb.33: Einfluss von Natriumpyruvat auf die Neurotransmitter-Metaboliten-vermittelte Abnahme der Bcl-2-Konzentration.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit Neurotransmitter-Metaboliten für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Bcl-2-Konzentration mittels Bcl-2 ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

### 3.9.2.3 Einfluss von Luteolin in Kombination mit Natriumpyruvat und Glutathion in Kombination mit Salsolinol auf die Expression von Bcl-2

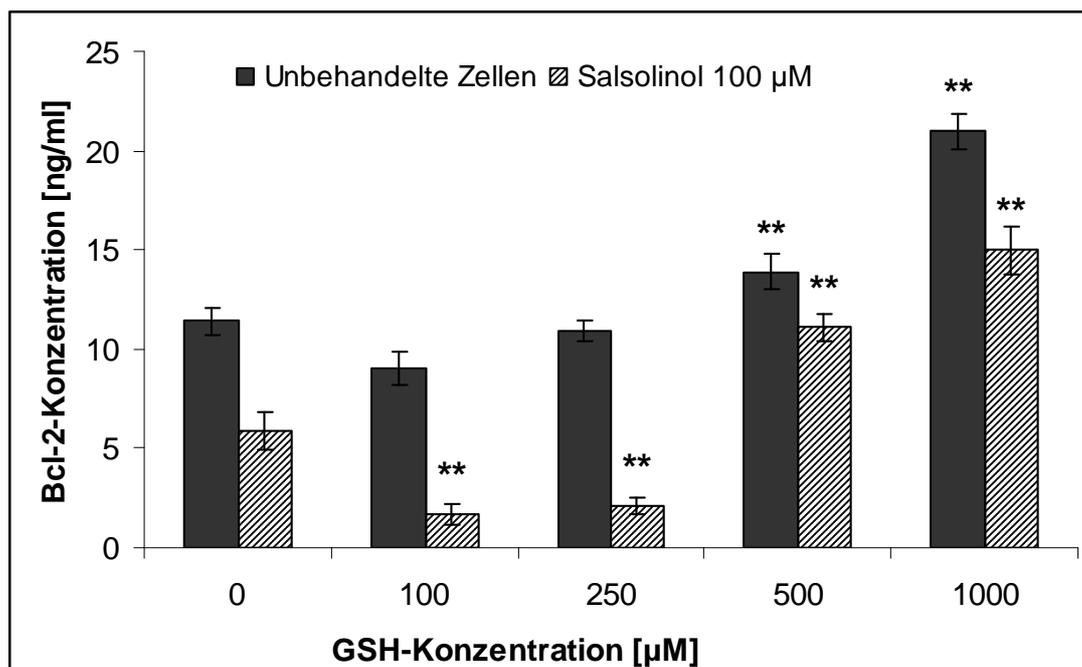
Eine Koinkubation von Luteolin und Natriumpyruvat zusammen mit 3-HK (100 µM) und 6-OHDA (50 µM) erfolgte in Konzentrationen von 3 µM bis 13 µM für Luteolin und in Konzentrationen von 100 µM bis 1000 µM Natriumpyruvat. GSH wurde in Konzentrationen von 5 µM bis 1000 µM mit Salsolinol (100 µM) untersucht. Eine Schutzverstärkung mittels Überexpression von Bcl-2 für Neuroblastomzellen gegenüber den Einzelsubstanzen Luteolin und Natriumpyruvat konnte nach der Koinkubation mit beiden Naturstoffen in keiner der untersuchten Konzentrationen in Anwesenheit von 6-OHDA (100 µM) oder 3-HK (100 µM) festgestellt werden.

Eine Zugabe von GSH in einer Konzentration von 500 µM bewirkte eine Erhöhung der Bcl-2-Konzentration auf 14,9 ng/ml, während bei einer Konzentration von 1000 µM die Bcl-2-Konzentration fast verdoppelt wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei GSH-Konzentrationen unter 500 µM blieb der Bcl-2-Gehalt in SH-SY5Y-Zellen unverändert. Als nächstes wurde getestet, wie eine gemeinsame Behandlung von unterschiedlichen GSH-Konzentrationen (100-1000 µM) mit Salsolinol (100 µM) die Bcl-2-Konzentration beeinflussen kann. Nachdem

SH-SY5Y-Zellen mit GSH (100  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von Salsolinol (100  $\mu\text{M}$ ) 24 Stunden behandelt wurden, wurde eine Konzentration von 1,7 ng/ml gemessen, wobei Salsolinol allein den Gehalt auf 5,9 ng/ml reduzierte. Eine noch deutlichere Abnahme an Bcl-2-Konzentration wurde nach der Koinkubation von GSH in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  in Anwesenheit von Salsolinol (100  $\mu\text{M}$ ) beobachtet. GSH ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  in Anwesenheit von Salsolinol war in der Lage, die Bcl-2-Konzentration zu normalisieren. Ein bemerkbarer Schutz vor der Salsolinol-Toxizität war bei einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  GSH zu sehen; 15 ng/ml der Kontrolle-11,4 ng/ml.



**Abb.34: Einfluss von Natriumpyruvat auf die 3-HK- und 6-OHDA-vermittelte Abnahme der Bcl-2-Konzentration.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Natriumpyruvat für 1 h vorinkubiert und dann der Zelltod mit 3-HK, 6-OHDA und Salsolinol für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Bcl-2-Konzentration mittels Bcl-2 ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )



**Abb.35: Einfluss von GSH auf die Salsolinol-vermittelte Abnahme der Bcl-2-Konzentration.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von GSH für 1 h vorinkubiert und dann die Apoptose mit Salsolinol für 24 h ausgelöst, anschließend wurde die Bcl-2-Konzentration mittels Bcl-2 ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Versuchen  $\pm$  SD. \*\* ( $P < 0,05$ )

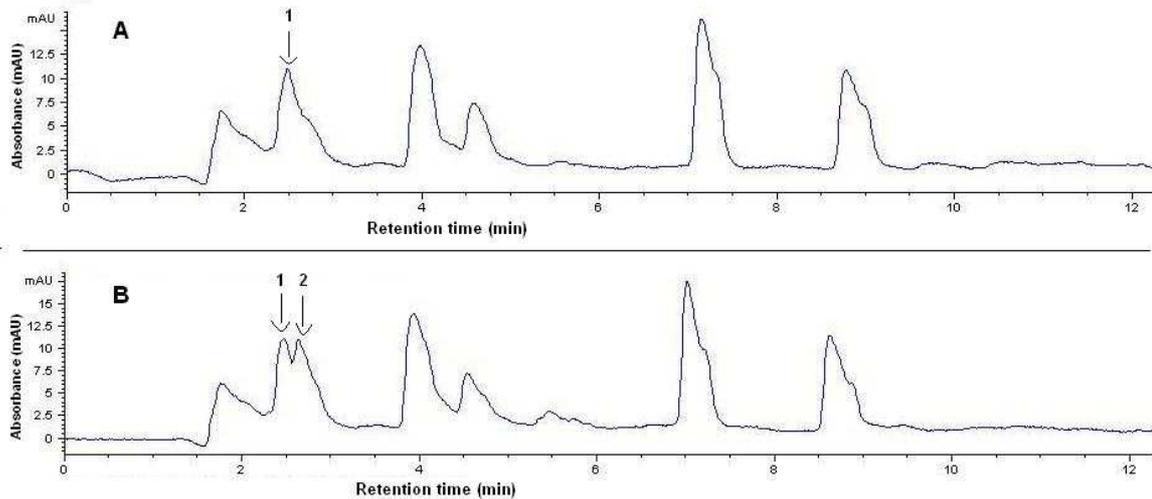
### 3.10 Bestimmung von Salsolinol und GSH mittels HPLC-Analyse

Um die Hypothese zu prüfen, dass die 24-stündige Koinkubation von GSH im Konzentrationsbereich 100-250  $\mu\text{M}$  und Salsolinol in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  zur Bildung neuer Moleküle führen könnte, wurde eine Analyse mittels HPLC unter Verwendung von C-18 Säulenmaterial durchgeführt. Die Bedingungen der HPLC-Analyse wurden im Abschnitt 2.10.2 erläutert. Die Chromatogramme sind in Abb.36 dargestellt.

Zuerst wurde die Retentionszeit von Salsolinol bestimmt. Das Peak-Maximum hatte eine Retentionszeit von 2,4 min. Weiterhin wurde Salsolinol, wie im 2.10.1 beschrieben, inkubiert und mittels HPLC analysiert. Es konnte außer dem Peak von Salsolinol, eine Vielzahl von weiteren Peaks beobachtet werden, die den Bestandteilen des Zellkulturmediums zugeordnet wurden; bei 3,95 min; 4,5 min; 7,1 min; 8,6 min. Die aufgeführten Peaks kamen sowohl im Chromatogramm von Salsolinol im Zellkulturmedium als auch im Chromatogramm von Salsolinol mit GSH im Zellkulturmedium vor.

Eine HPLC-Analyse von Salsolinol in einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$ , das mit GSH in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  24 Stunden im Zellkulturmedium bei

37°C inkubiert wurde, zeigte einen neuen Peak bei einer gering unterschiedlichen Retentionszeit von 2,6 min. Da der Peak von Salsolinol und der Peak von dem unbekanntem Produkt oder Produkten fast die gleichen Retentionszeiten bei der Wellenlänge 285 nm aufweisen, kann man schlussfolgern, dass die beiden Substanzen eng miteinander verwandt sind.



**Abb.36:** HPLC-Analyse von Salsolinol inkubiertem im Zellkulturmedium für 24 h bei 37° C (A) und von Salsolinol inkubiertem mit GSH im Zellkulturmedium für 24 h bei 37° C. Die Lösungen wurden mit einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) lyophilisiert und mittels HPLC (siehe 2.7.1) analysiert. Die Detektion erfolgte bei 285 nm.

## 4. Diskussion

Als Hauptfaktoren für neurodegenerative Erkrankungen werden gegenwärtig mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, ein Mangel an antioxidativem Schutz und chronische entzündliche Vorgänge diskutiert. Ferner zeigten wissenschaftliche Untersuchungen, dass im Organismus endogen produzierte Substanzen an der Entstehung zahlreicher neurodegenerativer Krankheiten beteiligt sind. Zu solchen Substanzen gehören Kynurenine wie QUIN, 3-HK und KYNA, die im Verlauf des Kynureninwegs bei Menschen gebildet werden und die oben genannten zytotoxischen Effekte in menschlichen Nervenzellen hervorrufen können. Die Toxizität der Metaboliten des Kynureninwegs ist noch nicht ausreichend untersucht. Der Grund dafür ist unter anderem die Tatsache, dass es kein richtiges *in vitro* Modell gibt, welches das betroffene Hirngewebe nachahmen könnte. Als endogenes Neurotoxin gilt auch Salsolinol, das auf dopaminerge nigrostriatale Zellen neurotoxisch wirkt. Salsolinol wird auch nach Alkoholkonsum gebildet und steht im Verdacht, eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des Morbus Parkinson zu spielen.

Es gibt keine Zweifel, dass die Vorbeugung die einzige Möglichkeit ist, das Risiko für neurodegenerative Krankheiten zu senken. Dies kann unter anderem durch Einnahme von Antioxidantien und damit verbundene Erhöhung des Gesamt-Antioxidantien-Status erreicht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *in vitro* Zellmodells zur Untersuchung des Einflusses von toxischen Eigenschaften der endogen gebildeten Neurotoxine Salsolinol und Metaboliten des Kynureninwegs. Zusätzlich wurden die Effekte von ausgewählten Naturstoffen, Pflanzenextrakten und Nanokristallen auf den durch verschiedene Neurotoxine ausgelösten Zelltod und die Abnahme des ATP-Gehaltes untersucht. Außerdem sollte die Arbeit überprüfen, welche Wirkmechanismen bei der neuroprotektiven Wirkung potentiell involviert sind.

### 4.1 Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen mittels all-trans-Retinsäure und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ in neuronale Zellen

Primärzellkulturen würden als perfektes *in vitro* Modell für neuronale Schädigung fungieren, wenn sie die *in vivo* ablaufenden Vorgänge korrekt widerspiegeln. Es bestehen jedoch Schwierigkeiten bei der Gewinnung der Zellen

aus dem Gewebe, ihrer Erhaltung und durch das langsame Wachstum, die den Einsatz in Labors begrenzen. Eine gute Alternative zu Primärzellen sind Zelllinien, die in Forschung und Entwicklung eine breite Anwendung finden. Die humane Neuroblastomzelllinie SK-N-SH und ihr dreifach selektierter Subklon dienen oft als Modell für *in vitro* Untersuchungen zur Neurotoxizität. Die SK-N-SH-Zelllinie besteht hauptsächlich aus neuronalen (N-Typ) und Schwann'schen Phänotypen (S-Typ), während die SH-SY5Y-Zelllinie eher homogen ist und überwiegend die S-Typ-Zellen enthält (Biedler et al., 1973). Beiden Zelllinien fehlen typische neuronale Eigenschaften, wie z.B. die neuronale Morphologie, verlangsamte Zellproliferation und Expression von neuronalen Markern. Allerdings können die Neuroblastomzellen mit unterschiedlichen Differenzierungsfaktoren, wie z.B. mit RA zu neuronalen Zellen differenziert werden (Wainwright et al., 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aus den Differenzierungsexperimenten zeigten, dass ähnlich wie in anderen Studien ein Zusatz von RA einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation und einen fördernden Effekt auf die Differenzierung der Neuroblastomzellen in Richtung neuronaler Zellen hat. Außerdem zeigten die Neuroblastomzellen nach der Behandlung mit RA einen neuronalen Phänotyp, was mittels Immunofluoreszenz-Methode nachgewiesen werden konnte und somit die Ergebnisse früherer Studien bestätigte (Encinas et al., 2000; Pizzi et al., 2002). Nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  erfolgte jedoch keine Differenzierung. Die Ergebnisse von Obregon et al. (1997) konnten nicht verifiziert werden.

## **4.2 Beeinflussung der Toxizität von Metaboliten des Kynureninwegs und anderen Neurotoxinen**

In Experimenten wurde die Toxizität von Kynureninen und anderen neurotoxisch wirkenden Substanzen auf verschiedene Zellmodelle untersucht. In der Literatur gibt es bisher wenige Informationen zu Effekten von Metaboliten des Kynureninwegs auf verfügbare Zelllinien. Neuere Studien belegen, dass QUIN, 3-HK und KYNA (in submolaren Konzentrationen) an der Entwicklung von einigen neurologischen Erkrankungen und an der Regulation von unterschiedlichen Wegen im ZNS beteiligt sein könnten (Stone und Perkins, 1981; Ogawa et al., 1992; Nakagami et al., 1996; Hilmas et al., 2001; Heyes et al., 2001; Prescott et al., 2006; Rozsa et al., 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die neurotoxischen Effekte von 3-HK auf Neuroblastomzellen (Jeong et al., 2004; Lee et al., 2005). Allerdings konnte mittels QUIN und KYNA kein Zelltod auf sowohl differenzierte als auch undifferenzierte Neuroblastomzellen im Vergleich zur Kontrolle induziert werden. Pizzi et al. (2002) berichteten, dass ein weiterer Vorteil der Differenzierung mit RA darin bestand, dass die Neuroblastomzellen nach der Behandlung mit RA über funktionelle Untereinheiten NR1 und NR2B der NMDA-Rezeptoren verfügen, die eine große Rolle bei Exzitotoxizität spielen (Garthwaite und Garthwaite, 1987). Obwohl durch Untersuchungen anderer Gruppen nachgewiesen werden konnte, dass QUIN und KYNA bei Zellkultursystemen aus Primärzellen toxische Effekte ausüben (Kerr et al., 1995; Rozsa et al., 2008; Brady et al., 2009), konnte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit mit Neuroblastomzellen für die beiden Metaboliten des Kynureninwegs keine toxische Wirkung in den untersuchten Konzentrationen festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass die Primärzellen eine heterogene Gruppe von verschiedenen Zellen in der Kultur darstellen und vermutlich auch Mikrogliazellen enthalten, die hauptsächlich von der QUIN-induzierten Toxizität betroffen sind. Ferner repräsentieren die Neuroblastomzellen eine homogene Population von menschlichen Zellen, die zwar Eigenschaften von Neuronen besitzen, aber keine Mikrogliazellen enthalten. Deshalb konnte vermutlich keine neurogene Entzündung induziert werden.

Die Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität von 6-OHDA, Salsolinol und 3-HK gegenüber differenzierten Neuroblastomzellen zeigten, dass diese Substanzen eine schwächere Toxizität im Vergleich zu unbehandelten Zellen ausüben. Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Differenzierung der Neuroblastomzellen mit RA die Resistenz gegen toxische Stoffe deutlich erhöht. Unterstützt wird dies durch die Beobachtungen anderer Studien, dass unter Verwendung von RA eine Resistenz gegenüber Toxinen festgestellt werden konnte (Cheung et al., 2009; Mak et al., 2010). Zudem berichtete Tieu et al. (1999), dass eine Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen mit RA zur Überexpression von antiapoptotischem Bcl-2-Protein und Unterdrückung der Aktivität im proapoptotischen p53-Gen führt.

Zytotoxizität kann durch bestimmte Bestandteile im Medium, in dem die Zellen wachsen, beeinflusst werden. Rodriguez-Enriquez et al. (2001) berichteten, dass die im Zellkulturmedium mit Glukose wachsenden immortalisierten Zellen,

Energie über die Glykolyse und nicht über die oxidative Phosphorylierung gewinnen („Crabtree Effect“). In der Leberkarzinom-Zelllinie HepG-2 wurde nachgewiesen, dass ein Ersatz von Glukose durch Galaktose im Zellkulturmedium eine Erhöhung der Anfälligkeit gegenüber bestimmten mitochondrialen Toxinen bewirkte (Marroquin et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit menschlichen Neuroblastomzellen SH-SY5Y stehen jedoch im Widerspruch dazu. Unter den beschriebenen Bedingungen zeigten sich die Neuroblastomzellen sogar als weniger anfällig gegenüber Neurotransmitter-Metaboliten-induzierter Zytotoxizität. Somit mussten höhere Konzentrationen von Toxinen zugesetzt werden, um die gleiche Zytotoxizität zu erzielen. Weiterhin konnte keine Zytotoxizität von QUIN und KYNA bei den Zellen im Galaktose-Medium gezeigt werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass es große Unterschiede im Stoffwechsel der Leberzellen und der neuronalen Zellen gibt. Weitere Studien sind notwendig, um die Vorgänge zu verstehen, die während der Behandlung von Neuroblastomzellen mit Galaktose ablaufen. Für die weiteren Untersuchungen wurden undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen eingesetzt.

### **4.3 Einfluss von Polyphenolen auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt**

Polyphenole umfassen eine große Gruppe Substanzen, zu denen unter anderem Flavonoide oder Kaffeesäurederivate gehören. Flavonoide sind polyhydroxylierte Pflanzeninhaltsstoffe, die hauptsächlich in Blättern, Blüten und äußeren Pflanzenteilen wie Schale und Haut von Früchten und Gemüse sowie daraus hergestellten Getränken wie Wein, Tee, Kaffee oder Säften vorkommen (Scalbert, 2002). Zahlreiche Studien zeigten, dass Flavonoide antioxidative (Chen et al., 1990; Manach et al., 1996; Rice-Evans et al., 1996; Otero et al., 1997; Rice-Evans, 2001) und entzündungshemmende (Ferrandiz und Alcaraz, 1991) *in vitro* Eigenschaften besitzen. Seitdem diese Eigenschaften bekannt sind, werden Flavonoide als mögliche Kandidaten für Prophylaxe neurodegenerativer Krankheiten angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene strukturell unterschiedliche pflanzliche Polyphenole auf ihre potentielle schützende Wirkung gegenüber verschiedenen neurotoxisch wirksamen Toxinen wie 3-HK, 6-OHDA und Salsolinol in menschlichen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen untersucht.

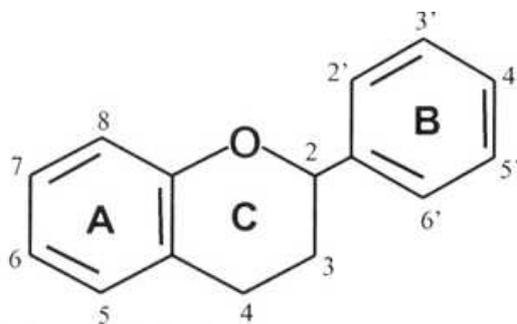
Aufgrund dessen, dass im MTT-Test das Tetrazoliumsalz (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen zum violetten Formazan reduziert wird, ist die Messung des Formazans kein direkter Hinweis auf zytotoxische oder zytoprotektive Eigenschaften. Beim MTT-Test kann eher von einer Bestimmung der metabolischen Aktivität gesprochen werden (Mosmann, 1983). Eine Abnahme der metabolischen Aktivität geht in der Regel mit gehemmter Proliferation der Zellen einher. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein Assay durchgeführt, in dem der intrazelluläre ATP-Gehalt und somit die Energie, die jeder Zelle zur Verfügung steht, gemessen werden kann.

Die Ergebnisse aus dem MTT-Test und ATP-Lumineszenz-Assay zeigten, dass für die meisten untersuchten polyphenolischen Substanzen keine neuroprotektive Wirkung gegen Neurotransmitter-Metaboliten-induzierten Zelltod und der Abnahme des ATP-Gehaltes nachgewiesen werden konnte. Die antioxidative *in vitro* Wirksamkeit von Flavonoiden und Phenolsäuren wurde mehrmals in der Literatur beschrieben (Chen et al., 1990; Rice Evans et al., 1996; Otero et al., 1997; Pietta, 2000). Ishige et al. (2001) schlugen vor, dass an der protektiven Wirkung von Flavonoiden drei verschiedene Wirkmechanismen beteiligt sind. Flavonoide können mit intrazellulären Antioxidantien wie z.B. Glutathionperoxidase interagieren und möglicherweise deren antioxidativen Fähigkeit erhöhen, reaktive Sauerstoffspezies abfangen und unschädlich machen, und vor einem vermehrten Calciumionen-Einstrom signifikant schützen. Um neuroprotektive Eigenschaften aufzuweisen, muss jedoch ein potentieller Neuroprotektant durch die Zellmembran in die neuronale Zelle eindringen. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die meisten der untersuchten Polyphenole kaum oder gar nicht in die Zelle eindringen können und somit nicht die Fähigkeit besitzen eine schützende intrazelluläre Konzentration zu erreichen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Befund von Saija et al. (1995), der einen Zusammenhang zwischen dem Einfluss auf membran-abhängige Prozesse, wie Peroxidation der Lipidmembran durch freie Radikale, Durchdringen der Lipidmembran und der chemischen Struktur von Polyphenolen darstellte.

Unter den untersuchten Polyphenolen erwies sich nur Luteolin als neuroprotektiv gegen oxidativen Stress, der durch 6-OHDA und 3-HK induziert wurde. Luteolin konnte in den untersuchten Konzentrationen in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen den ATP-Gehalt erhöhen und vor dem Zelltod schützen. Interessanterweise ergab sich, dass Luteolin keinen Einfluss auf das Zellüberleben

und den ATP-Gehalt beim Neuroblastomzellen hatte, die mit Salsolinol behandelt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Neurotoxine zur Induzierung des oxidativen Stresses gewählt. In früheren Studien wurde bereits belegt, dass Salsolinol zum oxidativen Stress führt, indem es die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen fördert und den ATP-Gehalt sowie GSH-Konzentration in SH-SY5Y-Zellen durch Inhibierung der Aktivitäten der mitochondrialen Komplexe I und II, der Tyrosinhydroxylase und der Monoaminoxidase erniedrigt (Bembenek et al., 1983; Storch et al., 2000; Wanpen et al., 2004). In anderen Studien wurde bereits versucht, den Zelltod durch Zugabe von Antioxidantien wie  $\alpha$ -Tocopherol oder durch das wasserlösliche Vitamin E-Analogon Trolox C zu reduzieren (Willets et al., 1995). Jedoch erwiesen sich lediglich Nikotin, Donepezil und N-Acetylcystein als wirksam gegen die Abnahme der Zellproliferation. Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass vermutlich die Toxizität von Salsolinol u.a. auf die Vermittlung durch Nikotin-Rezeptoren zurückzuführen ist (Wanpen et al., 2004; Bonda et al., 2009). In der hier durchgeführten Untersuchung wurde auch 6-OHDA als Neurotoxin verwendet, weil der Einsatz von 6-OHDA in Zellmodellen speziell in der Parkinsonforschung weit verbreitet ist und somit als Kontrolle dienen kann. 6-OHDA ist ein Derivat des Dopamins, das ähnlich wie Salsolinol die Bildung von ROS generiert und durch eine Hemmung des mitochondrialen Komplexes I, der NADH+H<sup>+</sup>-Ubichinon-Reduktase, und zusätzlich Komplexes IV (Cytochrome-c-Oxidase) zum Zelluntergang führen kann (Glinka und Youdim, 1995). 3-HK ist ein Bestandteil des Kynureninwegs, der zur Neurotoxizität durch intrazelluläre Akkumulation von Wasserstoffperoxid führt (Eastman und Guilarte, 1990). Auf Grundlage einer Durchsicht der veröffentlichten Publikationen lässt sich schwer erklären, warum Luteolin keine neuroprotektive Wirkung gegenüber Salsolinol induzierten Zelltod ausübt. Vermutlich sind an dem von Salsolinol-induzierten Zelltod unterschiedliche Signaltransduktionswege beteiligt und Luteolin ist nicht in der Lage, die ausgelösten zytotoxischen Effekte durch das Isochinolin-Alkaloid zu beeinflussen. In der vorliegenden Studie konnte keine protektive Wirkung gegen die ausgewählten toxischen Substanzen beobachtet werden, wenn die SH-SY5Y-Zellen mit Luteolin vorbehandelt und danach mit 3-HK oder 6-OHDA behandelt wurden. Wahrscheinlich wurden die in Luteolin enthaltenen Hydroxylgruppen metabolisiert oder oxidiert. Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon)

ist ein weit verbreitetes Flavonoid-Aglykon, das in hohen Konzentrationen in Sellerie (*Apium graveolens* L.), Paprika (*Capsicum annuum* L.), Perilla (*Perilla frutescens* (L.) Britton.) und Artischocke (*Cynara cardunculus cardunculus ssp. flavescens* Wikl.) zu finden ist und dem zahlreiche vorteilhafte biologische Aktivitäten zugeschrieben werden wie antioxidative Effekte (Manju et al., 2005; Quisheng et al., 2005) oder entzündungshemmende Aktivitäten (Kim und Jobin, 2005; Chen et al. 2007). Luteolin besteht grundsätzlich aus drei Kohlenstoffringen, zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem heterozyklischen Ring C. Der Ring A ist mit zwei phenolischen OH-Gruppen an C-5 und C-7 verbunden, der Ring B trägt auch zwei phenolische OH-Gruppen an dem Kohlenstoffatomen C-3' und C'4. Die enthaltenen OH-Gruppen erhöhen die Polarität und tragen dazu bei, dass Luteolin eine eher mittelpolare Substanz ist und sich in Ethanol, DMSO und Dimethylformamid auflöst.



**Abb. 37: Allgemeine Formel der Flavonoide**

(Quelle: <http://www.globalspec.com/reference/70423/203279/chapter-5-on-line-identification-of-flavonoids-by-hplc-coupled-to-diode-array-detection>)

Ferner wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen mit Sinensetin, einem polymethoxylierten Flavon-Aglykon, das in seiner chemischen Struktur dem Luteolin ähnlich ist, durchgeführt. Die Ergebnisse der hier erfassten Studie zeigten, dass Sinensetin keine neuroprotektive Wirksamkeit bei den Experimenten aufwies. Auch konnte Apigenin und Chrysin, die ebenfalls zur großen Flavon-Gruppe gehören, keine schützende Wirkung nachgewiesen werden. Zudem wurden auch für Cynarosid, ein Luteolin-7-O-Glykosid keine Toxizität reduzierenden Eigenschaften gefunden. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass eine Anwesenheit von freien OH-Gruppen am Kohlenstoffatom 7 und an C-3' und C4' im Ring B eine wichtige Rolle bei Neuroprotektion spielt. Außerdem bestätigen diese Resultate die Hypothese, dass Luteolin zuerst in die Zelle eindringen muss, um neuroprotektive Eigenschaften gegen 6-OHDA- und 3-HK-induzierten Zelltod entwickeln zu können. Die Befunde stehen

in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, bei denen behauptet wurde, dass die Anwesenheit von ortho-ständigen Hydroxylgruppen am B-Ring in Position C'3 und C'4 für das Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich ist (Rice-Evans et al., 1996).

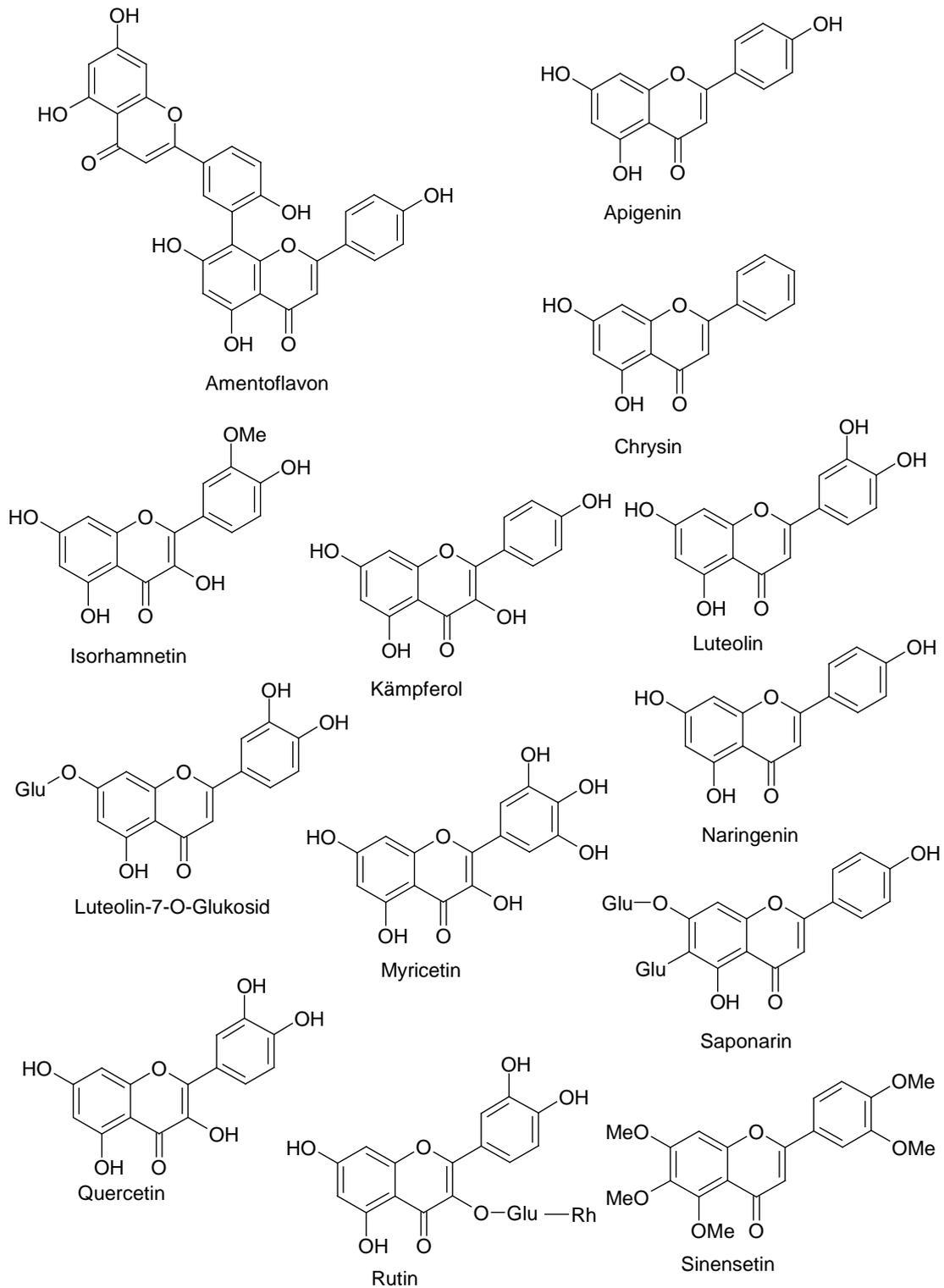
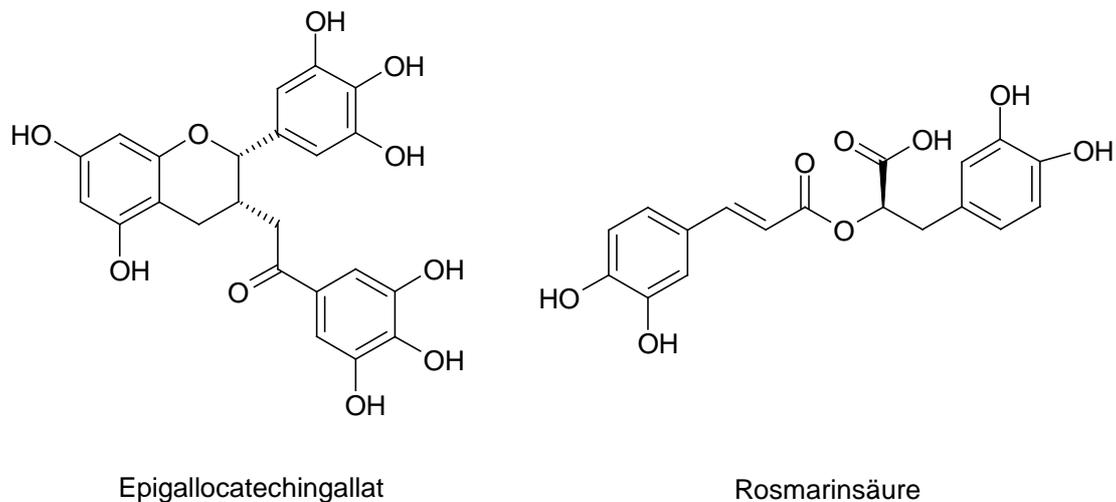


Abb. 38: Strukturformeln der untersuchten Flavonoide



**Abb.39: Strukturformeln der untersuchten Polyphenole aus anderen Gruppen**

Epicatechingallat, EGCG und Quercetin erwiesen sich in Vergleichsstudien zur Wirksamkeit der Flavonoide als am stärksten antioxidativ wirksam (Rice Evans et al., 1996). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit keine schützende Wirkung von EGCG vor einer durch 3-HK-induzierten Neurozytotoxizität in SH-SY5Y-Zelllinie gezeigt werden. Somit stehen die hier gewonnenen Ergebnisse nicht im Einklang mit den Ergebnissen von Jeong et al. (2004). Bei der gleichen verwendeten Konzentration wie bei Jeong et al. (2004) wurden in der vorliegenden Arbeit keine zytoprotektiven Eigenschaften beobachtet. Ferner zeigte sich Quercetin in der von Suematsu et al. (2010) durchgeführten Studie als wirksam gegen die durch Wasserstoffperoxid verursachten Schäden in der SH-SY5Y-Zelllinie. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Wirksamkeit für Quercetin in den untersuchten Konzentrationen gegen den durch Neurotransmitter-Metaboliten induzierten Zelltod festgestellt werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass eine Zugabe von Wasserstoffperoxid die Zellmembranen zerstört und nicht nur für Wasserstoffperoxid, sondern auch für Quercetin durchgängig machen kann. Ein weiterer Hinweis darauf, dass Quercetin durch die Zellen nicht oder sehr schlecht aufgenommen werden kann, zeigen Studie von Rivera et al. (2004, 2008), in denen nachgewiesen wurde, dass wässrige Quercetin-Lösungen im Gehirn-Gewebe sehr niedrige Konzentrationen erreichen, dagegen liposomales Quercetin bei Ratten im fokalen zerebralen Ischämie-Modell eine Neuroprotektion vermittelt.

Zahlreiche Untersuchungen belegen neuroprotektive Eigenschaften für

Östrogene. Es konnte gezeigt werden, dass Östrogene und selektive Östrogen-Rezeptor-Regulatoren vor oxidativer Schädigung durch Glutamat, freie Radikale oder A $\beta$  schützen sowie Aktivität des antioxidativen Enzyms in Mitochondrien wie Superoxiddismutase erhöhen können (Green et al., 1996; Behl et al., 1997, Gridley et al., 1997; Irwin et al., 2012). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch Kämpferol untersucht, das zur Gruppe der Phytoöstrogene gehört. Die Neurotoxizität, die in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe von Neurotransmitter-Metaboliten induziert wurde, konnte mit Kämpferol allerdings nicht verringert werden, wie es bei Untersuchungen von Roth et al. (1999) bei der Phäochromozytomzelllinie PC12 der Ratte belegt wurde. Ein weiterer Naturstoff in dieser Studie, die Rosmarinsäure ist ein Depsid aus Kaffeesäure und  $\alpha$ -Hydroxyhydrokaffeesäure, der eine hohe antioxidative Eigenschaft besitzt (Zheng und Wang, 2001; Liu et al., 1992) und welche in dopaminerger MES23.5-Zelllinie der Ratte den durch 6-OHDA-induzierten Zelltod reduzierte (Ren et al., 2009). Die Resultate der vorliegenden Arbeit korrelieren nicht mit den Angaben aus der Literatur, weil für Rosmarinsäure kein schützender Effekt auf die Zytotoxizität in den SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nachgewiesen werden konnte. Dies könnte damit erklärt werden, dass in den früheren Studien unterschiedliche Zellmodelle und andere Neurotoxine eingesetzt wurden.

In der Literatur finden sich in scheinbarem Einklang zu den bisher dargestellten Ergebnissen auch Hinweise darauf, dass weder eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität noch eine Neutralisierung der ROS zu einem gesundheitsfördernden Effekt beiträgt (Cook et al., 2007; Katsiki und Manes, 2009). Es wurde postuliert, dass eine Bildung der reaktiven Sauerstoffverbindungen eine zelluläre Signalübertragung zwischen Mitochondrien und anderen Kompartimenten induzieren könnte und somit die Aktivität der Enzyme der zweiten Phase ankurbelt, die vor der oxidativen Schädigung vor ROS schützen (Guzy und Schumacker, 2006; Owusu-Ansah et al., 2008). Diese Hypothese könnte teilweise erklären, warum fast alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polyphenole keinen Schutz vor dem neuronalen Zelltod liefern konnten. Es muss jedoch erwähnt werden, dass sich die Vorteile von ROS-Bildung nicht unbedingt auf neuronale Zellen beziehen müssen, die eine höhere Anzahl an Mitochondrien haben als andere Zellen.

#### **4.4 Einfluss ausgewählter Pflanzenextrakte auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt**

Eine Überlegenheit von Pflanzenextrakten gegenüber Einzelsubstanzen besteht oft darin, dass sie aus verschiedenen Wirkstoffen bestehen, die entweder eine synergistische oder eine vielfältige Wirkung aufweisen können. Das beste Beispiel dafür ist der *Ginkgo biloba*-Extrakt, der viele Bestandteile enthält, die unterschiedlich zu der neuroprotektiven Wirkung beitragen. In einer Studie wurde belegt, dass Ginkgolid und sein Abbauprodukt Bilobalid, ein Sesquiterpene, vor Ischämie und vor der durch Glutamat-induzierten Toxizität durch Reduktion des Anstiegs von Calcium-Ionen schützen (Zhu et al., 1997; Chandrasekaran et al., 2002). Die Biflavonoide Amentoflavon, Ginkgetin und Isoginkgetin wirkten dagegen als Neuroprotektivum gegen Zytotoxizität, die mittels oxidativer Belastungen und A $\beta$  verursacht wurde (Kang et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des Augentrostkraut-Extraktes, (*Euphrasiae herba*), Sellerieblätter-Extraktes (*Apium folium*) und lipophilen Artischocken-Extraktes (*Cynara cardunculus* L. ssp. *flavescens* Wikl.) auf die Zytotoxizität und den ATP-Gehalt untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Lösungsmittel wurden so ausgewählt, dass sich eine möglichst große Menge an unpolaren Inhaltstoffen sehr gut darin löst oder um die in der Volksheilkunde verwendete Darreichungsform nachzuahmen.

Die Experimente bezüglich der neuroprotektiven Wirkungen gegenüber Neurotransmitter-Metaboliten auf SH-SY5Y-Zellen zeigten, dass in den untersuchten Konzentrationen keine der Extrakte die verursachte Zytotoxizität reduzieren konnte. Eine mögliche Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse ist die Tatsache, dass die Konzentration an möglichen Wirkstoffen in den Extrakten zu niedrig war und somit konnte keine neuroprotektive Wirkung beobachtet werden. Es wäre sinnvoll in der Zukunft aus den Pflanzenextrakten durch Fraktionierung einzelne organische Fraktionen, die Luteolin enthalten, zu erhalten und sie auf neuroprotektive Wirkung zu untersuchen. Es ist auch sehr wahrscheinlich, dass die in der untersuchten Auszügen erhaltenen Inhaltstoffe eher entzündungshemmende Eigenschaften besitzen und auf diese Weise neuroprotektive Effekte ausüben könnten, was aufgrund der Abwesenheit von Mikrogliazellen und Astrozyten im verwendeten Zellmodell nicht

aufzuweisen war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenextrakte als unwirksam gegen den neuronalen Zelltod in der SH-SY5Y-Zelllinie zeigten.

#### **4.5 Einfluss von Quercetin- und Rutin-Nanokristallen auf den ATP-Gehalt**

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Löslichkeit und damit auch der Erhöhung der Bioverfügbarkeit der schwerlöslichen Substanzen besteht in der Herstellung von Nanokristallen durch Hochdruckhomogenisation. Dabei wird die Substanz in einer Tensidlösung zum Verhindern der Aggregation mit Drücken von bis zu 1500 bar homogenisiert, somit die Partikelgröße im Nanometerbereich liegt.

Dabei zeigten die Ergebnisse der von Teskac et al. (2010) durchgeführten Studie, dass eine Resveratrol-Nanosuspension die mitochondriale Aktivität nach UV-Strahlung normalisieren konnte, wobei Resveratrol selber keinen signifikanten Einfluss auf Mitochondrien hatte. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Flavonoid-Nanokristallen auf den ATP-Gehalt in der SH-SY5Y-Zellen untersucht. Es wurden zwei Flavonoide ausgewählt: Quercetin, weil es bei Pietta (2000) die höchste antioxidative Kapazität besitzt bzw. eine der höchsten Kapazität bei Ishige et al. (2001) zeigt sowie sein Glykosid Rutin.

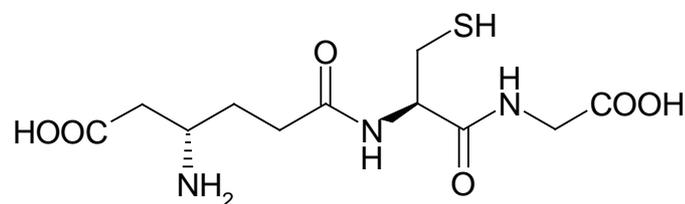
Rutin- und Quercetin-Nanokristalle konnten in keiner der untersuchten Konzentrationen und mit keiner Partikelgröße die durch Neurotransmitter-Metaboliten verursachte ATP-Abnahme erhöhen. Die Quercetin-Nanokristalle erwiesen sich sogar als toxisch. Eine Erhöhung der Quercetin-Konzentration bewirkte eine Verstärkung des zytotoxischen Effektes. In der Literatur findet man zahlreiche Hinweise darauf, dass Quercetin nicht nur antioxidativ wirkt, sondern auch in höheren Konzentrationen einen negativen Einfluss auf neuronale Zelllinien haben kann (Metodiowa et al., 1999; Spencer et al., 2003; Jakubowicz-Gil et al., 2008). In diesen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Quercetin unter gewissen Bedingungen prooxidative (Metodiowa et al., 1999) und zytotoxische (Spencer et al., 2003) Eigenschaften entfaltet. Anhand dieser Daten sollte die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Neurotoxizität der Quercetin-Nanokristalle auf prooxidative Eigenschaften von Quercetin zurückzuführen sein.

Auch die Compound-Formulierung, worin die Flavonoide suspendiert wurden, erwies sich als schwach toxisch. Auffällig war jedoch die steigende Toxizität je kleiner die Partikelgröße war. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass die Flavonoid-Nanokristalle zwar tatsächlich in die Zelle eindringen, aber nicht in der Lage sind, als Neuroprotektivum zu wirken.

#### 4.6 Einfluss von Naturstoffen auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt

Der menschliche Körper verfügt über unterschiedliche endogene Abwehrmechanismen gegen freie Radikale z.B. Antioxidantien mit niedrigerer Molarmasse und Proteine mit antioxidativen Eigenschaften, welche die Hirnzellen gegen Folgen von oxidativem Stress und seinen Auswirkungen schützen und das Redox-Gleichgewicht zwischen freien Radikalen und Antioxidantien sowohl in als auch außerhalb der Zelle aufrecht halten. Zu einer Vielzahl von entgiftenden Stoffen, die kontinuierlich in den Zellen produziert werden, gehören u.a. GSH und Natriumpyruvat.

GSH ist ein Tripeptid, das aus drei Aminosäuren: Cystein, Glycin und Glutamat besteht und über Glutamatcysteinligase und Glutathion-Synthetase gebildet wird. Die Thiolgruppe von Cystein dient als Elektronendonator für die Reduktion von giftigen Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden. Das Produkt der Oxidation von GSH das Glutathiondisulfid (GSSG), wird wiederum durch die Glutathionreduktase reduziert und ist wieder einsatzfähig. Das Gleichgewicht zwischen dem intrazellulären GSH- und GSSG-Gehalt und mit ihnen verbundenen Enzymen ist von großer Bedeutung (Jain et al., 1991; Aquilano et al., 2011).



Glutathion

Abb. 40: Strukturformel von Glutathion

Eine der grundlegenden GSH-Funktionen als intrazelluläres Antioxidans

besteht in der Neutralisation vom oxidativen Stress, der durch schädigende freie Radikale verursacht wird. Die Bedeutung des Normalgehaltes von GSH zeigen die Untersuchungen von Ebadi et al. (2000) und Mytilineou et al. (2002), in denen ein Zusammenhang zwischen der Abnahme des GSH-Gehaltes und vermehrter Produktion von Superoxid-Radikalen nachgewiesen werden konnte. Zu weiteren Folgen der Reduktion des GSH-Gehaltes gehört auch die Aktivierung der neuronalen 12-Lipoxygenase, welche die Bildung von Peroxiden und Einfluss der Calcium-Ionen vermittelt (Heales et al., 1995; Li et al., 1997). Im Endeffekt kommt es zu einer Störung der mitochondrialen Funktion, einem Energieverlust und schließlich zum neuronalen Zelltod (Jain et al., 1991). Zudem zeigten verschiedene Studien, dass die GSH-Erschöpfung an der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten beteiligt ist (Pearce et al., 1997; Do et al., 2000; Sian et al., 2004; Yao et al., 2006).

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von GSH gegenüber den endogenen Neurotoxinen 3-HK, 6-OHDA und Salsolinol auf SH-SY5Y-Neuroblastomzellen untersucht. Die Zytotoxizität und die Abnahme des ATP-Gehaltes, die mit 6-OHDA und 3-HK induziert wurden, konnten durch Zugabe von GSH signifikant reduziert werden. Es wurde belegt, dass die Autooxidation von Katecholaminen, zu denen auch 6-OHDA gehört, durch Bildung von reaktiven Quinonen eine Quelle intrazellulärer ROS darstellt und somit an pathologischen Prozessen bei neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Parkinson beteiligt ist (Cohen und Heikkila, 1974; Graham et al., 1978). Der vermutete Wirkmechanismus für die protektiven Effekte von GSH besteht in der Reaktion der Sulfhydrylgruppe des Cysteins im GSH-Molekül mit Quinonen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigten ebenfalls, dass GSH einen Schutz vor 3-HK-induzierten Zelltod lieferte. Dies könnte ähnlich wie bei 6-OHDA mit der Anwesenheit der Sulfhydrylgruppe im GSH erklärt werden. Interessante Daten lieferten Chiueh und Rauchala (1999), die von Entstehung eines Glutathion-Komplexes mit dem Stickstoffmonooxid, sogenanntem S-Nitrosoglutathion, im Gehirn berichteten. S-Nitrosoglutathion soll nicht nur 100x stärkere antioxidative Eigenschaften besitzen, sondern auch in der Lage sein, die Aktivität der Caspase-3 zu hemmen und auf diese Weise vor Apoptose schützen. Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse und einer umfassenden Durchsicht der Literatur kann man konstatieren, dass GSH eine wichtige Rolle in der Entgiftung der Zellen spielt und dass eine Senkung des GSH-Spiegels in

der Zelle eine oxidative Schädigung des Komplexes I verursacht (Chinta et al., 2006; Chinta et al., 2007).

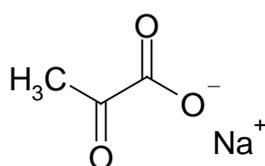
Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass es zwischen der Reduktion von durch 3-HK und 6-OHDA induzierten Zelltod und dem mitochondrialen Metabolismus einen Zusammenhang gibt und dass die Verabreichung von GSH in der Lage ist, die Zellen vor Zytotoxizität zu schützen. Interessanterweise verstärkten niedrigere Konzentrationen von GSH (unter 250  $\mu\text{M}$ ) in Kombination mit Salsolinol die Zytotoxizität und führten zur Abnahme des ATP-Gehaltes, während höhere Konzentrationen von GSH (über 250  $\mu\text{M}$ ) den Zelltod reduzierten und somit den ATP-Gehalt erhöhten, wie nach Behandlung mit 3-HK und 6-OHDA zu sehen war. Mehrere Studien bestätigten eine neurotoxische Wirkung von Salsolinol (Willems et al., 1996; Akao et al., 1999; Storch et al., 2000; Naoi et al., 2002; Wanpen et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Verstärkung der Toxizität von Salsolinol in Anwesenheit von GSH (100-250  $\mu\text{M}$ ) gezeigt. Aus den hier aufgeführten Ergebnissen geht hervor, dass während der 24-stündigen Inkubation von Salsolinol und Konzentrationen von GSH unter 250  $\mu\text{M}$  bei physiologischer Temperatur von 37°C und dem pH-Wert von 7 eine oder mehrere Substanzen gebildet werden, die ein höheres neurotoxisches Potential als Salsolinol besitzen.

Eine mögliche Erklärung dafür liefert Zhang (2002), der zeigte, dass eine Oxidation von Salsolinol in Anwesenheit von Cystein zur Bildung neuer und neurodegenerativer Tetrahydroisoquinolinderivate führen kann. Da im GSH-Molekül Cystein enthalten ist und somit GSH als Vorläufer der schwefelhaltigen Aminosäure dient, scheint es sehr wahrscheinlich zu sein, dass unter gewissen pathologischen Bedingungen, wenn Salsolinol oxidiert wird, niedrigere Konzentrationen von GSH eine wichtige Rolle bei der Induzierung von Neurotoxizität spielen können.

Mehrere Untersuchungen ergaben, dass Salsolinol an Morbus Parkinson beteiligt sein kann (Ohta et al., 1987; Niwa et al., 1991; Moser und Kömpf, 1992; Ikeda et al., 1993). Im Liquor von Patienten mit Morbus Parkinson wurde ein erhöhter Salsolinol-Spiegel festgestellt, wobei der GSH-Spiegel erniedrigt war (Moser und Kömpf, 1992; Garrido et al., 2011). Ferner zeigten Wanpen et al. (2004), dass Salsolinol den GSH- und ATP-Gehalt in SH-SY5Y-Zellen reduzieren kann. Interessant sind auch die Beobachtungen von Garrido et al. (2011), dass Störungen im

physiologischen GSH-Gleichgewicht einen selektiven Auslöser für die Degeneration dopaminerger Neuronen darstellen können. Laut Antkiewicz-Michałuk et al. (1997) war der Salsolinol-Spiegel im Liquor von Patienten mit Morbus Parkinson signifikant erhöht (1,2  $\mu\text{M}$ ), während eine Studie von Sjöquist et al. (1980) auf einen erhöhten Salsolinol-Spiegel in der Rückenmarkflüssigkeit von Alkoholabhängigen zwischen 60-112 nM hinwies. In der vorliegenden Arbeit wurde Salsolinol in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt als in der Rückenmarkflüssigkeit von Parkinson-Patienten oder Alkoholikern gefunden wurden. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  im MTT-Test und im ATP-Lumineszenz-Assay wurde keine Erhöhung der Zytotoxizität in SH-SY5Y-Zellen festgestellt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass *in vitro* Zellkultur-Modelle weniger empfindlich sind als *in vivo* Bedingungen. Ferner wurden in der vorliegenden Arbeit Kurzzeit-Versuche und nicht Langzeitversuche durchgeführt.

Zu anderen antioxidativen Schutzfaktoren des Körpers gehört u.a. Natriumpyruvat. Dieses Molekül ist das Endprodukt der Glykolyse, die allen Zellen zur Energiegewinnung dient. Natriumpyruvat gelangt über einen Symport mit  $\text{H}^+$  in der inneren Membran in die Mitochondrien (Poole und Halestrap, 1993). Weiterhin besitzt Natriumpyruvat starke antioxidative Eigenschaften, die er der  $\alpha$ -Keto-Carboxylat-Struktur verdankt.



Natriumpyruvat

**Abb. 41:** Strukturformel von Natriumpyruvat

Somit kann es reaktive Sauerstoffverbindungen direkt in den Mitochondrien neutralisieren und das Membranpotential stabilisieren (Wang et al., 2007). Eine weitere Studie berichtete, dass Natriumpyruvat durch erhöhte NADPH-Bildung zur Verbesserung des GSH-Redoxstatus beiträgt (Mallet et al., 2005). Es wurde bereits in mehreren Zellmodellen nachgewiesen, dass Natriumpyruvat den Schutz vor solchen Neurotoxinen wie  $\text{A}\beta$  (Alvarez et al., 2003), 6-OHDA (Fernandez-Gomez et al., 2006; Wang et al., 2007) und QUIN (Ryu et al., 2004) liefert. Ferner erwies sich

Natriumpyruvat in weiteren Studien als wirksam gegen Ischämie, indem es den die Erythropoetin-Bildung fördernden Hypoxie-induzierten Faktor 1- $\alpha$  und den Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Weg aktivierte, der antiapoptotische Signale vermittelt (Lee et al., 2001; Mongan et al. 2001; Ryou et al., 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass Natriumpyruvat einen neuroprotektiven Effekt hat und somit vor dem Zelltod und der Abnahme des ATP-Gehaltes in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen durch Neurotransmitter-Metaboliten schützt. Über eine Verbesserung des neuronalen Schutzes mit Natriumpyruvat gegen den durch 6-OHDA-induzierten Zelltod wurde bereits in der Literatur berichtet (Fernandez-Gomez et al., 2006; Wang et al., 2007), somit steht die erfasste Arbeit im Einklang mit den früheren Studien. Allerdings werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die Reduktion von Neurotoxizität mittels Natriumpyruvat gegen 3-HK und Salsolinol zum ersten Mal gezeigt. Interessanterweise wurde durch eine exzessive Steigerung der Konzentration von Natriumpyruvat keine weitere Verbesserung der neuroprotektiven Eigenschaften gegen Neurotransmitter-Metaboliten erreicht.

#### **4.7. Einfluss einer Kombination von Luteolin und Natriumpyruvat auf den neuronalen Zelltod und den ATP-Gehalt**

Nachdem die Beteiligung von Luteolin und Natriumpyruvat jeweils separat gegen durch 3-HK- und 6-OHDA-ausgelösten Zelltod und die Abnahme des ATP-Gehaltes in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde eine Kombination der beiden Wirkstoffe untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Behandlung mit Luteolin und Natriumpyruvat zu einer signifikanten Verstärkung der neuroprotektiven Eigenschaften gegen 3-HK- und 6-OHDA-Neurotoxizität fuhr. Zusätzlich konnte eine niedrigere Konzentration von Luteolin und Natriumpyruvat zugesetzt werden, um den gleichen protektiven Effekt zu erreichen. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Beleg dafür, dass Luteolin und Natriumpyruvat ihre neuroprotektiven Eigenschaften über verschiedene molekulare Mechanismen ausüben. Die beiden verwendeten Neurotoxine 6-OHDA und 3-HK stellen eine Quelle für oxidativen Stress dar, der u.a. Zellmembranen schädigen und im Endeffekt zum Zelltod führen kann (Eastman und Guilarte, 1990; Glinka und Youdim, 1995). 6-OHDA besitzt im Unterschied zu Dopamin eine zusätzliche Hydroxylgruppe am Phenyl-Ring und kann aufgrund dessen leichter als Dopamin

oxidieren und freie Radikale bilden. Es wurde nachgewiesen, dass 6-OHDA die antioxidative Kapazität der Zelle verringert, indem es den Gehalt von GSH und die Aktivität der Superoxiddismutase senkt. Ebenfalls trägt 6-OHDA durch eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette zum Energieverlust bei (Sachs und Jonsson, 1975). 3-HK, das bei dem Tryptophan-Katabolismus entsteht, besitzt auch einen o-aminophenolischen Rest, was zur spontanen Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Im weiteren Verlauf dient Wasserstoffperoxid als Substrat für die Cu/Fe abhängige Haber-Weiss-Reaktion, bei der neben Hydroxyl-Ionen auch hochreaktive Hydroxyl-Radikale freigesetzt werden (Okuda et al., 1996; Vasquez et al., 2000).

Basierend auf den Daten aus der Literatur bezüglich der Wirkmechanismen der untersuchten Neurotoxine, kann man schlussfolgern, dass der Schutz vor Zytotoxizität durch Vorbeugen der Auswirkungen des oxidativen Stresses erreicht werden kann. Für Luteolin wurde bisher nachgewiesen, dass das Flavonoid die Eigenschaften eines Radikalfängers besitzt (Ishige et al., 2001). Zudem kann Luteolin das intrazelluläre Redoxstatus modulieren, indem es die Aktivität der Superoxiddismutase und Katalase sowie den intrazellulären GSH-Gehalt in Anwesenheit von ROS stabilisiert (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2012). Zu Grunde liegt wahrscheinlich die Wirkung von Luteolin auf dem Nrf2-Signalweg, der die Aktivität u.a. von Glutamat-Cystein-Ligase und Glutathion-S-Transferase induziert und eine höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress hervorruft (Wruck et al., 2007). Natriumpyruvat besitzt ebenfalls die Fähigkeit, die intrazelluläre antioxidative Kapazität zu erhöhen (Wang et al., 2007). Weiterhin kann Natriumpyruvat durch die Aktivierung des PI3K/Akt-Wegs die Apoptose hemmen (Fernandez-Gomez et al., 2006; Ryou et al., 2012).

#### **4.8 Einfluss auf die Caspase-3/7-Aktivität**

Als nächstes sollte aufgeklärt werden, worauf der neuroprotektive Effekt von Luteolin und Natriumpyruvat und der neurotoxische Effekt von GSH in Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  und Salsolinol beruhen und vor welcher Art von Zelltod geschützt wird bzw. welche Art vom Zelltod hervorrufen wird. Grundsätzlich unterscheidet man zwei gegensätzliche Arten von Zelltod die Apoptose und die Nekrose. Apoptose ist charakterisiert durch Schrumpfung der Zelle und Zerschneiden des nukleären Kern-Chromatins mit Endonukleasen in gleichmäßige Fragmente unter Erhaltung der Zellmembranintegrität. Abschließend werden die Zellreste von

Makrophagen phagozytiert ohne jegliche entzündliche Vorgänge hervorzurufen und dabei umliegende Zellen zu schädigen. Nekrose führt wiederum infolge einer Zellschädigung und des Ausscheidens von Zellbestandteilen zur ausgedehnten Inflammation der umliegenden Zellen. Apoptose ist die häufigere Art des Zelltodes und es kommt oft zum inadäquaten Zelluntergang durch Apoptose z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer.

Caspase-3 ist ein Schlüsselenzym, das eine große Rolle in der Regulation der Apoptose spielt und somit wird seine Aktivität als Maß für Apoptoseinduktion angesehen. Eine Senkung der Caspase-3-Aktivität kann die Zelle vor dem programmierten Zelltod retten. Als erstes wurde untersucht, ob die ausgewählten Neurotoxine einen Zelltod über Apoptose hervorrufen. Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen im Einklang mit den Daten aus der Literatur, wo festgestellt wurde, dass 3-HK (Jeong et al., 2004; Lee et al., 2005), 6-OHDA (von Coelln et al., 2001) und Salsolinol (Wanpen et al., 2004) einen programmierten Zelltod in SH-SY5Y-Zellen auslösen.

Die Applikation von Luteolin auf humane SH-SY5Y-Neuroblastomzellen führte während der 24-stündigen Behandlung mit 6-OHDA und 3-HK zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate. Diese Daten bestätigen die früheren erhaltenen Ergebnisse aus dem MTT-Test und dem ATP-Lumineszenz-Assay, dass Luteolin die neuroprotektive Wirkung besitzt und vor dem durch 3-HK- und 6-OHDA-ausgelösten programmierten Zelltod schützt.

Darüber hinaus konnte mittels Caspase-3/7-Assay gezeigt werden, dass Luteolin schon ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  in diesem Zellmodell einen hemmenden Einfluss auf Apoptose ausübt. Dieser Befund deckt sich gut mit den Angaben von Lee et al. (2011), die nachwiesen, dass Luteolin die durch D-Galactosamin/LPS erhöhte Caspase-3-Aktivität in Leberzellen in Mäusen erniedrigt (Lee et al., 2011). Ferner konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass Luteolin einen Schutz vor Apoptose lieferte, indem die durch Tunikamycin, einem endoplasmatischen Retikulum-Stress-Auslöser, erhöhte proapoptotische Caspase-3-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen verringert wurde (Ishisaka et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit erwies sich auch Natriumpyruvat als Schutzmittel des Zelltodes durch Apoptose. Ein Zusatz von Natriumpyruvat konnte signifikant die Caspase-3/7-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen reduzieren und diese somit vor dem

Zelluntergang retten. Der inhibitorische Effekt von Natriumpyruvat auf Caspase-3/7-Aktivität ist in der Literatur bereits beschrieben. Ullah et al. (2011) berichteten, dass Natriumpyruvat-Behandlung zur Verringerung der durch Ethanol-induzierten apoptotischen Neurodegeneration bei 7-Tage alten Ratten führte, indem u.a. Caspase-3/7-Aktivität blockiert wurde.

Aufgrund der vor dem Zelltod verstärkt schützenden Eigenschaften einer Kombination aus Luteolin und Natriumpyruvat gegenüber den Einzelsubstanzen, wie die MTT-Messungen und die ATP-Lumineszenz-Assays zeigten, waren positive und auch verstärkte Einflüsse auf die Caspase-3/7-Aktivität zu erwarten. So ist in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen worden, dass schon eine Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat und 3  $\mu\text{M}$  Luteolin das Überleben von SH-SY5Y Neuroblastomzellen durch die Abnahme der Caspase-3/7-Aktivität sicherte. Ein signifikanter Schutz vor dem Zelluntergang konnte schon bei einer Zugabe von 100 $\mu\text{M}$  Natriumpyruvat und 3  $\mu\text{M}$  Luteolin beobachtet werden.

Mittels Caspase-3/7-Assays konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit GSH über 250  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Schutz vor der durch Salsolinol vermittelten Apoptose liefern konnte. In der Literatur sind keine Publikationen zu finden, welche die Wirkungen von äußerlich verabreichtem GSH auf den Verlauf der Apoptose beschreiben. Die Effekte von GSH auf den programmierten Zelltod werden zum ersten Mal im Rahmen der durchgeführten Arbeit dargestellt.

Dagegen verursacht eine Inkubation von GSH unter 250  $\mu\text{M}$  in Anwesenheit von Salsolinol- verursachte eine deutliche Induzierung der Caspase-3/7-Aktivität und somit verstärkte dies noch die durch Salsolinol ausgelöste Apoptoserate. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate, die mit Hilfe des MTT-Tests und ATP-Assays erhalten wurden, dass GSH in den Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  die Toxizität von Salsolinol verstärkt und dass der dadurch ausgelöste Zelltod über Apoptose stattfindet.

#### **4.9 Vermittlung der Neuroprotektion durch Wirkung auf Bcl-2**

Nachdem die antiapoptischen Wirkungen von Luteolin, Natriumpyruvat und GSH und proapoptische von GSH-Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  sowie Salsolinol nachgewiesen werden konnten, wurde ein Protein des intrinsischen Apoptose-Signalweges der Bcl-2-Familie untersucht. Mehrere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten Bildung von Bcl-2 und einer geringeren

Apoptoseneigung (McDonnell et al., 1990; Tieu et al., 1999). Ferner wurde nachgewiesen, dass das Bcl-2 Protein in neuronalen Zellen hoch exprimiert ist (Middleton et al., 1998), hauptsächlich im Bereich der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums (Zamzami et al., 1998) wirkt und dabei das mitochondrielle Membranpotential stabilisiert (Shimizu et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge an Bcl-2 in Neuroblastomazellen nach 24 Stunden Behandlung mit Testsubstanzen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die durch 3-HK- und 6-OHDA-ausgelöste Unterdrückung der Bcl-2-Produktion und damit vermittelte Apoptose durch Luteolin reduziert werden konnte. Bei Durchsicht der Literatur ergibt sich, dass die Expression von Bcl-2 durch verschiedene Polyphenole beeinflusst werden kann. Es konnte bereits gezeigt werden, dass u.a. das Isoflavon Puerarin (Xing et al., 2011) und das Flavon Baicalein (Liu et al., 2010) neuroprotektive Eigenschaften besitzen und das Überleben der Zellen durch Hochregulation von Bcl-2 sichern. Für Luteolin existieren Berichte über Interaktionen mit den Proteinen der Bcl-2-Familie. In einer Studie von Qi et al. (2011) erhöhte Luteolin in Ratten-Kardiomyozyten die Expression von Bcl-2. Ebenfalls konnte mittels Luteolin das Verhältnis des proapoptotischen Proteins Bax zu Gunsten von Bcl-2 beeinflusst werden (Qi et al., 2011).

In der vorliegenden Untersuchung konnte beobachtet werden, dass Natriumpyruvat nach 24-stündiger Inkubation mit Neurotransmitter-Metaboliten den Bcl-2-Gehalt in SH-SY5Y-Zellen erhöhen konnte. Eine antiapoptotische Wirkung von Natriumpyruvat wurde schon bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M nachgewiesen. Eine Erhöhung der Konzentration von Natriumpyruvat bewirkte keine Zunahme an der zellulären Bcl-2-Menge bei Behandlung mit 3-HK. Wahrscheinlich erreichte Natriumpyruvat bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M sein Maximum. Für 6-OHDA und Salsolinol bewirkte eine Erhöhung der Natriumpyruvat-Konzentration einen Anstieg an der intrazellulären Bcl-2-Konzentration. Ebenfalls sind für Natriumpyruvat Daten in der Literatur vorhanden, welche die Überexpression von Bcl-2 nach der Inkubation mit Natriumpyruvat beschreiben. In einer von Lee et al. (2003) an endothelialen HUVECs Zellen durchgeführten Studie wurde herausgefunden, dass Natriumpyruvat durch Hochregulation von Bcl-2 einen Schutz vor Wasserstoffperoxid-Toxizität liefert. Interessanterweise führte eine Koinkubation von Luteolin und Natriumpyruvat nicht zur erwarteten Schutzverstärkung vor 3-HK und 6-OHDA-induzierter Apoptose. Dies kann dadurch erklärt werden, dass an der

durch Luteolin und Natriumpyruvat vermittelten Neuroprotektion auch andere antiapoptotische Faktoren beteiligt sein können.

Bei der gemeinsamen Behandlung von exogen verabreichten GSH ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  und Salsolinol wurde eine deutliche Erhöhung der Bcl-2-Konzentration beobachtet, was auf eine antiapoptotische Wirkung von GSH hinweist. Allerdings wurde nach der Inkubation von GSH in Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  in Anwesenheit von Salsolinol festgestellt, dass der Bcl-2-Gehalt stark erniedrigt war im Vergleich zum Bcl-2-Gehalt nach Salsolinol-Behandlung ohne Zusatz von GSH. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass wahrscheinlich während der gemeinsamen Inkubation von exogenem GSH in Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  und Salsolinol eine oder mehrere Substanzen gebildet werden, die in einem höheren Maß als Salsolinol Apoptose auslösen.

#### **4.10 Untersuchungen zur Kombination von Glutathion und**

##### **Salsolinol**

Es wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Verstärkung der Salsolinol-Toxizität in Anwesenheit von niedrigeren Konzentrationen von GSH und der Bildung neuerer Substanzen unter diesen Bedingungen besteht. Zu diesem Zweck wurde eine 24-stündige Inkubation von GSH in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  mit toxisch wirkender Konzentration von Salsolinol unter physiologischen Bedingungen (pH 7, 37°C) durchgeführt. Danach erfolgte eine Messung unter Verwendung der HPLC.

Eine HPLC-Analyse zeigte deutlich, dass auf dem Chromatogramm einer Salsolinol- und GSH-Probe ein zusätzlicher Peak zu sehen ist. Dieser Befund deckt sich gut mit den Angaben in der Literatur. Wie bereits im Kapitel 4.6.1 beschrieben, wurde nachgewiesen, dass Salsolinol in Anwesenheit von Cystein oxidiert werden kann und auf diese Weise andere nervenschädigende Tetrahydroisoquinolinderivate entstehen können (Zhang, 2002). Zudem wurde postuliert, dass es während einer Oxidierung von Dopamin und anderen Katecholaminen zur Generierung von Quinonen, Anreicherung von zytotoxischen ROS und Umsetzung zu reaktiven Katechol-Thioetherderivaten kommt, z.B. in der Reaktion mit GSH, die zum Neurodegeneration beitragen (Graham et al., 1978; Montine et al., 1997; Montine et al., 2000). Ferner wurde in anderen Studien gezeigt, dass GSH unter bestimmten

Bedingungen als Prooxidanz wirken kann (Fischer-Nielsen et al., 1992; Spear und Aust, 1995). So kann man davon ausgehen, dass GSH bei niedrigen Konzentrationen prooxidative Eigenschaften sichert und dabei einige Substanzen wie z.B. Salsolinol oxidieren kann, was die Entstehung toxischerer Verbindungen bedingt. Der dadurch resultierende oxidative Stress führt schließlich zum Nervenzelltod bei neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Parkinson.

## 5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass wahrscheinlich ein geeignetes Zellmodell für die Untersuchung der Neurotoxizität von KYNA und QUIN außer neuronalen Zellen auch Zellen des Immunsystems beinhalten sollte. Dies könnte beispielsweise durch *in vitro* Kokultivierung einer neuronalen Zelllinie mit einer Mikrogliazelllinie erfolgen. Ferner sollte untersucht werden, wie ein Galaktose-Zusatz den Stoffwechselvorgang von neuronalen Zellen beeinflusst.

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Pflanzenextrakte, die Luteolin enthalten, könnten durch chromatographische Methoden fraktioniert und auf neuroprotektive Wirkung untersucht werden. Das verwendete Zellmodell könnte auch aus zwei Zelllinien bestehen: einer neuronalen Zelllinie und einer Mikrogliazelllinie.

Ein weiterer Schluss, der aus der erfassten Untersuchung gezogen werden kann ist, dass die meisten Flavonoide nicht in der Lage sind, in die neuronale Zelle einzudringen. Natriumpyruvat wird in die Zelle über einen  $H^+$  Monocarboxylat-Carrier (Poole und Halestrap, 1993) transportiert, GSH dagegen über einen mitochondrialen Dicarboxylat-Carrier (Kamga et al., 2010).

Versprechend wäre der Einsatz der Kombination von Luteolin und Natriumpyruvat als Neuroprotektant bei der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen. Eine ausgiebige Forschung wäre weiter notwendig um diese neuroprotektive synergistische Wirkung von Luteolin und Natriumpyruvat zu verstehen. Anhand von Tierversuchen und klinischen Studien könnte untersucht werden, ob sich diese Kombination bei der Behandlung neurodegenerativer Krankheiten als effektiv erweist.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine bisher unbekannte Verstärkung der Toxizität von Salsolinol in Anwesenheit von GSH in einer Konzentration unter 250  $\mu M$  aufgezeigt werden. Künftig sollte aufgeklärt werden, welche Verbindungen während der Koinkubation von Salsolinol in Anwesenheit von GSH in einer Konzentration unter 250  $\mu M$  entstehen. Die Verbindungen sollten weiterhin auf Toxizität untersucht werden. Zusätzlich sollte getestet werden, ob der erniedrigte intrazelluläre GSH-Spiegel einen Einfluss auf die Verstärkung der neurotoxischen Eigenschaften von Salsolinol hat.

## 6. Zusammenfassung

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass endogen gebildete Neurotoxine an der Entstehung einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer-Krankheit oder Parkinson-Krankheit beteiligt sein können. Mehrere Studien bestätigten, dass zu den Faktoren, die das Absterben der neuronalen Zellen begünstigen, zählen oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und Abnahme der antioxidativen Kapazität der Zelle. QUIN, KYNA und 3-HK, Metaboliten des Kynureninwegs und Salsolinol, ein Dopamin-Derivat werden mit mehreren Krankheiten des zentralen Nervensystems assoziiert. Als eine viel versprechende Therapiemöglichkeit gegen Neurodegeneration wird der Einsatz von Flavonoiden und anderen polyphenolischen Verbindungen pflanzlicher Herkunft aufgrund der antioxidativen Eigenschaften *in vitro* betrachtet.

Um Neurotoxizität oder Neuroprotektion gegenüber Kynurenin-Metaboliten zu untersuchen, werden in der neurobiologischen Forschung aufwendige Primärzellen-Modelle genutzt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein einfaches, schnelles und genaues *in-vitro* Zellmodell aus menschlichen SK-N-SH- und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen durch Behandlung mit verschiedenen Differenzierungsfaktoren zu etablieren. Als die Anfälligkeit einer Zelle verändernde Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit Differenzierungsfaktoren, wie TNF- $\alpha$  und RA sowie Modulierung des Stoffwechselforgangs durch den Ersatz von Glukose durch Galaktose im Zellkulturmedium verwendet. Die Ergebnisse der erfassten Studie weisen darauf hin, dass zwar eine Differenzierung der beiden Zelllinien mit RA zur Entwicklung des neuronalen Phänotyps führte, aber die Zellempfindlichkeit nach der Behandlung mit Neurotoxinen, Salsolinol und 6-OHDA sowie 3-HK im Vergleich zu unbehandelten Zellen niedriger war. Die Zellvitalität blieb weiterhin nach der Zugabe von QUIN und KYNA unverändert. Interessanterweise wurden die gleichen Beobachtungen bei den im Galaktose-Medium wachsenden Zellen gemacht.

Um einen möglichen therapeutischen Einsatz bei Alzheimer- und Parkinson-Patienten wissenschaftlich begründen zu können, wurden einige Polyphenole, Natriumpyruvat und GSH auf die schützenden Effekte gegen die durch Neurotransmitter-Metaboliten induzierte Neurotoxizität bei humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen mittels MTT-Tests und ATP-Lumineszenz-Assays untersucht.

Es konnte festgestellt werden, dass Luteolin vor der 6-OHDA- und 3-HK-vermittelten Reduktion der Zellvitalität schützte und dass zu den daran beteiligten Schutzmechanismen Erhöhung des ATP-Gehaltes, Abnahme der Caspase-3/7-Aktivität und Überexpression des Bcl-2-Proteins gehören. Allerdings war Luteolin nicht in der Lage, einen Schutz vor dem durch Salsolinol-induzierten Zelltod zu liefern. Weder eine Vorinkubation mit anderen Polyphenolen, noch eine gleichzeitige Inkubation konnten die neurotoxischen Effekte von Neurotransmitter-Metaboliten in SH-SY5Y-Zellen unterdrücken. Interessant scheint die Tatsache, dass sowohl eine Vorinkubation als auch eine Koinkubation mit Natriumpyruvat vor 6-OHDA, Salsolinol und 3-HK-induzierter Apoptose schützen konnte. Zudem war der durch Natriumpyruvat vermittelte Neuroprotektion signifikant größer als die von Luteolin, was die Ergebnisse des Caspase-3/7-Assays und des Bcl-2 ELISA zeigten. Eine Kombination von Luteolin und Natriumpyruvat war in der Lage, einen besseren Schutz zu liefern als die Behandlung mit einzelnen Substanzen. Die protektiven Eigenschaften von Luteolin und Natriumpyruvat gegenüber 6-OHDA- und 3-HK-Zytotoxizität in SH-SY5Y-Zellen weisen auf verschiedene Wirkmechanismen und die Eigenschaften hin, die das Eindringen der Substanzen in die Zelle erlauben.

In der vorliegenden Studie wurde auch beobachtet, dass GSH den durch 3-HK- und 6-OHDA-ausgelösten Zelltod und die Abnahme des ATP-Gehaltes reduziert. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Inkubation von Salsolinol und GSH in Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  zur Erhöhung der Apoptoserate in SH-SY5Y-Zellen führte. Die Behandlung mit GSH über 250  $\mu\text{M}$  lieferte einen Schutz vor Salsolinol-induziertem Zelltod. Ferner konnte mittels HPLC-Analyse beobachtet werden, dass eine Inkubation von Salsolinol und GSH in Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  zur Entstehung neuer Verbindungen führt, vermutlich Salsolinol-Derivate, die toxischer als Salsolinol sind. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass Salsolinol in Anwesenheit von GSH in den Konzentrationen unter 250  $\mu\text{M}$  an der Entstehung der Neurodegeneration beteiligt sein kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit können einen Beitrag zur Pathophysiologie der neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Parkinson-Krankheit leisten.

## 7. Summary

There is increasing evidence that endogenously produced toxins may be involved in the development of a number of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease and that the mechanisms leading to cell loss are a combination of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and decrease in antioxidant defenses. Quinolinic acid (QUIN), kynurenine acid (KYNA) and 3-hydroxykynurenine (3-HK), metabolites of the kynurenine pathway and salsolinol, a derivative of dopamine are thought to be associated with many central nervous system diseases. As a promising neuroprotective strategy against neurodegeneration the use of flavonoids and other polyphenolic compounds synthesised by plants is considered, due to antioxidative properties *in vitro*.

However, in neuroscience research in order to test neurotoxicity or neuroprotection against kynurenine-metabolites only primary cell models are available. In this investigation we aimed to develop a simple, rapid and accurate cellular *in vitro* model using immortalized human neuroblastoma cell lines, namely SK-N-SH and SH-SY5Y differentiated by treatment with various agents. In order to alter the cell response to the neurotoxins, tumor necrosis factor-alpha and retinoic acid as differentiating agents and modulation of the cellular metabolism through changing the sugar composition from glucose to galactose in media were used. Our results indicated that although retinoic acid-differentiation of both cell lines induced the expression of neuronal features, cell vulnerability after exposure to control neurotoxicants, salsolinol, 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and 3-HK was decreased in compare to untreated cells and was not influenced after exposure to QUIN and KYNA. Interestingly, the same observations were done in the cells grown in galactose media.

In order to find a possible therapeutic application to neurodegenerative disorders, we investigated protective effects of some polyphenols, sodium pyruvate and glutathione on 6-OHDA, salsolinol and 3-HK induced neurotoxicity in obtained cellular model system, human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

We found that luteolin prevented from 6-OHDA and 3-HK induced cell viability reduction and that mechanisms involved in the neuroprotective process include the ability to increase the level of cellular adenosine-5'triphosphate (ATP), decrease caspase-3/7 activity and upregulate Bcl-2 expression. However, luteolin was

ineffective against salsolinol-induced toxicity in MTT and ATP-luminescence assay. Neither pre-treatment with flavonoids nor simultaneous addition had any protective effects in the 6-OHDA, salsolinol or 3-HK induced neurotoxicity. Interestingly, both pre-treatment and co-treatment with sodium pyruvate provided protection against 6-OHDA, salsolinol or 3-HK induced apoptosis. Moreover, decrease of caspase-3/7 activity and ability to elevate Bcl-2 levels by sodium pyruvate was found to be more significant than that of luteolin. The ability of luteolin and sodium pyruvate to reduce toxicity of 6-OHDA and 3-HK in SH-SY5Y cells may be related to many different neuroprotective mechanisms and the capability to penetrate into the cell.

In this study, we also demonstrated that glutathione inhibits cell death and ATP-depletion caused by 3-HK and 6-OHDA. However, unexpectedly salsolinol neurotoxicity toward SH-SY5Y cells was potentiated during treatment with concentrations of glutathione below 250  $\mu$ M, whereas glutathione concentrations above 250  $\mu$ M resulted in protection against salsolinol induced neuronal cell death. We also report that the incubation of salsolinol and low concentrations of glutathione led to increased apoptosis. We also report that the incubation of salsolinol and low concentrations of glutathione leads to formation of novel compounds, probably salsolinol derivatives, which are more toxic than salsolinol. Hence, salsolinol in the presence of low glutathione concentration may be involved in neurodegeneration. These data may provide new promising insights into the pathophysiology of neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abramov AY, Duchon MR. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 1464: 2309-2314.
- Achim CL, Heyes MP, Wiley CA. Quantitation of human immunodeficiency virus, immune activation factors, and quinolinic acid in AIDS brains. *J Clin Invest* 1993; 91: 2769-2775.
- Adams M, Gmünder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 363–381.
- Aebi S, Assereto R, Lauterburg BH. High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 103–110.
- Akao Y, Nakagawa Y, Maruyama W, Takahashi T, Naoi M. Apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, is mediated by activation of caspase 3. *Neurosci Lett* 1999; 267: 153–156.
- Alberati-Giani D, Cesura AM. Expression of the kynurenine enzymes in macrophages and microglial cells: regulation by immune modulators. *Amino Acids* 1998; 14: 251–255.
- Aloisi F. Immune Function of Microglia. *Glia* 2001; 36: 165-179.
- Alvarez G, Ramos M, Ruiz F, Satrustegui J, Bogonez E. Pyruvate protection against  $\beta$ -amyloid-induced neuronal death: role of mitochondrial redox state. *J Neurosci* 2003; 73: 260-269.
- Anantharam V, Kaul S, Song C, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Pharmacological inhibition of neuronal NADPH Oxidase protects 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)- induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells. *Neurotoxicology* 2007; 28: 988-997.
- Anderson ME, Powrie F, Puri RN, Meister A. Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1985; 239: 538–48.
- Antkiewicz-Michaluk L, Krygowska-Wajs A, Szczudlik A, Romańska I, Vetulani J. Increase in salsolinol level in the cerebrospinal fluid of parkinsonian patients is related to dementia: advantage of a new high-performance liquid chromatography methodology. *Biol Psychiatry* 1997; 42: 514-518.
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione is a crucial guardian of protein integrity in the brain upon nitric oxide imbalance. *Commun Integr Biol* 2011; 4: 477-479.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
- Baran H, Jellinger K, Deecke L. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999; 106: 165–181.
- Barton AJ, Crook BW, Karran EH, Brown F, Dewar D, Mann DM, Pearson RC, Graham DI, Hardy J, Hutton M, Duff K, Goate AM, Clark RF, Roberts GW. Alteration in brain presenilin 1 mRNA expression in early onset familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 1996; 5: 213-218.
- Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 1998; 44: 110-114.

- Behan WM, McDonald M, Darlinton LG, Stone TW. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1754-1760.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$ -protein toxicity. *Cell* 1994; 77: 817-827.
- Behl C, Skutella T, Lezoualch F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 535-541.
- Bembenek ME, Abell CW, Chrisey LA, Rozwadowska MD, Gessner AW, Brossi A. Inhibition of monoamine oxidase-A and oxidase-B by simple isoquinoline alkaloids-racemic and optically active 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, 3,4-dihydroisoquinoline, and fully aromatic isoquinoline. *J Med Chem* 1983; 33: 147-152.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research* 1973; 33: 2643-2652.
- Bonda DJ, Mailankot M, Stone JG, Garrett MR, Staniszewska M, Castellani RJ, Das JR, Tizabi Y. Additive protective effects of donepezil and nicotine against salsolinol-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Neurotox Res* 2009; 16: 194-204.
- Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003; 39: 615-647.
- Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Harston S, Decamps A, Reigner B, Emeriau JP, Rainfray M. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* 2001; 30: 235-241.
- Brady N, Grant R, Adams S, Brew BJ, Guillemin GJ. Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res* 2009; 16: 77-86.
- Brion JP, Flament-Durand J, Dustin P. Alzheimer's disease and Tau Proteins. *The Lancet* 1986; 8515: 1098.
- Butterfeld DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 655-664.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 1992; 267, 546-554.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180: 248-257.
- Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 125-139.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.

- Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Chinopoulos C, Drieu K, Fiskum G. Bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), protects against neuronal death in global brain ischemia and in glutamate-induced excitotoxicity. *Cell Mol Biol* 2002; 48: 663-669.
- Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 19-21.
- Chen CY, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci* 2007; 81: 1602-1614.
- Cheung YT, Lau WKW, Yu MS, Lai CSW, Yeung SC, So KF, Chang RCC. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 2009; 30: 127-135.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-512.
- Chinta SJ, Andersen JK. Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 1442-1448.
- Chinta SJ, Kumar MJ, Hsu M. Inducible alterations of glutathione levels in adult dopaminergic midbrain neurons result in nigrostriatal degeneration. *J Neurosci* 2007; 27: 13997-14006.
- Chiueh CC, Rauhala P. The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic Res* 1999; 31: 641-650.
- Cho N, Choi JH, Yang H, Jeong EJ, Lee KY, Kim YC, Sung SH. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines. *Food Chem Toxicol* 2012; In press
- Choi SH, Aid S, Kim HW, Jackson SH, Bosetti F. Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *J Neurochem* 2012; 120: 292-301.
- Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents, *J Biol Chem* 1974; 249: 2447-2452.
- Collins MA, Nijm WP, Borge GF, Goldfarb C. Dopamine-related tetrahydroisoquinolines: significant urinary excretion by alcoholics after alcohol consumption. *Science* 1979; 206: 1184-1186.
- Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, Buring J, Manson JE. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1610-1618.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strirmatter WJ, Schmeichl DE, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmeider E, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 1994; 7: 180-184.

- Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 25409-25412.
- Curzon G. Brain tryptophan. Normal and disturbed control. *Adv Exp Med Biol* 1996; 398: 27-34.
- Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000; 14: 2035-2044.
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; 27: 1-20.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiat Res* 1979; 1: 249- 254.
- De Strooper B. Deficiency of presenilin 1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391: 387-390.
- Do KQ, Trabensinger MK, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex *in vivo*. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 3721-3728.
- Dumont M, Wille E, Stack C, Calingasan NY, Beal MF, Lin MY. Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2009; 23: 2459-2466.
- Duncan W, Smythe GA, Nicholson MV. Comparison of high-performance liquid-chromatography with electrochemical-detection and gas-chromatograph-mass fragmentography for the assay of salsolinol, dopamine and dopamine metabolite in food and beverage samples. *J Chromatogr* 1984; 336: 199 - 209.
- Eastman CL, Guilarte TR. The role of hydrogen peroxide in the *in vitro* cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. *Neurochemical research* 1990; 15: 1101-1107.
- Ebadi M, Hiramatsu M. Glutathione and metallothionein in oxidative stress of Parkinson's disease, in: Poli F, Cadenas E, Packer L (Eds.), *Free Radicals in Brain Pathophysiology*, Marcel Dekker, New York, 2000; S. 428-465.
- Enari M, Sakahira H, Yokojama H, Okawa K, Iwamatsua, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.
- Erhardt S, Blennow K, Nordin C, Skogh E, Lindstrom LH, Engberg G. Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 2001; 33: 96-98.
- Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, Gallego C, Comella JX. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 2000; 75: 991-1003.
- Esposito L, Raber J, Kekonius L, Yan F, Yu GQ, Bien-Ly N, Searce-Levie K, Masliah E, Mucke L. Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease like pathology and accelerates the onset of behavioural changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 2006; 26: 5167-5179.

- Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; 32: 804-812.
- Fernandez-Gomez FJ, Pastor MD, Garcia-Martinez EM, Melero-Fernandez de Mera R, Gou-Fabregas M, Gomez-Lazaro M, Calvo S, Soler RM, Galindo MF, Jordan J. Pyruvate protects cerebellar granular cells from 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by activating the Akt signalling pathway and increasing glutathione peroxidase expression. *Neurobiol Dis* 2006; 24: 296-307.
- Ferrandiz, ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Acta* 1991; 32: 283-288.
- Ferretti MT, Bruno MA, Ducatzeiler A, Klein WL, Cuello AC. Intracellular A $\beta$ -oligomers and early inflammation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2011; In Press
- Fischer-Nielsen A, Poulsen HE, Loft S. 8-Hydroxydeoxyguanosine in vitro: Effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 121-126.
- Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: a hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radical Biol Med* 1999; 26: 1346-1355.
- Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 236-245.
- Friedrich RP, Tepper K, Rönicke R, Westermann M, Reymann K, Kaether C, Fändrich M. Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of A $\beta$  pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 1942-1947.
- Forsmark-Andree P, Lee CP, Dallner G, Ernster L. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 391-400.
- Forster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett* 1984; 48: 273-278.
- Fuller S, Steele M, Münch G. Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease- do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat Res* 2010; 690: 40-49.
- Galindo MF, Jordan J, Gonzales-Garcia C, Cena V. Chromaffin cell death induced by 6-hydroxydopamine is independent of mitochondrial swelling and caspase activation. *J Neurochem* 2003; 84: 1066-1073.
- Garthwaite G, Garthwaite J. Receptor linked ionic channels mediate N-methyl aspartate neurotoxicity in rat cerebellar slices. *Neurosci Lett* 1987; 83: 241-246.
- Garrido M, Tereshchenko Y, Zhevtsova Z, Taschenberger G, Bähr M, Kügler S. Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol* 2011; 121: 475-485.
- Gerlach M, Kuhn W, Müller T, Riederer P. Therapeutische Ansätze zur neurodegenerativen Protektion. *Akt Neurol* 1994; 21: 151-161.
- Glinka YY, Youdim MB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6- hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol* 1995; 292: 329-332.

- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349: 704-706.
- Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991; 121: 29-65.
- Gomez-Lazaro M, Bonekamp NA, Galindo MF, Jordan J, Schrader M. 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1960-1969.
- Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. Autooxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharm* 1978; 14: 644-653.
- Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. Estradiol protects against beta-amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 1996; 218: 165-181.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1316.
- Gridley KE, Green PS, Simpkins JW. Low concentrations of estradiol reduce beta-amyloid (25-35)-induced toxicity, lipid peroxidation and glucose utilization in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Brain Res* 1997; 778: 158-65.
- Guevara J, Blanca E, Zenteno E, Vazquez L, Luna J, Perry G, Mena R. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 905-914.
- Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. Characterization of rat brain kynurenine aminotransferase I and II. *J Neurosci Res* 1997; 50, 457-465.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Brew BJ. Involvement of quinolinic acid in human brain cultures. *J Neurovirol* 2005; 5-6: 375-380.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Pemberton LA, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ. IFN-beta1b induces kynurenine pathway metabolism in human macrophages: potential implications for multiple sclerosis treatment. *J Interferon Cytokine Res* 2001, 21: 1097-1101.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 2001a; 78: 842-53.
- Guillemin GJ, Meininger V, Brew BJ. Implications for the kynurenine pathway and quinolinic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Dis* 2005; 2: 166-176.
- Guillemin GJ, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ. Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 105-112.
- Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 2005a; 49: 15-23.
- Guillemin GJ, Smythe GA, Veas LA, Takikawa O, Brew BJ. A beta 1-42 induces production of quinolinic acid by human macrophages and microglia *Neuroreport* 2003a; 19: 2311-2315.

- Guo H, Hu LM, Wang SX, Wang YL, Shi F, Liu F, Kang LY, Gao XM. Neuroprotective effects of scutellarin against hypoxic-ischemic-induced cerebral injury via augmentation of antioxidant defense capacity. *Chin J Physiol* 2011; 54: 399-405.
- Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006; 91: 807-819.
- Hartai Z, Juhasz A, Rimanoczy A, Janaky T, Donko T, Dux L, Penke B, Toth G, Janka Z, Kalman J. Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2007; 50: 308-313.
- Harkany T, Abraham I, Timmerman W, Laskay G, Toth B, Sasvari M, Konya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarandi M, Soos K, Penke B, Luiten PG. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate- triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 2735-2745.
- Heales SJR, Davies SEC, Bates TE, Clark JB. Depletion of brain glutathione is accompanied by impaired mitochondria function and decrease N-acetyl aspartate concentration. *Neurochem Res* 1995; 20: 249-256.
- Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJ, Lackner A, Larsen SA, Lee K, Leonard HL, Markey SP, Martin A, Milstein S, Mouradian MM, Pranzatelli MR, Quearry BJ, Salazar A, Smith M, Strauss SE, Sunderland T, Swedo SW, Tourtellotte WW. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 1992; 115: 1249-1273.
- Heyes MP. Metabolism and neuropathological significance of quinolinic acid and kynurenic acid. *Biochemical Soc Trans* 1993; 21: 83-89.
- Heyes MP, Ellis RJ, Ryan L, Childers ME, Grant I, Wolfson T, Archibald S, Jernigan TL, the HNRC Group. Elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid levels are associated with region-specific cerebral volume loss in HIV infection. *Brain* 2001; 124: 1033-1042.
- Hilmas C, Pereira EFR, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits  $\alpha 7$  nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha$  nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci* 2001; 21: 7463-7473.
- Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing* 2010; 39: 156-161.
- Hwang CK, Chun HS. Isoliquiritigenin isolated from Licorice *Glycyrrhiza uralensis* prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in dopaminergic neurons. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76: 536-543.
- Ikeda H, Markey CJ, Markey SP. Search for neurotoxins structurally related to 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res* 1993; 575: 285-298.
- Irwin RW, Yao J, To J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD. Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 236-248.
- Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 433-446.

- Ishiguro K, Ohno H, Arai H, Yamaguchi H, Urakami K, Park M, Sato K, Kohno H, Imahori K. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270: 91-94.
- Ishii T, Iwahashi H, Sugata R, Kido R. Formation of hydroxanthom- matin-derived radical in the oxidation of 3hydroxykynurenine. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294, 616–622.
- Ishisaka M, Kakefuda K, Yamauchi M, Tsuruma K, Shimazawa M, Tsuruta A, Hara H. Luteolin shows an antidepressant-like effect via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 1481-1486.
- Jakubowicz-Gil, Rzeski W, Zdzisinska B, Dobrowolski P, Gawron A. Cell death and neuronal arborization upon quercetin treatment in rat neurons. *Acta Neurobiol Exp* 2008; 68: 139-146.
- Jain A, Martensson J, Stole E., Auld PA, Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1913 – 1917.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury P T Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32: 4693–4697.
- Jenner P, Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44: 72-84.
- Jenner P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 2001; 24: 245-246.
- Jeong JH, Kim HJ, Lee TJ, Kim MK, Park ES, Choi BS. Epigallocatechin-3-gallate attenuates neuronal damage induced by 3-hydroxykynurenine. *Toxicology* 2004; 195: 53-60.
- Jung YJ, Surh YJ. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinolin alkaloid. *Free Radical Biol Med* 2001; 30: 1407-1417.
- Kamga CK, Zhang SX, Wang Y. Dicarboxylate carrier-mediated glutathione transport is essential for reactive oxygen species homeostasis and normal respiration in rat brain mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C497-C505.
- Kang JH. Salsolinol, a tetrahydroisoquinoline catechol neurotoxin, induces human Cu, Zn-superoxidic dismutase modification. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40: 684-689.
- Kang SS, Lee JY, Choi YK, Song SS, Kim JS, Jeon SJ, Han YN, Son KH, Han BH. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 3588-3591.
- Kato T. The other, forgotten genome: mitochondrial DNA and mental disorders. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 625-633.
- Katsiki N, Manes C. Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of arteriosclerosis? *Clin Nutr* 2009; 28: 3-9.
- Kawakami Z, Ikarashi Y, Kase Y. Isoliquiritigenin is a novel NMDA receptor antagonist in kampo medicine yokukansan. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31: 1203-1212.
- Keeley J. Evidence that Alzheimer's protein switches on genes. [www.eurekalert.org](http://www.eurekalert.org), Public release: 5-Jul. 2001.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.

- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.
- Kerr SJ, Armati PJ, Brew BJ. Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain cultures. *J Neurovirol* 1995; 1: 375-380.
- Kessler M, Terramani T, Lynch G, Boundary M. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* 1989; 52: 1319-28.
- Kim HJ, Soh Y, Jang JH, Lee JS, Oh YJ, Surh YJ. Differential cell death induced by salsolinol with and without copper: possible role of reactive oxygen species. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 440-449.
- Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-KappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology* 2005; 115: 375-387.
- Kim YH, Kim SS. Bcl-2 inhibits tumor necrosis factor-alpha-mediated increase of glycolytic enzyme activities and enhances pyruvate carboxylase activity. *Mol Cells* 2003; 31: 67-73.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-5588.
- Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 433-435.
- Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181-189.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980.
- Lapin IP. Taurine selectivity antagonizes L-kynurenine-produced seizures in mice. *J Neural Transm* 1980; 48: 311-316.
- Lapin IP. Kynurenines and seizures. *Epilepsia* 1981; 22: 257-265.
- Law A, Gauthier S, Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Rev* 2001; 25: 73-96.
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10: 66-75.
- Lee MW, Lee HJ, Bach JH, Park SC, Park JS, Lee KH, Yeo JH, Lee WB, Lee SH, Kim SS. Down-regulated reactive oxygen species by HSP90 in 3-HK-induced SK-N-SH cell death. *J Therm Biol* 2005; 30: 43-49.
- Lee JY, Kim YH, Koh JY. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* 2001; 21: RC171.
- Lee YJ, Kang IJ, Bünger R, Kang YH. Mechanisms of pyruvate inhibition of oxidant-induced apoptosis in human endothelial cells. *Microvasc Res* 2003; 66: 91-101.
- Lee WC, Jung HA, Choi JS, Kim YS, Lee SM. Protective effects of luteolin against apoptotic liver damage induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide in mice. *J Nat Prod* 2011; 74: 1916-1921.

- Leipnitz G, Schumacher C, Scussiato K, Dalcin KB, Wannmacher CMD, Wyse ATS, Dutra-Filho CS, Wajner M, Latini A. Quinolinic acid reduces the antioxidant defences in cerebral cortex of young rats. *Int J Devl Neuroscience* 2005; 23: 695-701.
- Leipnitz G, Schumacher C, Dalcin KB, Scussiato K, Solano A, Funchal C, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Latini A, Wajner M. In vitro evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain. *Neurochem Int* 2007; 50: 83-94.
- Lesne S, Ali C, Gabriel C, Croci N, MacKenzie ET, Glabe CG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C, Vivien D, Buisson A. NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci* 2005; 25: 9367-9377.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird, TD, Schellenberg GD, Tanzi RE. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-977.
- Li Y, Maher P, Schubert D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* 1997; 19: 453-463.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I Inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 2003; 278: 8516-8525.
- Li Z, Pang L, Zhang G, Zhang J, Xie M, Wang L. Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. *Brain Res* 2012; 1450: 116-124.
- Litvan I. Parkinsonian features: when are they Parkinson disease? *JAMA* 1998; 280: 1654-1655.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787-795.
- Liu C, Wu J, Xu K, Cai F, Gu J, Ma L, Chen J. Neuroprotection by balcalcin in ischemic brain injury involves PTEN/AKT pathway. *J Neurochem* 2010; 112: 1500-1512.
- Liu GT, Zhang TM, Wang BE, Wang YW. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 147-152.
- Liu R, Lan X, Ying J, Du GH. Protective effects of luteolin against amyloid  $\beta_{25-35}$ -induced toxicity on rat cerebral microvascular endothelial cells. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2010; 8: 223-227.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501.
- Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *CR Biol* 2005; 328: 616-631.

- Lugo-Huitron R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muniz P, Carrillo-Mora P, Pedraza-Chaverri J, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Torres I, Pinzon E, Ortiz-Isias E, Lopez T, Garcia E, Pineda B, Torres-Ramos M, Santamaria A, La Cruz VP. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 538-547.
- MacKenzie CR, Gonzalez RG, Kniep E, Roch S, Daubener W. Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 533-539.
- Mak YT, Lam WP, LÜ L, Wong YW, Yew DT. The toxic effect of ketamine on SH-SY5Y neuroblastoma cell line and human neuron. *Miscrosc Res Tech* 2010; 73: 195-201.
- Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med* 2005; 230: 435-443.
- Manach C, Regeat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* 1996; 16: 517-544.
- Manczak M, Mao P, Calkins M, Cornea A, Arubala RP, Murphy MP, Szeto HH, Park B, Reddy PH. Mitochondria-targeted antioxidants protect against Abeta toxicity in Alzheimer's disease neurons. *J Alzheimers Dis* 2010; 20 (Suppl 2): 609-631.
- Manju V, Balsubramaniyan V, Nalini N. Rat colonic lipid peroxydation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin in 1,2-dimethylhydrazine challenge. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10: 535-551.
- Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. Circumventing the crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci* 2007; 97: 539-547.
- Mattson MP. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neuro Virol* 2002; 8: 539-550.
- Massad CA, Washington TM, Pautler RG, Klann E. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS* 2009; 106: 13576-13581.
- Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinodal product. *Free Radical Biol Med* 1999; 26: 107-116.
- McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1901-1907.
- McNaught KS, Thull U, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD. Inhibition of complex I by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1903-1911.
- McNaught KS, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Thull U, Carrupt PA, Testa B, Jenner P, Marsden CD. Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *NeuroReport* 1995a; 6: 1105-1108.

- McPhail DB, Hartley RC, Gardner PT, Duthie GG. Kinetic and stoichiometric assessment of the antioxidant activity by Electron Spin Resonance spectroscopy. *J Agric Food Chem* 2003; 51, 1684-1690.
- Middleton G, Pinon LG, Wyatt S, Davies AM. Bcl-2 accelerates the maturation of early sensory neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 3344-3350.
- Mongan PD, Capacchione J, Fontana JW, West S, Bunger R. Pyruvate improves cerebral metabolism during hemorrhagic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 854-864.
- Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vitro: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981; 211: 491-494.
- Montine TJ, Amarnath V, Picklo MJ, Sidell KR, Zhang J, Graham DG. Dopamine mercapturate can augment dopaminergic neurodegeneration. *Drug Metabol Rev* 2000; 32: 363-376.
- Montine TJ, Picklo MJ, Amarnath V, Whetsell WO, Graham DG. Neurotoxicity of endogenous cysteinylcatechols. *Exp Neurol* 1997; 148: 26-33.
- Morikawa N, Naoi M, Maruyama W, Ohta S, Kotake Y, Kawai H, Niwa T, Dostert P, Mizuno Y. Effects of various tetrahydroisoquinoline derivatives on mitochondrial respiration and electron transfer complexes. *J Neural Transm* 1998; 105: 677-688.
- Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Aldinio C. The excitotoxin quinolinic acid is present in the brains of several animal species and its cortical content increases with the ageing process. *Neurosci Lett* 1984; 47: 51-55.
- Moroni F, Russi P, Lombardi G, Beni M, Carla V. Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *J Neurochem* 1988; 51: 177-180.
- Moser A, Kömpf D. Presence of methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,6-tetrahydroisoquinolines, derivatives of the neurotoxin isoquinoline, in parkinsonian lumbar CSF. *Life Sci* 1992; 50: 1885-1891.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Mudher A, Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci* 2002; 25: 22-26.
- Munoz AM, Rey P, Soto-Otero R, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Systemic administration of N-acetylcysteine protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced generation. *J Neurosci Res* 2004; 76: 551-562.
- Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T. SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid  $\beta$  protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2011; 286: 44557-44568.
- Musso T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, Varesio L. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 1994; 83: 1408-1411.
- Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 386-93.

- Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord* 2002; 6: 385-387.
- Nakagami Y, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxy-kynurenine toxicity on the rat striatum in vivo. *Jpn. J Pharmacol* 1996; 71: 183-186.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103.
- Nagasawa Y, Ueoka R, Yamanokuchi R, Horiuchi N, Ikeda T, Rotinsulu H, Mangindaan RE, Ukai K, Kobayashi H, Namikoshi M, Hirota H, Yokosawa H, Tsukamoto S. Isolation of salsolinol, a tetrahydroisoquinoline alkaloid, from the marine sponge *Xestospongia* cf. *vansoesti* as a proteasome inhibitor. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2011; 59: 287-290.
- Nakamura K, Wang W, Kang UJ. The role of glutathione in dopaminergic neuronal survival. *J Neurochem* 1997; 69: 1850-1858.
- Nanzeen N, Dewji-Singer AJ. Genetic clues to Alzheimer's disease. *Science* 1996; 271: 159-160.
- Naoi M, Maruyama W, Akao Y, Yi H. Dopamine-derived endogenous N-methyl-(R)-salsolinol: Its role in parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol* 2002; 24: 579-591.
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998; 102-103: 139-142.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-676.
- Niwa T, Takeda T, Yoshizumi H, Tatematsu A, Yoshida M, Dosterdt P, Naoi M, Nagatsu T. Presence of 2-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, novel endogenous amines, in Parkinsonian and normal human brains. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 603-609.
- Ockner RK. Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 248-260.
- Obregon E, Punzon MC, Gonzales- Nicolas J, Fernandez-Cruz E, Fresno M, MA Munoz- Fernandez. Induction of adhesion /differentiation of human neuroblastoma cells by tumor necrosis factor- $\alpha$  requires the expression of an inducible nitric oxide synthase. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1184-1193.
- Ogawa T, Matson WR, Beal MF, Myers RH, Bird ED, Milbury P, Saso S. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 1992; 42, 1702-1706.
- Ohta S, Kohno M, Makino Y, Tachikawa M, Hirobe M. Tetrahydroisoquinoline and 1-methyltetrahydroisoquinoline are present in the human brain: relation to Parkinson's disease. *Biomed Res* 1987; 8: 453-456.
- Ohyagi Y, Yamada T, Nishioka H, Clarke NJ, Tomlinson AJ, Naylor S, Nakabeppu Y, Kira J, Younkin SG. Selective increase in cellular A beta 42 is related to apoptosis but not to necrosis. *Neuroreport* 2000; 11: 167-171.

- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12553–12558.
- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem* 1998; 70: 299–307.
- Otero P, Viana M, Herrera E, Bonet B. Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. *Free Radic Res* 1997; 27: 619-626.
- Owusu-Ansah E, Yavari A, Mandal S, Banerjee U. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat Genet* 2008; 40: 356-361.
- Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattson MEK, Esscher T. Retinoic acid -induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 1984; 14: 135-144.
- Pallardo FV, Asensi M, Garcia de la Asuncion, Anton V, Lloret A, Sastre J, Vina J. Late onset administration of oral antioxidants prevents age-related loss of motor coordination and brain mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res* 1998; 29: 617-623.
- Papa L, Gomes E, Rockwell P. Reactive oxygen species induced by proteasome inhibition in neuronal cells mediate mitochondrial dysfunction and a caspase-independent cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 1389-1405.
- Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1989; 26: 719-723.
- Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1997; 104: 661-677.
- Pearson SJ, Reynolds GP. Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 1992; 144: 199–201.
- Pemberton LA, Kerr SJ, Smythe G, Brew BJ. Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN-gamma, TNF-alpha, and IFN- alpha. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 589 –595.
- Perkins MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res* 1982; 247: 184–187.
- Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10: 26–35.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-1042.
- Pizzi M, Boroni F, Bianchetti A, Moraitis C, Sarnico I, Benarese M, Gofii F, Valerio A, Spano PF. Expression of functional NR1/NR2B-type NMDA receptors in neuronally differentiated SK-N-SH human cell line. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 2342-2350.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.

- Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993; 264: C761-C782.
- Pratico D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 563-567.
- Prescott C, Weeks AM, Staley KJ, Partin KM. Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. *Neurosci Lett* 2006; 402: 108-112.
- Qi L, Pan H, Li D, Fang F, Chen D, Sun H. Luteolin improves contractile function and attenuates apoptosis following ischemia-reperfusion in adult rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2011; 688: 201-207.
- Quisheng Z, Yuntao Z, Rongliang Z, Dean G, Changling L. Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice. *Pharmazie* 2005; 60: 539-543.
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, Poirier J. Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 544-553.
- Rassoulpour A, Wu HQ, Ferre S, Schwarcz R. Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *J Neurochem* 2005; 93: 762-765.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland, DK, Hyman, BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993; 11: 575-580.
- Retz W, Thome J, Durany N, Harsanyi A, Retz-Junginger P, Kornhuber J, Riederer P, Rösler M. Potential genetic markers of sporadic Alzheimer's dementia. *Psychiatr Genet* 2001; 11: 113-122.
- Rice Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Res* 1996; 20: 933-956.
- Rice Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001; 8: 797-807.
- Riggin RM, Kissinger PT. Letter: identification of salsolinol as a phenolic component in powdered cocoa and cocoa-based products. *J Agric Food Chem* 1976; 24: 900.
- Riggin RM, McCarthy MJ, Kissinger PT. Identification of salsolinol as a major dopamine metabolite in the banana. *J Agric Food Chem* 1976; 24: 189-191.
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004; 24, 915-919.
- Ritchie K, Lovestone S. The dementias. *The Lancet* 2002; 347: 1759-1766.
- Rivera F, Urbanavicius J, Gervaz E, Morquio A, Dajas F. Some aspects of the *in vivo* neuroprotective capacity of flavonoids: bioavailability and structure-activity relationship. *Neurotox Res* 2004; 6: 1-11.
- Rivera F, Costa G, Abin A, Urbanaviciua J, Arruti C, Casanova G, Dajas F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotox Res* 2008; 13: 105-114.

- Rios C, Santamaria A. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res* 1991; 16: 1139–1143.
- Robinson CM, Shire KA, Carlin JM. Synergistic transcriptional activation of indolamine dioxygenase by IFN- gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23: 413-421.
- Rodriguez-Enriquez S, Juarez O, Rodriguez-Zavala JS, Moreno-Sanchez R. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2512-2519.
- Rommelspacher H, Susilo R. Tetrahydroisoquinolines and carbolines: Putative natural substances in plants and mammals, in: Jucker, E. (Ed.), *Progress in Drug Research*, Vol. 29, Birkhauser, Basel, 1985, S. 415 – 459.
- Roth A, Schaffner W, Hertel C. Phytoestrogen kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) protects PC12 and T47D cells from  $\beta$ -amyloid-induced toxicity. *J Neurosci Res* 1999; 57: 3999-404.
- Rozsa E, Robotka H, Vecsei L, Toldi J. The Janus-face kynurenic acid. *J Neural Transm* 2008; 115: 1087- 1091.
- Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 2004; 187: 150-159.
- Ryou MG, Liu R, Ren M, Sun J, Mallet RT, Yang SH. Pyruvate protects the brain against ischemia-reperfusion injury by activating the erythropoietin signalling pathway. *Stroke* 2012; 43: 1107-1107.
- Sachs C, Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine: *Biochem Pharmacol*; 1975; 24: 1-8.
- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 481-486.
- Sankarapandi S, Zweier JL, Mukherjee G, Quinn MT, Huso DL. Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Arch Biochem Biophys* 1998; 353: 312–321.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 172-188.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 276–282.
- Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 54: 823-827.
- Schipling S, Kontush A, Arlt S, Buhmann C, Stürenburg HJ, Mann U, Müller-Thomsen T, Beisiegel U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 351–360.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9649-9653.

- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Kohler C Jr. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 1984; 35: 19-32.
- Scott JF, Gray CS. Cerebral and systemic pathopsychological response to acute stroke. *Age Ageing* 2000; 29: 197-202.
- Seniuk NA, Tarton WG, Greenwood CE: Dose-dependant destruction of the coeruleus- cortical and nigral- striatal projections by MPTP. *Brain Res* 1990; 275: 321-328.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Tsuda T, Mar L, Foncin J. F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St. George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375: 754-760.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10771-10778.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 1996; 13: 21-29.
- Shuvaew VV, Laffont I, Serot JM, Fujii J, Taniguchi N, Siest G. Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 397-440.
- Sian J, Dexter DT, Lee AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. Alterations in glutathione level in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994; 36: 348-355.
- Siddhuraju P, Becker K. Rapid reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantification of L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), non-methylated and methylated tetrahydroisoquinoline compounds from Mucuna beans. *Food chemistry* 2001; 72: 389-394.
- Sidell N. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells *in vitro*. *J. Natl Cancer Znst* 1982; 68, 580-593.
- Sjöquist B, Magnuson E. Analysis of salsolinol and salsoline in biological samples using deuterium-labelled internal standards and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Biomed Appl* 1980; 183: 17-24.
- Sjöquist B, Borg S, Kvannd H. Analysis of the dopamine-derived tetrahydroisoquinoline salsolinol in urine and cerebrospinal fluid from alcoholics and healthy volunteers. *Drug Alcohol Depend* 1980; 6: 73-74.
- Sjöquist B, Borg S, Kvannd H. Catecholamine derived compounds in urine and cerebrospinal fluid from alcoholics during and after long-standing intoxication. *Subst Alcohol Actions/ Misuse* 1981; 7: 63-72.
- Sjöquist B, Borg S, Kvannd H. Salsolinol and methylated salsolinol in urine and cerebrospinal fluid in human volunteers. *Subst Alcohol Actions/Misuse* 1981; 2: 73-77.
- Sjöquist B, Eriksson A, Winblad B. Brain salsolinol levels in alcoholism. *The Lancet* 1982; 1: 675-676.
- Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen

- species. *Brain Pathol* 1999; 9: 69-92.
- Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process (1,2). *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 37-44.
- Spear N, Aust SD. Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols. *Arch Biochem Biophys* 1995; 317: 142-148.
- Spencer JP, Kuhnle GG, Williams RJ, Rice-Evans C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J* 2003; 372: 173-181.
- Spillantini MG, Schmidt M, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. *Nature* 1997; 388: 839-840.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257: 1220-1224.
- Stamer K, R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow, Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 2002; 156: 1051-1063.
- Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. Mitochondrial  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 2004; 36: 7779-7788.
- Stone TW, Addae JI. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 2002; 447: 285-96.
- Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 309-379.
- Stone DJ, Molony C, Suver C, Schadt EE, Potter WZ. ApoE genotyping as a progression-rate biomarker in phase II disease-modification trials for Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* 2010; 10: 161-164.
- Stone TW, Perkins MN. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 1981; 72: 411-412.
- Storch A, Kaftan A, Burkhardt K, Schwarz J. 1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4 tetrahydroisoquinoline salsolinol is toxic to dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via impairment of cellular energy metabolism. *Brain Res* 2000; 855: 67-75.
- Sun GY, Horrocks LA, Farooqui AA. The roles of NADPH oxidase and phospholipases A(2) in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 2007; 103: 1-16.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 1996; 184: 1331-1341.
- Suematsu N, Hosoda M, Fujimori K. Protective effects of quercetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2011; 504: 223-227.
- Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002; 54:101-127.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CE, Wajner M, Souza DO, Dutra-Filho CS. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport* 2000; 11: 249-253.

- Teskac K, Kristl J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm* 2010; 390: 61-69.
- Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p-53 proteins. *J Neurosci Res* 1999; 58: 426-435.
- Thomas SR, Mohr D, Stocker R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1994; 269:14457-14464.
- Trillo-Pazos G, McFarlane-Abdulla E, Campbell IC, Pilkington GJ, Everall IP. Recombinant nef HIV-IIB protein is toxic to human neurons in culture. *Brain Res* 2000; 864: 315-326.
- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria, *Biochem J* 1980; 191: 421-427.
- Ullah N, Naseer MI, Ullah I, Lee HY, Koh PO, Kim MO. Protective effect of pyruvate against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neuropharmacology* 2011; 61: 1248-1255.
- Wainwright LJ, La sorella A, Iavarone A. Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9396-9400.
- Wang X, Perez E, Liu R, Mallet RT, Yang SH. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res* 2007; 1132: 1-9.
- Wanpen S, Govitrapong P, Shavali S, Sangchot P, Ebadi M. Salsolinol, a dopamine-derived tetrahydroisoquinoline, induces cell death by causing oxidative stress in dopaminergic SH-SY5Y cells and the said effect is attenuated by metallothionein. *Brain Res* 2004; 1005: 67-76.
- Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2000; 107: 343-353.
- Willets JM, Lambert DG, Lunec J, Griffiths HR. Studies on the neurotoxicity of 6,7-dihydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) in SH-SY5Y cells. *Eur J Pharmacol* 1995; 293: 319-326.
- Wruck, CJ, Claussen M, Fuhrmann G, Romer L, Schulz A, Pufe T, Waetzig V, Peipp M, Herdegen T, Gotz ME. Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP+ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. *J Neural Transm Suppl* 2007; 72: 57-67.
- Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6145-6150.
- Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol* 1992; 4: 389-397.
- Van Mau N, Kajava AV, Bonfils C., Martinou JC, Harricane MC. Interactions of Bax and tBid with lipid monolayers. *J Membr Biol* 2005; 207: 1-9.
- Vasquez S., Garner B., Sheil M. M. and Truscott R. J. (2000) Characterization of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. *Free Radical Res* 2000; 32: 11-23.

- Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2012 In Press
- Velliquette RA, O'Connor T, Vassar R. Energy inhibition elevates  $\beta$ -secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 2005; 25: 10874-10883.
- von Coelln R, Kugler S, Bahr M, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Rescue from death but not from functional impairment: caspase inhibition protects dopaminergic cells against 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not against the loss of their terminals. *J Neurochem* 2001; 77: 263-273.
- Xie G, Hipolito L, Zuo W, Polache A, Granero L, Krnjevic K, Ye JH. Salsolinol stimulates dopamine neurons in slices of posterior ventral tegmental area indirectly by activating  $\mu$ -opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 341: 43-50.
- Xing G, Dong M, Li X, Zou Y, Fan L, Wang X, Cai D, Li C, Zhou L, Liu J, Niu Y. Neuroprotective effects of puerarin against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells via a PI3K-dependent signaling pathway. *Brain Res Bull* 2011; 85(3-4): 212-218.
- Xu Y, Sun S, Cao X, Tong E. Protective effect of GSH on PD model induced by 6-OHDA in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2002; 22: 355-358.
- Yao JK, Leonard S, Reddy R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis Markers* 2006; 22: 83-93.
- Yamada Y. Effects of salsolinol on rat brain and liver monoamine oxidase. *Jpn J Pharmacol* 1971; 21: 833-835.
- Yamada A, Akimoto H, Kagawa S, Guillemin GJ, Takikawa O. Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1-42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2009; 110: 791-800.
- Yonish RE, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wildtype p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 353: 345-347.
- Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mechanisms of apoptosis inhibition by Bcl-2-related proteins. *Oncogene* 1998; 16: 2265-2282.
- Zeng KW, Wang XM, Ko H, Kwon HC, Cha JW, Yang HO. Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid  $\beta$ -protein via the PI3K/Akt/Bad/Bcl(XL)-regulated mitochondrial apoptotic pathway. *Eur J Pharmacol* 2011; 671: 45-55.
- Zhang F. Formation of novel toxic compounds from oxidative interaction between salsolinol and cysteine. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30: 197-208.
- Zhang XN, Li JM, Yang Q, Feng B, Liu SB, Xu ZH, Guo YY, Zhao MG. Anti-apoptotic effects of hyperoside via inhibition of NR2B-containing NMDA receptors. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 949-955.

- Zhang F, Shi JS, Zhou H, Wilson B, Hong JS, Gao HM. Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through its anti-inflammatory actions. *Mol Pharmacol* 2010a; 78: 466-477.
- Zhao G, Yao-Yue Ch, Qin GW, Guo LH. Luteolin from Purple Perilla mitigates ROS insult particularly in primary neurons. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 176-186.
- Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 5165-5170.
- Zhu L, Wu J, Liao H, Gao J, Zhao XN, Zhang ZX. Antagonistic effects of extract from leaves of Ginkgo biloba on glutamate neurotoxicity. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1997; 18: 344-347.
- Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, Thuret S, Proce J, Pariante CM. Interleukin-1 $\beta$ : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 939-949.

## **9. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 10. Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Wszelaki N, Kuciun A, Kiss Anna K. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharm* 2010; 60: 119–128.

Wszelaki N, Paradowska K, Jamróz Marta K, Granica S, Kiss Anna K. Bioactivity-guided fractionation for the butyrylcholinesterase inhibitory activity of furanocoumarins from *Angelica archangelica* L. roots and fruits. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 9186–9193.

Wszelaki N, Melzig MF. Research on an *in vitro* cell system for testing the neurotoxicity of kynurenine pathway metabolites. *Die Pharmazie* 2011; 66: 899–903.

Wszelaki N, Melzig MF. Low level of glutathione can intensify the toxic effect of salsolinol in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *NeuroToxicology* 2012; 33: 424-428.

### Übersichtsarbeiten

Cybula M, Wszelaki M, Wszelaki N. Dziurawiec, roślina nie(d)oceniona? *Postępy fitoterapii* 2005;1-2: 50-52.

Wszelaki N. Hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez surowce roślinne i ich substancje czynne. *Postępy fitoterapii* 2009; 1: 23-37.

Wszelaki N, Melzig MF. Augentrost – *Euphrasia officinalis* L. *Zeitschrift für Phytotherapie* 2011; 32: 40 – 46.

**Poster**

Wszelaki N, Melzig MF. The effect of some flavonoids and pyruvate on 6-hydroxykynurenine induced neurotoxicity. 58<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research and Natural Product Research (GA), Berlin 2010, August 29-September 2, Poster P310.

Chen R, Wszelaki N, Melzig MF, Müller RH, Keck CM. Production, characterization and neuro-effect of quercetin nanocrystals: Correlation between the size and cell penetrating. Poster zum Tag der Pharmazie an der Freien Universität Berlin 2012.

## **11. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Matthias F. Melzig für die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und die zahlreichen Anregungen, von denen ich (erheblich) profitieren konnte. Er stellte mir sein Wissen beim Forschen zur Verfügung und gab meinen wissenschaftlichen Artikeln den letzten Schliff.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biologie des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin für das Miteinander in Forschung und Lehre. Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Dana Nitzsche, die mir bei der Einarbeitung im Zelllabor und in der Zellkultur eine große Hilfe war und immer praktische Hinweise gab. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Julia Lazar-Schurreit und Frau Dr. Racha Helal bedanken, die immer ein freundliches Wort für mich hatten.

Bei Herrn Prof. R.H. Müller möchte ich mich für die Bereitstellung der Nanokristalle bedanken, deren Untersuchung ein Bestandteil dieser Arbeit war und Herrn Run Chen für die Anfertigung der Nanokristalle.

Besonders dankbar bin ich Frau Cornelia Görick für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, die fachlichen Ratschläge, ihr stets offenes Ohr und das sorgfältige Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Joanna Gronczyńska- meiner besten Freundin, die immer für mich da war und mich immer unterstützt und ermutigt hat, danke ich für die Geduld.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie für die wertvolle Unterstützung, das Verständnis und den liebevollen Rückhalt während der gesamten Zeit bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit gar nicht zustande gekommen.

## **12. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Berlin, den

Natalia Wszelaki