

**Untersuchungen zur endogenen Bildung,
Cytotoxizität und DNA-schädigenden Wirkung des
dopaminergen Neurotoxins TaClo**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG**

**vorgelegt von
Miriam Birgit Münchbach
aus
Speyer**

Würzburg 2001

Eingereicht am: _____

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

der Dissertation

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1997 bis Dezember 2000
am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt

Herrn Prof. Dr. G. Bringmann danke ich
für die freundliche Betreuung und
Förderung dieser Arbeit

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von
Publikationen^[72,79,97,123,203,214,238] sowie von Postern und Vorträgen

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL	1
1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Morbus Parkinson.....	5
2.1 Epidemiologie und Krankheitsbild	5
2.2 Basalganglien	6
2.2.1 Aufbau und Funktionsweise der Basalganglien.....	7
2.2.2 Degeneration der Basalganglien bei der Parkinsonschen Krankheit und medikamentöse Regulierung der Defizite.....	9
2.3 Ursachen der Neurodegeneration.....	14
2.3.1 Oxidativer Streß	16
2.3.2 Exzitotoxizität	17
2.4 MPTP – Neurotoxin und Modellsubstanz in der Parkinsonforschung.....	18
2.5 TaClo – ein endogenes Neurotoxin.....	22
2.5.1 Neurotoxische Eigenschaften von TaClo.....	23
2.5.2 Pharmakokinetik und Metabolismus von TaClo.....	24
3 Untersuchungen zur DNA-schädigenden Wirkung von TaClo	27
3.1 Belichtungsexperimente mit zellfreier pBR322-DNA.....	28
3.2 Untersuchung zur TaClo-DNA-Bindungs-Wechselwirkung	32
3.3 Cu(II)-Experimente	33
4 Toxizität von TaClo auf PC12-Zellen.....	36
4.1 Cytotoxizität von TaClo gegenüber PC12-Zellen.....	36
4.2 Quantifizierung der Cytotoxizität durch LDH-Aktivitäts-Messung	38
4.3 Cytotoxizität und Atmungsketteninhibition von TaClo und seinen Derivaten.....	39
4.4 Mechanismus der Zelldegeneration	41

5	<i>In-vivo</i>-Entstehung von TaClo im Menschen nach Einnahme von Chloralhydrat.....	43
5.1	Erste Befunde zur <i>in-vivo</i> -Entstehung von TaClo	44
5.2	Etablierung einer neuen Spurenanalytik von TaClo mittels HPLC-ESI-MS-MS.....	45
5.3	Nachweis von TaClo in Humanblutproben.....	48
5.4	Nachweis von TaClo in Humanurinproben.....	50
5.5	Analyse von Blut- und Urinproben eines 10jährigen Epilepsie-Patienten.....	51
6	Trichlorethylen – eine weitere TaClo-Quelle?	54
6.1	Trichlorethylen.....	54
6.2	<i>In-vitro</i> -Untersuchung zur Entstehung von TaClo aus TRI.....	58
6.3	Nachweis von TaClo in einer Frau nach jahrelanger Lösungsmittel-Exposition	59
6.4	Umfrage bei Parkinsonpatienten, die mit TRI in Berührung kamen	61
7	Stereochemische Aspekte der Bildung und Metabolisierung von TaClo im Säugerorganismus.....	69
8	Untersuchungen zur Metabolisierung von TaClo.....	75
8.1	Metabolismusstudien an Rattenlebermikrosomen	76
8.2	Metabolisierung von TaClo in neuronalen PC12-Zellen	78
8.3	Tierexperimentelle Studien an Ratten und Mäusen – Identifizierung von TaClo und Metaboliten im Urin der Tiere	80
8.4	Suche nach Hydroxy-TaClo in Blut- und Urinproben Chloralhydrat-behandelter Patienten.....	81
9	Untersuchungen zur Stereostruktur von Naturstoffen	82
9.1	Aufklärung der absoluten Konfiguration chiraler benzylischer Alkohole und deren Ester oder Ether durch Ruthenium-katalysierten oxidativen Abbau.....	83
9.1.1	(α -Hydroxyethyl)aryl-Verbindungen.....	86
9.1.2	(α -Hydroxypropyl)aryl-Verbindungen	87
9.1.3	(α -Methoxyethyl)aryl-Verbindungen	89
9.2	Der Naturstoff Isoshinanolon.....	91
9.2.1	Aufklärung der absoluten Konfiguration von Isoshinanolon.....	94

10	Zusammenfassung	97
11	Summary	104
	EXPERIMENTELLER TEIL	111
1	Allgemeine Methoden	111
1.1	Verwendete Meßgeräte	111
1.2	Verwendete Geräte zur Probenaufarbeitung	112
1.3	Chromatographische Methoden	113
1.3.1	Dünnschicht- und Säulenchromatographie (DC und SC).....	113
1.3.2	Flüssigkeitschromatographie (LC).....	113
1.3.3	Gaschromatographie (GC).....	115
1.4	Vorbereitung der Versuche	116
2	Untersuchungen der DNA-schädigenden Wirkung von TaClo	117
2.1	Gelelektrophoretische Untersuchungen	117
2.2	Quantifizierung der DNA-Schädigung	117
2.3	Herstellung der freien Basen.....	117
2.4	Belichtungsexperimente.....	118
2.4.1	Zeitabhängige Experimente	118
2.4.2	Konzentrationsabhängige Experimente	119
2.5	Cu(II)-Experimente	119
2.6	Versuche mit BCS.....	120
2.7	UV-Absorptionsmessungen zur Untersuchung der Wechselwirkung von TaClo mit DNA.....	120
2.8	Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Wechselwirkung von TaClo mit DNA.....	121
2.9	Untersuchung der Wechselwirkung von TaClo mit DNA über Verdrängungsexperimente mit Ethidiumbromid.....	123

3	Untersuchungen mit PC12-Zellen	124
3.1	Zellkulturen	124
3.2	Neubauer-Methode.....	124
3.3	Erste orientierende Untersuchungen zur Cytotoxizität von TaClo	124
3.4	Darstellung von 8-Methyl-TaClo	125
3.5	Inkubationsexperimente	125
3.6	LDH-Messungen	126
3.7	Isolierung von DNA aus PC12-Zellen	126
3.8	Bestimmung der DNA – Konzentration.....	127
3.9	Gelelektrophoretische Untersuchung der isolierten DNA	127
4	Qualitative und quantitative Analyse von TaClo.....	128
4.1	Festphasenextraktion.....	128
4.2	Aufarbeitung von Serum	128
4.3	Aufarbeitung von Blutkuchen	128
4.4	Aufarbeitung von Urin	129
4.5	Nachweis von TaClo über HPLC-MS-MS	129
4.6	Bestimmung der Wiederfindungsrate	130
4.7	Abschätzung der Nachweisempfindlichkeit.....	130
4.8	Untersuchung von Blutproben Chloralhydrat-behandelter Parkinsonpatienten	131
4.9	Untersuchung von Proben Chloralhydrat-behandelter Kinder.....	132
4.10	Untersuchung der Blutproben einer Frau, die über einer Reinigung gewohnt hatte	133
5	Untersuchungen zur Bildung von TaClo aus TRI	134
5.1	Aufarbeitung von Rattenlebermikrosomen	134
5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	134
5.3	Metabolisierung von TRI	134
5.4	Metabolisierung von TRI in Gegenwart von Tryptamin.....	135

5.5	Umfuge bei Parkinsonpatienten zum Umgang mit TRI.....	136
5.5.1	Teil I: Angaben zur persönlichen, die Parkinsonerkrankung betreffenden Krankheitsgeschichte	136
5.5.2	Teil II: Angaben, die sich auf die TRI-Exposition beziehen	144
5.5.3	Aussagen über den Umgang mit TRI.....	153
6	Untersuchungen zur enantiomer-differenzierenden Bildung und Metabolisierung von TaClo.....	154
6.1	<i>In-vitro</i> -Versuche zur Metabolisierung von TaClo durch Rattenlebermikrosomen	154
6.2	Trennung von TaClo an chiraler RP-Phase.....	154
6.3	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen zur Bildung und Metabolisierung von TaClo.....	154
6.3.1	Tierexperimentelle Studien.....	154
6.3.2	Analyse einer humanen Blutprobe	155
7	Untersuchungen zum Metabolismus von TaClo	156
7.1	Nachweis der TaClo-Derivate mittels HPLC-MS-MS	156
7.2	Inkubationsexperimente mit Rattenlebermikrosomen	156
7.3	Inkubationsexperimente mit PC12-Zellen	157
7.4	Untersuchungen zum Metabolismus von TaClo in Ratten- und Mäuseurin	158
7.5	Untersuchungen zum Metabolismus von TaClo in humanen Blut- und Urinproben	158
8	Untersuchungen zur Stereostruktur von Naturstoffen mit der Methode des oxidativen Abbaus	159
8.1	α -Acetoxybutansäure	159
8.2	α -Methoxypropansäure	159
8.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Acetylierung von benzyllischen Alkoholen.....	159
8.4	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Methylierung von benzyllischen Alkoholen.....	160
8.5	Allgemeine Arbeitsvorschrift zum oxidativen Abbau	160
8.5.1	GC-MS-Analyse von α -Acetoxypropansäure und α -Acetoxybutansäure	160
8.5.2	GC-MS-Analyse von α -Methoxypropansäure.....	161
8.5.3	Analyse von 2-Methylbernsteinsäure.....	161

8.5.3.1	Derivatisierung.....	161
8.5.3.2	GC-MS-Analyse von 2-Methylbernsteinsäuredimethylester.....	161
A	Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalysen	162
	A 1Röntgenbeugungsanalyse von 48	162
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	164
	LITERATUR UND ANMERKUNGEN	167

ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung und Problemstellung

Die Schüttellähmung oder Parkinsonsche Krankheit (Morbus Parkinson), eine der häufigsten Alterserkrankungen, trägt den Namen des englischen Arztes James Parkinson, der dieses Krankheitsbild 1817 erstmals beschrieb.^[1] Morbus Parkinson ist verbunden mit unkontrolliertem Zittern, Starre der Muskulatur und stark verlangsamten Bewegungen.^[2] Schon 1817 erkannte Parkinson richtig, daß diese Krankheit von einer Schädigung im zentralen Nervensystem herrühren müßte.^[3] Doch erst 1919 wurde von Trétiakoff^[4] eindeutig die Zerstörung der *Substantia nigra* als pathologisch-anatomischer Herd des Krankheitsbildes erkannt und beschrieben. Lange Zeit waren die Folgen dieser Degeneration die zu den Symptomen der Parkinsonschen Krankheit führten unklar. In den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts gelang jedoch ein wesentlicher Durchbruch, was das Verständnis der Krankheit angeht. Damals entdeckte der Schwede Arvid Carlsson,^[5] daß der Neurotransmitter Dopamin (1) im gesunden Gehirn im *Striatum* vermehrt vorhanden ist. Er vermutete, daß Dopamin zur Kontrolle von Bewegungen nötig sei. Bereits 1960 stellten Ehringer und Hornykiewicz^[6] daraufhin einen Dopaminmangel im Gehirn von Parkinsonpatienten fest (siehe Abb. 1), was auf die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* zurückgeführt wurde. Diese Neuronen projizieren normalerweise zum *Striatum*, einem Kern der Basalganglien, wo sie von großer Bedeutung für die Kontrolle der Informationsverarbeitung durch die Basalganglien sind (siehe Abb. 1).^[7]

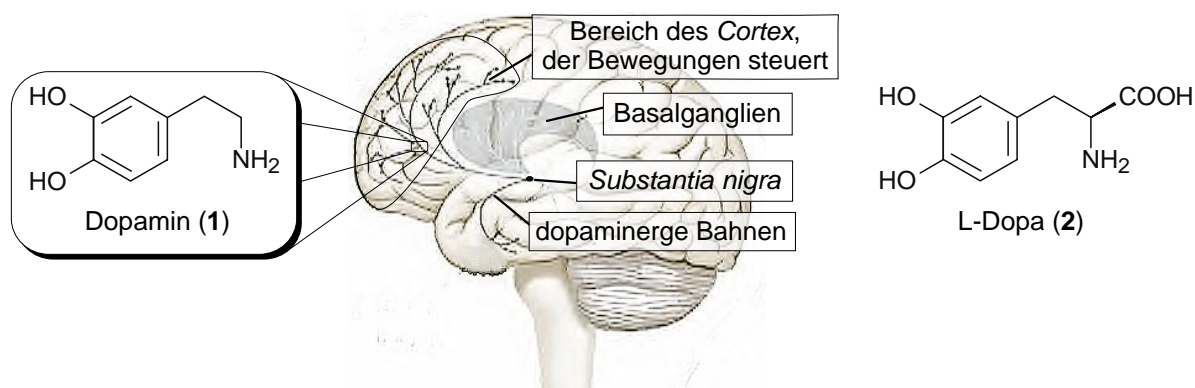


Abb. 1. Nervenbahnen des Neurotransmitters Dopamin (1) im Gehirn und das Antiparkinsonmittel L-Dopa (2), ein Medikament zum Ausgleich des Dopaminmangels bei der Parkinsonschen Krankheit

Für diese Entdeckung sowie für die Erforschung der Funktion der Neurotransmitter zur Bewegungskontrolle wurde Carlsson im Herbst 2000 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet. Seine Forschung legte zugleich den Grundstock für die Entdeckung eines

effizienten Arzneimittels gegen die Parkinsonsche Krankheit, welches infolge der Arbeiten von Carlsson wenige Jahre später von Birkmayer^[8,9] und Barbeau^[10] gefunden wurde: L-Dopa (2), ein noch heute verwendetes Antiparkinsonmittel, kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und im Gehirn nach Decarboxylierung zu Dopamin (1) den bestehenden Neurotransmittermangel ausgleichen (siehe Abb. 1).^[11] Die Bedeutung der Entdeckung von Carlsson kann nicht hoch genug eingeschätzt werden. Sie führte nicht nur zu einer Behandlung, die die Leiden Tausender von Patienten sichtbar verminderte, sondern machte auch deutlich, daß Erkrankungen des Gehirns sich auf bestimmte Neuronen und bestimmte molekulare Prozesse beschränken können.

Die eigentliche Ursache für das selektive Absterben der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* bei Parkinsonkranken ist jedoch bis heute unbekannt.^[12] Man nimmt an, daß Morbus Parkinson ein multifaktoriell ausgelöstes Leiden ist.^[13] Im Mittelpunkt der Diskussionen über mögliche Faktoren stehen vor allem genetische und toxische Ursachen.^[14-16] Diese möglichen Krankheitsauslöser können sich gegenseitig beeinflussen und verstärken, sie lösen in der Zelle Oxidativen Streß^[17] (Anwesenheit freier reaktiver Radikale) aus und stören die mitochondriale Atmungskette, was zu einem Energiedefizit in der Zelle und schließlich zu ihrem Absterben führt (siehe Abb. 2).^[18]

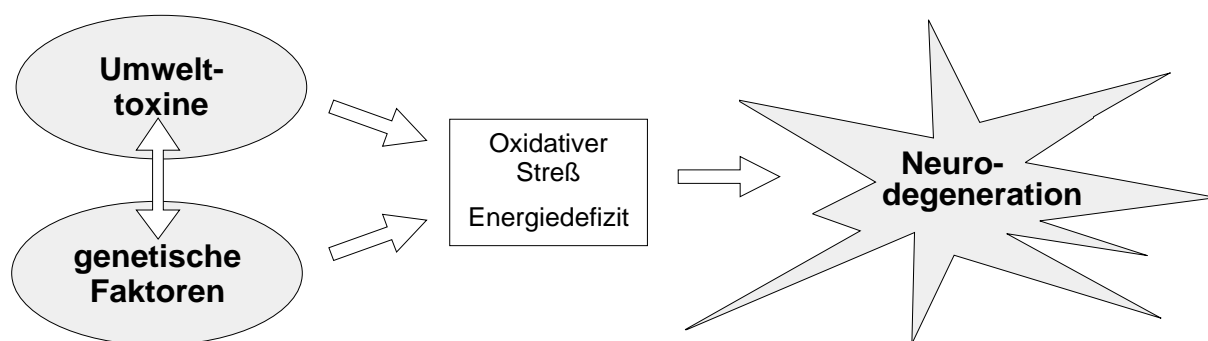
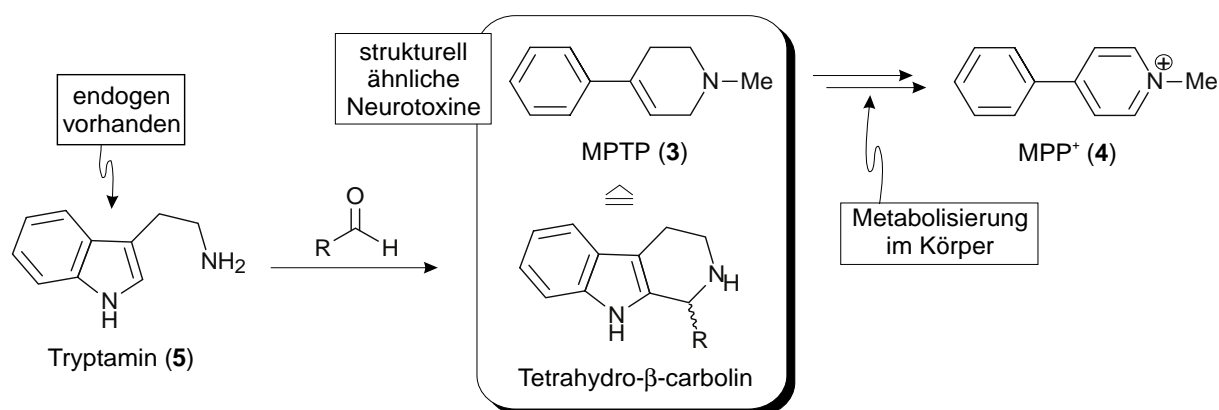


Abb. 2. Mögliche, sich gegenseitig beeinflussende Auslöser der Parkinsonschen Krankheit

Als eines der ersten neurotoxischen Moleküle wurde MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin, 3) identifiziert. Es löste als Verunreinigung in einem synthetischen Heroin in den 80er Jahren bei jungen Drogenabhängigen Parkinson-ähnliche Symptome aus.^[19,20] Nach Metabolisierung zu MPP⁺ (1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion, 4; siehe Schema 1) verursacht es in Dopamin-produzierenden Zellen der *Substantia nigra* durch Inhibierung des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette ein Energiedefizit. Dadurch werden vermehrt freie Radikale gebildet, es kommt zu einer absinkenden Aktivität von Antioxidantien, zu Membranlipidperoxidationen, zur Schädigung von DNA und schließlich zum Untergang der Zelle.^[21] Da MPTP auch in der Lage ist, in Primaten künstlich die Symptome der Krankheit

auszulösen, wurde es in der Folgezeit für die Entwicklung neuer Antiparkinsonmittel, aber auch für die Erforschung der Krankheitsursachen genutzt.^[22]

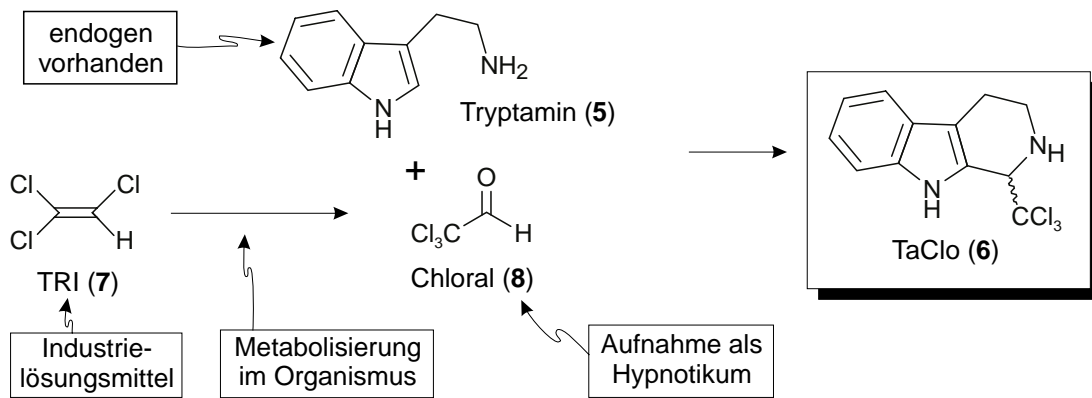
Zusätzlich wurde nach weiteren Neurotoxinen gesucht, die ähnliche neurotoxische Eigenschaften besitzen wie MPTP (**3**), mit denen aber der Mensch auf natürliche Weise in Berührung kommen kann. Ein Augenmerk fiel auf die Substanzklasse der β -Carboline, die strukturelle Ähnlichkeiten zu MPTP (**3**) aufweisen und im menschlichen Organismus aus endogen vorhandenem Tryptamin (**5**) oder anderen körpereigenen Indolyethylaminen und reaktiven Aldehyden gebildet werden können (siehe Schema 1).^[23]



Schema 1. Das Neurotoxin MPTP (**3**) und dessen Metabolisierung sowie Bildung strukturell verwandter Tetrahydro- β -carboline

Ein besonderer Vertreter dieser Verbindungsklasse ist das in unserer Arbeitsgruppe entdeckte dopaminerge Neurotoxin TaClo (1-Trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin, **6**),^[24] das aufgrund seiner CCl_3 -Gruppe über eine große Lipophilie verfügt und deshalb im Gegensatz zu anderen Tetrahydro- β -carbolen leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann.^[25] In neuronalen Zellen inhibiert TaClo (**6**) den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette,^[26,27] es kommt zu oxidativem Streß und zum Untergang der Neuronen.^[28,29] Nach Langzeitapplikation des Toxins (7 Wochen, tägl. 0.2 mg TaClo/kg *i.p.*) konnten an Ratten in Verhaltenstests Parkinson-ähnliche Symptome beobachtet werden.^[30]

Die Bildung von TaClo (**6**) im menschlichem Körper konnte bereits bei Patienten, die mit dem Schlafmittel Chloralhydrat (**8**·H₂O) behandelt worden waren, nachgewiesen werden.^[31] Prinzipiell muß auch davon ausgegangen werden, daß TaClo (**6**) nach einer Exposition mit dem noch vor wenigen Jahren weit verbreiteten Industrielösungsmittel TRI (Trichlorethylen, **7**), welches im Körper zu Chloral (**8**) metabolisiert, entsteht (siehe Schema 2).^[32]



Schema 2. Mögliche Entstehung des Neurotoxins TaClo

Aufgrund der vielen noch offenen Fragen zur Neurotoxizität von TaClo, seiner Entstehung im menschlichen Körper und der Metabolisierung im Säugerorganismus ergab sich für die vorliegende Arbeit folgende Aufgabenstellung:

- Untersuchung der schädigenden Wirkung von **6** gegenüber zellfreier pBR322-DNA nach Initiierung von Radikalprozessen durch Belichtung;
- Versuche zur Cytotoxizität von TaClo an Neuronen-ähnlichen Zellen: Vergleich der zellschädigenden Eigenschaften von TaClo-Derivaten und Untersuchung der Art des durch **6** verursachten Zelltods durch Isolierung der zelleigenen DNA;
- Nachweis von TaClo in Blutproben Chloralhydrat-behandelter Patienten: sensitive und selektive Identifizierung von endogen gebildetem **6** mit Hilfe einer spezifischen Methode der LC-MS/MS-Analytik;
- Untersuchungen zu dem Lösungsmittel TRI (**7**): Entstehung von TaClo (**6**) in Inkubationsexperimenten an Rattenleberhomogenat sowie eine Umfrage an Parkinsonpatienten, die Kontakt zu TRI hatten;
- Untersuchung stereochemischer Aspekte bei der Entstehung und Metabolisierung von TaClo im Säugerorganismus: Etablierung einer Stereoanalytik an chiraler RP-Phase für die LC-MS/MS-Analytik;
- Identifizierung von TaClo-Stoffwechselprodukten in verschiedenen *in-vitro*- und *in-vivo*-Systemen, wie neuronalen Zellen, Rattenleberhomogenat und Urin von TaClo-behandelten Ratten und Mäusen.

2 Morbus Parkinson

2.1 Epidemiologie und Krankheitsbild

Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, von der *ca.* 1-2%^[33,34] der Weltbevölkerung betroffen sind. Rund 200.000 – 250.000 Menschen leiden in Deutschland an der Parkinsonschen Krankheit. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen liegt zwischen 20.000 und 25.000.^[35] Meist leiden Menschen ab dem 60. Lebensjahr an der Krankheit. In diesem Alter liegt das Risiko, an Morbus Parkinson zu erkranken, bei etwa 1% (siehe Abb. 3).^[36]

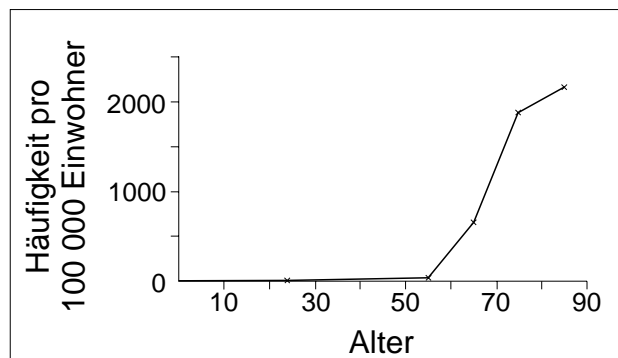


Abb. 3. Altersspezifische Häufigkeit des Parkinsonsyndroms

Die ersten, meist zwischen dem 55. und dem 65. Lebensjahr auftretenden Krankheitssymptome^[34,37,38] sind auf die häufigste Form dieser Erkrankung, dem sog. idiopathischem Parkinson, zurückzuführen. Die genauen ursächlichen Zusammenhänge für die Manifestation dieses alterstypischen Parkinson sind bis heute weitgehend unbekannt. Die auslösenden Faktoren für weitere Formen des Morbus Parkinson hingegen, wie z.B. beim postenzephalitischen Parkinsonsyndrom, das zu Anfang des 20. Jahrhunderts vermehrt infolge einer Infektion mit einem Enzephalitis-Virus aufgetreten war, konnten aufgeklärt werden. Außerdem sind noch die medikamentöse und die rein toxische Form der Parkinsonschen Krankheit bekannt. Sie werden durch Intoxikation durch ein Nervengift ausgelöst. Im Folgenden soll jedoch nur auf die typischerweise im Alter auftretende häufigste Erkrankungsform eingegangen werden. Werden die Begriffe: "Parkinsonsche Krankheit", "Morbus Parkinson", u.s.w. verwendet, so ist folglich stets von der idiopathischen Form der Krankheit die Rede.

Die ersten Anzeichen der Parkinsonschen Krankheit sind rhythmisches Zittern einer Hand oder eines Fußes. Mit der Zeit werden die Patienten in ihren Bewegungen langsamer und steifer. Parkinsonpatienten können sich oft nur schwer in Bewegung setzen oder aus einer Bewegung anhalten. Das Gleichgewicht und die Koordination der Erkrankten sind gestört, sie fallen öfters hin und haben Mühe, ihren Körper aufrecht zu halten. Ihr Gang ist schlurfend

und kleinschrittig, die Arme schwingen beim Gehen nicht mehr mit. Es kommt vor, daß Parkinsonpatienten plötzlich an einer Stelle „einfrieren“, ihre verhärteten Muskeln „einrasten“. Hinzu kommt eine starre Mimik („Maskengesicht“). Auch die häufig kleine Schrift der Kranken kann als Ausdruck der Bewegungsarmut interpretiert werden.^[2]

An vegetativen Störungen treten Kreislaufprobleme, vermehrtes Schwitzen, Magen-Darm-Beschwerden sowie Störungen der Blasen- und Sexualfunktion auf. Gelegentlich leiden die Patienten unter Depressionen und unter einer Beeinträchtigung der geistigen Fähigkeiten.

In Tab. 1 sind die Symptome des Parkinsonsyndroms aufgelistet. Die auffälligen sog. "Kardinalsymptome" Tremor, Rigor, Akinese und Haltungsinstabilität, die von Patient zu Patient unterschiedlich stark ausgeprägt erscheinen, beschreiben die starke Beeinträchtigung des Bewegungsapparates bei der Parkinsonschen Krankheit.

Tab. 1. Symptome der Parkinsonschen Krankheit

Kardinalsymptome	
Tremor (Zittern)	
Rigor (Muskelsteifheit)	
Akinese (Verlust von automatischen Bewegungsabläufen)	
Posturale Instabilität (gestörte Stellreflexe)	
Begleitsymptome	
<i>Vegetative Störungen</i>	<i>Psychische Störungen</i>
vermehrter Speichelfluß	Bradyphrenie (verlangsamter Gedankenablauf)
erhöhte Talgproduktion	Demenz
Blutdruckstörungen	Depression
Potenzstörungen	
Verdauungsstörungen	<i>Weitere Symptome</i>
Atemstörungen	Sprachstörungen
Schlafstörungen	Störung des Visus und der Augenmotorik
Störungen der Temperaturregulation	Schmerzen
	Sensibilitätsstörungen

2.2 Basalganglien

Die Basalganglien spielen eine wichtige Rolle bei der Ausführung von Bewegungen. Eine Erkrankung der Basalganglien führt deshalb zu einer funktionellen Beeinträchtigung der willkürlichen und der unwillkürlichen Motorik der Betroffenen, wie dies bei der Parkinsonschen Krankheit der Fall ist. Zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der

Basalganglienerkrankungen ist daher die Kenntnis der funktionellen Anatomie der Basalganglien erforderlich.

2.2.1 Aufbau und Funktionsweise der Basalganglien

Die Basalganglien bestehen aus fünf unterschiedlichen diskreten Kernen, die durch komplexe Bahnen miteinander verbunden sind. Diese Kerne sind: *Nucleus caudatus*, *Putamen*, *Globus pallidus* (oder *Pallidum*), *Nucleus subthalamicus* und *Substantia nigra* (siehe Abb. 4).^[39]

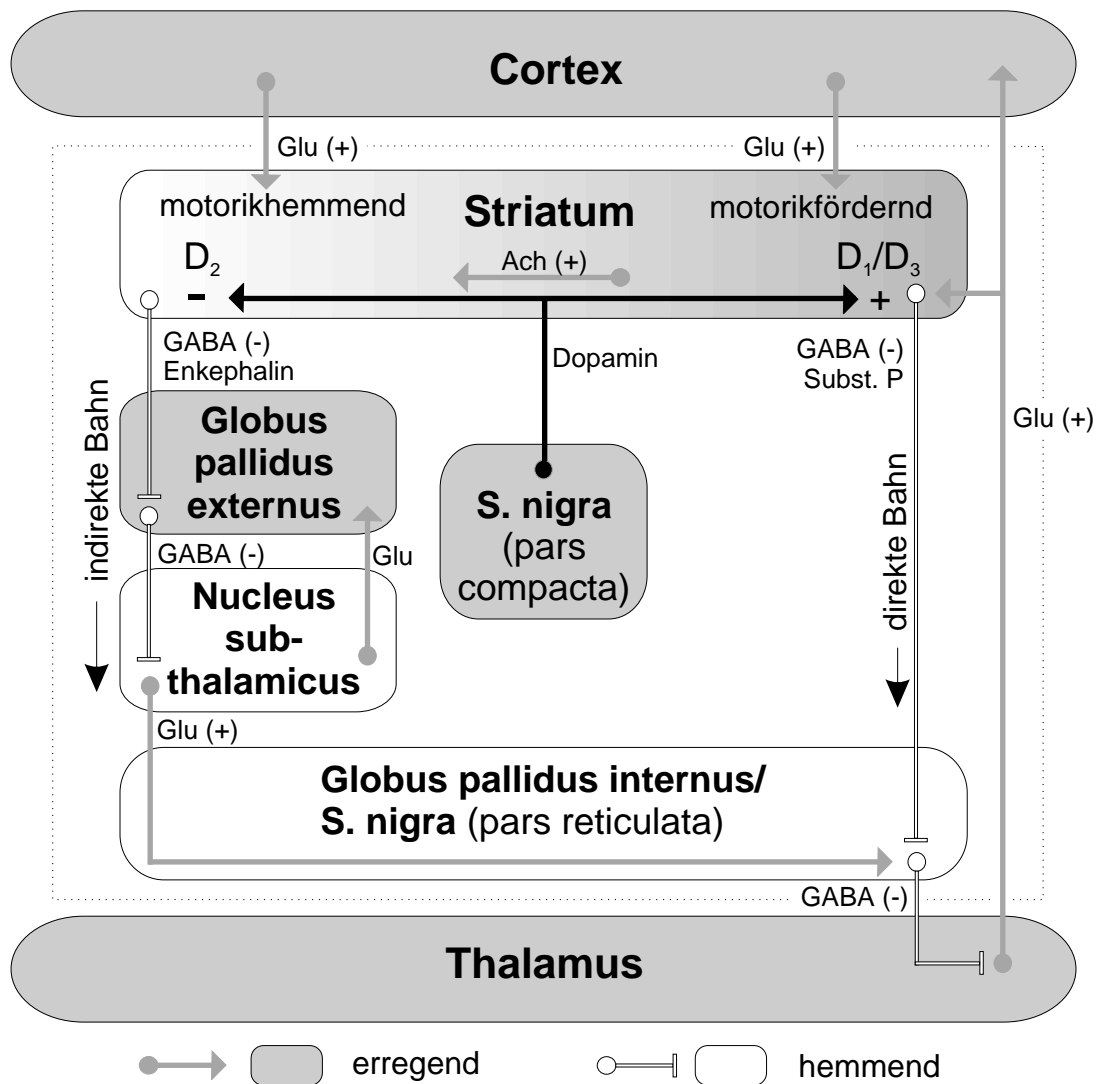


Abb. 4. Afferente und efferente Verschaltungen der Basalganglien^{[7]a}

Nucleus caudatus und *Putamen* werden meist unter dem Begriff *Striatum* zusammengefasst, sie stellen gemeinsam die sog. „Eingangsstation“ der Basalganglien dar. Das Striatum erhält Afferenzen (hinführende Bahnen) von allen motorischen und sensorischen Arealen des *Cortex*

^a Alle verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis nochmals aufgeführt.

und von dopaminergen Neuronen aus der *Pars compacta* der *Substantia nigra*. Das *Striatum* besitzt außerdem Efferenzen (wegführende Bahnen) zum *Globus pallidus* und zur *Substantia nigra* (*Pars reticulata* und *Pars compacta*). Der *Globus pallidus* ist in zwei Teile aufgeteilt: dem externen, mit dem *Nucleus subthalamicus* reziprok verbundenen Segment und einem internen Segment, welches die wesentliche Ausgangsstation dieses Kernes bildet. Das interne Segment des *Globus pallidus* projiziert zum *Thalamus*, der mit dem *Cortex* verbunden ist. Auch die *Pars reticulata* der *Substantia nigra* projiziert zum *Thalamus*. So können die Basalganglien, über Projektionen zum *Thalamus* Einfluß auf den motorischen *Cortex* nehmen (siehe Abb. 4).

Corticostriatale Bahnen (Bahnen vom *Cortex* zum *Striatum*) werden von glutamatergen Neuronen gebildet. Ebenso wie thalamostriatale Bahnen (Bahnen vom *Thalamus* zum *Striatum*) wirken sie exzitatorisch (erregend) gegenüber den cholinergen Interneuronen des *Striatums*. Man unterscheidet zwei efferente Projektionen des *Striatums*:

1. Die direkte Bahn:

Die direkte, inhibitorisch wirkende Bahn geht vom *Striatum* zum internen Segment des *Globus pallidus* und zur *Pars reticulata* der *Substantia nigra* (siehe Abb. 4). Das *Striatum* benutzt für diese Ausgänge den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) zusammen mit Substanz P, einem aus elf Aminosäuren bestehenden Neuropeptid, als Cotransmitter.^[39]

2. Die indirekte Bahn:

Diese Bahn wird ebenfalls von GABAergen Neuronen gebildet, die jedoch als Cotransmitter Enkephalin besitzen. Die indirekte Bahn verläuft vom *Striatum* zum externen Segment des *Globus pallidus*. Von dort ziehen GABAerge Bahnen zum *Nucleus subthalamicus*. Der *Nucleus subthalamicus* sendet glutamaterge Projektionen zurück zum externen Segment des *Globus pallidus* und außerdem zu den Ausgangsstationen der Basalganglien, dem internen Segment des *Globus pallidus* und der *Pars reticulata* der *Substantia nigra*.

Direkte und indirekte Bahnen besitzen als gemeinsame Endstrecke GABAerge Efferenzen vom internen Segment des *Globus pallidus* und von der *Pars reticulata* der *Substantia nigra* zum *Thalamus*. Eine Erregung der direkten Bahn führt zu einer Exzitation des prämotorischen *Cortex*. Eine hemmende Wirkung wird durch Aktivierung der indirekten Bahn erreicht. Von der *Pars compacta* der *Substantia nigra* wird durch dopaminerge Bahnen die Aktivität der beiden Systeme reguliert. Je nach Balance der beiden Systeme fördern oder hemmen die Basalganglien die Aktivität des motorischen *Cortex*.^[40]

2.2.2 Degeneration der Basalganglien bei der Parkinsonschen Krankheit und medikamentöse Regulierung der Defizite

Schon 1919 stellte Trétiakoff^[4] im Mittelhirn eine Degeneration des pigmentierten neuronalen Systems in der *Pars compacta* der *Substantia nigra* fest. Das Pigment Neuromelanin ist ein Produkt des Catecholamin-Metabolismus und dient auch heute noch als Marker von dopaminergen und noradrenergen Neuronen. Trétiakoff fand damit die grundlegende Pathologie der Parkinsonschen Krankheit. Später entdeckten dann Ehringer und Hornykiewicz,^[6] daß es sich bei diesem degenerierten neuronalen System um Dopaminproduzierende Zellen in der *Substantia nigra* handelt, wodurch ein Dopamin-Defizit im *Striatum* und der *Substantia nigra* resultiert. Sie fanden, daß der Grad des striatalen Dopaminmangels mit der Stärke der Parkinsonschen Symptome korreliert. Erste motorische Ausfälle treten jedoch erst dann auf, wenn schon *ca.* 80% der dopaminergen Neuronen untergegangen sind.^[2] Infolge dieser Degeneration kommt es beim Parkinsonsyndrom zu sekundären Veränderungen in den motorischen Bahnen der Basalganglien selbst (siehe Abb. 4, S. 7) und in den von ihnen beeinflussten Strukturen.^[41]

Im *Striatum* übt Dopamin (**1**) seine Wirkung vorwiegend postsynaptisch an lokalen Rezeptoren aus, welche pharmakologisch in D₁/D₃- und D₂-Rezeptoren unterteilt werden können. Der Dopaminmangel im *Striatum* bewirkt u.a. eine gesteigerte Aktivität cholinergischer striataler Interneuronen und eine verminderte Aktivierung bzw. Hemmung GABAerger Neuronen der direkten Bahnen (siehe Abb. 4, S. 7). Es kommt zu einem Überwiegen der indirekten Bahnen: Der *Globus pallidus externus* wird durch GABAerg inhibitorische Nervenfasern des *Striatums* infolge der nachlassenden dopaminergen Funktion unkontrolliert gehemmt und kann den *Nucleus subthalamicus* nicht mehr inhibieren. Der "enthemmte" *Nucleus subthalamicus* aktiviert den *Globus pallidus internus* und die *Substantia nigra pars reticulata* der Basalganglien. Dies führt zu einem erhöhten inhibitorischen Ausgangssignal aus den Basalganglien und dadurch zu einem hypokinetisch-hypertonen Syndrom, das die Symptomatik der Parkinsonschen Erkrankung im wesentlichen charakterisiert.^[40]

Mittlerweile sind viele Medikamente bekannt, die in diese gestörte motorische Schleife der Basalganglien eingreifen und das Verhältnis der Neurotransmitter wieder ausgleichen.

Eines der ersten Parkinsonmedikamente, das eher zufällig entdeckt wurde, gehört zur Klasse der Anticholinergika. Das vor etwa 100 Jahren eingeführte Belladonna-Alkaloid Atropin (**9**) (isoliert aus der Tollkirsche) ist jedoch seit 1950 von synthetischen Anticholinergika [z.B. Benztropin (**10**)] abgelöst worden (siehe Abb. 5).^[2] Diese Medikamente vermindern die nach Dopaminmangel eintretende cholinerge Überaktivität striataler Interneurone. Anticholinergika beeinflussen vor allem den Tremor und den Rigor günstig, die Akinese wird jedoch kaum gebessert.^[41] Aufgrund von beeinträchtigenden Nebeneffekten, wie z.B. Sehstörungen und

Gedächtnisprobleme, spielen diese Medikamente seit der Entdeckung von L-Dopa (2) in den 60er Jahren nur noch eine kleine Rolle.^[2]

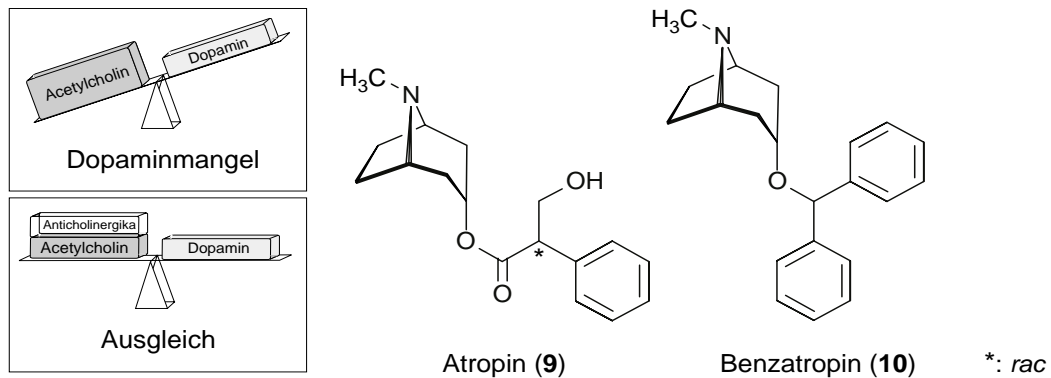
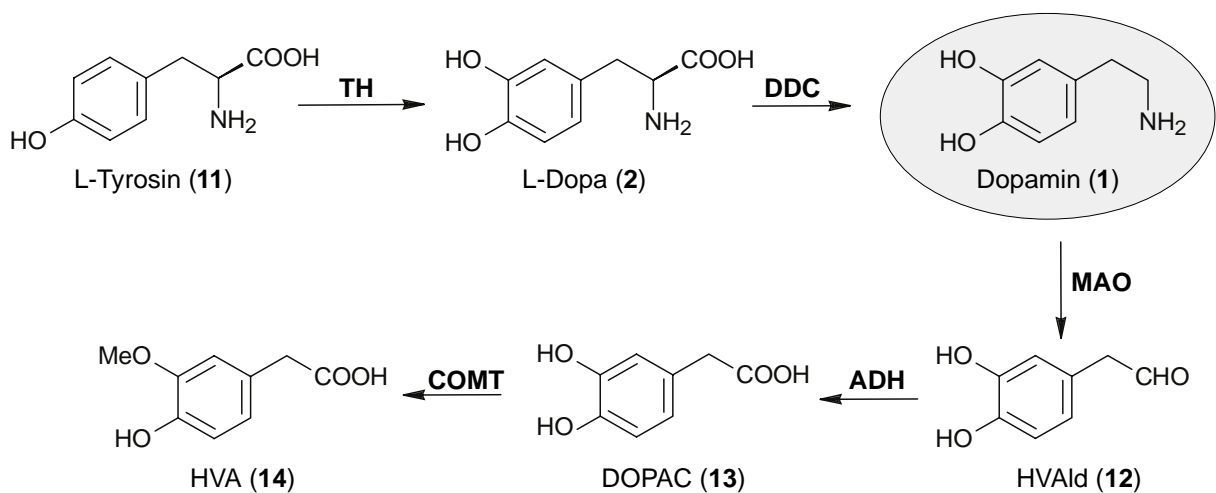


Abb. 5. Ausgleich der Acetylcholin/Dopamin-Ungleichgewichts durch Hemmung von Acetylcholin durch Anticholinergika

1961 wurde von Birkmayer, Hornykiewicz^[8,9] und Barbeau^[10] L-Dopa (2) eingeführt, ein Medikament, das erstmals eine deutliche Linderung der schweren Parkinsonsymptomatik möglich machte. Ziel der Behandlung ist es, durch Zufuhr von L-Dopa (2) den Dopaminmangel zu regulieren. L-Dopa (2) wird von Decarboxylase-Enzymen (DDC) im Gehirn zu Dopamin (1) umgewandelt (siehe Schema 3) und kann, da es im Gegensatz zu Dopamin (1) die Blut-Hirn-Schranke passiert, das Dopamindefizit direkt in der *Substantia nigra* ausgleichen (siehe auch Abb. 7, S. 12).



Schema 3. Biochemischer Syntheseweg und synaptischer Abbau von Dopamin mittels Tyrosinhydroxylase (TH), Dopa-Decarboxylase (DDC), Monoaminoxidase (MAO), Aldehyd-Dehydrogenase (ADH) und Catcheol-*O*-methyltransferase (COMT)

Leider konnte bei den anfänglich eingesetzten kleinen Dosen von L-Dopa (2) kein therapeutischer Effekt beobachtet werden. Erst nach Medikation^[42] mit Dosen bis zu 8 g

täglich wurde eine Besserung beobachtet. Später fand man,^[43] daß oral verabreichtes L-Dopa (**2**) zu 90% in der Peripherie und nicht erst im Gehirn zu Dopamin (**1**) decarboxyliert wird. Durch parallele Gabe von **2** und Decarboxylasehemmern, die selbst nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren können, wurde dann im Folgenden die L-Dopa-Behandlung entscheidend verbessert. Durch die Kombination der beiden Medikamente konnten die erforderlichen L-Dopa-Dosen bei besserer therapeutischer Wirksamkeit und geringeren peripheren Nebenwirkungen um 80% reduziert werden.^[44] Leider stellte man sehr bald fest, daß L-Dopa (**2**) auch nicht das Allheilmittel zur Behandlung der Parkinsonsymptome ist. Nach ca. 4-5 Jahren Therapie mit L-Dopa (**2**) werden die Patienten allmählich unempfindlich gegenüber **2**, dessen Wirkdauer im Organismus außerdem deutlich kürzer wird. Auch die Nebenwirkungen nehmen zu: psychische Störungen, Schwindel beim Aufstehen, Übelkeit sowie On-Off-Phänomene, bei denen unvorhersehbare Momente der Bewegungslosigkeit mit solchen normaler oder unwillkürlicher Bewegungen wechseln.^[2]

Ebenfalls zur medikamentösen Regulierung des gestörten Neurotransmittergleichgewichts werden Amantadine [z.B. Amantadin (**15**), Memantin (**16**), siehe Abb. 6] eingesetzt. Als NMDA-Rezeptorantagonisten bremsen sie die funktionelle Übersteuerung von Glutamat,^[45] ihre Wirkung ist jedoch schwächer als die von L-Dopa-Präparaten. Sie werden deshalb meist in Kombination mit L-Dopa (**2**) eingesetzt.^[2]

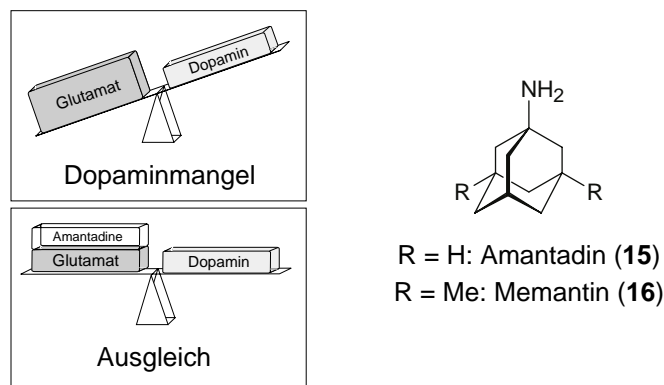


Abb. 6. NMDA-Rezeptorantagonisten zum Ausgleich der funktionellen Übersteuerung von Glutamat

Weiterhin sind Parkinsonmedikamente bekannt, die in die gestörte synaptische Übertragung von Impulsen aus der *Substantia nigra* auf striatale Neuronen wirken (siehe Abb. 7).

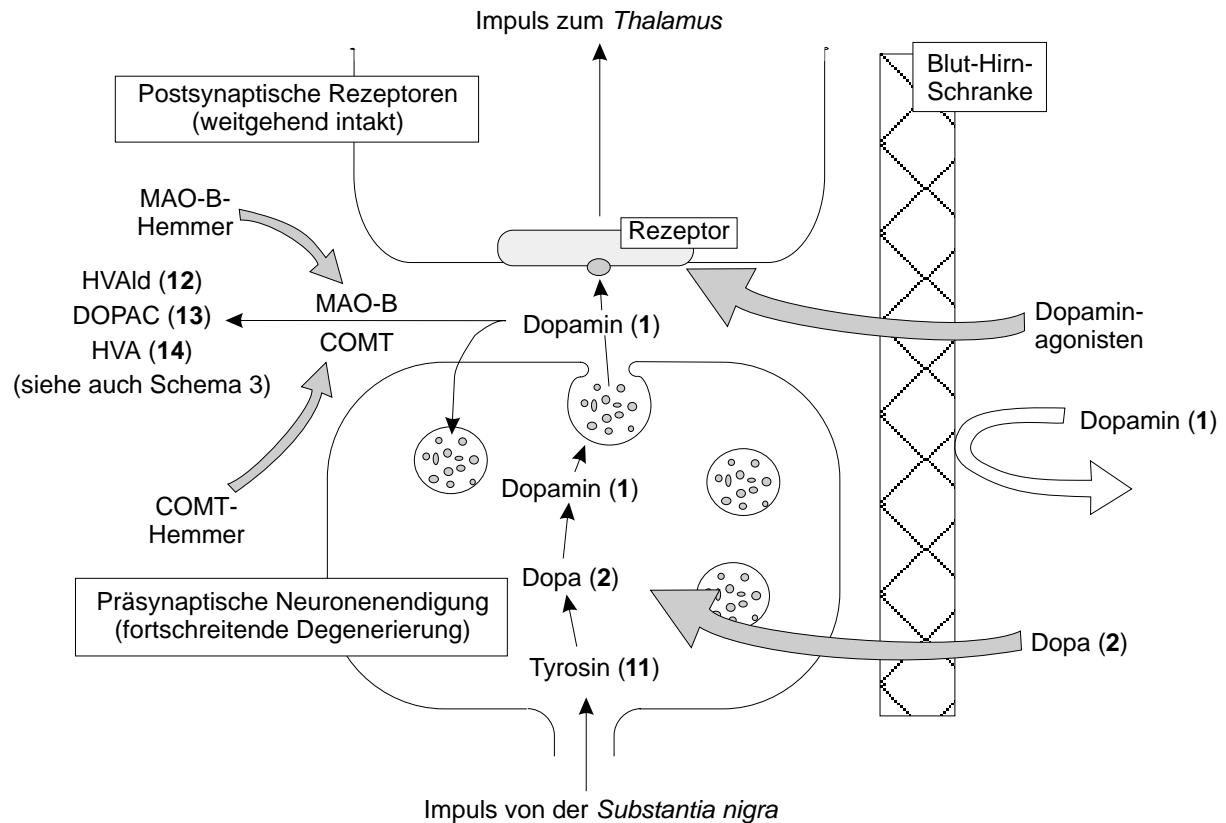


Abb. 7. Synaptische Impulsübertragung und Ansatzpunkte der medikamentösen Therapie

Zur Verfügung stehen die auf die striatalen Dopaminrezeptoren wirkenden Dopaminagonisten, die jedoch meist im Vergleich zu L-Dopa (2) auch eine schwächere Wirksamkeit haben und oft mit stärkeren Nebenwirkungen verbunden sind. Die meisten Dopaminagonisten zählen zu der Klasse der Ergolin-Verbindungen (z.B. Cabergolin, 17, siehe Abb. 8) und sind D₂-Agonisten, die zusätzlich eine variable Aktivität an den D₁-Rezeptoren besitzen. Ihre Wirkung erfolgt also hauptsächlich über die indirekte Bahn und nur teilweise über die direkte Bahn (siehe auch Abb. 4, S. 7).^[46] Die Nicht-Ergolin-Verbindung Pramipexol (18) (siehe Abb. 8) stimuliert D₃-Rezeptoren, die den *Globus pallidus internus* direkt inhibieren und D₂-Rezeptoren, die den *Globus pallidus internus* indirekt hemmen (siehe auch Abb. 4, S. 7).^[47]

Außerdem sind Medikamente bekannt, die den Abbaustoffwechsel von Dopamin beeinflussen (siehe Schema 3, S.10 und Abb. 7, S. 11). Die Dopamin-abbauende Monoaminoxidase (MAO B) wird durch Selegilin (19, siehe Abb. 8) irreversibel gehemmt und führt so zu einer Erhöhung des Dopamingehaltes im *Striatum*. Die symptomatische Wirkung dieses MAO-B-Hemmers ist schwach. Er kann jedoch die Wirkung von gleichzeitig genommenem L-Dopa erhöhen.^[41]

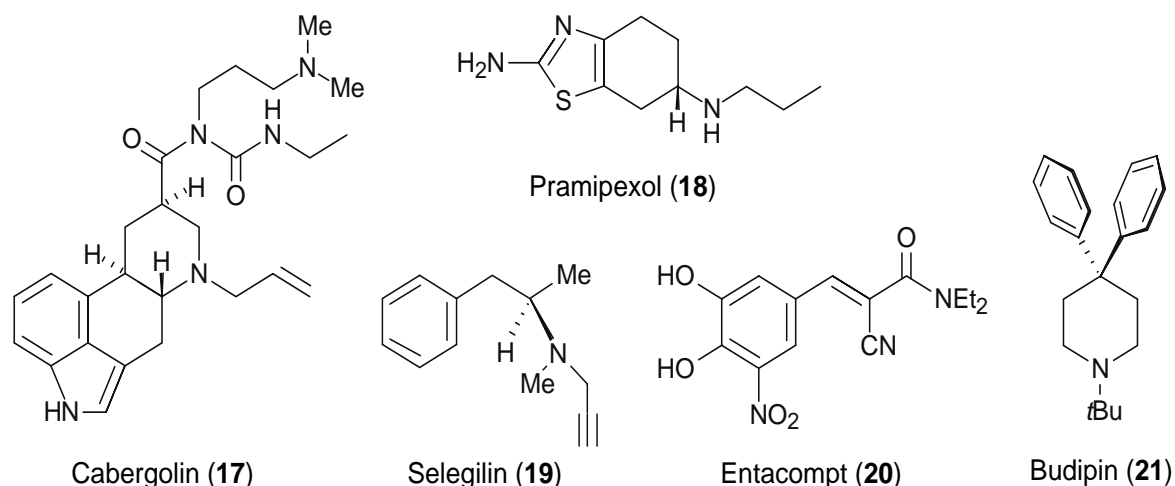


Abb. 8. Dopaminagonisten Pramipexol (**18**) und Cabergolin (**17**), der MAO-B-Hemmer Selegilin (**19**), der COMT-Hemmer Entacomp (**20**) und Budipin (**21**)

Ebenfalls den Abbau von Dopamin (**1**) beeinflussende Medikamente wurden mit den COMT-Hemmern [z.B. Entacomp (**20**), siehe Abb. 8] gefunden. Sie blockieren ein weiteres L-Dopa-abbauendes Enzym, die Catechol-*O*-methyl-Transferase (COMT) (siehe Schema 3, S.10). Dieses Enzym kann sowohl L-Dopa (**2**) als auch Dopamin (**1**) abbauen. Durch seine Hemmung gelingt es, wesentlich mehr L-Dopa (**2**) in das Gehirn zu schleusen und damit die Menge an Dopamin (**1**) zu erhöhen und gleichzeitig seinen Abbau zu reduzieren (siehe Abb. 7, S. 12).^[48]

Seit 1997 ist außerdem Budipin (**21**, siehe Abb. 8) zur Parkinsontherapie zugelassen. Der genaue Wirkmechanismus dieses Medikaments ist allerdings nicht bekannt, in Modellversuchen zeigt es jedoch einen Dopamin-verstärkenden und Glutamat-hemmenden Einfluß.^[49]

Neben der medikamentösen Behandlung ist eine chirurgische Therapie des Morbus Parkinson möglich, die nach der anfänglichen Euphorie über L-Dopa in den Hintergrund getreten, heute wieder vermehrt, vor allem in späten Stadien der Krankheit, angewendet wird.^[2]

Man unterscheidet 2 Verfahren:

1. Stereotaktische OP-Verfahren

Durch Läsion werden basale, dem *Striatum* nachgeschaltete und durch Dopaminmangel übererregte Kerngebiete des Gehirns (*Globus pallidus internus*, *Nucleus subthalamicus*) strukturell und funktionell ausgeschaltet. Zielsymptom des operativen Eingriffs ist die sog. Überschußsymptomatik, in erster Linie der Tremor, aber auch der Rigor. Seit Kurzem ist auch der Einsatz eines "Gehirnschrittmachers" möglich, einer Elektrode, die nach Knopfdruck eine Blockierung der Nervenimpulsübertragung auslöst.^[50]

2. Transplantation von Dopamin-synthetisierenden Zellen ins *Striatum*

Hierbei wird allogenes fetales Mittelhirngewebe in das *Striatum* des Patienten eingesetzt. Die transplantierten Zellen können dort als Dopaminlieferanten wirken und können außerdem durch synaptische Wiederaufnahmemechanismen das L-Dopa/Dopaminsystem puffern. Diese bisher erst bei einigen wenigen Patienten durchgeführte Behandlung zeigt bislang einen langanhaltenden Therapieeffekt bei ca. 80% der Patienten. Jedoch ist die Methode, die sich noch weitgehend im Versuchsstadium befindet, nicht unumstritten: insbesondere die Verwendung fetalen Gewebes zu therapeutischen Zwecken und die damit verbundenen ethischen Fragestellungen lassen eine generelle Anwendung dieses Verfahrens beim derzeitigen Stand der Diskussion nicht zu.^[50]

Zusammenfassend kann man sagen, daß in der Parkinsontherapie durch die Kenntnis der Pathophysiologie und Pathochemie dieser Krankheit große Fortschritte errungen werden konnten. Jedoch beschränken sich alle bekannten Behandlungsstrategien nach wie vor auf die Erzielung von Linderung in der Symptomatik; eine Therapie der Ursachen oder gar Heilung von Parkinsonpatienten ist nach wie vor nicht in Sicht.

2.3 Ursachen der Neurodegeneration

Noch immer ist die eigentlich Ursache der Degeneration des neuronalen Systems der *Substantia nigra* bei Parkinsonpatienten unbekannt. Diskutiert werden genetische Faktoren und Umwelteinflüsse, die alleine oder in Kombination als auslösende Ursachen des idiopathischen Parkinsonsyndroms wirken können. Obwohl genetische Komponenten nur im Anfangsstadium der Krankheit eine Rolle zu spielen scheinen und es noch immer keine eindeutige Identifizierung eines spezifischen Umwelteinflusses gibt, nimmt man an, daß komplexe Wechselwirkungen zwischen Umweltgiften und multiplen Gendefekten (Mutationen z.B. im α -Synuclein oder Parkin-Gen) ablaufen. Diese pathogenen Faktoren können eine komplexe Kaskade schädlicher Mechanismen auslösen, die schließlich zur Apoptose (programmierter Zelltod) der betroffenen Zellen, also zur neuronalen Degeneration führen (siehe Abb. 9).^[12,14]

Die Apoptose ist ein aktives Programm des Zellselbstmordes, welches das Schrumpfen der Zelle, die Fragmentierung der Zell-DNA und schließlich die Phagozytose durch Makrophagen bewirkt. Der *via* Apoptose vermittelte exzessive Zelltod kann aufgrund von Umwelteinflüssen oder erblicher Veranlagung einsetzen. Diese Faktoren können ein verstärktes Auftreten von Signalen bewirken, die Apoptose auslösen oder die Schwelle, an der solche Ereignisse letztendlich die Apoptose einleiten, senken.^[52] Es könnten proapoptotische Gene in

neuronalen Zellen von Parkinsonpatienten vorhanden sein, was ein vermehrtes Auftreten der Krankheit in manchen Familien erklären könnte.

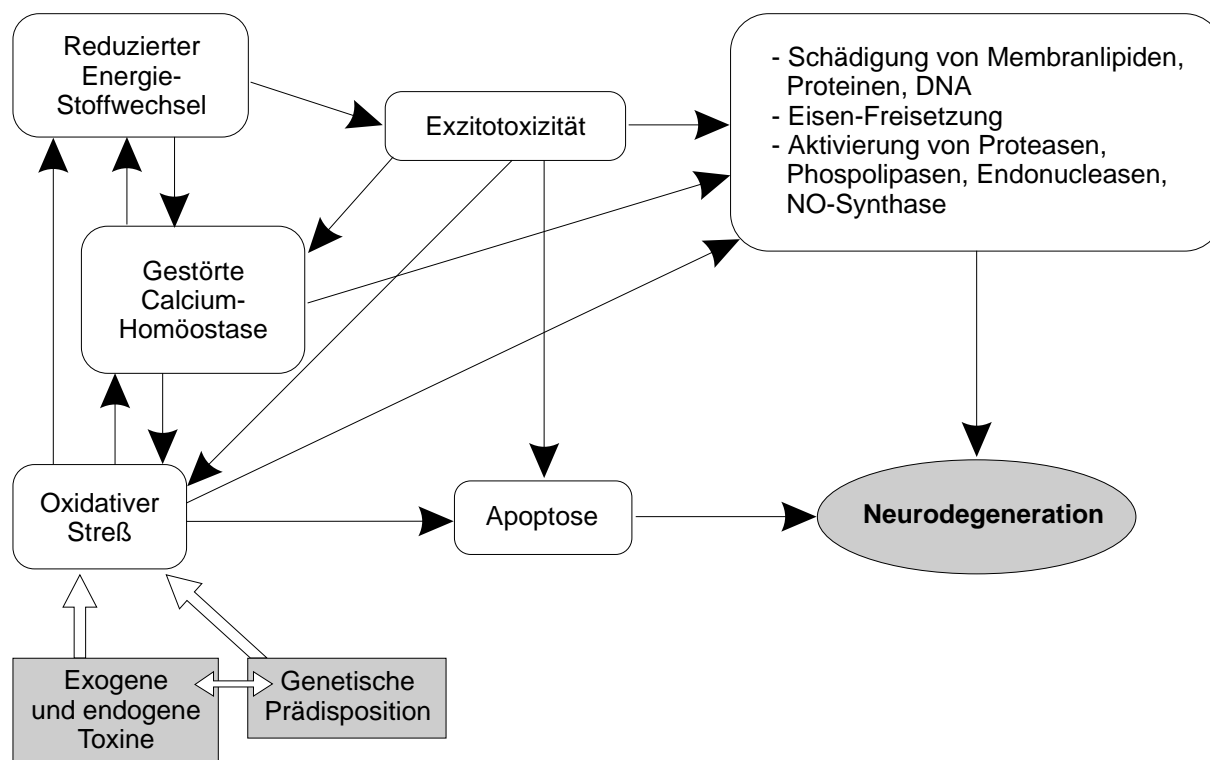


Abb. 9. Interaktion und Synergismus der dopaminergen Neurodegeneration^[51]

Dem neuronalen Zelltod gehen bei der Parkinsonschen Krankheit eine Reihe von Ereignissen voraus (siehe Abb. 9):

- oxidativer Streß (siehe Kap. 2.3.1),
- vermehrter Ca^{2+} -Einstrom,
- vermehrtes Einströmen von Exzitotoxinen (z.B. Glutamat) (siehe Kap. 2.3.2),
- Fehlen von Überlebensfaktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren.

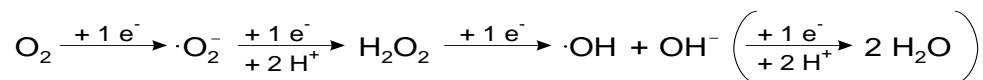
Jeder dieser Stoffwechselfvorgänge kann Apoptose im Neuron bzw. die Bereitschaft dazu auslösen und außerdem weitere Prozesse aktivieren und so die schädliche, schließlich zum Zelltod führende Kaskade starten.^[53,54]

2.3.1 Oxidativer Streß

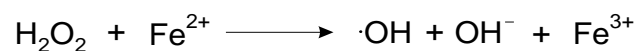
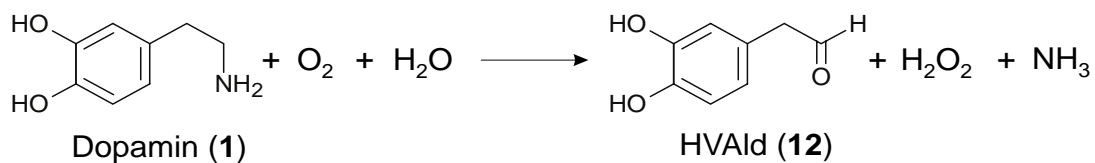
Oxidativer Streß ist ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion freier Radikale und antioxidativer Prozesse. Die auch im normalen Zellstoffwechsel anfallenden Radikale werden nicht mehr durch vorhandene Mechanismen (z.B. durch Abbauenzyme wie Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase) inaktiviert.^[40]

Es existieren zahlreiche Möglichkeiten zur Bildung freier Radikale:^[14]

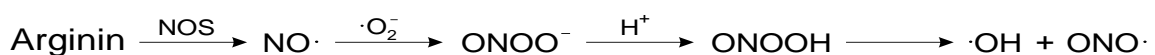
1. Bei der Reduktion von O₂ zu H₂O während der oxidativen Phosphorylierung (Bildung von ATP) in den Mitochondrien werden reaktive Sauerstoffspezies ($\cdot\text{O}_2^-$, H₂O₂, $\cdot\text{OH}$) gebildet. Sie sind unter normalen Bedingungen an Enzyme gebunden und werden zu H₂O reduziert.



2. Bei der Oxidation von Dopamin (1) bildet sich als Nebenprodukt H₂O₂, das in Anwesenheit von Fe²⁺ in einer Fenton-artigen Reaktion unter Bildung von Hydroxylradikalen weiterreagiert. Die vermehrte Anwesenheit von Fe³⁺ in der *Substantia nigra* von Parkinsonpatienten wird deshalb auch als Indiz für das Vorhandensein freier Radikale angesehen.



3. Ca²⁺-Einstrom in die Zelle führt zur Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Enzyme wie der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). Sie synthetisiert aus Arginin NO \cdot , welches mit Superoxid ($\cdot\text{O}_2^-$) weiterreagiert.



2.3.2 Exzitotoxizität

Als Exzitotoxizität bezeichnet man einen durch Aktivierung exzitatorischer (glutamaterger) Rezeptoren hervorgerufenen Zelltod. Es existieren zwei unterschiedliche Mechanismen:

1. Exzitotoxizität durch erhöhte Glutamatkonzentration

Eine erhöhte Glutamatkonzentration, wie sie z.B. bei akuten neurologischen Erkrankungen wie der cerebralen Ischämie beobachtet wird, bewirkt eine Stimulierung von ionotropen, an Kationenkanälen gekoppelten Glutamatrezeptoren, sog. NMDA-Rezeptoren. Ihre Aktivierung bewirkt ein Einströmen von Ca^{2+} in die Zelle. Dadurch werden intrazelluläre Prozesse aktiviert, die zum Zelltod führen können (siehe Abb. 10).^[40]

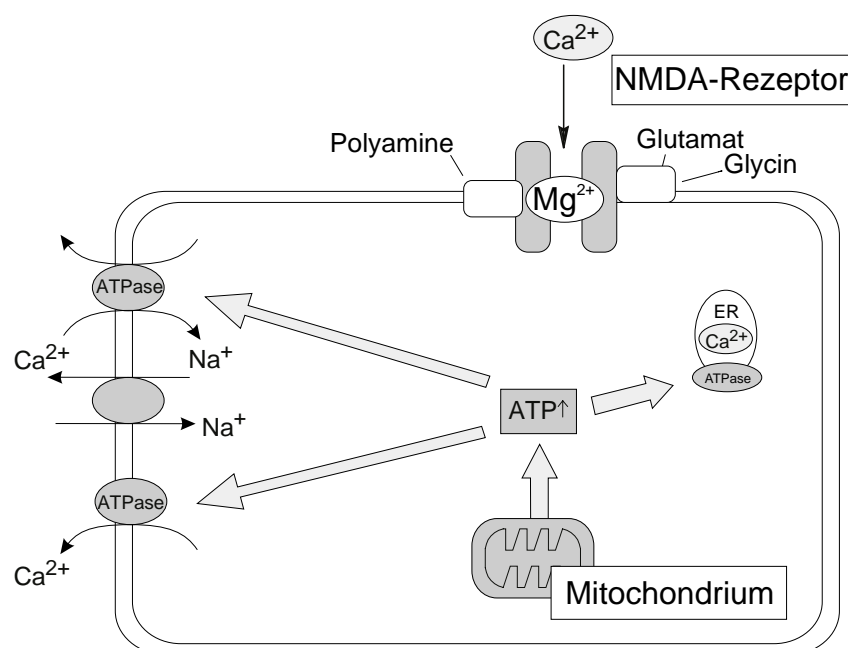


Abb. 10. Die Zelle im normalen Zustand: Das Mitochondrium produziert ATP, das als Energielieferant für eine Vielzahl von Ionenpumpen dient. Die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration wird durch ATPasen, die energieverbrauchend Ca^{2+} aus der Zelle heraus- oder in intrazelluläre Organellen (z.B. Endoplasmatisches Reticulum, ER) hineinpumpen, innerhalb der Zelle niedrig gehalten. Im Normalzustand wird der NMDA-Rezeptor von Mg^{2+} blockiert. Eine extrazellulär erhöhte Glutamatkonzentration führt zu einer Übererregung der Rezeptoren und zum Einstrom von Ca^{2+} .

2. Sekundäre Exzitotoxizität

Bei physiologisch normalem extrazellulärem Glutamat Spiegel führt eine Störung des Energiestoffwechsels zur sekundären Exzitotoxizität (siehe Abb. 11). Durch Inhibition der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium kommt es zu einer ATP-Verarmung und dadurch zu einem Anstieg des Ruhepotentials und zu einer Deblockierung des NMDA-

Rezeptors durch Mg^{2+} . Ca^{2+} strömt in die Zelle, was eine Aktivierung calciumabhängiger Enzyme zur Folge hat. Die so aktivierte Stickstoffmonoxid-Synthase produziert $NO\cdot$. Dieses Radikal löst oxidativen Streß in der Zelle aus. Es kommt zur Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA und zur Inhibierung mitochondrialer Enzyme.^[40]

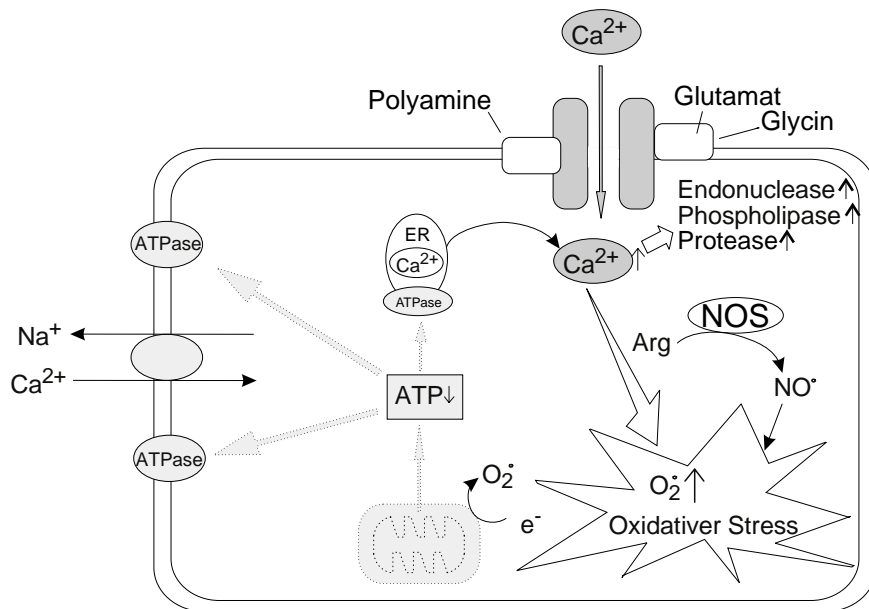


Abb. 11. Sekundäre Exzitotoxizität. Die Störung der Mitochondrienfunktion führt zur ATP-Verarmung, woraus ein Einströmen von Ca^{2+} resultiert, wodurch wiederum Ca^{2+} -abhängige Enzyme aktiviert werden, die zur Produktion freier Radikale beitragen. Es kommt zu oxidativem Streß

2.4 MPTP – Neurotoxin und Modellschubstanz in der Parkinsonforschung

Viele Erkenntnisse über biochemische Mechanismen und Abläufe der in Kap. 2.2 bis 2.3 beschriebenen zerstörerischen Prozesse gehen auf die Entdeckung und Untersuchungen des Neurotoxins 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP, **3**) zurück. MPTP kam 1983 in die Schlagzeilen, als Langston^[55] von jungen Drogenabhängigen berichtete, die nach Injektion eines synthetischen Heroins parkinsonähnliche Symptome zeigten. Man fand bald heraus, daß MPTP, das als Verunreinigung in diesem Heroin vorhanden war, diese jungen Leute in eine fast totale Bewegungslosigkeit versetzt hatte.

Das Neurotoxin entwickelte sich sehr bald zu *der* Modellschubstanz in der Parkinsonforschung, da es in Tierversuchen ebenfalls eine selektive Schädigung des dopaminergen Systems in der *Substantia nigra pars compacta* hervorrufen kann, die bekanntermaßen den Morbus Parkinson charakterisiert. Mit Hilfe von MPTP konnte in den letzten 25 Jahren eine Vielzahl von Befunden erhoben werden, die erheblich zu einem verbesserten Verständnis der Abläufe

bei der Neurodegeneration beigetragen haben. Weiterhin findet MPTP pathophysiologisch Einsatz bei der Suche nach neuen Medikamenten und ihrer Wirkungsweise.

Man weiß heute, daß **3** selbst nicht an der Zerstörung der Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* beteiligt ist. MPTP wird, nach Passage der Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn, von Gliazellen aufgenommen (siehe Abb. 12). Diese Zellen schleusen MPTP (**3**) in ihre Mitochondrien ein, wo es, katalysiert durch MAO-B, zunächst zum 1-Methyl-4-phenyldihydropyridiniumion (MPDP⁺, **22**) oxidiert und schließlich spontan, nicht-enzymatisch in das neurotoxische 1-Methyl-4-phenylpyridiniumkation (MPP⁺, **4**) umgewandelt wird. Dieser MPTP-Metabolit wird schließlich von der Gliazelle freigesetzt und spezifisch von Dopamin-produzierenden Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* aktiv über den Dopamin-Transporter aufgenommen. Dort entfaltet **4** seine zerstörerische Kraft. MPP⁺ inhibiert Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Es kommt zur ATP-Verarmung, zu einem massiven Einströmen von Ca²⁺, zu oxidativem Streß, zu Lipidperoxidation und zur Schädigung von DNA. Schließlich geht das dopaminerge Neuron zugrunde (siehe Abb. 12).^[21]

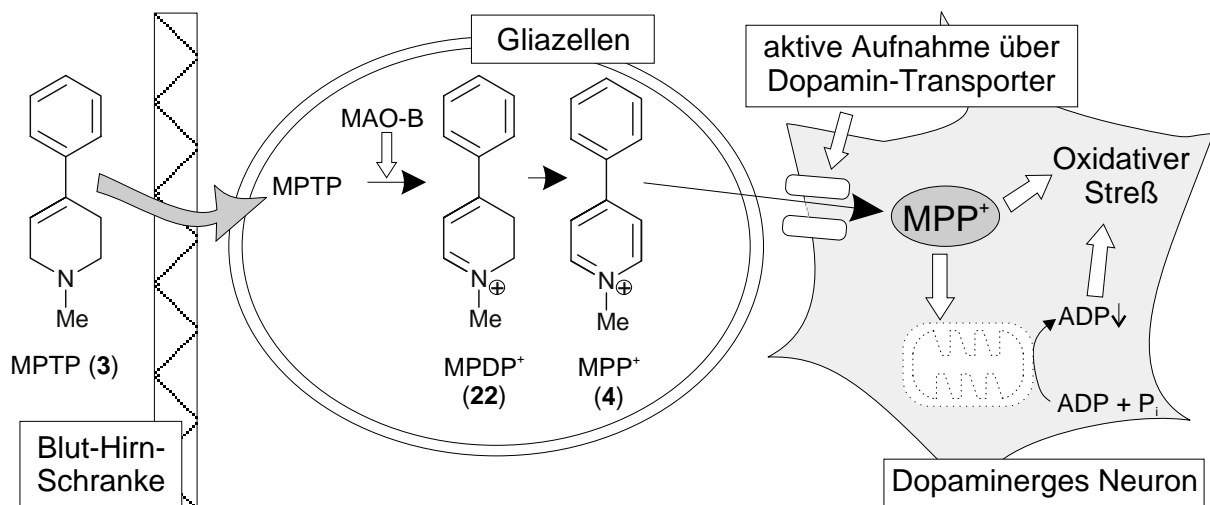


Abb. 12. Metabolismus und Wirkungsweise von MPTP (**3**)

Trotz der vielen mit MPTP erzielten Erkenntnisse, die die Parkinsonforschung weit vorangetrieben haben, sind noch immer die eigentlichen auslösenden Faktoren für die Degeneration des dopaminergen Systems unbekannt. Die Entdeckung von **3** rückte die Annahme, daß Neurotoxine vielleicht sogar in Kombination mit einer genetisch bedingten Empfindlichkeit gegenüber Umweltgiften Auslöser der Parkinsonschen Krankheit sein könnten, in den Vordergrund. Es wurde nach Substanzen gesucht, die ähnliche neurotoxische Eigenschaften wie MPTP (**3**) oder MPP⁺ (**4**) aufweisen, mit denen jedoch der Mensch, anders als mit dem Modellneurotoxin **3**, auf natürliche Weise in Berührung kommen kann.

Auch aufgrund epidemiologischer Untersuchungen,^[13,56,57] die eine Assoziation von Pestiziden und Herbiziden zu der Parkinsonschen Krankheit aufzeigten, konnte Rotenon (**23**) als ein weiteres Neurotoxin identifiziert werden. Diese Substanz kommt in der Natur in Wurzeln von verschiedenen Schmetterlingsblütlern vor und wird seit längerem zur Schädlingsbekämpfung in Gemüsegärten, aber auch zur Regulierung von Fischbeständen, eingesetzt. Rotenon galt lange Zeit als sichere Alternative zu synthetischen Pestiziden.^[58]

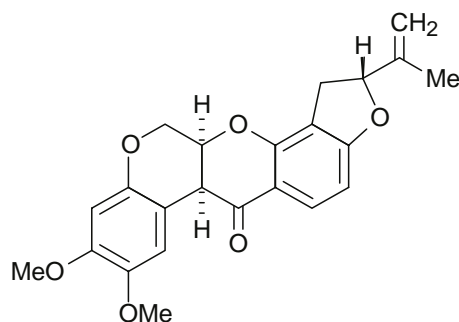
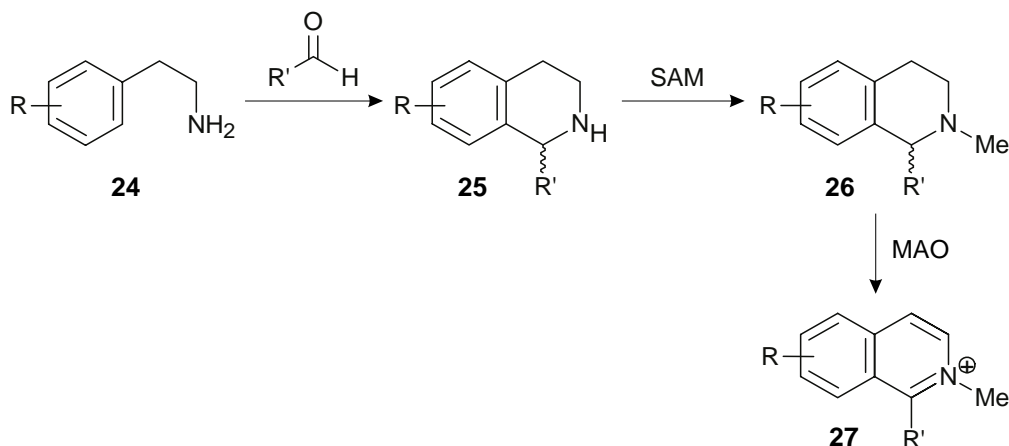


Abb. 13. Das Pestizid Rotenon (**23**)

Das hydrophobe **23** kann leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren, durch die Zellmembranen diffundieren und dort den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette inhibieren. In Tierversuchen verursachte Rotenon, wenn es in geringen Dosen injiziert wurde, Parkinson-ähnliche Symptome. Man fand eine spezifische Degenerierung nigrostriataler dopaminerger Neuronen. Ähnlich wie im Gehirn von Parkinsonpatienten wurden cytoplasmatische Einschlüsse, sog. Lewy-Körperchen gefunden,^[59] die im Gegensatz dazu bei MPTP-behandelten Tieren nicht auftauchen.^[60] Der potente Komplex-I-Inhibitor Rotenon war also in der Lage, eine dem Krankheitsbild des Morbus Parkinson, sowohl hinsichtlich neurochemischer wie auch neuropathologischer Charakteristika, sehr ähnliche Symptomatik hervorzurufen. Mit Rotenon (**23**) steht deshalb seit jüngster Zeit ein weiteres Toxin zur Generierung von Parkinsonsymptomen im Tiermodell zur Verfügung. Oral aufgenommen, scheint Rotenon jedoch wenig Toxizität zu besitzen, ist also selbst wahrscheinlich nicht an der Entstehung der Parkinsonschen Krankheit beteiligt. Aufgrund der Untersuchungen mit **23** erscheint es jedoch mittlerweile als gesichert, daß eine partielle Komplex-I-Inhibierung im gesamten Gehirn vor allem in einer Neurodegeneration des nigrostriatalen dopaminergen Systems resultiert. Diese Neurodegeneration scheint im wesentlichen auf oxidativen Streß zurückzuführen zu sein.^[58]

Ebenfalls gute Komplex-I-Inhibitoren, die auch schon als natürlich vorkommende potentielle Parkinsonauslöser zur Diskussion standen, sind Alkaloid-artige Heterocyclen der Substanzklasse der Tetrahydroisochinoline (**25**, TIQs).^[61] Der Mensch kann diese Verbindungen über zahlreiche Lebensmittel, u.a. Bananen, Käse, Milch, gekochtes Fleisch oder alkoholische Getränke aufnehmen. Zusätzlich können TIQs im menschlichen

Organismus durch eine Pictet-Spengler-Ringschlußreaktion von endogen vorhandenen Aminen wie Phenylethylamin (**24**) oder Katecholaminen mit Aldehyden oder α -Ketosäuren gebildet werden (siehe Schema 4).^[62]



Schema 4. Bildung und Metabolisierung von Tetrahydroisochinolin (25) im menschlichen Körper

Tetrahydroisochinoline **25** werden im menschlichen Körper enzymatisch von *S*-Adenosylmethionin (SAM) *N*-methyliert und schließlich von Monoaminoxidasen (MAO) zu *N*-Methylisochinolinium-Ionen **27** oxidiert. Von Isochinolin-Derivaten ist bekannt, daß sie ähnlich wie MPP^+ (**4**) die Aktivität von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und α -Ketoglutaratdehydrogenase (α -KGDH) inhibieren, damit oxidativen Streß auslösen und Apoptose induzieren können. Die Relevanz dieser Verbindungsklasse, potentiell Auslöser der Parkinsonschen Krankheit sein zu können, wurde durch den Nachweis von Tetrahydroisochinolin in Leber, Niere, Urin, Blut, aber auch im Gehirn von Menschen erbracht. Jedoch ist die Detektion dieser Verbindungen im Gehirn nicht auf eine Aufnahme über die Nahrung zu erklären, da TIQs eine zu geringe Lipophilie aufweisen und daher die Blut-Hirn-Schranke nur schlecht passieren können.^[63] Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, daß Verbindungen wie **25** direkt im Gehirn gebildet werden. Bei der in den letzten Jahren vielfach geführten Diskussion über beschleunigte neurodegenerative Prozesse bei L-Dopa-behandelten Parkinsonpatienten wurde als mögliche Ursache hierfür auch die endogene Entstehung von Tetrahydroisochinolin genannt. In der Tat wurden erhöhte Konzentrationen an TIQs und Folgeprodukten im Gehirn dieser unter L-Dopa-Therapie stehenden Patienten detektiert.

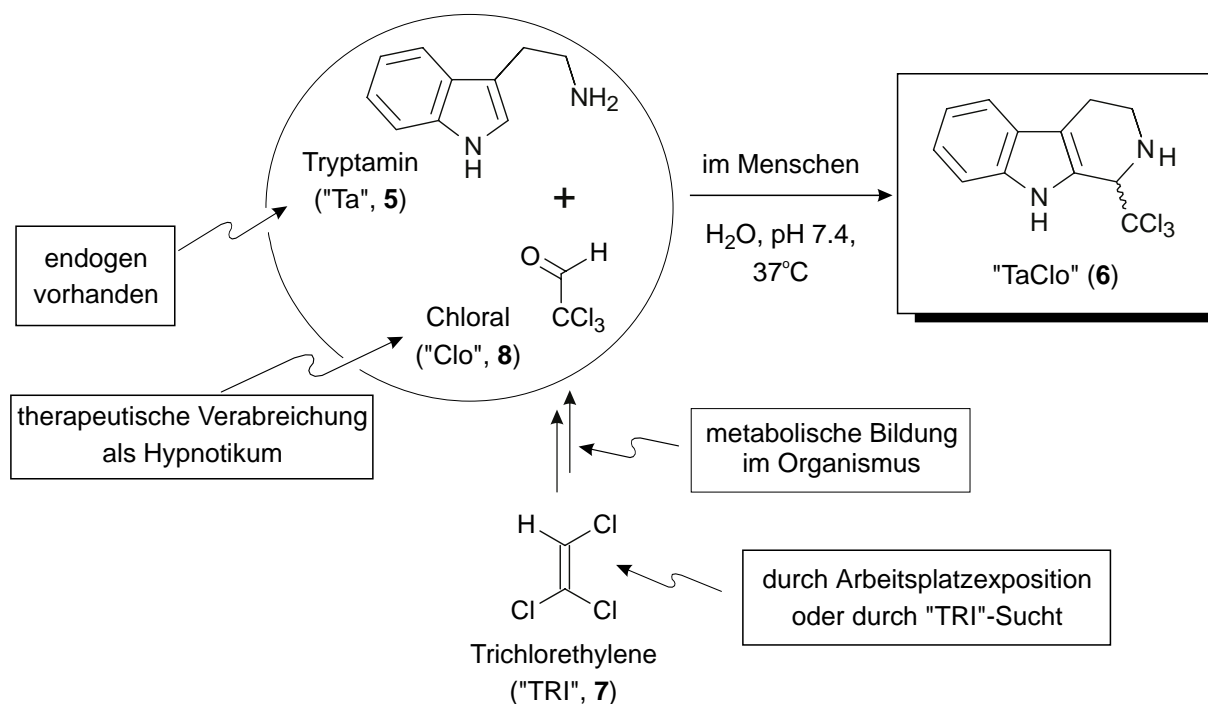
Überraschenderweise konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Parkinsonschen Krankheit und chronischem Alkoholismus gefunden werden. Dies ist besonders deshalb verwunderlich, da bei Alkoholikern aufgrund der erhöhten Aldehydkonzentration auch eine erhöhte Tetrahydroisochinolin-Konzentration nachgewiesen wurde.^[61,64] Der endgültige

Beweis für das Auftreten von Morbus Parkinson aufgrund endogen gebildeter Tetrahydroisochinoline steht also bislang noch aus.^[61,62]

2.5 TaClo – ein endogenes Neurotoxin

Eine weitere Substanzklasse, die zum einen strukturelle Ähnlichkeit mit dem Neurotoxin MPTP aufweist (siehe Abb. 14) und zum anderen ebenfalls wie die Tetrahydroisochinoline endogen im Körper gebildet werden kann (siehe Schema 5), ist die der β -Carboline. Infolge der Forschungsarbeiten zur Neurotoxizität von MPTP (**3**) wurde auch das neuropharmakologische Potential von β -Carboline-Alkaloiden im Zusammenhang mit der Ätiopathogenese des Morbus Parkinson näher untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, daß β -Carboline als mitauslösende Faktoren bei der Entstehung der Parkinsonschen Krankheit durchaus eine Rolle spielen könnten.^[23,65]

Ein Vertreter dieser Substanzklasse der β -Carboline ist TaClo (1-Trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin, **6**). TaClo entsteht durch Pictet-Spengler-Reaktion von endogen vorhandenem Tryptamin (**5**) mit Chloral (**8**) (siehe Schema 5). Diese Bildung konnte unter *quasi*-physiologischen Bedingungen (H_2O , pH 7.4, 37°C),^[66] aber auch schon in Patienten,^[31] die mit dem Schlafmittel Chloralhydrat ($\mathbf{8}\cdot\text{H}_2\text{O}$) behandelt worden waren, gefunden werden. Prinzipiell kann auch von der Kondensation zu TaClo (**6**) infolge einer Exposition mit dem Industrielösungsmittel Trichlorethen (TRI, **7**) ausgegangen werden.^[25] TRI (**7**) wird im Organismus über Chloral (**8**) als Zwischenstufe metabolisiert.^[32]



Schema 5. Bildung von TaClo (**6**)

Der Chloral-abgeleitete Heterocyclus **6** zeichnet sich durch eine große CCl_3 -Gruppe aus, die dem Molekül einen lipophilen, aber auch Radikal-auslösenden Charakter verleiht. Die aus der CCl_3 -Gruppe resultierenden Eigenschaften kann man sich sehr gut durch Vergleich mit dem gut erforschten DDT (*p,p'*-Dichlordiphenyltrichlorethan, **28**) verdeutlichen (siehe Abb. 14). Von DDT (**28**) weiß man, daß es sich über Jahre hinweg in fettreichem Gewebe anreichert und toxisch auf das zentrale Nervensystem wirkt.^[67] Auch von TaClo (**6**) kann aufgrund seiner strukturellen Analogie zu DDT (**28**) angenommen werden, daß es sich (z.B. bei ständiger TRI-Exposition am Arbeitsplatz) im Körper anreichert und dort neurologische Schäden verursachen kann. Die durch die CCl_3 -Gruppe bedingte Lipophilie von TaClo sollte ein erleichtertes Passieren der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen und somit eine Akkumulation und Speicherung auch im Gehirn begünstigen. Dort sind vor allem Schäden aufgrund des Radikal-auslösenden Potentials^[68,69] der CCl_3 -Gruppe wahrscheinlich. Durch entstehende Radikale könnte die Zellmembran geschädigt werden und dadurch die zerstörerische Kaskade der Neurodegeneration in Gang gesetzt werden. Auch die strukturelle Analogie zu dem Neurotoxin MPTP (**3**) deutet auf das neurotoxische Potential von TaClo hin (siehe Abb. 14).^[24]

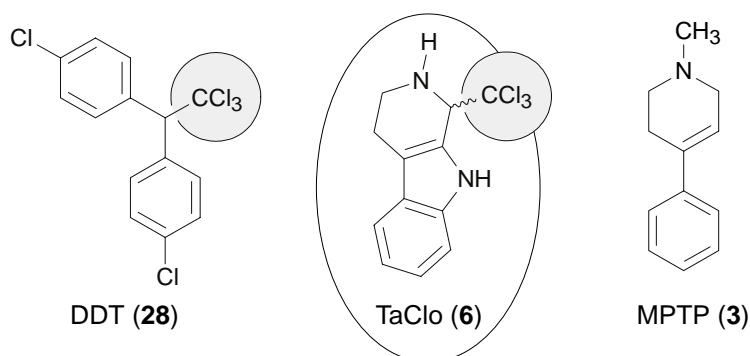


Abb. 14. Die drei Neurotoxine DDT (**28**), TaClo (**6**) und MPTP (**3**)

Tatsächlich wurde TaClo (**6**) im Rahmen eines Verbundprojektes zusammen mit Neuropharmakologen, -physiologen, -chemikern und -pathologen in zahlreichen Untersuchungen (*in vivo* und *in vitro*) als neurotoxisch gegenüber dem serotonergen und dem dopaminergen System eingestuft.^[29,70]

2.5.1 Neurotoxische Eigenschaften von TaClo

TaClo (**6**) zeigte in Langzeit-Verhaltentests an Ratten nach 7-wöchiger Applikation von täglich 0.2 mg TaClo/kg *i.p.* neurotoxische Wirkung. Noch 12 Wochen nach der letzten TaClo-Injektion reagierten die Tiere bei Stimulation der postsynaptischen dopaminergen Rezeptoren mit dem DA-Rezeptor-Agonisten Apomorphin (2 mg/kg *s.c.*) mit deutlich

geringerer Empfindlichkeit. Die Tiere wiesen eine signifikant verringerte Laufaktivität auf, und die Anzahl der Putz- und Schnüffelbewegungen war vermindert. Die beobachtete Bradykinesie (Bewegungsverlangsamung) kann als typisches Parkinsonsyndrom gewertet werden. Im Vergleich zu MPTP (**3**) zeigte sich die Wirkung von TaClo (**6**) deutlich verzögert. Im Gegensatz zu **3** weist der beobachtete schleichende Prozeß Ähnlichkeit mit der langsam fortschreitenden Neurodegeneration bei der Parkinsonkrankheit auf.^[30]

In pulsvoltametrischen Untersuchungen an Ratten konnte gezeigt werden, daß TaClo (**6**) nach einmaliger Gabe von 10 µg **6** in die *Substantia nigra pars compacta* nach einer Woche die Konzentration an striatalem extrazellulärem DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, **13**) deutlich verringert war. Die Konzentration des Dopamin-Metaboliten DOPAC (**13**) ist ein Maßstab für die Dopamin-Freisetzung und für den Dopamin-Metabolismus. Ein erniedrigtes DOPAC-Signal deutet also auf die Zerstörung von striatalen dopaminergen Zellen hin.^[28]

Histochemische *post-mortem*-Untersuchungen bestätigten diese Befunde: Eine Woche nach einmaliger intranigraler Injektion von 10 µg TaClo fand man bei der Ratte eine verminderte Gesamtneuronenzahl in der *Substantia nigra*.^[29]

Morphologische Untersuchungen an Primärzellkulturen Tyrosinhydroxylase-immunoreaktiver (TH-IR) Neurone zeigten nach TaClo-Gabe eine reduzierte DA-Konzentration in der Kultur. Außerdem war eine langsam fortschreitende Degeneration und Auflösung der Dendriten feststellbar.^[71]

Zusätzlich wurde bei *in-vitro*-Experimenten an isolierten Mitochondrien und 'submitochondrial particles' (SMPs) TaClo als hochpotenter Inhibitor von Komplex I der Atmungskette identifiziert. Es zeigt ein um den Faktor 10 erhöhtes inhibitorisches Potential im Vergleich zu MPTP. Diese herausragende Eigenschaft von **6** könnte wesentlich zu dessen Toxizität beitragen, da durch eine starke Hemmung von Komplex I auch die NADH-abhängige ATP-Produktion im Neuron unterbunden wird.^[26,27]

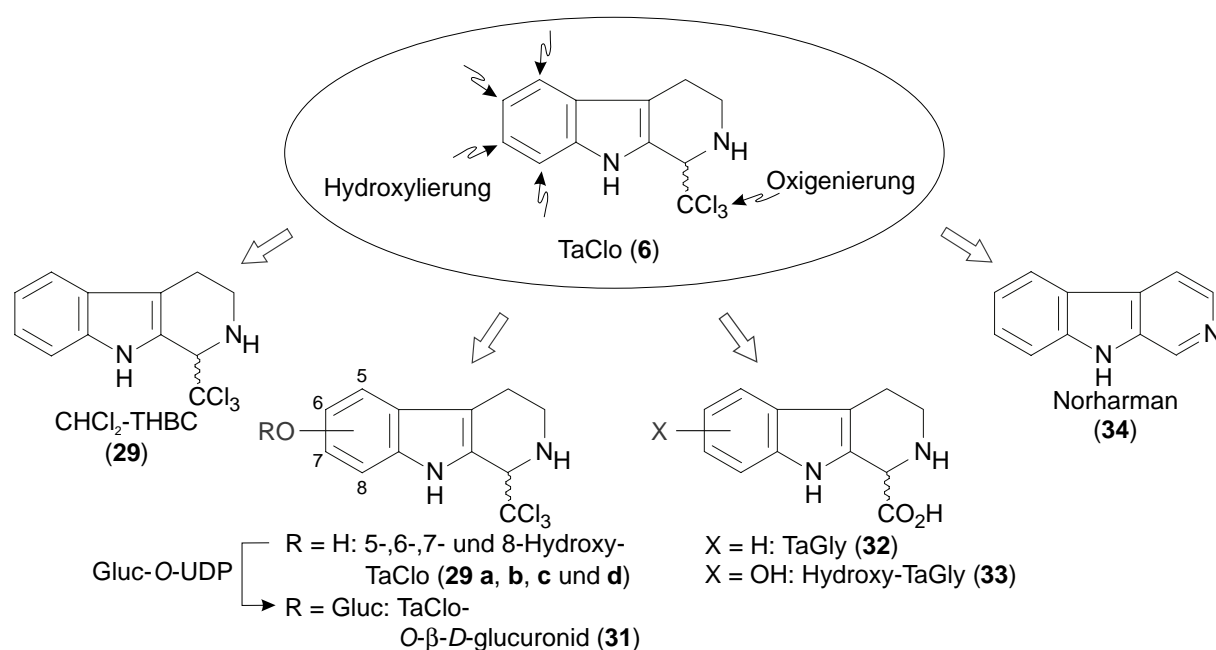
Durch *in-vitro*-Untersuchungen an dopaminergen (IMR-32, HEK-392) und serotonergen (JAR) Zellen konnte gezeigt werden, daß TaClo durch passive Diffusion und nicht wie MPP⁺ (**4**) aktiv über Neurotransporter durch die Zellmembran dringt.^[70] Dies könnte die trotz des höheren inhibitorischen Potentials auf Komplex I der mitochondrialen Atmungskette geringere Neurotoxizität von TaClo (**6**) im Vergleich zu MPTP (**3**) erklären.

2.5.2 Pharmakokinetik und Metabolismus von TaClo

Pharmakokinetische Untersuchungen mit radioaktiv markiertem [¹⁴C]-TaClo, das intraperitoneal an Ratten verabreicht worden war, zeigte eine schnelle (0.5 h) Verteilung der

Radioaktivität im ganzen Körper. Die Abnahme der Aktivität erfolgte innerhalb von 48 h zu 35% durch renale Exkretion und zu 65% durch Elimination über den Darm. Aufgrund von lang anhaltenden hohen Aktivitäten in Leber und Dünndarm wurde auf einen hepatischen "First-Pass"-Effekt geschlossen, der nur geringe Dosen des Neurotoxins in den Blutkreislauf gelangen ließ. Nur wenig Aktivität (<1%) konnte im Gehirn gemessen werden. Diese Aktivität nahm innerhalb von zwei Tagen nur langsam ab. Also kann bei wiederholter Verabreichung von TaClo (**6**) durchaus mit einer Akkumulation des lipophilen β -Carbolins **6** oder seiner Metabolite gerechnet werden.^[72]

Metabolismusstudien an Ratten, die intraperitoneal mit 12 mg/kg TaClo (**6**) behandelt worden waren, deuten darauf hin, daß **6** hauptsächlich über einen oxidativen Verstoffwechslungsprozeß zu polaren Metaboliten abgebaut wird (siehe Schema 6).



Schema 6. Metabolismus von TaClo (**6**)

In LC-MS-MS-Studien unter Zuhilfenahme von synthetischen Referenzmaterialien konnten die in Schema 6 skizzierten TaClo-Metabolite eindeutig identifiziert werden. Als Hauptmetabolisierungsweg muß die Hydroxylierung im Isocyclus von TaClo (**6**) in den Positionen 5, 6, 7 und 8 unter Bildung der entsprechenden Regioisomeren (**30a-d**) angesehen werden. Außerdem konnten die *O*- β -D-glucuronierte Form dieser hydroxylierten TaClo-Metabolite **30a-d** im Urin der Ratten wiedergefunden werden. Die lipophile CCl₃-Gruppe wurde einerseits hydrodehalogeniert zu Dichlormethyl-tetrahydro- β -carbolin (CHCl₂-THBC, **29**), man fand andererseits auch eine vollständige Oxigenierung der CCl₃-Gruppe zu 1-Carboxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (TaGly, **32**). Als einziges vollaromatisches Metabolisierungsprodukt konnte Norharman (**34**) identifiziert werden. Die Radio-HPLC-

Analyse von Urinproben ^{14}C -behandelter Ratten weist darüber hinaus auf weitere Verstoffwechslungsprodukte von TaClo (**6**) hin, eine Identifizierung dieser Verbindungen war bisher jedoch noch nicht möglich.

Zielsetzung für die eigenen Untersuchungen war es nun, Bildung und Metabolisierung von **6** im Säuger, u.a. auch im Menschen zu studieren, aber auch weitere Aspekte der toxischen Wirkung von TaClo zu untersuchen, so z.B. dessen Einfluß auf die DNA nach Initiierung von Radikalprozessen sowie die Cytotoxizität gegenüber neuronalen Zellen.

3 Untersuchungen zur DNA-schädigenden Wirkung von TaClo

Der genaue Wirkmechanismus der durch TaClo (**6**) induzierten Neurotoxizität ist bislang noch völlig ungeklärt. Von chlororganischen Insektiziden wie z. B. DDT (**28**), Lindan (**35**) und Endrin (**36**),^[73] aber auch von photosensitiven Wirkstoffen wie *N*-Hydroxypyridinthion (**37**)^[74] und α -Terthienyl (**38**)^[75] (siehe Abb. 15) ist bekannt, daß sie DNA-Fragmentierungen in der Zelle und dadurch Nervenschädigungen auslösen können.

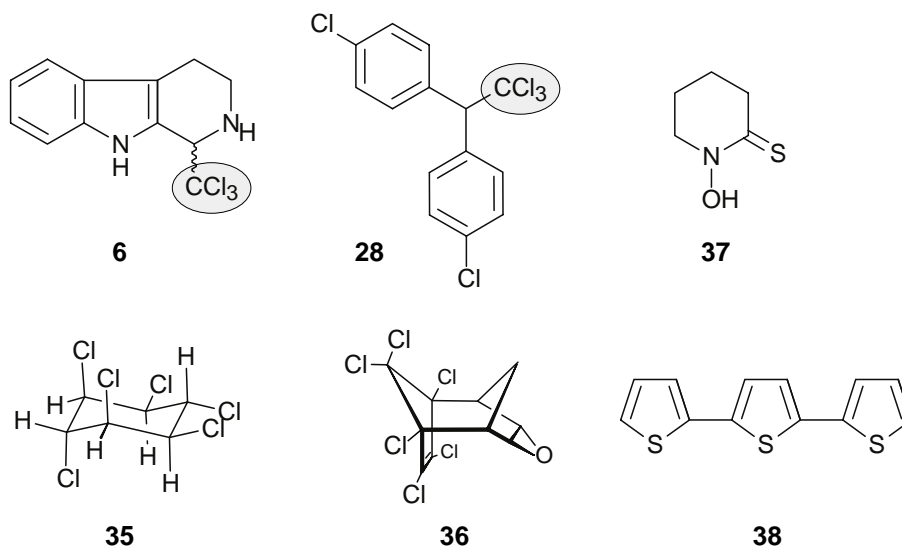
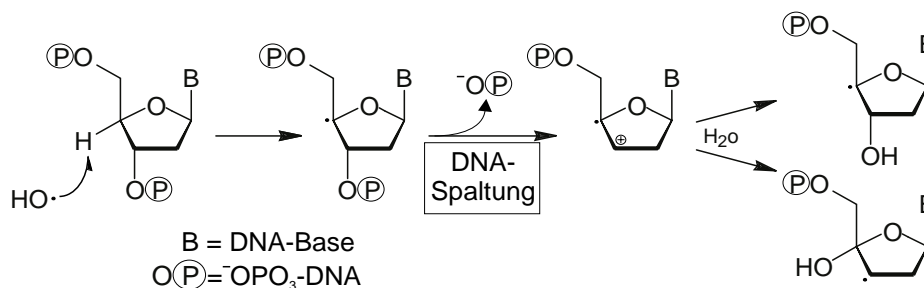


Abb. 15. TaClo (**6**), DDT (**28**), Lindan (**35**), Endrin (**36**), *N*-Hydroxypyridinthion (**37**) und α -Terthienyl (**38**) – Substanzen, die DNA-Strangbrüche auslösen können

Man nimmt an, daß die DNA-schädigende Wirkung dieser Substanzen in einem ursächlichen Zusammenhang mit zellschädigenden Prozessen, bedingt durch oxidativen Streß und/oder Radikalbildung, steht. Die Vermutung liegt nahe, daß TaClo (**6**) aufgrund seiner CCl₃-Gruppe – ähnlich wie DDT^[73] – über Radikal-induzierende Eigenschaften verfügt und somit auch DNA-schädigende Wirkung besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher – zunächst an *in-vitro*-Systemen – eingehender untersucht werden, ob TaClo tatsächlich DNA-schädigende Effekte an zellfreier plasmidischer superhelikaler DNA, sog. pBR322-DNA, auszulösen vermag.

Zu diesem Zweck wurden DNA-Probenlösungen mit **6** inkubiert und anschließend einer gelelektrophoretischen Analyse unterzogen. Kommt es infolge toxischer Prozesse zu einer Schädigung dieser superhelikalen DNA, bildet sich die relaxierte, offencirculare Form der DNA aus.^[76] Diese Schädigung manifestiert sich in der Verletzung des Phosphat-Zuckergerüsts durch Aufbrechen einer der Phosphatdiester-Ketten (siehe Schema 7).



Schema 7. Ausbildung der offencircularen DNA durch Hydroxyradikale

Die aufgrund von Einzelstrangbrüchen geschädigte DNA besitzt im Vergleich zur superhelikalen pBR322-DNA unterschiedliche Laufeigenschaften im elektrischen Feld, welche durch Zugabe und anschließende Fluoreszenzanregung von Ethidiumbromid, einem in die DNA interkalierenden Farbstoff, nach durchgeführter Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann (vgl. auch Abb. 16).^[77]

3.1 Belichtungsexperimente mit zellfreier pBR322-DNA

In einem ersten Experiment wurde pBR322-DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen TaClo (**6**) im Dunkeln inkubiert. Die daraufhin durchgeführten gelelektrophoretischen Untersuchungen zeigten jedoch keinen durch **6** verursachten schädigenden Effekt an der DNA.

Die Fähigkeit von TaClo, die DNA nach radikalischer Aktivierung zu beeinflussen, wurde, da Radikale durch Photolyse gebildet werden können, durch Belichtung einer TaClo-Lösung in Gegenwart von Plasmid-DNA untersucht. Für diese Bestrahlung wählte man eine Wellenlänge ($\lambda = 300 \text{ nm}$) in der Nähe des Absorptionsmaximums ($\lambda = 291 \text{ nm}$) von **6**. Tatsächlich fand man unter diesen Bedingungen eine Schädigung der DNA durch TaClo (siehe Abb. 16).

Belichtete man TaClo (**6**) vor der Zugabe von DNA, so konnte nach anschließender Inkubation mit DNA keine schädigende Wirkung festgestellt werden. Wahrscheinlich bildet sich während der Belichtung eine reaktive Spezies, die das Phosphat-Zuckergerüst der Plasmid-DNA angreift, in Abwesenheit von DNA aber rasch anderweitig abreagiert und die schädigende Wirkung dabei verliert.

In einer vergleichenden Studie wurde der DNA-fragmentierende Effekt von TaClo (**6**) mit dem der bekannten DNA-phototoxischen Verbindung *N*-Hydroxypyridinthion (**37**) untersucht. Von **37** weiß man, daß es durch Belichtung Hydroxylradikale bildet, die schließlich mit der DNA reagieren.^[74,78] Die durchgeführten Experimente zeigten, daß der Effekt von TaClo, die DNA zu spalten [37% Schädigung bei 15 min Belichtung, 1 mM TaClo

(6)], nur wenig kleiner ist verglichen mit dem von *N*-Hydroxypyridinthion (37) (49% Schädigung).

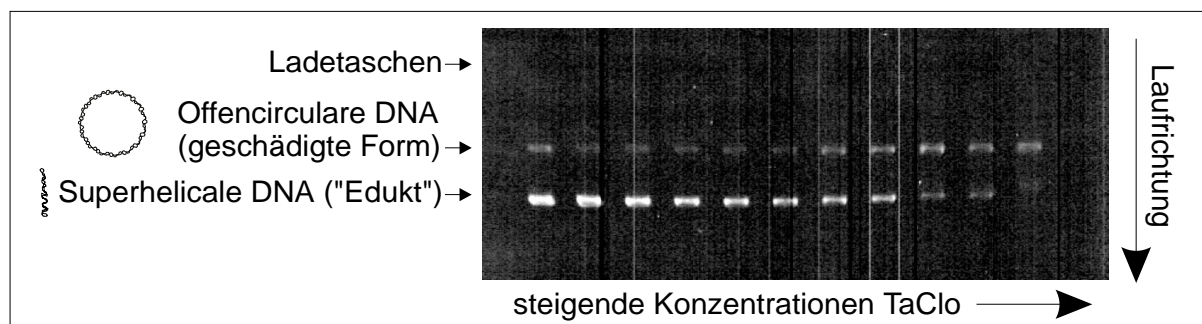
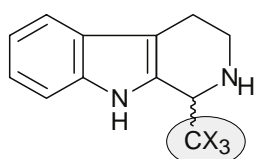


Abb. 16. Gelelektrophoretische Untersuchungen zellfreier pBR322-DNA nach Inkubation von TaClo (6) mit gleichzeitiger Bestrahlung ($\lambda = 300$ nm): nach Belichtung der DNA-TaClo-Gemische gab man die Reaktionslösungen in die Ladetaschen eines Agarosegels; die anschließend angelegte Spannung bewirkte die Trennung der geschädigten und intakten DNA, die mit dem Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurden

Nun stellte sich die Frage, ob der DNA-fragmentierende Effekt von TaClo (6) von der CCl_3 -Gruppe des Moleküls, die besonders anfällig gegenüber homolytischer Bindungsspaltung durch Photolyse oder Reaktion mit anderen Radikalen oder Reduktionsmittels ist, herrühren könnte. Es war anzunehmen, daß über die CCl_3 -Gruppe eine reaktive, DNA-schädigende Spezies gebildet werden könnte. Um den Einfluß dieser Gruppe auf die DNA-spaltenden Aktivität näher zu untersuchen, wurden deshalb ähnliche Belichtungsexperimente mit dem strukturverwandten, jedoch Halogen-freien natürlichen Pflanzenalkaloid Eleagnin (39) sowie mit den unterschiedlich halogenierten TaClo-Analogen TaFlu (40) und TaBro (41) durchgeführt (siehe Abb. 17).



X		
Cl	TaClo	6
H	Eleagnin	39
F	TaFlu	40
Br	TaBro	41

Abb. 17. Die Tetrahydro- β -carboline TaClo (6), Eleagnin (39), TaFlu (40) und TaBro (41)

Diese Experimente wurden mit verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt. Von den getesteten Verbindungen zeigte TaBro (41) den stärksten DNA-fragmentierenden Effekt, während TaClo (6), Eleagnin (39) und TaFlu (40) eine geringere Aktivität aufwiesen (siehe Abb. 18).

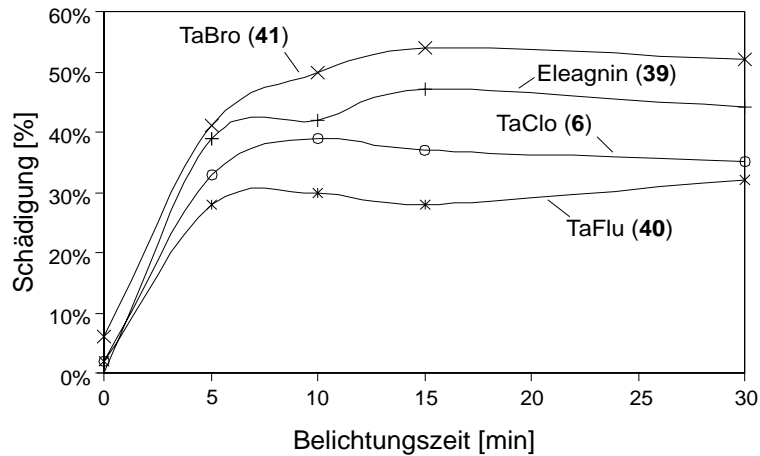


Abb. 18. Schädigung der DNA durch TaBro (**41**), TaClo (**6**), Eleagnin (**39**) und TaFlu (**40**) in Abhängigkeit der Zeit (Konzentration: 1 mM) bei einer Wellenlänge von 300 nm

Die Entstehung von TaClo (**6**) in Chloralhydrat-behandelten Patienten veranlaßte uns außerdem dazu, Experimente unter physiologisch relevanteren Bedingungen durchzuführen. Die Fähigkeit der Tetrahydro- β -carboline (**6**, **39**, **40** und **41**) wurde deshalb auch bei einer Wellenlänge von 350 nm untersucht. Obwohl die Verbindungen **6**, **39**, **40** und **41** eine verschwindend kleine UV-Absorption bei 350 nm besitzen, konnten trotzdem DNA-Schädigungen in einem relativ großen Ausmaß beobachtet werden (siehe Abb. 19).

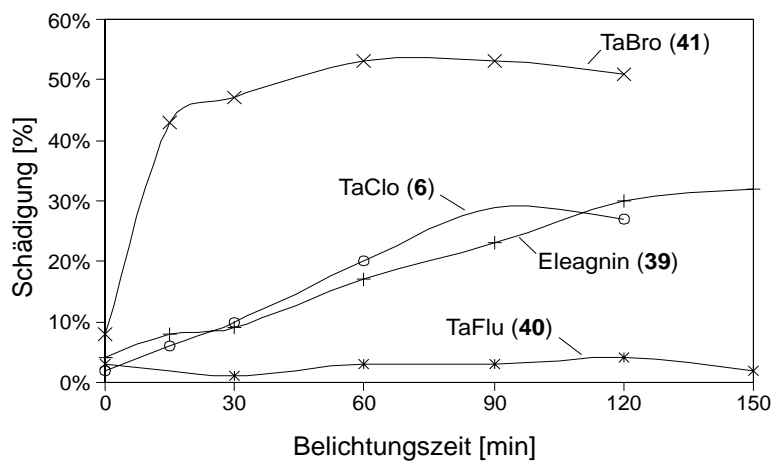


Abb. 19. Schädigung der DNA durch TaBro (**41**), TaClo (**6**), Eleagnin (**39**) und TaFlu (**40**) bei Belichtung ($\lambda = 350$ nm) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer (Konzentration 2 mM)

Auch bei 350 nm zeigte TaBro (**41**) den stärksten Effekt gegenüber der DNA. Es mußte generell bei Arbeiten mit TaBro darauf geachtet werden, daß vor der Bestrahlung die TaBro-DNA-Lösung im Dunkeln gehandhabt wurde, da **41** DNA-Fragmentationen schon bei Tageslicht induziert.

Zusätzlich durchgeführte Inkubationsexperimente mit steigenden Konzentrationen der Tetrahydro- β -carboline (**6**, **39**, **40** und **41**) zeigten, daß relativ rasch (bei ca. 1 mM Reagenz) ein Plateau mit maximaler DNA-Schädigung erreicht wird (siehe Abb. 20)

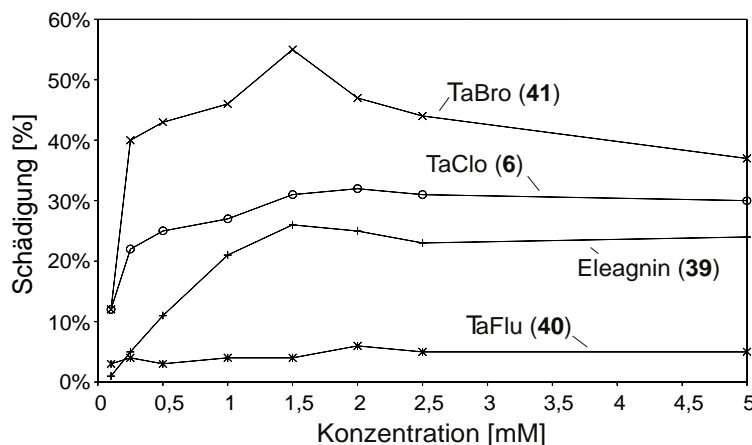


Abb. 20. Konzentrations-abhängiger DNA-schädigender Effekt der Tetrahydro- β -carboline TaBro (**41**), TaClo (**6**), Eleagnin (**39**) und TaFlu (**40**) bei Belichtung ($\lambda = 350$ nm, Belichtungszeit: 1 h)

Bei 350 nm Belichtungswellenlänge wurden ebenfalls vergleichende Experimente mit der literaturbekannten Verbindung *N*-Hydroxypyridinthion (**37**) durchgeführt. TaClo (**6**) zeigte auch hier eine gegenüber **37** ähnliche DNA-schädigende Aktivität [TaClo 37% und *N*-Hydroxypyridinthion 40% Schädigung bei 1.5 h Bestrahlung, 1 mM Reagenz]. Dies verdeutlicht nochmals die Toxizität von TaClo und damit dessen Relevanz im menschlichen Körper als möglicher Mitauslöser der Parkinsonschen Krankheit.

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob TaClo bei Belichtung in Abwesenheit von Sauerstoff auch DNA-Strangbrüche verursacht. Dazu wurden, analog zu den bisher beschriebenen Versuchen mit Plasmid-DNA, DNA-Inkubationsexperimente mit **6** unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigte das Tetrahydro- β -carbolin **6** eine ähnliche DNA-schädigende Wirkung wie in Gegenwart von Sauerstoff. Die Belichtungsreaktion von TaClo mit DNA ist also sauerstoffunabhängig.

Aufgrund der durchgeführten Versuche erscheint es wahrscheinlich, daß die CCl_3 -Gruppe radikalisch gespalten wird, und die entstandenen Radikale über den in Schema 7 (S. 28) beschriebenen Mechanismus eine Spaltung des Phosphat-Zuckergerüsts der DNA auslösen.^[79]

3.2 Untersuchung zur TaClo-DNA-Bindungs-Wechselwirkung

Aus der Literatur ist bekannt, daß Norharman (**34**) und Harman (**42**) (siehe Abb. 21),^[73,80,81] aber auch andere β -Carboline^[82] mit der DNA in Wechselwirkung treten können. So interkalieren z.B. **34** und **42** mit Kalbsthymus-DNA.^[83] Dies kann durch das Verschwinden der Fluoreszenzeigenschaften von Norharman (**34**) bei Addition von DNA sowie anhand eines deutlichen Rot-Shifts und Hypochromismus der Absorptionsspektren von **34** und **42** beobachtet werden.^[83]

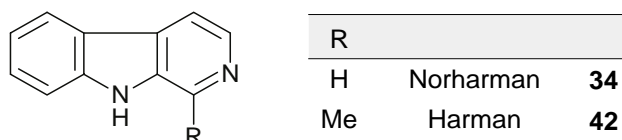


Abb. 21. Die in die DNA interkalierenden β -Carboline Norharman (**34**) und Harman (**42**)

Auch von TaClo (**6**) sollte festgestellt werden, inwieweit das Molekül mit der DNA in Wechselwirkung treten kann. Es wurde deshalb ein Fluoreszenzspektrum von **6** in einer wäßrigen Lösung aufgenommen und dessen Veränderungen nach Zugabe von Kalbsthymus-DNA verfolgt. Leider konnte keine eindeutige Veränderung der Maxima beobachtet werden. Die Versuche lieferten uneinheitliche Ergebnisse.

Auch die Aufnahme von UV-Spektren nach Zugabe von Kalbsthymus-DNA zu einer wäßrigen TaClo-Lösung ließen keine Rückschlüsse auf vorhandene Wechselwirkungen zu (siehe Abb. 22). Dies kann auf eine teilweise Überlappung der Absorptionsbanden der DNA (Maximum bei 260 nm) mit denen von TaClo (**6**) zurückgeführt werden.

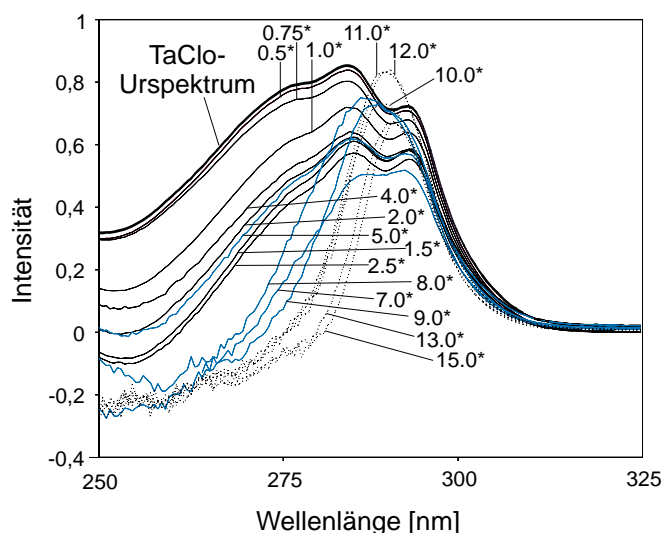


Abb. 22. UV-Spektren von TaClo (**6**) und deren Veränderungen bei Zugabe von Kalbsthymus-DNA. *Angabe der zugegebenen Äquiv. DNA

In Abb. 23 sind die Intensitäten der in Abb. 22 dargestellten UV-Spektren mit den Wellenlängen 260, 280 und 291.5 nm abzüglich der durchgeführten Verdünnungsreihe dargestellt. Diese Verdünnungsreihe ergab sich durch Aufnahme von UV-Spektren einer TaClo-Lösung, welcher in den gleichen Volumeneinheiten Wasser, statt (wie in den in Abb. 22 dargestellten Messungen) DNA, hinzugefügt wurde. Ein Trend in Zu- oder Abnahme der Intensitäten ist aus diesem Diagramm nicht ablesbar.

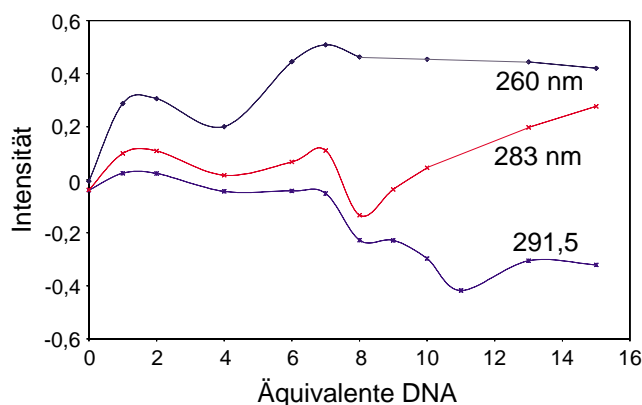


Abb. 23. Intensitätsmaxima der in Abb. 22 dargestellten UV-Spektren abzüglich der Intensitätsmaxima einer analog gemessenen Verdünnungsreihe (Zugabe von gleichen Volumina an Wasser zu der TaClo-Lösung), aufgetragen in Abhängigkeit der zugegebenen DNA- Äquiv.

Um die Bindungsaffinität von TaClo (**6**) gegenüber der DNA dennoch einschätzen zu können, wählte man eine indirekte Methode, nämlich die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums von einer Ethidiumbromid-DNA-Lösung und dessen Veränderung bei Zugabe von TaClo. Der in die DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid besitzt eine große Emissionsintensität, so daß eine Verdrängung des fluoreszierenden Farbstoffs durch eine andere mit der DNA wechselwirkende Substanz eine deutlich erkennbare Abschwächung des Maximums im Fluoreszenzspektrum bewirken sollte. Selbst bei Zugabe eines großen Überschusses an **6** (Ethidiumbromid/TaClo = 1/25) zu der vorgelegten Ethidiumbromid-DNA-Lösung beobachtete man jedoch nur eine kleine Verringerung der Emissionsintensität. TaClo scheint also mit Kalbsthymus-DNA nur eine geringe Wechselwirkung ausbilden zu können.^[79]

3.3 Cu(II)-Experimente

Das Tetrahydroisochinolin-Alkaloid Salsolinol (**43**), ein in der Literatur^[84-87] sehr intensiv untersuchtes dopaminerges Neurotoxin, kann in einer Cu(II)-katalysierten, nicht-enzymatischen Reaktion oxidiert werden.^[88] Während dieser Reaktion wird eine reaktive Spezies gebildet, die in der Lage ist, DNA-Einzelstrangbrüche und damit Prozesse des neuronalen Zelltodes zu induzieren.^[89]

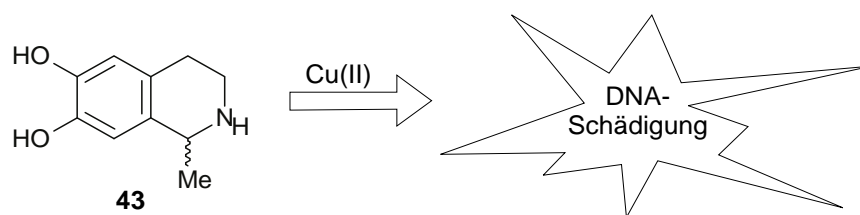


Abb. 24. Salsolinol (**43**) fragmentiert DNA in Gegenwart von Cu(II)-Ionen

In eigenen Untersuchungen gingen wir deshalb der Frage nach, ob TaClo (**6**) ebenfalls einer derartigen Fenton-ähnlichen Reaktion unterliegt und ein reaktives Intermediat entsteht,^[90] das einen DNA-spaltenden Prozeß zu induzieren vermag. Wie in Tab. 2 zu erkennen, fand man tatsächlich, daß TaClo in Gegenwart von Cu(II)-Ionen bei 37°C im Dunkeln DNA-Strangbrüche verursacht. Dagegen schädigten **6** und Cu(II)-Ionen alleine die DNA nicht. Interessanterweise war der DNA-fragmentierende Effekt im System TaClo/Cu(II) stärker als im Ansatz Salsolinol/Cu(II). Dies deutet darauf hin, daß auch durch TaClo in Gegenwart von Cu(II)-Ionen ein Cu(II)/Cu(I)-vermittelter Redoxcyclus abläuft, bei dem eine reaktive Spezies gebildet wird, die die pBR322-DNA schädigen kann.

Tab. 2. Durch TaClo (**6**) und Cu(II) (Inkubation mit der DNA für 1.5 h) verursachter DNA-Strangbruch und UV-Absorption bei 480 nm nach Zugabe von Bathocuproindisulfonsäure (BCS)

Zugabe von			Cu(I)/BCS-Komplex ^a $\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$	DNA-Schädigung [%] ^b
TaClo	Cu(II)	Cu(I)		
–	–	–	0.01	0
–	–	+	1.88	100
–	+	–	0.09	11
+	–	–	0.40	8
+	+	–	1.32	54

^a Detektion der UV-Absorption nach Zugabe des Cu(I)-komplexierenden Liganden BCS. Die Anwesenheit von Cu(I) kann durch eine erhöhte UV-Absorption bei 480 nm festgestellt werden

^b Fehler $\pm 12\%$

Die Entstehung von Cu(I)-Ionen während dieses Redoxprozesses wurde durch Experimente mit dem Dinatriumsalz von Bathocuproindisulfonsäure (BSC) bestätigt. BCS bildet in Gegenwart von Cu(I)-Ionen einen Metallkomplex aus, der eine charakteristische UV-Absorption bei 480 nm besitzt. Nach Zugabe von Cu(II)-Ionen zu TaClo (**6**) wurde in Gegenwart von BCS tatsächlich eine verstärkte Intensität der UV-Absorption bei 480 nm und dadurch die Bildung von Cu(I) nachgewiesen (siehe Tab. 2). Jedoch wirkt auch Cu(I) selbst schädigend auf die pBR322-DNA, so daß aufgrund dieses Befundes unklar ist, ob die DNA-

Strangbrüche, die aus dem System Cu(II)/TaClo resultieren, aus der Bildung von Cu(I) oder einem reaktiven Intermediat von TaClo (**6**) stammen.^[79] Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der chemischen Natur der entstandenen Spezies werden deshalb in Zukunft noch nötig sein.

Die gefundene DNA-fragmentierende Fähigkeit von TaClo (**6**) nach Belichtung oder Reaktion mit Cu(II) veranlaßte uns dazu in weiteren Experimenten, näher zu untersuchen, ob das Neurotoxin **6** auch in einem zellulärem System fähig ist, DNA-Strangbrüche zu induzieren (vgl. Kap. 4.4).

4 Toxizität von TaClo auf PC12-Zellen

Zur Untersuchung der Neurotoxizität von Substanzen, aber auch zur Erforschung einer Vielzahl neurobiologischer Fragestellungen, werden häufig neuronale Zelllinien, wie z.B. die PC12-Zelllinie aus dem peripheren Nervensystem der Ratte, benutzt. Diese Zellen stammen aus einem induzierten und transplantierbaren Phäochromocytoma-Tumor des Nebennierenmarks der Ratte, sind also tumoröse, chromaffine Zellen. Der normale Phänotyp dieser chromaffinen Zelle kann sich unter Einwirkung von Nervenwachstumsfaktoren in Richtung einer differenzierten Nervenzelle des sympathischen Nervensystems ändern. Die Zellen vermindern in Gegenwart von Nervenwachstumsfaktoren ihre Proliferationsrate, bilden Neurite, d.h. axon- oder dendritenähnliche Fortsätze aus und exprimieren neuronale Marker.^[91]

PC12-Zellen werden häufig als neuronales Modellsystem zur Untersuchung der Cytotoxizität von Neurotoxinen und des ablaufenden Mechanismus der verursachten Schädigung benutzt. So findet man in der Literatur eine Reihe von Studien mit PC12-Zellen sowohl über die toxischen Eigenschaften von MPTP (**3**), seinem aktiven Metaboliten MPP⁺ (**4**),^[92,93] als auch über die Wirkung von Neuromelanin^[94] und dem dopaminergen Toxin 6-OHDA (6-Hydroxydopamin).^[95] Von einigen β -Carbolinen^[65] ist ebenfalls eine schädigende Wirkung auf PC12-Zellen beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die Cytotoxizitäten von TaClo sowie einer Serie ausgewählter TaClo-Derivate gegenüber PC12-Zellen sowie der Mechanismus des ausgelösten Zelltods eingehender untersucht werden.

4.1 Cytotoxizität von TaClo gegenüber PC12-Zellen

Ein erstes Experiment sollte zeigen, in welcher Konzentration TaClo (**6**) cytotoxisch auf PC12-Zellen wirkt. Jeweils ca. 10^6 Zellen wurden mit 4 ml Medium in Petrischalen (\varnothing 5 cm) gegeben. Nach zwei Tagen bei 37°C im Brutschrank und einer befeuchteten Atmosphäre mit 95% Luft- und 5% CO₂-Anteil wurde das Medium entfernt und TaClo-HCl (**6**·HCl) in Konzentrationen von 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 250 μ M und 1000 μ M in jeweils 4 ml Medium zugegeben. Nach weiteren zwei Tagen wurde die TaClo-Medium-Lösung entfernt. Nach Zugabe einer Trypanblau-Lösung betrachtete man die Zellen unter dem Lichtmikroskop (siehe Abb. 25).

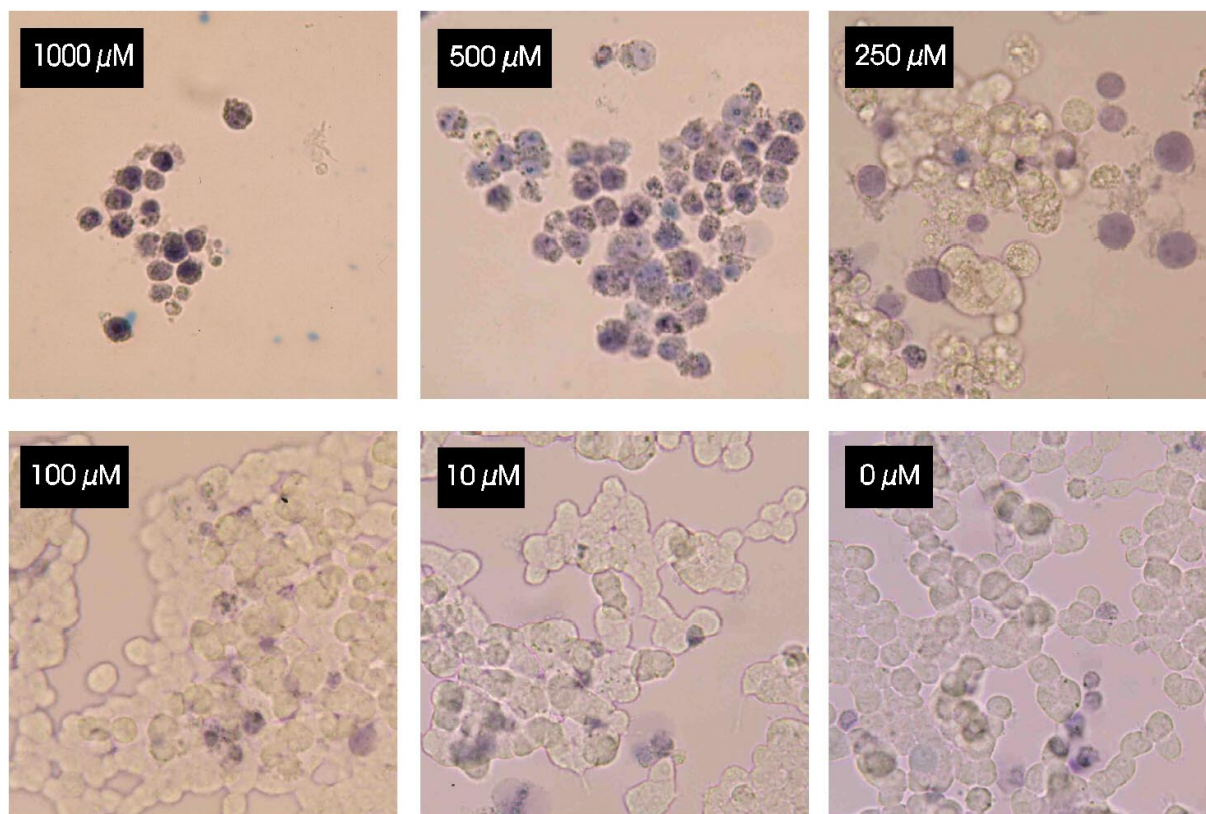


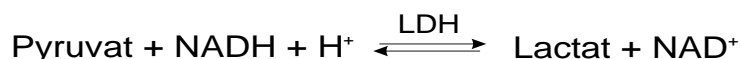
Abb. 25. Mit unterschiedlichen Konzentrationen des Neurotoxins TaClo behandelte PC12-Zelle; tote Zellen erscheinen nach Trypanblau-Anfärbung dunkel

Tote und geschädigte Zellen konnten anhand der Blaufärbung aufgrund der Diffusion von Trypanblau durch die geschädigte Membran der Zellen identifiziert werden. Wie in Abb. 25 erkennbar, gingen bei 1000 µM und auch noch bei 500 µM TaClo·HCl (6·HCl) die Zellen vollständig zugrunde. Bei 1000 µM beobachtete man sogar eine extrem verminderte Anzahl an Zellen. Zelllinien, die mit 250 µM TaClo·HCl inkubiert worden waren, zeigten neben geschädigten auch noch eine große Anzahl lebender, nicht-geschädigter Zellen. Bei 10 µM und 100 µM war kein Effekt des Neurotoxins 6·HCl gegenüber PC12-Zellen im Vergleich zu nicht-inkubierten Zellen zu beobachten.

In einem ersten Versuch zur Quantifizierung der Schädigung der PC12-Zellen durch TaClo wurden jeweils 125 000 Zellen (Zellen waren zwei Tage angewachsen) mit unterschiedlichen Konzentrationen TaClo·HCl in DMSO/Wasser inkubiert. Nach zwei Inkubationstagen wurde die TaClo-Medium-Lösung abgenommen, die verbleibenden Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und die Zellen zur Auszählung mit der Neubauerkammer^[96] durch Zugabe von Trypsin abgelöst. Durch Anfärbung mit Trypanblau konnten in der Zählkammer die Anzahl toter (blau angefärbter) und lebender Zellen bestimmt werden. Leider stellte sich nach Vergleich der jeweils vier parallel durchgeführten Versuche pro Konzentration heraus, daß diese Auszählmethode mit einem zu großen Fehler behaftet war und man daher keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten konnte.

4.2 Quantifizierung der Cytotoxizität durch LDH-Aktivitäts-Messung

Für eine genauere Charakterisierung (und damit auch Quantifizierung) der durch TaClo (**6**) induzierten toxischen Prozesse gegenüber den PC12-Zellen wurde für die im folgenden beschriebenen Experimente die Lactatdehydrogenase (LDH) als biochemischer Marker näher betrachtet. Die prozentuale Schädigung durch TaClo·HCl wurde dabei durch Vergleich der LDH-Aktivität im überstehenden Medium (also der LDH-Aktivität, die durch tote und geschädigte Zellen verursacht wurde) mit der gesamten Enzymaktivität (also aus Zellgrund mit intakten Zellen und überstehendem Medium) bestimmt. Die Aktivität der LDH läßt sich anhand der Gleichung in Schema 8 bestimmen. Gemessen wird die Absorptionsabnahme bei 340 nm, die aus der Oxidation von NADH ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) zu NAD^+ resultiert. Die Aktivität von LDH kann als direkt proportional zur Abnahme der Absorption bei 340 nm angesehen werden.



Schema 8. Prinzip der LDH-Aktivitäts-Bestimmung. Gemessen wird die Extinktionsabnahme, die aus der Oxidation der bei 340 nm absorbierenden NADH resultiert

Es wurden jeweils vier analoge Experimente pro Konzentration durchgeführt. Der Wert jedes einzelnen Experimentes ergab sich aus dem Mittelwert von drei Extinktionsdifferenzen ($\Delta E/\text{min}$), die jeweils 1 min nach Start der Pyruvatreaktion erhalten wurden.

Neben TaClo·HCl (**6**·HCl) wurden, mittels Bestimmung der LDH-Aktivität, auch die HCl-Salze fünf weiterer TaClo Derivate, nämlich die *N*-Alkyl-Derivate *N*-Methyl-TaClo·HCl (**44**·HCl), *N*-Ethyl-TaClo·HCl (**45**·HCl), *N*-Butyl-TaClo·HCl (**46**·HCl), *N*-Hexyl-TaClo·HCl (**47**·HCl) und das im Isocyclus an Position 8 methylierte 8-Methyl-TaClo·HCl (**48**·HCl) auf ihre Cytotoxizität gegenüber PC12-Zellen untersucht (siehe Abb. 26).

Insbesondere sollte der Einfluß der Lipophilie auf die Cytotoxizität der Verbindungen bestimmt werden. Wie in Abb. 26 zu erkennen, wirken alle sechs untersuchten Trichlorheterocyclen schädigend auf die PC12-Zelllinien, wobei das Ausmaß der cytotoxischen Wirkung für alle Verbindungen annähernd in der gleichen Größenordnung liegt (siehe Abb. 26). Eine signifikante 50% Schädigung der PC12-Zellen der meisten untersuchten Verbindungen (**6**, **44-46**, **48**) liegt zwischen 190 μM (ED_{50} -Wert der LDH-Freisetzung von 8-Methyl-TaClo) und 310 μM (ED_{50} -Wert von *N*-Butyl-TaClo; siehe auch Tab. 3, S. 40).

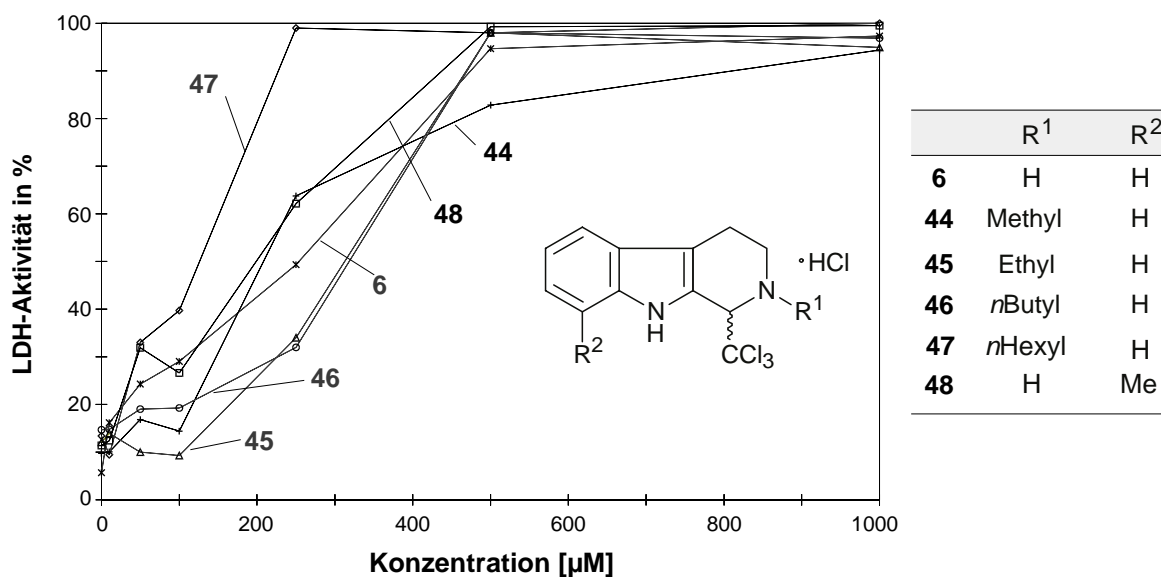


Abb. 26. LDH-Freisetzung in PC12-Zellen aufgrund der Einwirkung der Neurotoxine TaClo (**6**), seiner *N*-alkylierten Derivate *N*-Methyl-TaClo (**44**), *N*-Ethyl-TaClo (**45**), *N*-Butyl-TaClo (**46**), *N*-Hexyl-TaClo (**47**) und 8-Methyl-TaClo (**48**)

Besonders auffällig ist die Wirkung von *N*-Hexyl-TaClo (**47**): Bei dieser Substanz wurde der niedrigste ED₅₀-Wert (120 µM) und eine fast 100% LDH-Freisetzung bei 250 µM beobachtet (siehe Abb. 26). Diese erhöhte Cytotoxizität gegenüber PC12-Zellen kann auf die, bedingt durch den langen Alkyl-Rest, hohe Lipophilie von *N*-Hexyl-TaClo (**47**) zurückgeführt werden. Diese bewirkt, daß **47** besser durch die Membran der Zelle diffundiert und sich dadurch schneller am Ort der Schädigung befindet.^[97]

4.3 Cytotoxizität und Atmungsketteninhibition von TaClo und seinen Derivaten

Von MPP⁺ (**4**), dem eigentlich aktiven Metaboliten von MPTP (**3**) ist bekannt, daß das hohe neurotoxische Potential gegenüber dopaminergen Neuronen auf zwei wesentliche Eigenschaften dieser Verbindung zurückzuführen ist: Zum einen inhibiert **4** selektiv die mitochondriale Atmung, zum anderen wird **4** aktiv in die dopaminerge Zelle und das intakte Mitochondrium aufgenommen, wo es in hohen Konzentrationen akkumuliert wird.^[21]

Schon in vorangegangenen Untersuchungen^[98] wurde gezeigt, daß β-Carboline eine gegenüber MPP⁺ (**4**) geringe Affinität für solch ein aktives Transportsystem besitzen. Auch von TaClo (**6**) wurde in unserer Arbeitsgruppe in Aufnahmestudien mit dem radiomarkiertem Heterocyclus **6** in menschlichen Neuroplastenzellen, die den Dopamin-Transporter exprimierten, eine passive Aufnahme in diese Zellen beobachtet.^[70]

Ähnliche Ergebnisse liefert der Vergleich der IC₅₀-Werte der Inhibition von Komplex I^[99] mit den in dieser Arbeit gemessenen ED₅₀-Werten der LDH-Freisetzung der Trichlorheterocyclen **6** sowie **44-48**. Während die Werte der untersuchten Verbindungen

direkt miteinander korrelieren, sind die Werte von MPP⁺ (**4**) völlig verschieden (IC₅₀ der Komplex I Inhibierung = 3500 μM; ED₅₀ der LDH-Freisetzung = 280^[92] bzw. 375^[100] μM; siehe Tab. 3).^[97]

Tab. 3. Vergleich des Inhibierungspotentials von **6**, **44-48** Komplex I (NADH-Ubichinon-Reduktase) mit der Fähigkeit dieser Substanzen, eine LDH-Freisetzung in das Medium der PC12-Zellen auszulösen

Verbindung	Inhibierung von Komplex I IC ₅₀ [μM] ^[99]	LDH-Freisetzung ED ₅₀ [μM]
6	200	250
44	150	200
45	300	300
46	250	310
47	150	120
48	200	190
MPP ⁺ (4)	3500	375 ^[100] 280 ^[92]

Das Inhibierungspotential gegenüber Komplex I der Verbindungen **4**, **6**, **44-48** wurde in Rattenhirnhomogenaten und in submitochondrialen Partikeln (SMP) gemessen, d.h. der für das neurotoxische Potential von MPP⁺ (**4**) mitverantwortliche Dopamin-Transporter lag hier nicht vor. MPP⁺ (**4**) zeigt schwächere Werte, da es durch unspezifische Diffusion weitaus langsamer an den Wirkort gelangt, damit *in vitro* eine deutlich niedrigere Toxizität auf die Enzyme der Atmungskette entfaltet. Dagegen besitzen die TaClo-Derivate ein großes Potential, den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zu inhibieren (siehe Tab. 3), sie gelangen aufgrund ihrer hohen Lipophilie schnell an den Wirkort.

Die hohe Aktivität von MPP⁺ (**4**) und den β-Carbolinen **6** und **44-48**, PC12-Zellen zu schädigen, ist u.a. auf eine schnelle Aufnahme dieser Verbindungen zurückzuführen. PC12-Zellen exprimieren den Dopamin-Transporter, wodurch MPP⁺ schnell in die Zellen aufgenommen wird. Die TaClo-Derivate (**6**, **44-48**) dagegen passieren aufgrund ihrer hohen Lipophilie schnell die Zellmembran, gelangen also durch passive Diffusion in die Zelle. Die direkte Korrelation der IC₅₀-Werte von Komplex-I-Inhibierung und die ED₅₀-Werte der LDH-Freisetzung verdeutlichen nochmals diesen passiven Aufnahmemechanismus der Trichlorheterocyclen **6** sowie **44-48**.

4.4 Mechanismus der Zelldegeneration

Zwei verschiedene Muster des Zelltodes sind bekannt: Zum einen die passive Form des Zelltodes, die Nekrose, zum anderen der programmierte Zelltod, die Apoptose. Die Nekrose ist eine aktive, unmittelbare Reaktion auf Umwelteinflüsse wie z.B. Anoxia (O₂-Mangel), Hitze, Schläge oder Toxine, wodurch auch größere Gewebeareale mit unterschiedlichen Zellarten betroffen sind. Sie ist charakterisiert durch ein Anschwellen der Zelle (Onkose) bis hin zur Zerstörung der Plasmamembran und der damit verbundenen Freisetzung des Inhalts des Cytosols und von Zellorganellen in den interzellulären Raum.^[101]

Im Gegensatz dazu sterben bei der Apoptose genau definierte und ausgewählte Zellen im jeweiligen Gewebeverband ab. Die Apoptose tritt unter physiologischen und pathologischen Bedingungen auf und ist eine Art "Suizid" der Zelle. Sie ist durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen definiert, wie z.B. das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins. Die DNA wird zwischen den Nucleosomen charakteristisch gespalten, es entstehen DNA-Stücke mit einer Länge von 200 Basenpaaren (200 bp) und ganzzahlige Vielfache davon. Von der äußeren Membran einer apoptierenden Zelle schnüren sich kleine membranumschlossene Säckchen ab, die Kernmaterialien und cytoplasmatische Bestandteile enthalten ('blebbing'). Die Membran der Zelle bleibt so lange intakt, bis sie als Ganzes von phagozytierenden Zellen aufgenommen und verdaut wird.^[102]

Es gibt mehrere Methoden, Apoptose nachzuweisen.^[103,104] Eines dieser Verfahren nutzt die charakteristische DNA-Spaltung, die während der Apoptose abläuft. Eine gelelektrophoretische Untersuchung der DNA apoptotischer Zellen läßt eine typische DNA-Leiter mit Basenstücken von 200 bp und einem Vielfachen davon erkennen.^[94]

Der durch TaClo-HCl (**6**-HCl) verursachten Zelltod wurde deshalb anhand der isolierten DNA aus PC12-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des Neurotoxins **6** einen Tag behandelt worden waren, näher untersucht. In Abb. 27 erkennt man, daß bei niedrigen Konzentrationen des Neurotoxins (0-100 µM) keine Fragmentierung der DNA zu beobachten ist. Bei diesen Konzentrationen schädigt **6** die Zellen nicht. Bei 250 µM ist eine typische DNA-Leiter zu erkennen. TaClo induziert bei dieser Konzentration Apoptose, was dazu führt, daß DNA-Bruchstücke gebildet werden, die man anhand der Banden bei 250 µM in Abb. 27 erkennen kann. Bei 500 µM ist die DNA-Fragmentierung nicht mehr zu beobachten, die Zellen gegen nekrotisch zugrunde (siehe Abb. 27). Die progrediente Verschiebung von apoptotischem zu nekrotischem Zelltod wird, neben der verminderten DNA-Fragmentierung (siehe Abb. 27), außerdem in der verstärkten Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (siehe Abb. 26, S. 39) der PC12-Zellen bei Konzentrationen > 250 µM deutlich.

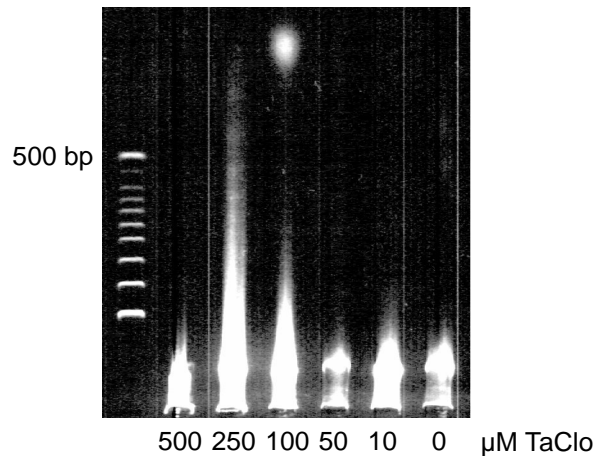


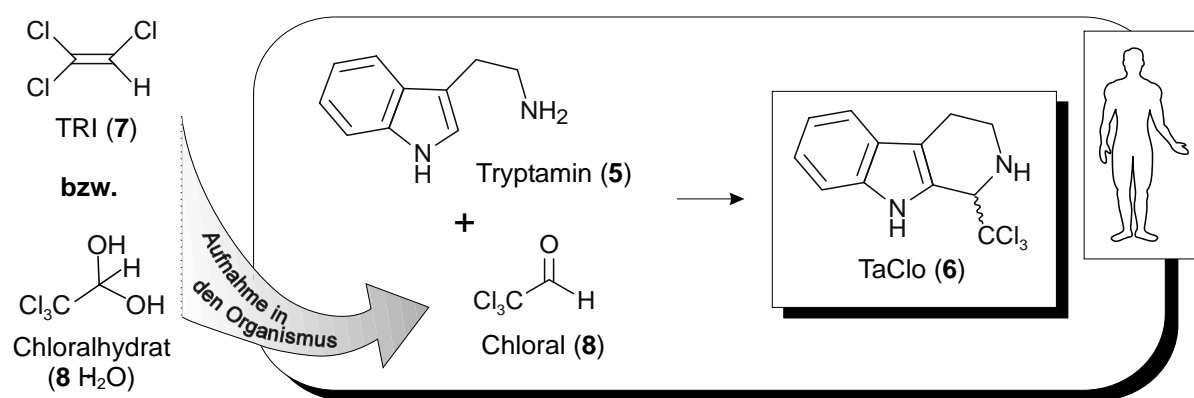
Abb. 27. Gelelektrophoretische Untersuchung von aus PC12-Zellen isolierter DNA; die Zellen waren zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen des Neurotoxins TaClo (**6**) behandelt worden

Wie schon in Kap. 2.5.1, S. 23 angedeutet, sind Parallelen zwischen den durch MPTP (**3**) und TaClo (**6**) induzierten biochemischen Abnormalitäten erkennbar. Auch von MPP⁺ (**4**) sind ähnlich konzentrationsabhängige schädigende Mechanismen beschrieben worden.^[92] Das Modell-Neurotoxin **4** schädigt in niedrigen Konzentrationen PC12-Zellen und andere Dopamin-produzierende Zelllinien (z.B. GH3-Zellen)^[105] apoptotisch, in höheren Konzentrationen jedoch nekrotisch.^[92] Von MPP⁺ (**4**) wird zudem beschrieben,^[92] daß aufgrund des Ausmaßes der Reduktion des ATP-Gehaltes in der Zelle eine Verschiebung von apoptotischen hin zu nekrotischen Prozessen erkennbar ist. Ein erhebliches Energiedefizit in der Zelle geht vermutlich in starkem Maße mit einer Inhibierung der Atmungskettenenzyme, insbesondere von Komplex I einher. Wahrscheinlich sind auch zusätzliche Mechanismen wie z.B. oxidativer Streß involviert.^[92,97]

Jedoch nicht nur die Parallelen zu dem dopaminergen Neurotoxin MPTP (**3**) und dessen Metaboliten MPP⁺ (**4**), auch der Nachweis, daß die Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* von Parkinsonkranken apoptotisch zugrunde gehen,^[54,106] verdeutlichen die Relevanz von TaClo (**6**) und dessen Metaboliten, ein potentieller Mitauslöser der Parkinsonschen Krankheit zu sein.

5 In-vivo-Entstehung von TaClo im Menschen nach Einnahme von Chloralhydrat

Einen essentiellen Punkt zur Untermauerung der Hypothese, daß TaClo (**6**) tatsächlich an der Entstehung der Parkinsonschen Krankheit beteiligt sein könnte, stellt der Nachweis der Bildung des Neurotoxins **6** im Blut von Patienten dar, die mit dem Schlafmittel Chloralhydrat (**8**·H₂O) behandelt wurden (siehe Schema 9). Aber auch bei Menschen, die am Arbeitsplatz einer längeren Exposition mit dem Lösungsmittel TRI (**7**) ausgesetzt waren, muß mit einer endogenen Bildung von TaClo (**6**) gerechnet werden, da Chloral (**8**) als Metabolit im Körper dieser Personen vorkommt (siehe Schema 9).^[32]



Schema 9. Das Lösungsmittel TRI (**7**) und das Schlafmittel Chloralhydrat (**8**·H₂O) als mögliche Ausgangsverbindungen bei der Entstehung von TaClo (**6**) im menschlichen Körper

Der reaktive Aldehyd **8**, der unter quasiphysiologischen Bedingungen (H₂O, pH 7.4, 37°C) schnell mit Tryptamin (**5**) zu TaClo (**6**) reagiert (siehe Schema 9),^[66] wird schon seit über 100 Jahren als Schlafmittel und Seditativum in der Medizin eingesetzt. Chloral wird speziell Kindern und älteren Menschen verabreicht und gilt als effektiver und ungefährlicher Wirkstoff mit geringen Nebenwirkungen.^[107-109] Als Narkotikum wird Chloralhydrat (**8**·H₂O) gerne benutzt, da es im Gegensatz zu anderen Schlafmitteln die REM- und non-REM-Schlafphase nicht beeinträchtigt oder verkürzt.^[110,111] Das Seditativum Chloralhydrat gilt auch heute noch als erste Wahl zur Ruhigstellung von Kindern bei routinemäßigen Untersuchungen in der Klinik.^[107] Der Aldehyd kann oral und rektal verabreicht werden und besitzt die Fähigkeit, im Organismus durch Membranen zu diffundieren und in die Zelle zu gelangen. Chloralhydrat verfügt über krampflösende Eigenschaften,^[112] weswegen es in der Behandlung von Epilepsie zum Einsatz kommt. Eine Langzeitmedikation von Chloralhydrat bei Epilepsiepatienten führt jedoch zu einer Toleranz gegenüber dem seditativen Effekt des Medikamentes.^[113,114]

5.1 Erste Befunde zur *in-vivo*-Entstehung von TaClo

Bereits in vorangegangenen Arbeiten^[29,31,115] wurde eine Methode zum Nachweis von TaClo (**6**) auch aus komplexer Matrix entwickelt. Man detektierte das Neurotoxin **6** mit Hilfe einer kombinierten gaschromatographischen Technik mittels eines für halogenreiche Verbindungen prädestinierten Elektronen-Einfang-Detektors (ECD) und zusätzlich durch Detektion mittels eines massenselektiven Detektors (MSD). Vorbereitend wurden die zu untersuchenden Proben über C18-Kartuschen aufgearbeitet und mit TFAA (Trifluoressigsäureanhydrid, **49**) derivatisiert (siehe Abb. 28).

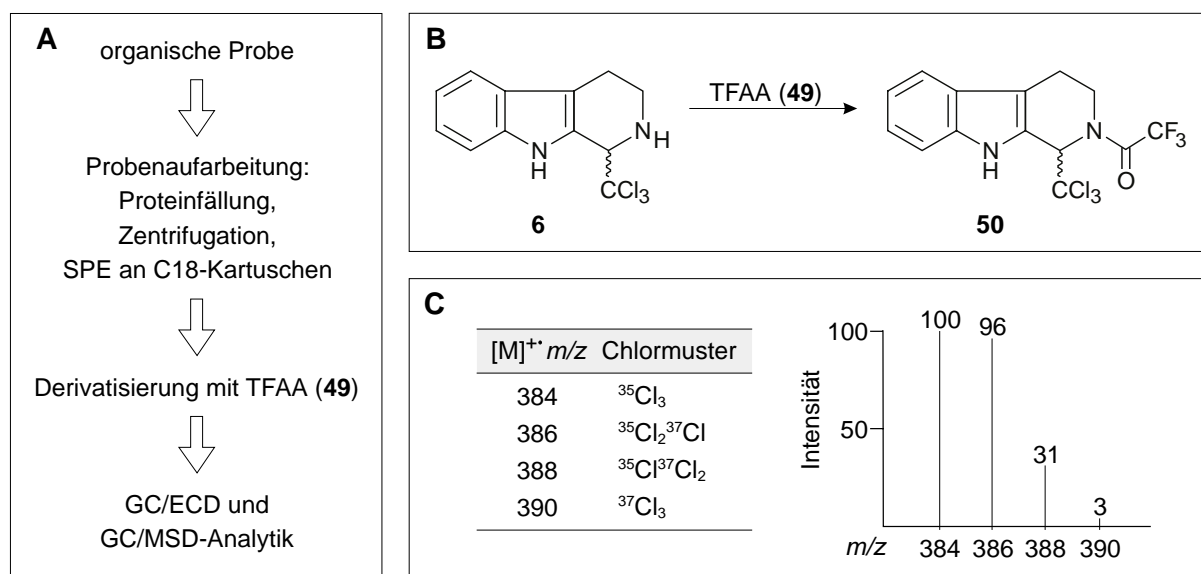


Abb. 28. Gaschromatographische Methode zur Spurenanalytik von TaClo (**6**): (A) Probenbearbeitung, (B) Derivatisierung, (C) Chlorisotopenmuster des Moleküliions

Eine positive Identifizierung des TaClo-TFA-Derivates (**50**) mittels GC/ECD bei der erwarteten Retentionszeit wurde zusätzlich durch Detektion des Moleküliions [M]⁺ von **50** mittels GC/MSD im SIM-Mode ('selected ion monitoring' Mode) bestätigt. TaClo (**6**) galt nur dann als eindeutig nachgewiesen, wenn das Isotopenverhältnis dieses Ions (*m/z* 384/386/388/390) die erwartete Intensitätsverteilung von 100:96:31:3 zeigte (siehe Abb. 28).

Mit dieser Technik wies God^[29] zum ersten Mal die *in-vivo*-Entstehung von TaClo (**6**) in tierexperimentellen Studien zweifelsfrei nach. So wurde **6** in Han-Wistar-Ratten, die über einen längeren Zeitraum mit physiologisch relevanten Konzentrationen an Tryptaminhydrochlorid (**5**·HCl, 5 mg/kg *i.p.*) und Chloralhydrat (**8**·H₂O, 10 mg/kg *i.p.*) behandelt worden waren, eindeutig detektiert.

God^[29] wandte sich als nächstes der Frage nach der *in-vivo*-Bildung von TaClo (**6**) im Menschen zu. Dazu wurden Blutproben von fünf älteren Parkinsonpatienten (65–82 Jahre),

die über einen Zeitraum von zwei bis fünf Tagen hinweg das Beruhigungs- und Schlafmittel Chloraldurat[®] (Wirkstoff Chloralhydrat, $8 \cdot H_2O$) oral eingenommen hatten, analysiert. Zur Abschätzung der gebildeten Mengen an TaClo wurde vor der Aufarbeitung der interne Standard 8-Methyl-TaClo (**48**) den Proben zugesetzt. Tatsächlich konnte in jeder der fünf Blutproben dieser Patienten TaClo (**6**) im ECD-Chromatogramm detektiert werden. Interessanterweise korrelierten die aufgetretenen Peakintensitäten gut mit der jeweils verabreichten Menge Chloralhydrat ($8 \cdot H_2O$). Auch war zu beobachten, daß aufgrund des lipophilen Charakters von **6** sich das Molekül stärker im Blutkuchen als im Serum angereichert hatte.^[31] Eine sichere Identifizierung von TaClo auch durch GC/MSD gelang jedoch nur in zwei Blutproben.

Einerseits ermutigten die erzielten Befunde bzgl. der *in-vivo*-Entstehung im menschlichen Körper zur weiteren Untersuchung der Verstoffwechslung von TaClo (**6**) im Organismus, jedoch warf die beschriebenen Analysen-Methode auch Probleme auf. Als problematisch erwies sich, alle Parameter des komplexen Analysesystems zur Spurenanalytik von TaClo (**6**) über einen längeren Untersuchungszeitraum konstant zu halten. So ließ die Trennleistung der benutzen Kapillarsäule nach mehreren Analysen der Matrixproben extrem nach, was zu Retentionszeitverschiebungen und Matrix-abhängigen Signalschwankungen führte. Da sich die Detektion von TaClo (**6**) mit dieser Methode zu jeder Zeit am Rande der Nachweisgrenze befand, sollte in der vorliegenden Arbeit eine Technik gefunden werden, die einerseits eine sichere und sensitive Analyse von TaClo erlaubt, mit der jedoch andererseits ein großer Probendurchsatz zur Aufklärung der Pharmakokinetik des Neurotoxins **6** möglich sein sollte.

5.2 Etablierung einer neuen Spurenanalytik von TaClo mittels HPLC-ESI-MS-MS

Für die Verwirklichung dieser Aufgabenstellung stand uns im Institut für Lebensmittelchemie (Arbeitskreise PD Dr. Herderich und Prof. Schreier) ein HPLC-gekoppeltes Elektrospray-Tandem-Massenspektrometer (HPLC-ESI-MS-MS) zur Verfügung. Mit dieser modernen Technik sollte es möglich sein, auch kleinste Mengen des Analyten **6** bis hinunter in den pg-Bereich nachzuweisen^[116] und darüber hinaus Untersuchungen zur Metabolisierung von TaClo (**6**) durchzuführen. Das für unsere geplanten Studien zur *in-vivo*-Bildung und Verstoffwechslung von TaClo (**6**) verfügbare Gerät, das mit einem Elektronenspray-Ionisations (ESI) als Interface zwischen HPLC und Massenspektrometer ausgerüstet war, erlaubte eine milde Ionisierung unter Erhalt des intakes Pseudo-Moleküliens $[M+H]^+$. Als Scantechnik wurde das sog. SRM-Experiment (SRM = selected reaction monitoring) gewählt. Im SRM-Modus werden mit den Filter Q1 – ähnlich wie bei der vormals zur Detektion von TaClo (**6**) verwendeten GC/MS-SIM-Methodik für **6** – spezifische Moleküliionen ausgewählt, jedoch zusätzlich in einem zweiten Quadrupol (Q2, Stoßkammer) mit einem Stoßgas (hier

Argon) unter definiertem Druck (1-3 mTorr, Kollisionsenergien 10-40 eV) zertrümmert. Von den hierbei entstehenden Fragmentationen (Tochterionen) werden schließlich im Analysator (Q3) ausgewählte Ionen detektiert (siehe Abb. 29).

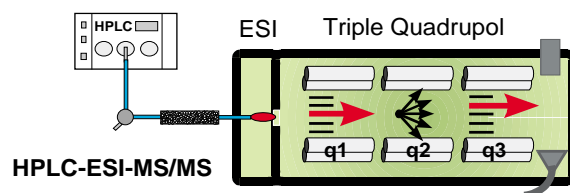


Abb. 29. HPLC-ESI-MS-MS im SRM-Modus^[117]

Als Vorbereitung für das SRM-Experiment war zunächst die Aufnahme eines Tochterionenspektrum von TaClo (**6**) notwendig. Im Tochterionen-Scan werden im ersten Quadrupol das Moleküllion $[M+H]^+$ selektiert und in Q3, nach Fragmentierung in Q2, alle erhaltenen Fragmentationen detektiert. Das Tochterionenspektrum zeigte die typischen Fragmentierungen, die man für ein Tetrahydro- β -carbolin mit einer CCl_3 -Gruppe erwartet (siehe Abb. 30):

- eine für Tetrahydro- β -carboline typische Retro-Diels-Alder-Reaktion,^[118] die in einem Neutralverlust von 29 u resultiert (siehe Schema 10)
- HCl-Abspaltung aus der CCl_3 -Gruppe

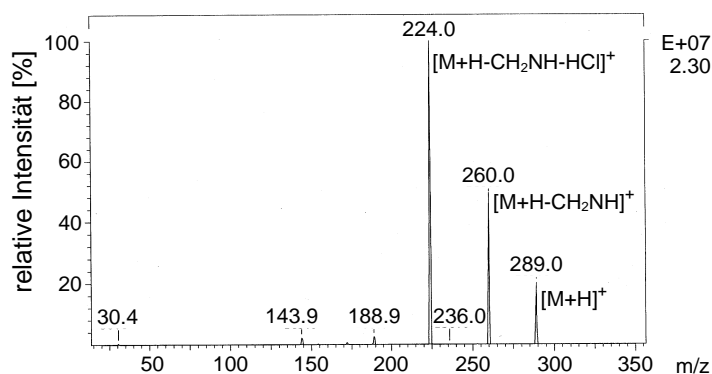
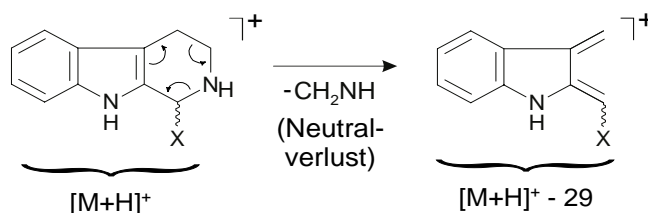


Abb. 30. Tochterionenspektrum von TaClo (**6**)



Schema 10. Retro-Diels-Alder-Reaktion von Tetrahydro- β -carbolinen

Aufgrund dieser Daten wurden zum Nachweis von TaClo (**6**) das SRM-Experiment m/z 289 \rightarrow 260 und das analoge SRM-Experiment für das isotope Molekülion m/z 291 \rightarrow 262 gewählt. TaClo galt nur dann als positiv identifiziert, wenn alle der folgenden vier Kriterien erfüllt waren (siehe Abb. 31):

1. Elution bei der spezifischen Retentionszeit von 6.95 min im Chromatogramm;
2. Detektion des Molekülions m/z 289 wie auch des isotopen Molekülions m/z 291 in SRM-Experimenten;
3. Fragmentierung der beiden Molekülionen m/z 289 und m/z 291 in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Verlust einer CH_2NH -Einheit (-29 u);
4. Detektion der Isotopenlinien für beide SRM-Experimente im erwarteten theoretischen Verhältnis von ca. 1:1.

Mit dieser Methode lassen sich falsch-positive Befunde auch bei Analyse in komplexer Matrix praktisch ausschließen. Die durch die SRM-Analyse erzielte Filtrierung der detektierten Ionen führt außerdem zu einem reduzierten chemischen Rauschen, woraus exzellente Nachweisempfindlichkeiten für TaClo (**6**) resultieren. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der deutlich reduzierten Probenvorbereitung, da z.B. der für die Gaschromatographie notwendige Derivatisierungsschritt entfällt.

Ähnlich wie bei dem gaschromatographischen Analyseverfahren wurde das Probenmaterial vor der HPLC-MS-MS-Untersuchung durch Proteinfällung, Zentrifugation und Festphasenextraktion über C18-Kartuschen aufgereinigt. Durch diese Probenvorbereitung wurde einerseits Matrix, die die Trennleistung der benutzten RP-Säule bei der HPLC-Analyse beeinträchtigen könnte, aus der Analysenlösung entfernt, andererseits wurde durch diesen Probenvorbereitungsschritt TaClo (**6**) in der Probe angereichert und somit der Nachweis auch kleinerer Mengen an **6** deutlich verbessert.

Zur Abschätzung der in den Proben enthaltenen Mengen an **6** wurde vor der Probenaufarbeitung $[\text{D}_4]$ -TaClo ($[\text{D}_4]$ -**6**) zugesetzt. Diese deuterierte Verbindung hat im Gegensatz zu dem bei der früheren gaschromatographischen Technik gewählten Standard 8-Methyl-TaClo (**48**) den Vorteil, gleiche ionisierende Eigenschaften wie **6** zu besitzen und ähnliche Fragmentierungen mit vergleichbaren Intensitäten im SRM-Experiment zu liefern. Analog zu **6** wurden zum Nachweis von $[\text{D}_4]$ -**6** die SRM-Experimente m/z 293 \rightarrow 262 und 295 \rightarrow 264 gewählt, also der Neutralverlust von -31 u, der aus der Retro-Diels-Alder-Fragmentierung des Molekülions resultiert (siehe Abb. 31). Der Zusatz dieser Eichsubstanz ermöglichte den direkten Vergleich der Peakflächen und dadurch den Rückschluß auf die Konzentration von TaClo (**6**), wobei auch zufällige Fehler während der Aufarbeitung das Ergebnis nicht verfälschen konnten. Die Zuverlässigkeit der Methode wurde auch bei der

von Tabletten (Chloraldurat[®]) jeweils abends verabreicht worden. Am darauffolgenden Morgen wurden den Teilnehmern ca. 10 ml Vollblut abgenommen, welches sogleich durch Zentrifugation in Serum und Blutkuchen getrennt und bis zur Aufarbeitung und Analyse gekühlt (meist bei -40°C) gelagert wurde. Zum Nachweis von TaClo (**6**) wurden Serum und Blutkuchen getrennt voneinander aufgearbeitet und untersucht.

Tab. 4. Behandlungsschema für Chloraldurat[®] bei Parkinsonpatienten und Nachweis von TaClo (**6**) in Blutproben

Nr.	Alter [Jahre]		Chloraldurat [®] - Dosis [mg]	Dauer der Behandlung	Blutmenge [g]		TaClo [ng/g] ^a	
					Serum	Blutkuchen	Serum	Blutkuchen
1	70	♀	250	> 2 Monate	9.2	8.3	(0.05)	0.2
2	67	♀	500	3 Tage	9.3	8.9	(0.07)	(0.07)
3	76	♀	250	> 6 Monate	9.3	9.0	0.5	4.0
4	68	♀	250	> 6 Monate	-	5.2	-	0
5	83	♀	250	13 Tage	7.5	-	0.14	-
6	77	♀	250	8 Tage	-	5.6	-	0.96
7	79	♀	750	2 Tage	6.9	-	(0.04)	-
8	63	♀	500	5 Tage	8.2	-	0	-
9	74	♀	500	?	10.7	8.1	(0.02)	0.14
10	77	♀	250	8 Tage	5.3	-	(0.03)	-
11	? ^b	♀	500	10 Tage	7.8	-	4.0	-
12	?	♀	?	?	6.16	6.9	0.4	0
13	74	♂	250	1 Monat		7.5		0
14	?	♀	?	?		10.3		0.14
15	?	♂	?	?		10.4		(0.06)

^aWerte in Klammern liegen im Bereich der Nachweisgrenze

^bDaten sind nicht bekannt

Wie in Tab. 4 zu erkennen ist, wurde in acht Proben TaClo (**6**) wiedergefunden und dessen Konzentration anhand von zugesetztem [D₄]-TaClo abgeschätzt. Leider korrelieren die erhaltenen Daten nur sehr schlecht mit der jeweils aufgenommenen Dosis Chloraldurat[®] und der Länge der Chloraldurat[®]-Behandlung. Fehlende Daten über den Zeitpunkt der Einnahme

und die Abnahme der Blutprobe verbieten außerdem die Diskussion über eine mögliche Verteilung und Ausscheidung des Neurotoxins TaClo (**6**). Die Befunde erhärten jedoch das Postulat, daß mit der Einnahme des Schlafmittels Chloralhydrat die Entstehung von TaClo im menschlichen Körper einhergeht.

5.4 Nachweis von TaClo in Humanurinproben

Es wurden außerdem Urinproben Chloralhydrat-behandelter Kinder aus der Kinderklinik der Universität Freiburg^[120] auf TaClo (**6**) untersucht. Die bei -40°C gelagerten Urinproben wurden nach Zugabe von $[\text{D}_4]$ -TaClo über C18-Kartuschen aufgereinigt und schließlich mittels HPLC-MS-MS-Analyse untersucht (siehe Tab. 5)

Tab. 5. Nachweis von TaClo (**6**) in Urinproben Chloralhydrat-behandelter Kinder

Nr.	Alter	♀/♂	Chloraldurat [®] - Dosis [mg]	Dauer der Behandlung	Urinmenge [ml]	Zeitpunkt der Abnahme	TaClo [ng/g] im Urin
16	18 d	♀	200	einmalig	0.12	?	0
17	1 a	♂	? ^b	einmalig	6.74	?	0.2
18	1 a	♂	600	einmalig	2.82	1.5 h	0
19	2 a	♀	490	einmalig	5.0	4 h	0
20	5 a	♂	600	einmalig	31.4	3 h	0
21	5 a	♂	180	einmalig	5.9	?	0
22	6 a	♀	?	einmalig	8.0	?	0.4
23	10 a	♂	1000	täglich seit 5.5 a	19.5	?	6.3 pg ^c

^bDaten sind nicht bekannt

^c Menge TaClo im Blut : Serum 1.2 ± 0.4 ng/g; Blutkuchen 68.8 ± 0.9 ng/g

In drei der acht Proben war TaClo (**6**) nachweisbar. Da bei einigen Proben nur sehr wenig Urin zur Verfügung stand, sind die erhaltenen Negativ-Befunde auch durch die geringe Probenmenge erklärbar. Zusätzlich ist bekannt,^[121] daß TaClo (**6**) zu 65% über Faeces und nur zu 35% über den Urin ausgeschieden wird. Da fast alle Proben von Kindern nach nur einmaliger Verabreichung von Chloralhydrat (**8**·H₂O) stammen, ist nicht von einer Anreicherung des Neurotoxins auszugehen. Mögliche vorhandene Konzentrationen lagen daher wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze. Offen bleibt auch die Frage, ob eine

Ausscheidung von TaClo (**6**) nach nur 1.5 h bis 4 h über die Niere oder den Darm überhaupt schon möglich ist.

5.5 Analyse von Blut-und Urinproben eines 10jährigen Epilepsie-Patienten

Von besonderem Interesse waren für uns die Blut- und Urinprobe eines 10jährigen Jungen (Patient 23), der über viele Jahre hinweg mit 1 Gramm Chloralhydrat (**8**·H₂O) pro Tag medikamentiert wurde. Gerade bei Epilepsie-Patienten ist der Wirkstoff **8**·H₂O immer noch ein häufiges, für eine chronische Behandlung der Begleitsymptome eingesetztes Seditativum.^[112] Der Junge litt seit einem Alter von sieben Monaten an maliner Epilepsie, die durch nächtliche krampfartige konische Anfälle (GTCS), welche bis zu 35 min anhielten, gekennzeichnet war. Seit seinem fünften Lebensjahr besserten sich diese Symptome nach Beginn einer regelmäßigen Einnahme von Chloralhydrat. Die ansonsten ein bis zwei Mal pro Nacht stattfindenden Anfälle konnten durch das Schlafmittel **8**·H₂O zuverlässig unterdrückt werden.

Bei diesem Jungen wurde in Spuren (6.3 pg) TaClo (**6**) im Urin wiedergefunden (siehe Tab. 5, Patient 23). Diese, trotz der chronischen Einnahme von Chloralhydrat, geringe Konzentration an **6** ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sich das lipophile Molekül **6** nur schlecht im wässrigen Mileu (Urin) anreichert. Vielmehr ist davon auszugehen, daß TaClo im Fettgewebe wiederzufinden ist oder nach Verstoffwechselung als Metabolit ausgeschieden wird.

Umso interessanter war eine Blutprobe desselben Patienten, die wir 9 Monate später erhielten. Schon aus vorausgegangenen Untersuchungen^[31,122] war bekannt, daß der lipophile Heterocyclus **6** vor allem im Blutkuchen gut zu finden ist. Dieser Befund wurde auch bei der Blutprobe des Jungen, die 18 Stunden nach der letztmaligen Einnahme von Chloralhydrat (**8**·H₂O) abgenommen worden war, bestätigt. Im Serum fanden sich 1.2 ± 0.4 ng/g TaClo (**6**), im Blutkuchen wurde die bisher größte Menge (68.8 ± 0.9 ng/g) des Neurotoxins **6** detektiert (siehe Abb. 32). Das lipophile TaClo (**6**) reichert sich also eher in den Erythrocyten als in der hydrophilen Plasma-Fraktion an.^[122]

Die in dem Jungen nachgewiesenen hohen Konzentrationen an TaClo (**6**) müssen also als ein weiterer Hinweis gewertet werden, daß sich das Neurotoxin durchaus im Körper anreichern kann. Dieser Befund macht deutlich, daß von einer chronischen Applikation des Schlafmittels Chloralhydrat (**8**·H₂O), wie sie häufig vor allem bei Kindern mit Epilepsie eingesetzt wird,^[113] angesichts der progredient wirkenden Neurotoxizität von TaClo (**6**) dringend abzuraten ist.

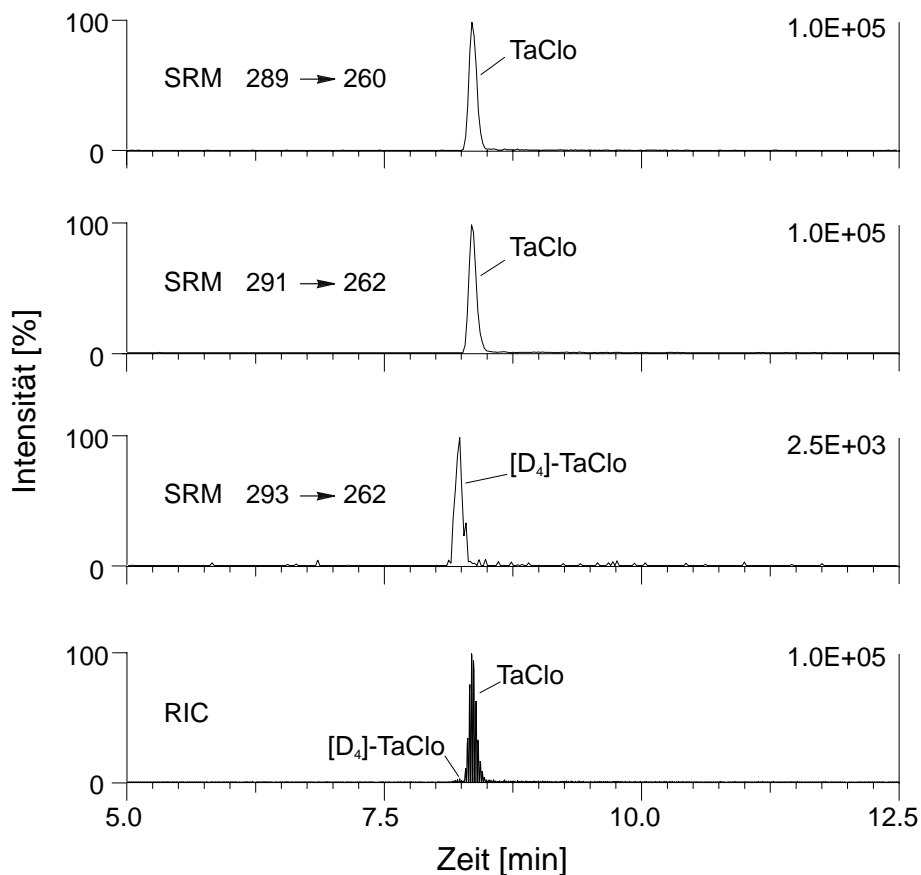


Abb. 32. HPLC-MS-MS-Chromatogramm der Blutprobe (Blutkuchen) des Jungen

Bei dem Jungen wurde aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse mittlerweile versucht, die Medikation mit Chloralhydrat ($8 \cdot H_2O$) durch andere Schlafmittel zu ersetzen. Bis jetzt konnte jedoch noch kein Mittel gefunden werden, bei dem ähnlich wie mit Chloralhydrat ($8 \cdot H_2O$) die nächtlichen Anfälle ausblieben.

Fazit:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine selektive und sensitive Analysemethode basierend auf dem Nachweis von TaClo mittels HPLC-ESI-Tandem-MS entwickelt, die es nun ermöglicht, TaClo (**6**) auch in geringen Spuren schnell und sicher zu detektieren. Mit dieser Methode gelang es uns, das Postulat der Entstehung des Neurotoxins **6** im menschlichen Organismus nach Aufnahme des Schlafmittels Chloralhydrat ($8 \cdot H_2O$) weiter zu untermauern: In 11 Proben wurden signifikante Konzentrationen von **6** eindeutig nachgewiesen. Die hohen Blutwerte des Neurotoxins **6** in einem Jungen, der über 5-6 Jahre hinweg täglich Chloralhydrat ($8 \cdot H_2O$) in großen Mengen (1 g) eingenommen hatte, stellen einen zusätzlichen ersten Hinweis auf eine Anreicherung von TaClo (**6**) im menschlichen Körper dar.^[123]

Sollte sich außerdem noch zeigen, daß TaClo auch in Menschen, die - z.B. an ihrem Arbeitsplatz - lange Zeit mit TRI (**7**) Umgang hatten, vorhanden ist, so würde es immer

wahrscheinlicher, daß das Tetrahydro- β -carbolin **6** möglicherweise an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sein kann. In Kap. 6 sind daher erste Untersuchungen, die im Umfeld dieser Fragestellung durchgeführt wurden, beschrieben.

6 Trichlorethylen – eine weitere TaClo-Quelle?

6.1 Trichlorethylen

Der hochreaktive Aldehyd Chloral (**8**), der sich rasch im gesamten Körper verteilt, kann nicht nur in Folge einer Behandlung mit dem Schlafmittel Chloralhydrat (**8**·HCl) in den Körper gelangen, sondern auch nach Exposition mit dem Lösungsmittel Trichlorethylen (TRI, **7**) das im menschlichen Körper zu Chloral (**8**) metabolisiert wird. Somit muß auch TRI als potentielle Quelle für das Neurotoxin TaClo betrachtet werden. Die Entstehung von TaClo (**6**) aus TRI hat vor allem aufgrund des noch vor wenigen Jahren weit verbreiteten Einsatzes des Lösungsmittels **7** in gewerblichen Betrieben möglicherweise eine besondere Relevanz für die Entstehung und Ätiologie der Parkinsonschen Krankheit.

Das Lösungsmittel TRI (**7**) fand besonders aufgrund seiner fettlösenden Eigenschaften, seiner Flüchtigkeit und Nichtbrennbarkeit eine häufige Anwendung in der Metall- und Druckindustrie, aber auch in Optik- und Glasindustrie. Es wurde zur chemischen Reinigung von Textilien und als Lösungsmittel beim wasserfreien Färben von Textilien benutzt. Außerdem diente es als Extraktionsmittel für natürliche Fette, Öle, Harze, Wachse und für Coffein aus Kaffee.^[124] TRI wurde als Lösungsmittel in Klebern, Schmiermitteln, Farben, Lacken, Pestiziden oder als Fleckenentferner und Teppichreiniger verwendet und gelangte so auch in zahlreiche Haushalte.

Noch bis 1940 wurde **7** außerdem als Vollnarkotikum in der Geburtshilfe^[125] und in der Zahnmedizin benutzt.^[126] Die narkotischen Eigenschaften von TRI begründeten auch den Mißbrauch dieses zur Gewöhnung und psychischer Abhängigkeit führenden Lösungsmittels als Rauschnarkotikum durch sog. "Schnüffler".^[127]

Mittlerweile ist TRI aufgrund seiner inzwischen gut erforschten carcinogenen Wirkung^[128-130] weitgehend vom Markt verschwunden. 1996 wurde **7** von der MAK-Kommission der DFG in die Gruppe III A1 eingestuft, welche beim Menschen die krebserzeugend wirkenden Arbeitsstoffe klassifiziert.^[130] Als Verunreinigung z.B. bei der Herstellung von Polyvinylchlorid besitzt TRI (**7**) jedoch nach wie vor arbeitsplatz-hygienische Relevanz.^[131]

Wegen seiner weit verbreiteten Anwendung auch in großen Maßstäben, ist TRI zu einer der häufigsten Kontaminationen der Umwelt geworden.^[132] Es tritt als Verunreinigung im Boden, im Oberflächen-, Regen- und Trinkwasser und in der Luft auf.^[133-135] 1988 wurden in 38% der amerikanischen Städte zwischen 0.11 und 53 ppb TRI im Grundwasser gefunden.^[136]

In einer 1994 in Italien durchgeführten Studie^[137] wies man **7** in relativ hohen Konzentrationen (25 ng/l bis zu 11 µg/l) in mehr als 65% der untersuchten Blutproben, die aus der allgemeinen arbeitenden Bevölkerung stammten, nach. In einer 1999 in Deutschland

vorgelegten Studie^[138] dagegen wurden nur in den seltensten Fällen TRI-Kontaminationen in Lebensmitteln (Fette, Öle) und in Rohwasser gefunden.

TRI (7) kann sehr gut über die Haut absorbiert werden,^[139] über kontaminiertes Trinkwasser oder TRI-haltige Lebensmittel oral aufgenommen und über verunreinigte Luft eingeatmet werden.^[139,140] Nach oraler Aufnahme gelangt es schnell ins Blut und akkumuliert nach kurzer Zeit im Fettgewebe und im fettreichen Nervengewebe.^[134] Als lipophile Substanz passiert 7 leicht durch passive Diffusion Membranen. Mit zunehmender TRI-Konzentration wächst die Verweildauer des Lösungsmittels im Organismus.^[141,142]

Wie schon die Verwendung als Narkotikum zeigt, besitzt TRI (7) eine starke depressorische Wirkung auf das Zentralnervensystem. TRI (7) entfettet die Haut und seine Dämpfe reizen die Schleimhäute der Augen und des Atemtraktes. Akute Überdosierung kann Lähmungen der Atmungs- und Kreislaufregulationszentren hervorrufen, es kommt zu Bewußtlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen.^[143] Arbeiter, die u.a. mit TRI (7) in Berührung gekommen waren, zeigten eine reduzierte Konzentrationsfähigkeit. Gedächtnisleistungen, psychomotorische Reaktionen, räumliches Sehvermögen und motorisches Geschick verschlechterten sich rapide.^[143]

Chronische Exposition mit TRI (> 40 ppm während 2-15 Jahren) führt hauptsächlich zu vegetativ-nervösen und zentral-nervösen Veränderungen, es kommt zu Kopfschmerzen, Müdigkeit und Schwindel sowie zu leichten neurologischen Ausfällen oder Sehstörungen. Außerdem wurden häufig Leber- und Nierenschäden sowie Nierenkarzinome beobachtet.^[130,136]

In Tierversuchen stellte man fest, daß eine TRI-Exposition eine Schädigung von Axonen und Dendriten im frontalen, im okzipidalen und im parietalen Cortex und im Hippocampus verursacht. Es wurde eine weitreichende bilaterale Myelin- und Axon-Degenerierung der trigeminalen Nerven beobachtet.^[144] Neuropsychologische Veränderungen aufgrund von TRI-Einwirkung ähneln den funktionellen Mustern der kognitiven und affektiven Veränderungen, wie sie bei Patienten mit neurologischen Erkrankungen (z. B. Huntington Chorea, Morbus Parkinson und Multipler Sklerose) auftreten. Man nimmt an, daß TRI die Funktion der corticalen und subcorticalen Strukturen nachhaltig beeinflusst und damit die typischen Symptomatiken der eben genannten Erkrankungen zu induzieren vermag.^[134,145]

Ein möglicher Zusammenhang zwischen TRI und der Parkinsonschen Krankheit wurde von Guehl^[146] in einer Fallbeschreibung einer 47jährigen Frau, die nach sieben Jahren der TRI-Exposition an ihrem Arbeitsplatz an Morbus Parkinson erkrankte, beschrieben. Diese Beobachtung veranlaßte zur Untersuchung von Mäusen, die vier Wochen lang mit TRI (400 mg/kg; fünf Tage die Woche) behandelt worden waren. Guehl konnte eine 50 proz. Reduktion von Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* dieser Tiere feststellen. Es muß also ein

Einfluß von TRI (7) an der Entstehung der Parkinsonschen Krankheit in Betracht gezogen werden.

Die toxische Wirkung von TRI (7) kann dabei von dem halogenierten Lösungsmittel selbst, aber auch von Verstoffwechslungs- und Zersetzungsprodukten von 7 stammen.^[131]

TRI besitzt zwei Metabolisierungswege im Organismus. Der reduktive Abbau (siehe Abb. 33) des Lösungsmittel macht dabei nur einen geringen Anteil der TRI-Verstoffwechslung aus.

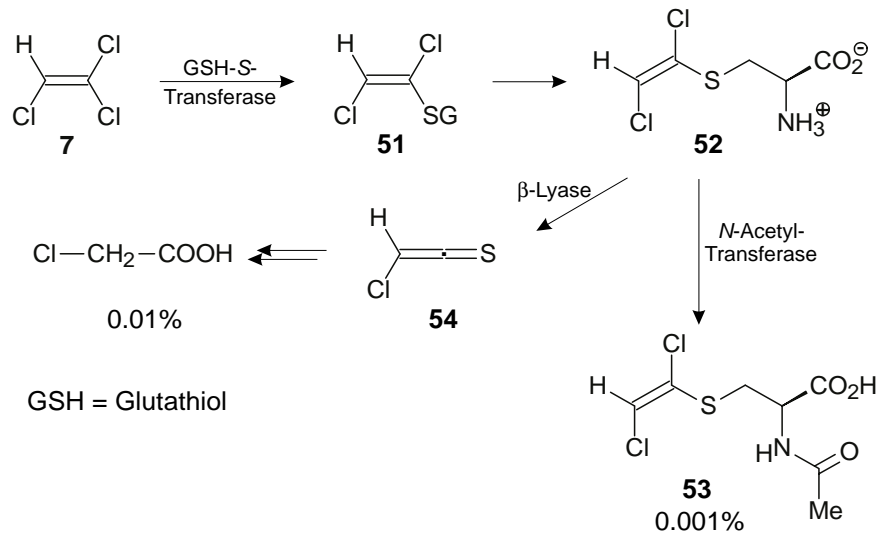


Abb. 33. Reduktiver Metabolismus von TRI in der Ratte; Prozentangaben repräsentieren den Anteil der oralen Dosis von 200 mg/kg KG (Körpergewicht), der im Urin wiedergefunden wurde^[147]

Das während der reduktiven Metabolisierung durch HCl-Elimination und enzymatische Bindung an Glutathion entstehende 1,2-Dichlorvinylglutathion (51) geht durch Abspaltung von Glutaminsäure und Glycin in die Cysteinerverbindung 52 über. 1,2-Dichlorvinylcystein (52) wird nach Transport in die Niere entweder zur harngängigen Mercaptursäure 53 *N*-acetyliert oder durch β -Lyase in ein instabiles Thiolintermediat gespalten, das durch Dehydrochlorierung in das reaktive Thioketen 54 übergeht.^[130] Da die β -Lyase besonders in den Nierentubuli angereichert ist, erklärt sich die organspezifische Toxizität von TRI (7) aus dem in der Niere gebildeten carcinogenen Thioketens 54.

Der Hauptabbauweg von TRI (7) ist jedoch die oxidative Metabolisierung.^[147] Sie wird durch mischfunktionelle Oxygenasen katalysiert und findet in der Leber von Mensch und Tier statt. TRI wird zunächst im Stoffwechsel durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen in ein reaktives Oxiran 55 umgewandelt, das nach intramolekularer Umlagerung zu Chloral (8), zu den Hauptmetaboliten Trichloressigsäure (56) und Trichlorethanol (57) weiterreagiert (siehe Abb. 34).

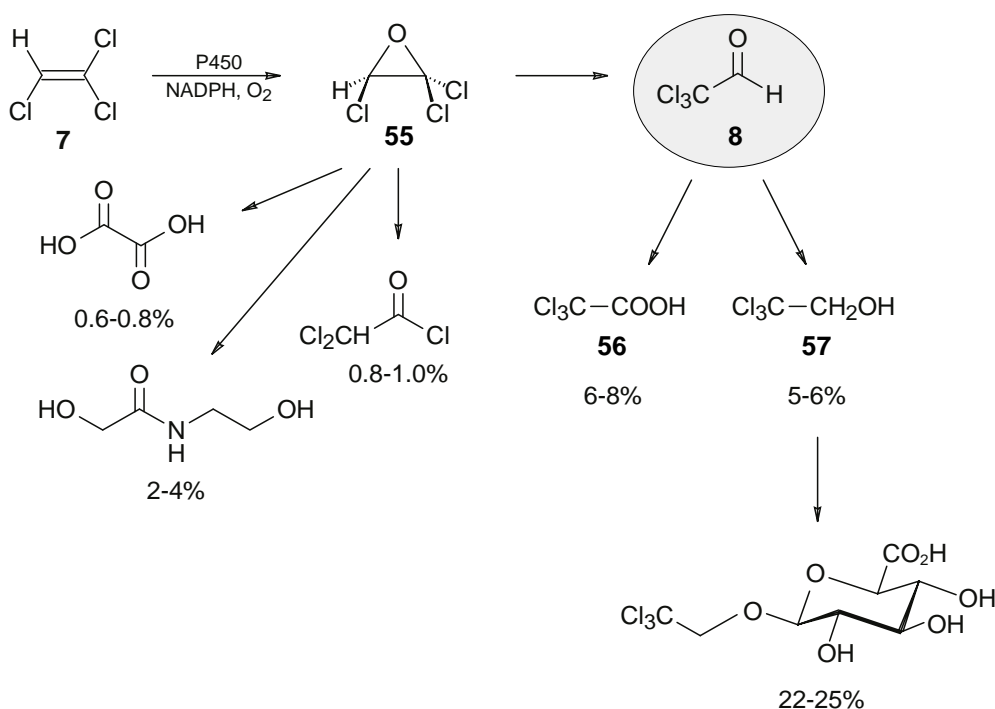


Abb. 34. Oxidativer Metabolismus von TRI (**7**) in der Ratte; Prozentangaben repräsentieren den Anteil der oralen Dosis von 200 mg/kg KG, der im Urin wiedergefunden wurde^[147]

Der oxidative Metabolisierungsweg wird bei hohen TRI-Konzentrationen gesättigt. Es ist deshalb zu erwarten, daß die Verstoffwechslung über den glutathionabhängigen reduktiven Weg mit steigenden TRI-Konzentrationen zunimmt. Außerdem konnte beobachtet werden, daß bei gleichzeitiger Einnahme von Alkohol (0.4%) sich die TRI-Konzentration im Blut auf das 2.5-fache erhöht, die Konzentration in der Ausatemungsluft sogar auf das Vierfache. Dies ist auf die Hemmung der mischfunktionellen Oxygenase zurückzuführen.^[148] Für das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Metabolisierung ist die Konzentration, die Zeitdauer der Einwirkung von TRI (**7**) sowie die Gegenwart anderer oxidativ abzubauenen Fremdstoffe bestimmend.^[149]

Zusätzlich ist denkbar, daß der intermediär gebildete reaktive Aldehyd Chloral (**8**) mit dem im Organismus endogen vorhandenen Tryptamin (**5**) weiterreagiert zu TaClo (**6**). Die Bildung des β -Carbolins **6** könnte schließlich die neurotoxischen Eigenschaften von TRI (**7**) erklären. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob TaClo sich tatsächlich während der Metabolisierung von TRI aus Chloral und Tryptamin zu bilden vermag (siehe Abb. 35).

6.2 *In-vitro*-Untersuchung zur Entstehung von TaClo aus TRI

Die mögliche Bildung von TaClo (**6**) aus dem kurzlebigen Zwischenprodukt Chloral (**8**), das bei der Metabolisierung von TRI (**7**) auftritt, wurde zunächst in *in-vitro*-Versuchen untersucht. Hierzu wurde die oxidative Verstoffwechslung von **7** in Gegenwart von mischfunktionellen Oxygenasen und NADPH nachvollzogen. Nach literaturbekannter Vorschrift^[150] wurden Mikrosomen aus Lewis-Ratten isoliert. Diese Mikrosomen enthielten P450-Enzyme, deren Aktivität durch Umsetzung mit TRI (**7**) in Gegenwart von NADPH überprüft wurde.^[151] Durch gaschromatographische Analyse des Toluol-Extraktes dieser Mikrosomenlösung wurde Trichlorethanol (**57**) detektiert. Die Bildung von Chloral aus TRI wurde durch Analyse des Ethylacetat-Extraktes festgestellt (siehe Abb. 35). Eine Metabolisierung von **7** fand also unter diesen Bedingungen statt.

Als nächstes wurde untersucht, ob nach Zugabe von Tryptamin zu solch einem TRI-Metabolisierungsansatz gemäß Abb. 35 die Substanz TaClo nachgewiesen werden kann.

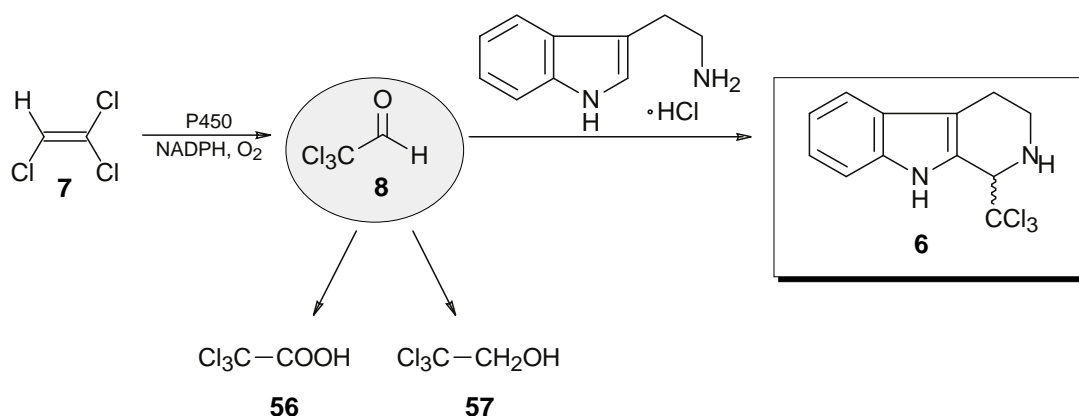


Abb. 35. Oxidative Metabolisierung von TRI (**7**) in Gegenwart von Lebermikrosomen, NADPH und Tryptamin

Tatsächlich wurde bei gleichzeitiger Zugabe von TRI (**7**) und Tryptamin (**5**) zu einer Mikrosomen/NADPH-Suspension nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur TaClo (**6**) mittels HPLC-ESI-MS-MS-Analytik (siehe Kap. 5.2, S. 45) detektiert.

TaClo wurde nicht gefunden, wenn Tryptamin erst eine halbe Stunde nach Zugabe der TRI-Lösung zum Inkubationsansatz hinzugefügt worden war. Für diesen Zeitpunkt wird von Elfarra *et al.*^[151] die höchste Chloral-Konzentration angegeben. Anscheinend muß Tryptamin (**5**) direkt in der Lösung vorhanden sein, damit die Cyclisierung durch Pictet-Spengler-Reaktion mit Chloral (**8**) stattfinden kann.

Fazit:

Die *in-vitro*-Bildung von TaClo (**6**) aus dem Metabolisierungsprodukt von TRI (**7**) und Tryptamin (**5**) konnte nachgewiesen werden. Es muß also prinzipiell davon ausgegangen werden, daß das Neurotoxin **6** auch im Menschen nach TRI-Exposition entstehen kann. Sollte sich diese Vermutung erhärten, so ist davon auszugehen, daß in einem Großteil der Bevölkerung, aufgrund der weiten Verbreitung des Lösungsmittels TRI, das Neurotoxin TaClo entstanden sein könnte. Ob jedoch diese Bildung einen Einfluß auf die Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit hat, ist bislang noch nicht geklärt und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6.3 Nachweis von TaClo in einer Frau nach jahrelanger Lösungsmittel-Exposition

Ende 1999 wurden wir von einer 40jährigen Frau kontaktiert, die 22 Jahre über einer chemischen Reinigung gewohnt hatte. Bei dieser Frau wurden im Februar 1999 mit Hilfe einer MRT (Kernspintomographie) multiple fokale supratentorielle Demyelinisierungen, die teils periventriculär, teils an der Rindenmarkgrenze gelegen waren, gefunden. Diese neurologischen Schädigungen des Großhirns führt die Frau auf eine Intoxikation durch Gifte aus der Reinigung zurück. Auch der Vater dieser Frau, der 24 Jahre über der selben chemischen Reinigung gewohnt hatte, litt an neurologischen Schäden, die sich bei ihm in einem Parkinsonsyndrom äußerten.

Aufgrund ihrer Beschwerden ließ die Frau im November 1998 erstmals eine Raumlufthuntersuchung in ihrer Wohnung durchführen, bei der ein Wochenmittelwert von 2.76 mg/m^3 ($\pm 20\%$) an Tetrachlorethylen (PER, **58**) festgestellt wurde. Nach dem auch in Reinigungen gebräuchlichen TRI (**7**) wurde nicht gesucht.

Als Hauptquelle von PER (**58**) wurde der Betrieb der chemischen Reinigung unter der Wohnung der Frau ermittelt. Das zur chemischen Reinigung häufig benutzte PER (**58**) besitzt, ähnlich wie TRI (**7**), die Fähigkeit durch massive Hauswände zu diffundieren und kann so auch in Räume in der Nachbarschaft der Reinigungen gelangen. PER reichert sich ebenso wie TRI (**7**) in fettreichen Lebensmitteln an und kann über den Atemtrakt, die Haut oder über die Nahrung aufgenommen werden.^[152] Der deutsche Grenzwert für Wohnräume ist auf 0.1 mg/m^3 festgelegt.^[153,154] Dieser Grenzwert wurde also in der Wohnung der Frau um ca. das 28-fache überschritten.

Im Dezember 1998 wurden mehrere Einrichtungsgegenstände der Wohnung untersucht. Es fanden sich in einem Polstersessel aus dem Schlafzimmer der Frau 5.4 mg PER/m^3 ($\pm 15\text{-}20\%$), im Bett wurden 6.76 mg PER/m^3 ($\pm 15\text{-}20\%$) festgestellt. In einem Kinderzimmer, das sich nicht wie das Schlafzimmer der Frau direkt über der Reinigungsanlage befand, wurden

4.31 mg PER/m³ (± 15-20%) im Bett wiedergefunden. Diese Untersuchungen, die nach einem eine Woche zurückliegenden Störfall in der Reinigung stattfanden, wiesen nochmals deutlich erhöhte Werte gegenüber der im November 1998 detektierten Konzentration von **58** auf. Aufgrund der massiven Beeinträchtigung durch das Reinigungsmittel **58** zog die Frau im Dezember 1998 um, die Reinigungsanlage wurde stillgelegt.

Von dem Reinigungsmittel PER (**58**) ist bekannt, daß es in analoger Weise zu TRI (**7**) hauptsächlich oxidativ zu Trichloressigsäure (**56**) abgebaut wird (siehe Abb. 36).^[155,156] Dieses Metabolisierungsprodukt wird meist zum Nachweis einer Intoxikation mit PER verwendet. Es ist jedoch ebenfalls denkbar, daß die detektierte Trichloressigsäure (**56**) aus einer Intoxikation mit TRI (**7**) stammt, das ebenfalls zu **56** metabolisiert wird (siehe Abb. 34, S. 57).^[69] Der Nachweis von **56** schließt also eine Mischexposition von PER und TRI nicht aus.

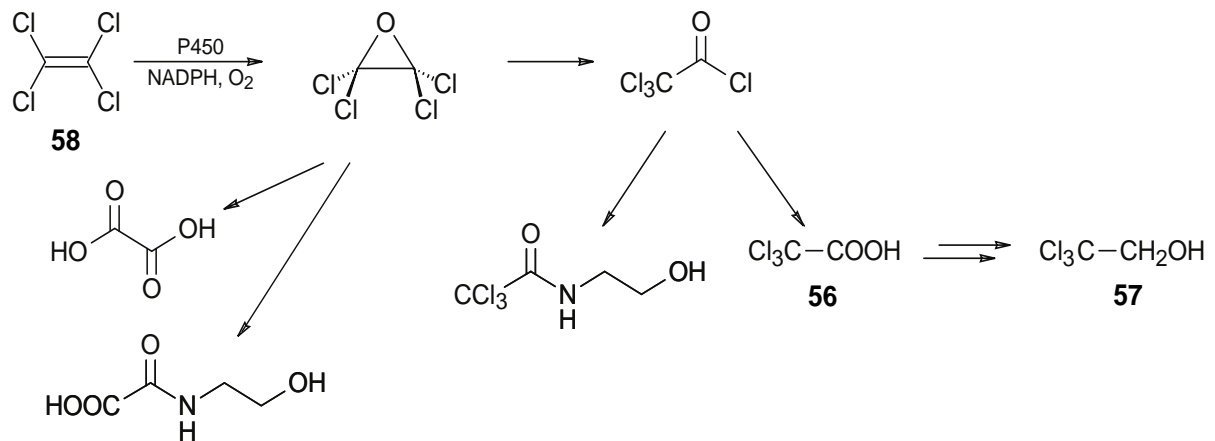


Abb. 36. Oxidative Metabolisierung von Tetrachlorethylen (PER, **58**)

Selbst neun Monate nachdem die Frau aus der Wohnung ausgezogen war konnte der PER- und TRI-Metabolit Trichloressigsäure (**56**) im abnehmenden Maße im Harn der Frau wiedergefunden werden.

Im Dezember 1999, fast 12 Monate nach dem Verlassen der Wohnung, wurde der Frau eine Blutprobe abgenommen, durch Zentrifugation in Serum und Blutkuchen getrennt und bis zur weiteren Analyse bei -40°C gelagert. Diese Blutprobe wurde analog der in Kap. 5.2 beschriebenen HPLC-ESI-MS-MS-Methode analysiert. Es wurden 0.4 ng TaClo/g Serum und 0.3 ng TaClo/g Blutkuchen detektiert. Der Nachweis von TaClo (**6**) wurde im Februar 2000 anhand einer zweiten Blutprobe bestätigt.

Eine im März 2000 durchgeführte Raummessung in der Wohnung über der Reinigung, fast eineinhalb Jahre nach Stilllegung des Reinigungsautomaten, ergab eine Luftkonzentration von 0.97 mg PER/m³ (± 20%) im ehemaligen Wohnraum, 0.24 mg PER/m³ (± 20%) im Hohlraum

des Fußbodens dieses Zimmers und 0.34 mg PER/m^3 ($\pm 20\%$) im Hohlraum des Fußbodens der Küche. Die ebenfalls durchgeführte Analyse von TRI (7) an diesen Stellen fiel negativ aus. Die Bestimmungsgrenze für 7 lag bei diesen Messungen bei $6 \text{ } \mu\text{g TRI/m}^3$ im Wohnraum und $20 \text{ } \mu\text{g TRI/m}^3$ für die Fußbodenuntersuchungen. Eine Mischexposition mit PER (58) und TRI (7) ist jedoch aufgrund des lange zurückliegenden Betriebes der Reinigungsanlage trotz dieser Meßergebnisse nicht gänzlich auszuschließen.

Mittels der in Kap. 6.2, S. 58 beschriebenen Mikrosomentests wurde überprüft, ob sich während der Metabolisierung von PER (58) zu Trichloressigsäure (56) und der weiteren Reduktion zu Trichlorethanol (57) (siehe Abb. 36) intermediär Chloral (8) bilden und eine Cyclisierung mit Tryptamin (5) stattfinden kann. Hierzu wurden Rattenleber-Mikrosomen in Gegenwart von NADPH mit PER (58) und Tryptamin (5) versetzt. Bei der anschließenden GC/MS-Analyse der Mikrosomenlösung konnte im Ethylacetat-Extrakt Chloral (8) nicht nachgewiesen werden. Die Analyse der über C18-Kartuschen aufgearbeiteten Mikrosomenlösung zeigte, daß sich TaClo (6) während dieser *in-vitro*-Bedingungen nicht gebildet hatte. Daher ist anzunehmen, daß das nachgewiesene TaClo (6) im Blut der Frau nach einer stattgefundenen Exposition mit TRI (7) entstanden war.

Fazit:

Der *in-vivo*-Nachweis von TaClo (6) im Blut einer Frau, die über Jahre hinweg durch chemische Reinigungsmittel (z.B. PER und wahrscheinlich auch TRI) belastet war, macht nochmals deutlich, daß sich das Neurotoxin 6 auch nach Intoxikation mit TRI (7) bilden könnte. Aufgrund der bis vor wenigen Jahren großen Verbreitung von 7 muß deshalb angenommen werden, daß ein großer Teil der Bevölkerung schon mit dem Neurotoxin 6 in Berührung kam. Für eine Beurteilung, ob endogen entstandenes TaClo an der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit beteiligt ist sind in Zukunft weitere Studien nötig, in denen einerseits die Konzentrationen des nach TRI-Exposition (in Arbeitsplatz-relevanten Mengen) entstandenen TaClo (6) im Organismus bestimmt und andererseits die schädigende Wirkung dieser Konzentrationen an TaClo (6) in Tierversuchen aufgezeigt werden sollten.

6.4 Umfrage bei Parkinsonpatienten, die mit TRI in Berührung kamen

Ein erster Versuch, den nach den vorangegangenen Befunden möglich erscheinenden Zusammenhang zwischen der Parkinsonschen Krankheit und TRI (7) bzw. TaClo (6) näher in der Praxis zu betrachten, wurde mittels einer Umfrage an ehemals TRI-exponierten Parkinsonpatienten unternommen. In Zusammenarbeit mit einer Parkinsonpatientin, die an

ihrem Arbeitsplatz lange Jahre dem Lösungsmittel 7 ausgesetzt war, annocierten wir deshalb in der Mitgliederzeitschrift der Deutschen Parkinsonvereinigung (DPV, siehe Abb. 37).

Gesucht:

Parkinsonpatienten, die Kontakt mit Trichlorethylen ('TRI') hatten

Das Parkinsonsyndrom, das durch (chronische) Exposition von irgendwelchen "**Umweltgiften**" ausgelöst wird, ist kein neues, dafür aber – v.a. in Kreisen junger erkrankter Patienten – ein vieldiskutiertes, jedoch in den seltensten Fällen wissenschaftlich nachgewiesenes Phänomen.

Unzählige in der Natur vorkommenden Giftstoffe und landwirtschaftliche sowie industrielle Chemikalien wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte nicht nur auf ihre krebserregenden oder das Erbgut verändernden Eigenschaften hin untersucht, sondern auch speziell im Hinblick auf mögliche *neurotoxischen Eigenschaften*.

Bis heute hat man allerdings trotz aller Verdachtsmomente noch keine dieser Substanzen eindeutig mit der speziellen Parkinsonsymptomatik in Verbindung bringen können. Die einzige Ausnahme ist aus der Drogenszene Anfang der 80er Jahre bekannt: MPTP, damals gefunden in verunreinigtem Heroin, ist die einzige sicher erwiesene Substanz, die beim Menschen (und einigen Tieren) ein akutes Parkinsonsyndrom erzeugen kann.

Seit einigen Jahren stehen nun in der Industrie gebräuchliche Lösungsmittel im Verdacht, neurotoxisch im Sinne eines parkinsonistischen Krankheitsbildes zu wirken. Trichlorethylen ('TRI'), ein weit verbreitetes Lösungsmittel zur Reinigung und Entfettung unterschiedlichster Materialien, wie z.B. Metalle, Textilien oder Glas, ist hierbei ein besonders interessanter Kandidat.

Wissenschaftler vermuten, dass das extrem lipophile (fettlösliche) 'TRI' im menschlichen Körper zu 'TaClo' (1-Trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin) umgewandelt werden kann. TaClo seinerseits ist von seiner chemischen Struktur her ein "enger Verwandter" von MPTP – es liegt also nahe, eine ähnliche Wirkung auf die dopaminergen Neuronen zu vermuten – nicht so stark und akut wie bei den MPTP-Opfern, aber letztendlich, bei chronischer Belastung, ebenfalls mit dem Resultat eines Parkinsonsyndromes.

Es besteht daher der Verdacht, dass eine chronische Exposition mit 'TRI' oder ähnlichen Lösungsmitteln bei Menschen, die einen schwächeren Abwehr- oder Entgiftungsmechanismus besitzen, die Entstehung der Parkinsonschen Krankheit begünstigen kann. Oder: Der Kontakt mit 'TRI' könnte eventuell ein Parkinsonsyndrom *verfrüht*, also in relativ jungem Alter (unter 60 oder gar unter 40 Jahren), zum Vorschein bringen, welches sich bei den Betroffenen sonst erst im fortgeschrittenen Alter gezeigt hätte.

Tatsache ist, daß die Patienten erkranken immer zahlreicher und früher, und vielleicht könnte eine intensive/chronische 'TRI'-Exposition zumindest für einige davon eine Teil-Ursache darstellen. Möglicherweise gibt es hierbei eine hohe Dunkelziffer.

Wir rufen daher alle Betroffenen auf, die meinen, bei ihnen könnte es einen **Zusammenhang zwischen ihrer Parkinsonerkrankung und einer Belastung mit 'TRI'** (am Arbeitsplatz oder durch im Wohngebiet angesiedelte Betriebe) bestehen, sich an unserer Fragebogenaktion zu beteiligen, die aus der Initiative und dem Erfahrungs- und Theorie-Austausch zwischen einem führenden forschenden Experten auf diesem Gebiet (Prof. Dr. G. Bringmann) und einem U40-Patienten entstand.

Dabei spielt es keine Rolle, ob zwischen Abschluss der Arbeit mit 'TRI' und Beginn der ersten Parkinsonzeichen Jahre oder gar Jahrzehnte vergangen sind. Sie dürfen auf Wunsch gerne anonym bleiben (Fragebogen über Regionalleiter oder Bekannte Ihres Vertrauens anfordern); alle Daten werden selbstverständlich geschützt und ausschließlich zu Zwecken der **Grundlagenforschung** verwendet. Das Ergebnis der Umfrage werden wir in jedem Fall an dieser Stelle veröffentlichen, dito das der Studie, sofern diese zu neuen Erkenntnissen führt.

Abb. 37. Annonce in der Mitgliederzeitschrift der Deutschen Parkinsonvereinigung (DPV)

Es war davon auszugehen, daß über diese Zeitschrift viele Parkinsonpatienten in Deutschland erreichbar sind. Die durchgeführte Umfrage sollte dabei keine repräsentativen Aussagen liefern, sondern vielmehr einen ersten Eindruck verschaffen, ob Parkinsonpatienten tatsächlich mit dem Lösungsmittel 7 in Berührung gekommen waren und diese TRI-Exposition das Auftreten der Krankheit begünstigen könnte.

Auf die Anzeige hin meldeten sich 96 Parkinsonpatienten bei uns. 14 Fragebögen wurden von vornherein aufgrund einer nicht vorhanden gewesenen TRI-Exposition aussortiert. Unter den verbleibenden 82 Fragebögen waren die meisten von Männern (69 Männer, 13 Frauen) ausgefüllt worden, was auf die Exposition von TRI (7) vor allem am Arbeitsplatz zurückzuführen ist. Die Arbeiter stammten u.a. aus der metallverarbeitenden und optischen Industrie, aus der Textilindustrie, aus Kunststoff-verarbeitenden Betrieben sowie aus Druckereien.

Einige Umfrageteilnehmer beschrieben ihren Umgang mit dem Lösungsmittel. Wie sorglos mit TRI (7) noch vor wenigen Jahren umgegangen wurde, zeigen die folgenden Aussagen:

"Früher waren die Fußböden der Wohnungen vielfach mit Linoleum ausgelegt. Dieses wurde zum Schutz gewachst und wenn mehrere Schichten Wachs aufeinander waren, mußte es gründlich entfernt werden, und das geschah mit TRI. Dazu wurde TRI auf den Fußboden geschüttet, man kniete nieder und bearbeitete den Boden mit Bürste und Lappen, bis alles Wachs entfernt war."

"[...] Das in Fässern gelieferte TRI war als Reinigungsmittel hoch angesehen. Jeder konnte es sich in Dosen oder gar Schüsseln abfüllen. Putzwolle wurde in TRI getaucht und die ölverschmierten Maschinen damit gewaschen, eine letzte gründliche TRI-Wäsche erfuhren die neu gelieferten Bäckereimaschinen in der Lackiererei. Schutzhandschuhe und Atemschutz gab es nicht. [...] Besonders im Winter, wenn der mächtige Ofen in der Lackiererei bullerte, konnte mit dem unbrennbaren TRI direkt neben dem Ofen gearbeitet werden. Bei uns Lehrbuben war die Tätigkeit dort sehr beliebt; vielleicht wegen der rauschartigen Zustände, die nach längerem Arbeiten auftraten. [...] TRI war völlig unverdächtig, und so wuschen wir unsere Hände in der TRI-Schüssel. In Flaschen abgefüllt fand TRI auch zuhause beim Fahrrad- oder Motorradputzen oder in der Hobbywerkstatt Verwendung."

"[...] Die Arbeitskleidung wurde zeitweilig nach Schichtende in TRI gewaschen, nachts gelüftet und am Folgetag erneut getragen."

Es wurde von einmaligen bis hin zu mehreren Jahren dauernden TRI-Belastungen berichtet (siehe Tab. 6).

Tab. 6. TRI-Belastung der Umfrageteilnehmer

Dauer der TRI-Exposition [Jahre]	Anzahl der Personen
>20	25
15-20	10
10-14	14
5-9	13
0-4	18

Der Kontakt mit TRI (7) kam bei den meisten Umfrageteilnehmern durch Einatmen von Dämpfen (73 Mal angekreuzt) und durch Hautkontakt (56 Mal angekreuzt) zustande. Zwei Patienten berichteten von einem unfallbedingten Verschlucken des Lösungsmittels, bei fünf Patienten kam es zu einem Kontakt mit TRI (7) über eine offene Wunde, und zehn Umfrageteilnehmer gaben an, TRI in die Augen bekommen zu haben.

Der Umgang mit dem Lösungsmittel 7 wurde von 16 Patienten als ständige Exposition beschrieben. Bei 15 Patienten bestand der Kontakt täglich, aber nur stundenweise. 17 Umfrageteilnehmer waren dem Lösungsmittel mehrmals pro Woche einige Stunden, 22 Teilnehmer ein paar Stunden pro Woche ausgesetzt. Einen selteneren Umgang mit TRI (7) (weniger als ein Mal pro Woche) hatten 13 Patienten; ein Patient berichtete von einer einmaligen TRI-Exposition. Dabei gaben 37 Umfrageteilnehmer eine starke TRI-Belastung (Geruch die ganze Zeit wahrnehmbar) an. Von einem mäßigen Umgang mit 7 sprachen 33 Patienten, 11 berichteten von einer relativ geringen, jedoch chronischen Exposition.

Die Intensität der Belastung konnte auch aus den daraus resultierenden Krankheitssymptomen abgelesen werden. So traten bei 53 Umfrageteilnehmern Beschwerden auf, die sie auf den Kontakt mit TRI (7) zurückführten. Am häufigsten (von 32 Personen angegeben) wurde über Kopfschmerzen berichtet, oft (25 Personen) traten Reizungen der Augen- und Nasenschleimhäute auf. Es wurde über Schwindel (19 Personen), Störungen der Wortfindung und des Kurzzeitgedächtnisses (15 Personen), Herzrhythmusstörungen (15 Personen), Zittern (13 Personen) und Sehstörungen (12 Personen) berichtet. Seltener traten Tagesschläfrigkeit (neun Mal angekreuzt), Schlafattacken am Tage (acht Mal), respiratorische Probleme (acht Mal) und Hauterkrankungen (sechs Mal angekreuzt) auf. Nur ein Umfrageteilnehmer berichtete von einer Herzschädigung und ebenfalls ein Patient von einer Krebserkrankung.

Auch über akute Beschwerden wurde in 42 Fällen berichtet: Reizungen der Augen traten auf (28 Mal angekreuzt), die Umfrageteilnehmer befanden sich in rauschartigen Zuständen (18 Mal) und litten unter Atembeschwerden (13 Mal). Verwirrung und Orientierungslosigkeit traten in fünf Fällen auf, in ebenfalls fünf Fällen wurde von deutlichen Bewegungs-, Koordinations- und Sprachstörungen berichtet. Bei drei Umfrageteilnehmern kam es aufgrund einer TRI-Exposition sogar zu Bewußtlosigkeit, und zwei Patienten gaben an, daß TRI (7) akute Herzprobleme bei ihnen verursacht habe.

Die TRI-Konzentrationen, welchen die Umfrageteilnehmer ausgesetzt waren, können grob durch Vergleich der in Tab. 7 aufgeführten Literaturangaben^[129] aus experimentellen Kurzzeit-Inhalationen abgeschätzt werden.

Tab. 7. Symptome, die nach experimenteller Kurzzeit-Inhalation von TRI (7) beobachtet wurden

TRI-Konzentration [ppm]	Symptome
20	Geruch eben wahrnehmbar ^[157]
160	Augenreizung ^[158]
200	in Std bis Tagen: leichte subjektive Beeinträchtigung ^[159]
279-372	30 min: erträglich ^[160]
229-284	mehrere Std. lang: Präarkose ^[161]
1280	5 min lang: Schleimhautreizung, Präarkose ^[160]
2500-6000	volle Narkose ^[162]

Fast allen Befragten war die Giftigkeit von TRI (7) während des Umgangs mit dem Lösungsmittel 7 nicht bekannt. Maßnahmen zum Schutz vor Dämpfen durch Absauganlagen oder zum Schutz vor Hautkontakt durch Handschuhe bestanden kaum.

Die ersten Symptome der Parkinsonschen Krankheit traten bei einem Großteil der Befragten noch während oder kurz nach der Exposition zu TRI auf (siehe Tab. 8).

Ein Trend in der Ausprägung eines bestimmten Parkinsontyps konnte nicht festgestellt werden: 55 Personen gaben an, daß es sich bei ihrer Krankheit um einen Akinese-Rigor-Dominanztyp handelt, mit dem Äquivalenztyp bezeichneten 17 Personen bei sich alle Kardinalssymptome als gleich stark ausgeprägt und 16 Personen gaben an, daß bei ihnen Tremor-Dominanz vorhanden sei.

Tab. 8. Auftreten der ersten Symptome nach TRI-Belastung

Zeitpunkt des Krankheitsbeginns nach TRI-Exposition [Jahre]	Anzahl der Personen
0-4	28
5-9	12
10-14	12
15-19	10
20-29	9
>29	9

Es konnte keine Auffälligkeit in der Ausprägung einer bestimmten Körperseite bei den TRI-exponierten Parkinsonpatienten festgestellt werden: bei 22 Patienten waren beide Körperhälften gleich stark betroffen, 27 Personen gaben eine Ausprägung der linken Seite, 32 Personen eine Ausprägung der rechten Seite an.

Der Krankheitsverlauf wurde von 44 Patienten als langsam schleichend beschrieben, 22 berichteten von einem durchschnittlichen Verlauf, und 18 gaben an, daß die Krankheit relativ abrupt einsetzte und eine deutliche Verschlechterung innerhalb weniger Jahre auftrat.

Im Rahmen der Fragebogenaktion wurden jedoch keine Auffälligkeiten bzgl. der Symptomatik bei den befragten Parkinsonpatienten festgestellt, die mit der TRI-Exposition in Zusammenhang gebracht werden konnten.

Nachgefragt wurde außerdem nach Zigaretten- und Alkoholkonsum. Auch hier fielen keine Besonderheiten auf. Der Zigarettenkonsum kann als normal eingestuft werden. Der Alkoholkonsum wurde als eher gering beschrieben, keiner der Patienten zeigte einen besonderen Hang zum Alkohol, die Patienten bezeichneten sich eher als Alkohol-intolerant. Diese Überempfindlichkeit gegenüber Alkohol kann auf eine durch TRI-Exposition gesteigerte Wirkung des Lösungsmittels 7 zurückgeführt werden.

Interessanterweise zeigte der Vergleich mit einer in der Literatur erhobenen Statistik^[37] zum Auftreten der ersten Symptome bei der Parkinsonschen Krankheit mit den aus der Umfrage erhaltenen Daten ein früheres Einsetzen der Krankheit bei den Umfrageteilnehmern (siehe Abb. 38).

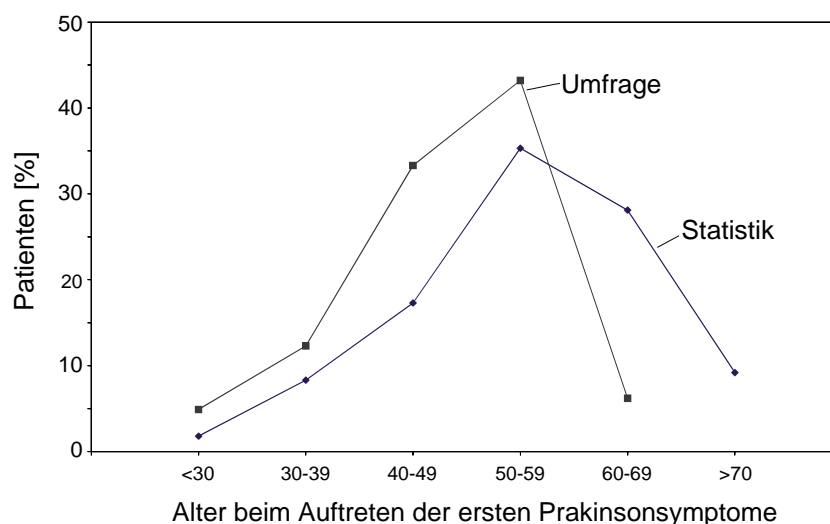


Abb. 38. Vergleich des Auftretens der ersten Parkinsonsymptome nach Statistik und nach der Umfrage

Es ist denkbar, wenngleich natürlich nicht statistisch belegt, daß dieses verfrühte Einsetzen der Parkinsonschen Krankheit im Falle der Umfrageteilnehmer auf die Exposition von TRI (7) und vielleicht auch auf das sich bildende TaClo (6) zurückzuführen ist.

Das vermehrte Vorhandensein von Parkinsonfällen in der Verwandtschaft der Umfrageteilnehmer (19 Patienten berichteten von einer familiären Vorbelastung) läßt außerdem vermuten, daß eine genetisch bedingte Hypersuszeptibilität gegenüber TRI (7) bestehen könnte. Diese familiäre Vorbelastung wird in epidemiologischen Studien als einer der gesicherten Risikofaktoren der Parkinsonschen Krankheit beschrieben.^[57,163-168] So haben 5-10% aller Parkinsonfälle eine familiäre Komponente.^[169-171] In einigen Familien konnte auch ein Gendefekt festgestellt werden. Dieser ist jedoch in einer Vielzahl der Parkinsonfälle nicht vorhanden.^[57] Auch Zwillingsstudien sprechen gegen solch ein genetisch verursachtes Parkinsonsyndrom.^[172-177] Die meisten Epidemiologen vermuten deshalb, daß die Krankheit wahrscheinlich von mehreren Faktoren ausgelöst werden kann. Es werden Umweltfaktoren, Genetik und Alter diskutiert.^[56,57,163,165,166] Für diese multifaktorielle Theorie spricht, daß bei einigen Patienten metabolische Defekte entdeckt wurden.^[57,163,178-181] Diese Defekte äußern sich in einem weniger aktiven Detoxikationssystem der Parkinsonpatienten, was eine potenzierte Wirkung von nur in geringen Konzentrationen vorhandenen Neurotoxinen bewirken könnte.^[57,163] Für eine Beteiligung von Umwelttoxinen spricht nach epidemiologischen Studien außerdem, daß die Krankheit in Industrieländern häufiger auftritt.^[57,166] Auch wurde bei Männern in einigen Studien ein höherer Risikofaktor für die Parkinsonsche Krankheit gefunden. Diese geschlechtsspezifische Prädisposition wird darauf zurückgeführt, daß Männer an ihren Arbeitsplätzen häufiger mit Toxinen in Berührung kommen.^[166,167] Zusätzlich wurden in einigen epidemiologischen Studien eine Assoziation von Gebrauch von Brunnenwasser mit der Parkinsonschen Krankheit festgestellt.^[57,168,182,183]

Das Quellwasser wurde deshalb auf mehrere Chemikalien, z.B. auf Schwermetalle untersucht, bisher konnte jedoch kein Toxin im Wasser identifiziert werden, das neurodegenerative Eigenschaften besitzt und mit der Krankheit in Zusammenhang gebracht werden kann.^[163] TRI wurde bei diesen Untersuchungen jedoch nicht mit einbezogen. In einer deutschen Studie wurde außerdem aufgrund von Patientenaussagen eine positive Assoziation zu Gasen, Dämpfen, Lösungsmitteln, Klebern, Lacken, Abgasen und Kohlenmonoxid (also häufig auch zu Gemischen, in denen TRI (7) enthalten sein kann) zu der Parkinsonschen Krankheit gefunden. Legte man jedoch sachkundige Beurteilungen der Arbeitsplatzexposition (JEM, job exposure matrix) zugrunde, so konnte keine Assoziation festgestellt werden. Diese Diskrepanz macht nochmals die Schwierigkeiten bei der Erfassung von Toxinen in der Umwelt deutlich. Eine Aussage über Intensität und Dauer von Expositionen liegt selten vor. Oft ist es auch schwierig, das eigentlich wirksame Toxin bei einer Mischexposition zu identifizieren. Auch diese Studie kann deshalb nur Hinweise liefern, direkte Rückschlüsse auf einen bestehenden Zusammenhang der Parkinsonschen Krankheit mit TRI (7) sind nicht möglich.

Fazit:

Die Entstehung von TaClo (6) aus TRI (7) wurde in *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen bestätigt. Außerdem konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen TRI (7) und der Parkinsonschen Krankheit beobachtet werden, der sich in einem frühzeitigen Auftreten der ersten Krankheitssymptome bei TRI-exponierten Arbeitern im Vergleich zur Statistik manifestierte. Ausführliche neurologische Untersuchungen ausgewählter Teilnehmer dieser Umfrage und deren Arbeitskollegen sind geplant. Eventuell vorhandene Besonderheiten, die die Parkinsonsymptome betreffen und eine mögliche genetische Prädisposition der Umfrageteilnehmer aufzeigen könnten, sollen dabei näher betrachtet werden.

7 Stereochemische Aspekte der Bildung und Metabolisierung von TaClo im Säugerorganismus

Die endogene Bildung von TaClo (**6**) im Menschen nach Einnahme des Hypnotikums Chloralhydrat (**8**·H₂O) kann mittlerweile als experimentell gesichert betrachtet werden, wie auch Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit (siehe Kap. 5) und früherer Studien^[31] eindeutig belegen.

Da von TaClo (**6**) mit seinem Stereozentrum an C-1 prinzipiell zwei zueinander enantiomeren Formen, (*R*)-**6** und (*S*)-**6** (siehe Abb. 39), existieren, stellt sich nunmehr die Frage, ob diese beiden TaClo-Antipoden im lebenden Organismus als chiraler Umgebung unterschiedliche Eigenschaften besitzen und/oder verschiedenartigen Biotransformationsreaktionen unterliegen.

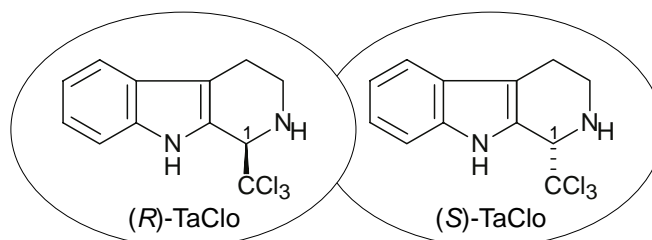


Abb. 39. Die beiden Enantiomere von TaClo (**6**), (*R*)-TaClo und (*S*)-TaClo

So ist für zahlreiche andere bioaktive chirale Verbindungen bekannt, daß die Enantiomere sich in ihrem Metabolismus, ihrer Toxizität, Plasma-Verteilung und Kinetik der Urin-Ausscheidung oft stark unterscheiden.^[184,185]

Aufgrund von *in-vitro*-Kondensationsexperimenten mit Tryptamin (**5**) und Chloral (**8**) darf vermutet werden, daß TaClo (**6**) im Säugerorganismus auf rein chemischen Weg durch eine spontan verlaufende Pictet-Spengler-Ringschlußreaktion gebildet wird und somit in racemischer Form auftreten sollte.^[66] Die Beteiligung eines Enzyms bei der Entstehung von TaClo (**6**) sollte jedoch, aufgrund der allgemeinen hohen Stereodifferenzierung bei Enzymreaktionen, in der Bildung von nur *einem* oder überwiegend einem TaClo-Enantiomer deutlich werden.

Ausgangspunkt für die hier vorgestellten Arbeiten über stereochemische Aspekte bei der Bildung und Metabolisierung von **6** im Säugerorganismus war die in früheren Arbeiten^[122] bereits erfolgreich geglückte Zuordnung der absoluten Konfiguration von TaClo mit CD-spektroskopischen Methoden (experimentelle Analyse in Verbindung mit quantenchemischen Berechnungen der CD-Spektren) und durch Röntgenstrukturanalyse. Zudem konnte erfreulicherweise auf bereits vorhandenes enantiomerenreines Referenzmaterial von (*R*)-**6** und (*S*)-**6** zurückgegriffen werden.^[122]

Voraussetzung für eine chirale Spurenanalytik von TaClo (**6**) in biologische Proben war der Einsatz der LC-MS-MS-Methodik mit den in Kap. 5.2 beschriebenen SRM-Experimenten nach Trennung der Enantiomere (*R*)-**6** und (*S*)-**6** an chiraler Phase.

Die in früheren Arbeiten^[122] erstellte chirale Analytik für TaClo (**6**) basierte auf der Trennung von (*R*)-**6** und (*S*)-**6** an chiraler HPLC-Normalphase. Für die Untersuchung von biologischen Proben mit Hilfe der LC-ESI-MS/MS-Analytik war man jedoch aufgrund des ESI-Interface zwischen HPLC und Massenspektrometer auf wäßrige Eluenten, also auf die Verwendung einer chiraler RP-Phase angewiesen. Deshalb wurde zunächst eine Enantiomeren-Trennung an chiraler RP-Phase (Chiralcel OD-R, MeCN:H₂O = 1:1) erstellt (siehe Abb. 40). Wie in Abb. 40 dargestellt, konnten (*R*)- und (*S*)-TaClo leicht getrennt werden und ihre CD-Spektren online, durch Anwendung der HPLC/CD-Kupplungstechnik, im Stop-Flow-Modus erhalten werden. Die Zuordnung der beiden Antipoden erreichte man durch Vergleich dieser CD-Spektren mit bereits bekannten CD-Spektren von enantiomerenreinem Material (siehe Abb. 40).

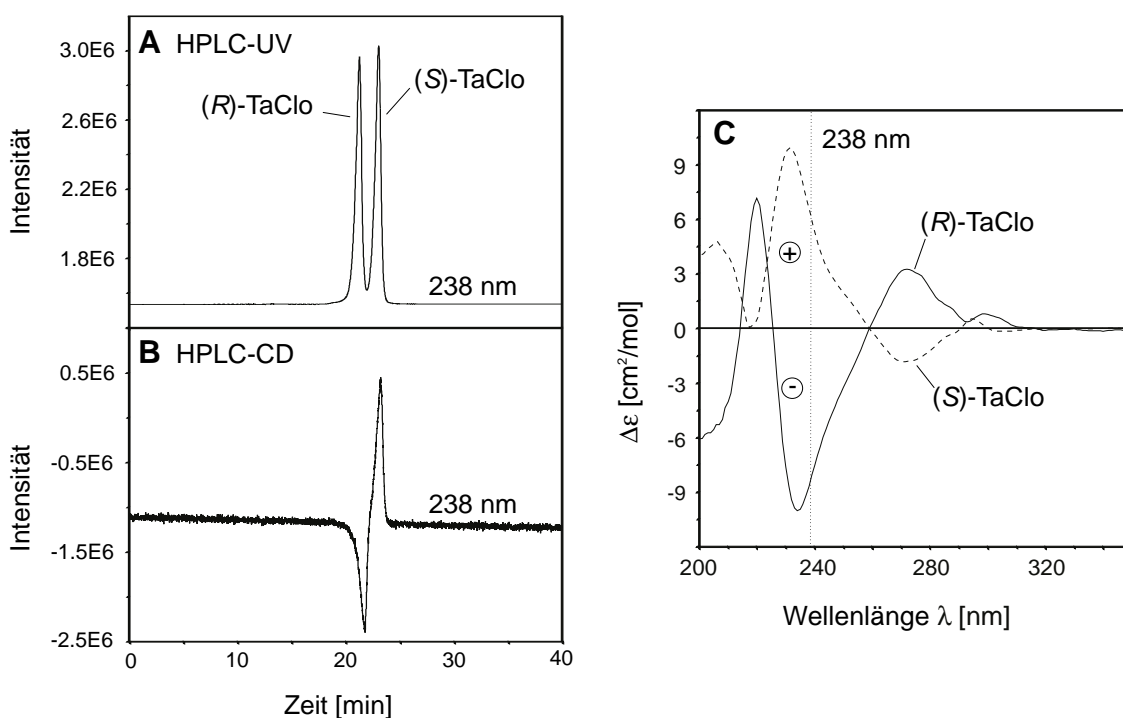


Abb. 40. HPLC-CD-Chromatogramm der Trennung von racemischem TaClo (**6**) an chiraler RP-Phase (Chiralcel OD-R, 4.6 x 250 mm, Daicel Chemical Industries Ltd., MeCN: H₂O = 1:1) und Detektion mittels (A) HPLC-UV (238 nm), (B) HPLC-CD (238 nm) und (C) die korrespondierenden CD-Spektren gemessen im Stop-Flow-Modus

Damit waren die analytischen Voraussetzungen geschaffen, auch Blut- und Urinproben mit geringen TaClo-Konzentrationen zu untersuchen: Nach chiraler HPLC-Trennung wurden die

beiden Enantiomere durch SRM-Experimente (m/z 289 \rightarrow 269, 291 \rightarrow 262) im MS-MS-Chromatogramm detektiert (siehe Abb. 41).

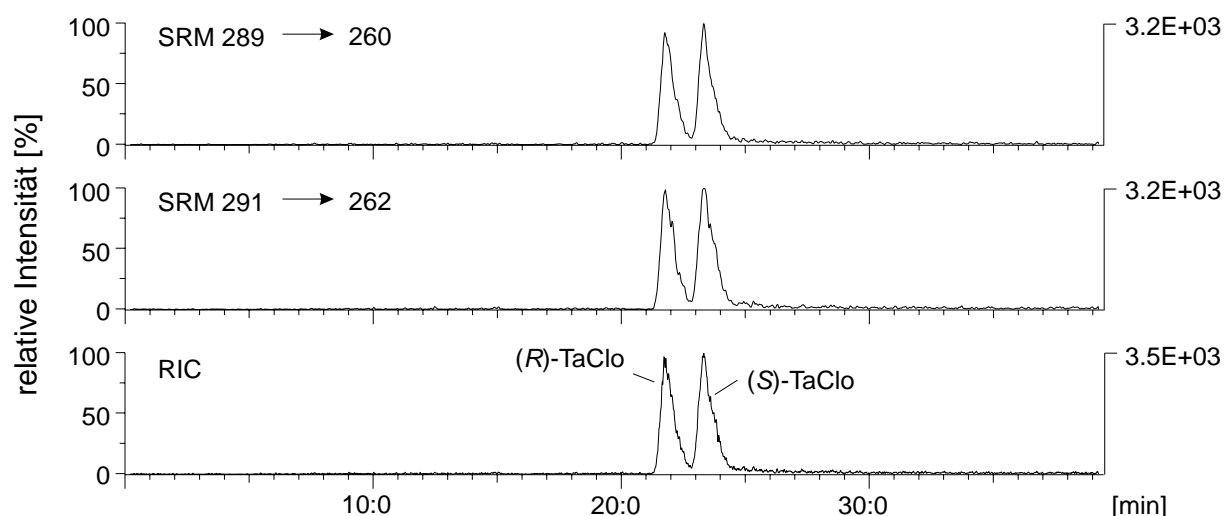


Abb. 41. HPLC-ESI-MS-MS Analytik von TaClo (**6**) an chiraler RP-Phase (Chiralcel OD-R, MeCN:H₂O = 60:40) in einer Blutprobe eines Chloralhydrat-behandelten Jungen ("Patient Nr. 23")

Mit der erstellten Methode wurden zunächst die stereochemischen Aspekte der Bildung von TaClo (**6**) im menschlichen Organismus untersucht. Hierzu analysierte man die Blutprobe des Chloralhydrat-behandelten Jungen ("Patient Nr. 23"), in dessen Blut zuvor große Mengen des Neurotoxins **6** gefunden worden waren (siehe Kap. 5.5). (*R*)- und (*S*)-TaClo wurden in dieser Probe in nahezu identischen Konzentrationen detektiert (siehe Abb. 41). TaClo (**6**) bildet sich demnach im menschlichen Körper vermutlich nicht enzymkatalysiert, sondern auf einem rein chemischen Weg durch eine spontane Pictet-Spengler-Cyclisierung.

Zur Aufklärung der Frage, ob auch die Verstoffwechslung im Säugerorganismus auf einem rein chemischen Weg oder enzymatisch abläuft, wurden Urin-Proben TaClo-behandelter Ratten und Mäuse untersucht. Ein Jahr alte C57BL/6 Mäuse und 3-4 Monate alte Wistar-Ratten waren über einen Zeitraum von sieben Wochen mit einer täglichen Dosis von 0.8 mg/kg TaClo (**6**) (*i.p.*) behandelt worden.^[186] Von diesen Tieren erhielten wir fünf Proben mit jeweils 48-h-Sammelurin (siehe Tab. 9).

Wie in Tab. 9 aufgelistet, konnte in den vier Ratten-Proben ein (*S*)-TaClo-Enantiomerüberschuß gefunden werden (siehe auch Abb. 42). Dies zeigt, daß offensichtlich enzymatisch-katalysierte Verstoffwechslungsreaktionen stattfinden können bzw. das (*S*)-Enantiomer unter bestimmten Bedingungen in der Ratte bevorzugt ausgeschieden wird.

Tab. 9. Stereochemische Untersuchung von TaClo in 48-h-Sammelurin von TaClo-behandelten (täglich 0.8 mg/kg TaClo) Ratten und Mäusen

Probe	behandelte Spezies	Sammelurin des X. Behandlungstages	<i>er</i> R/S-TaClo
1	Ratte	2. + 3.	17:83
2	Ratte	2. + 3.	46:54
3	Ratte	7. + 8.	28:72
4	Ratte	7. + 8.	44:56
5	Maus	7. + 8.	58:42

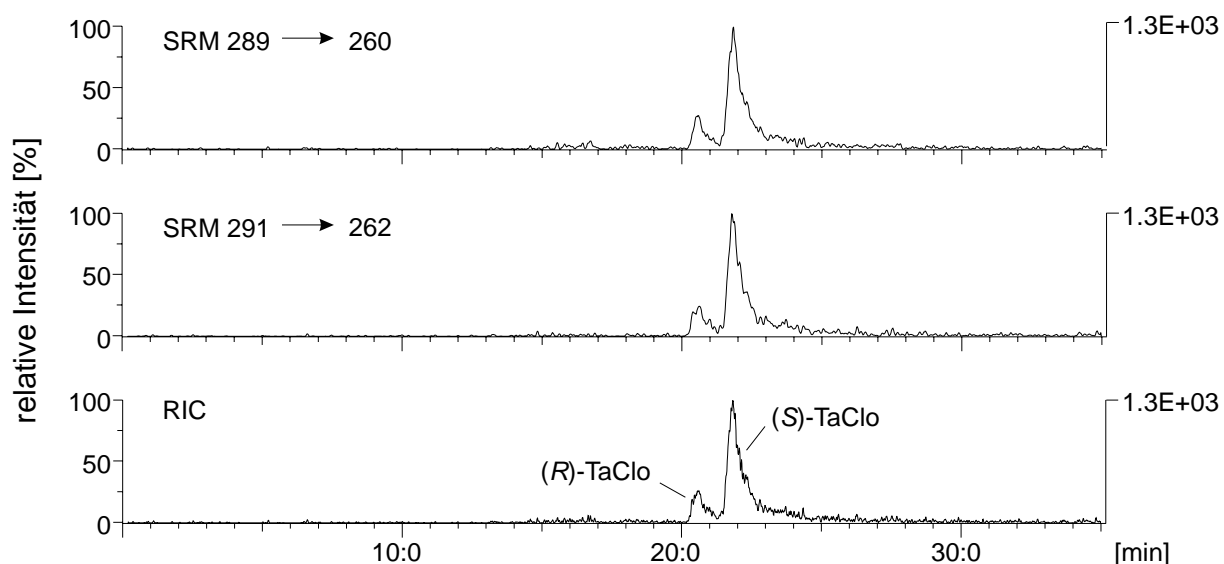


Abb. 42. HPLC-MS-MS-Untersuchung einer Urinprobe einer TaClo-behandelten Ratte an chiraler Phase (Chiralcel OD-R, MeCN:H₂O = 60:40)

In der Urinproben einer Maus (Probe 5) wurde jedoch ein geringer Überschuß von (*R*)-TaClo gefunden (siehe Tab. 9). An der Verstoffwechselung in der Maus sind also wahrscheinlich andere Enzyme als in der Ratte beteiligt.

Die Bedingungen, unter denen eine enzymatische Metabolisierung stattfinden kann, sind zur Zeit noch nicht geklärt. Erste Versuche zur Aufklärung der beteiligten Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit in *in-vitro*-Versuchen mit mischfunktionellen Oxygenasen durchgeführt. Hierzu wurden Mikrosomen aus der Rattenleber isoliert und in Gegenwart von NADPH mit TaClo (**6**) umgesetzt. Die anschließend durchgeführte HPLC-UV-Untersuchung an chiraler Normal-Phase (Chiralcel OD, 250 x 4.8 mm, *n*-Hexan:*i*-PrOH 70:30) zeigte jedoch

keine enantiomerspezifische Reaktion von **6**: (*R*)- und (*S*)-TaClo lagen racemisch vor. Der (*S*)-Enantiomerüberschuß im Urin der Ratten aus Tab. 9 (Probe 1-4) ist daher sehr wahrscheinlich nicht auf mischfunktionelle Oxygenasen aus der Rattenleber zurückzuführen. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkungsweise und Art möglicher beteiligter Enzyme an der Verstoffwechslung von TaClo (**6**) bzw. der Akkumulation des (*R*)-Enantiomers im Organismus der Ratte und anderer Tiere werden deshalb noch notwendig sein.

Fazit:

Die hier erzielten Resultate^[123] der spontanen Bildung von TaClo (**6**) durch eine Pictet-Spengler-Reaktion und die sehr wahrscheinlich stattfindende enzymkatalysierte Verstoffwechslung von **6** stehen im Einklang mit literaturbekannten Untersuchungen^[187] über die Entstehung und Verstoffwechslung des Acetaldehyd-abgeleiteten Tetrahydro- β -carbolins Eleagnin (**39**, siehe Abb. 43). Dieser alkaloidartige Heterocyclus wird im menschlichen Organismus in racemischer Form gebildet, die Metabolisierung erfolgt jedoch enzymkatalysiert, wobei bevorzugt das (*S*)-Enantiomer verstoffwechselt wird.^[187]

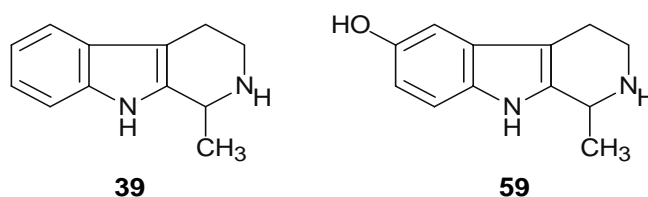


Abb. 43. Die literaturbekannten Acetyldehyd-abgeleiteten Tetrahydro- β -carboline Eleagnin (**39**) und 6-Hydroxyeleagnin (**59**)

Auch die unterschiedliche Verstoffwechslung in Ratte und Maus steht in Einklang mit literaturbeschriebenen Versuchen.^[188] So ist von dem ebenfalls Acetaldehyd-abgeleiteten Tetrahydro- β -carbolin 6-Hydroxyeleagnin (**59**, siehe Abb. 43) bekannt, daß es in racemischer Form in Menschen, Hunden und Mäusen vorhanden ist, in Ratten, Katzen und Affen jedoch ein Enantiomerenüberschuß vorliegt. Die in der Literatur^[188] gezogenen Rückschlüsse auf eine enzymkatalysierte Bildung und eine spontane Metabolisierung von 6-Hydroxyeleagnin (**59**) sollten jedoch mit Vorsicht betrachtet werden: Beck *et al.*^[188] detektierte einen Überschuß eines Enantiomers von natürlicherweise in Ratten und Katzen vorhandenen **59**. Aufgrund von gefundenem racemischen 6-Hydroxyeleagnin (in 100-2000-fachen höheren Konzentrationen) nach Behandlung (*i.p.*) mit rac-**59** schloss er auf eine enantioselektive Biosynthese, eine enantiomer-differenzierende Metabolisierung oder Ausscheidung hielt er für unwahrscheinlich. Da jedoch anzunehmen ist, daß bei einer Behandlung mit sehr großen

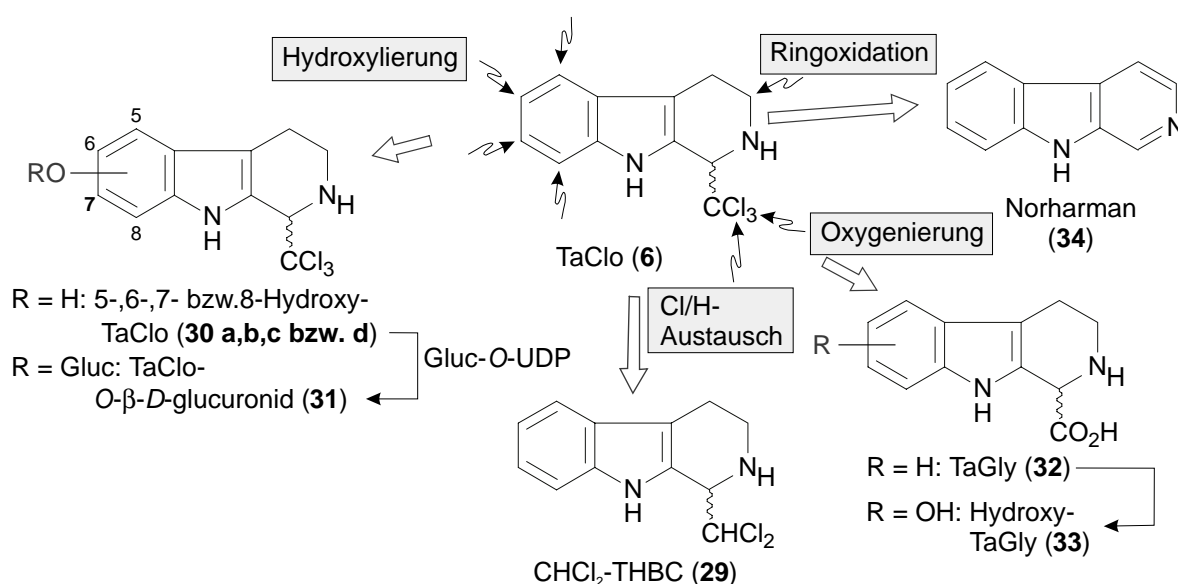
Mengen des β -Carbolins **59** die enzymatische Metabolisierung zu vernachlässigen ist, sind die gezogenen Folgerungen nicht bewiesen.

Mit der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten HPLC-MS-MS-Methode ist es in Zukunft möglich, die Konfigurationen von geringen Mengen an TaClo (**6**) in *in-vivo*-Probenmaterial einfach und schnell zu untersuchen. Die Kopplung von achiraler und chiraler Analytik sollte deshalb in sämtlichem untersuchtem Material angestrebt werden, so daß die Art der Verstoffwechslung und die Bedingungen, die zu einem Enantiomeren-Überschuß führen, aufgeklärt werden können.

8 Untersuchungen zur Metabolisierung von TaClo

Aufgrund der vorliegenden Befunde, daß TaClo (**6**) nach therapeutischer Gabe von Chloralhydrat (**8**·H₂O) (siehe Kap. 5) und wahrscheinlich auch nach Exposition mit dem Industrielösungsmittel Trichlorethylen (**7**) (siehe Kap. 6) *de novo* im Menschen entsteht und dort neurotoxische Prozesse zu induzieren vermag,^[29] ist es dringend erforderlich aufzuklären, ob während der Metabolisierungsphase Verstoffwechslungsprodukte von TaClo (**6**) entstehen, die möglicherweise ein noch stärkeres toxisches Potential als TaClo selbst besitzen. Eine Aufgabenstellung dieser Arbeit war es daher, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Verstoffwechslung von **6** zu untersuchen. Im Rahmen von *in-vitro*-Studien an Rattenlebermikrosomen und an neuronalen PC12-Zellen (siehe Kap. 4) sowie durch *in-vivo*-Untersuchungen an TaClo-behandelten Ratten und Mäusen wurde nach denkbaren TaClo-Metaboliten gesucht. Außerdem wurden zusätzlich diejenigen Blutproben Chloralhydrat-behandelter Patienten bzgl. der Metabolisierung des Neurotoxins **6** näher betrachtet, in denen TaClo (**6**) detektiert worden war.

Mit Hilfe spezifischer Methoden der hochempfindlichen LC-MS-MS-Kopplungstechnik (siehe Kap. 5.2) war es uns gelungen^[72,121] in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Herderich (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie unserer Universität), Hauptmetabolite von **6** im Urin und Gehirn von TaClo-behandelten Ratten strukturell zu identifizieren. Als der wohl überwiegend ablaufende Prozeß zur Verstoffwechslung von TaClo (**6**) im Säugerorganismus muß die Hydroxylierung im Isocyclus des β -Carbolins zu Hydroxy-TaClo (HO-TaClo, **30**), welches auch in glucuronierter Form (**31**) gefunden wurde, angesehen werden (siehe Schema 11).



Schema 11. Identifizierung von TaClo-Metaboliten mittels HPLC-MS-MS in Urin und Gehirn von Ratten nach intraperitonealer Applikation von TaClo (**6**)

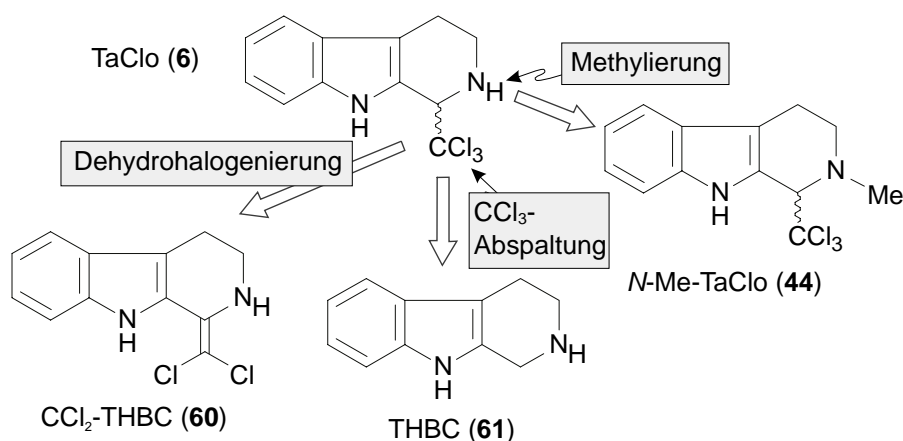
Weitere metabolische Veränderungen beobachtete man an der lipophilen Trichlormethylgruppe: Hydrodehalogenierung führt zur Bildung von 1-Dichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (CHCl₂-TaClo, **29**); Oxygenierungsreaktionen liefern unter vollständigem Verlust der CCl₃-Gruppe den halogenfreien Heterocyclus 1-Carboxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (TaGly, **32**), der zusätzlich in der am Isocyclus hydroxylierten Form, detektiert wurde (siehe Schema 11). Ein weiteres halogenfreies Verstoffwechslungsprodukt von TaClo (**6**) wurde mit dem vollaromatischen tricyclischen Heterocyclus Norharman (**34**) im Rattenorganismus identifiziert.

8.1 Metabolismusstudien an Rattenlebermikrosomen

Die Transformation und Elimination von Fremdstoffen aus Organismen wird meist von Enzymen, die u.a. im endoplasmatischen Reticulum gefunden werden, bewerkstelligt. Solche für den Fremdstoffmetabolismus notwendigen Enzyme, z.B. mischfunktionelle Oxygenasen, finden sich in Mikrosomen wieder, die man durch fraktionierte Zentrifugation aus Leberhomogenisaten gewinnt. Bei diesen sog. Mikrosomen handelt es sich um Bruchstücke des endoplasmatischen Reticulums, welches neben den Ribosomen, den Organellen der Proteinbiosynthese, mischfunktionellen Oxygenasen enthält. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb *in-vitro*-Metabolisierungsstudien mit Hilfe von Rattenlebermikrosomen durchgeführt werden.

Neben den in Schema 11 dargestellten schon bekannten TaClo-Metaboliten HO-TaClo (**30**), TaGly (**32**), CHCl₂-THBC (**29**) und Norharman (**34**) sind außerdem folgende Verstoffwechslungsreaktionen denkbar: eine Dehydrohalogenierung zu 1-Dichlormethylen-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (CCl₂-THBC, **60**), eine vollständige Abspaltung der Trichlormethylgruppe zu Tetrahydro- β -carbolin (THBC, **61**) sowie eine *N*-Methylierung, wie sie auch von der Verstoffwechslung anderer β -Carboline^[189-191] bekannt ist, zu *N*-Methyl-TaClo (**44**) (siehe Schema 12).

Zur Sturkturaufklärung vermuteter TaClo-Metabolite wurde, wie auch bei der Suche nach TaClo (**6**) in Blut- und Urinproben Chloralhydrat-behandelter Patienten (vgl. Kap. 5), ein HPLC-MS-MS-System eingesetzt. Die Identifizierung der TaClo-Abkömmlinge erfolgte im SRM-Modus ('single reaction monitoring') und konnte dann als gesichert angesehen werden, wenn eine Übereinstimmung der Retentionszeiten des selektierten Molekülions und die für Tetrahydro- β -carboline charakteristische Retro-Diels-Alder-Fragmentierung vorlag.



Schema 12. Weitere mögliche Verstoffwechslungsprodukte von TaClo (6)

In einem ersten Metabolisierungsversuch wurde TaClo (6) mit isolierten Rattenlebermikrosomen und NADPH umgesetzt und nach Extraktion über C18-Kartuschen mittels HPLC-MS-MS untersucht. Bei diesen Versuchen wurden die auch schon von Brückner^[121] gefundenen TaClo-Metabolite HO-TaClo (30), TaGly (32) und CHCl₂-THBC (29) nachgewiesen. Anfänglich detektiertes Norharman (34) und THBC (61) erwiesen sich jedoch in einem zweiten Metabolisierungsansatz mit [D₄]-TaClo ([D₄]-6) als aus der Rattenleber stammend. Mischfunktionelle Oxygenasen bewirken also keine Abspaltung der Trichlormethylgruppe zu THBC (61) und auch keine vollständige Oxidation des Isocyclus von TaClo zum vollaromatischen β-Carbolin Norharman (34), welches von Brückner im Urin TaClo-behandelter Ratten gefunden worden war. Ebenso wurde keine N-Methylierung von TaClo (6) zu N-Me-TaClo (44) beobachtet.

CCl₂-THBC (60), eine bislang noch nicht als TaClo-Metabolit identifizierte Verbindung, wurde in den Mikrosomenversuchen jedoch eindeutig als TaClo-Verstoffwechslungsprodukt identifiziert. Zum Nachweis dieses dehydrohalogenierten TaClo-Abkömmlings kam eine im Produktionenspektrum ersichtliche HCl-Abspaltung (siehe Abb. 44) zum Einsatz, die im SRM-Experiment 253 → 217 detektiert wurde (siehe Abb. 44).

Von diesem erstmals detektierten TaClo-Metabolisierungsprodukt wurde außerdem durch Umsetzung von TaClo (6) mit Mikrosomen und NADPH untersucht, ob es selbst einer weiteren Verstoffwechslung unterliegt. Mittels HPLC-MS-MS-Analyse (SRM 217 → 188; siehe dazu auch Abb. 44) wurde bei diesem Metabolisierungsansatz TaGly (32) identifiziert (siehe Schema 13). Auch 32 zeigte bei der Umsetzung mit Mikrosomen und NADPH eine weitere Verstoffwechslung: Das hydroxylierte Produkt (OH-TaGly, 33) wurde mittels HPLC-MS-MS-Analyse der Retro-Diels-Alder-Fragmentierung im SRM-Modus (233 → 204; siehe dazu auch Abb. 44) detektiert (siehe Schema 13).

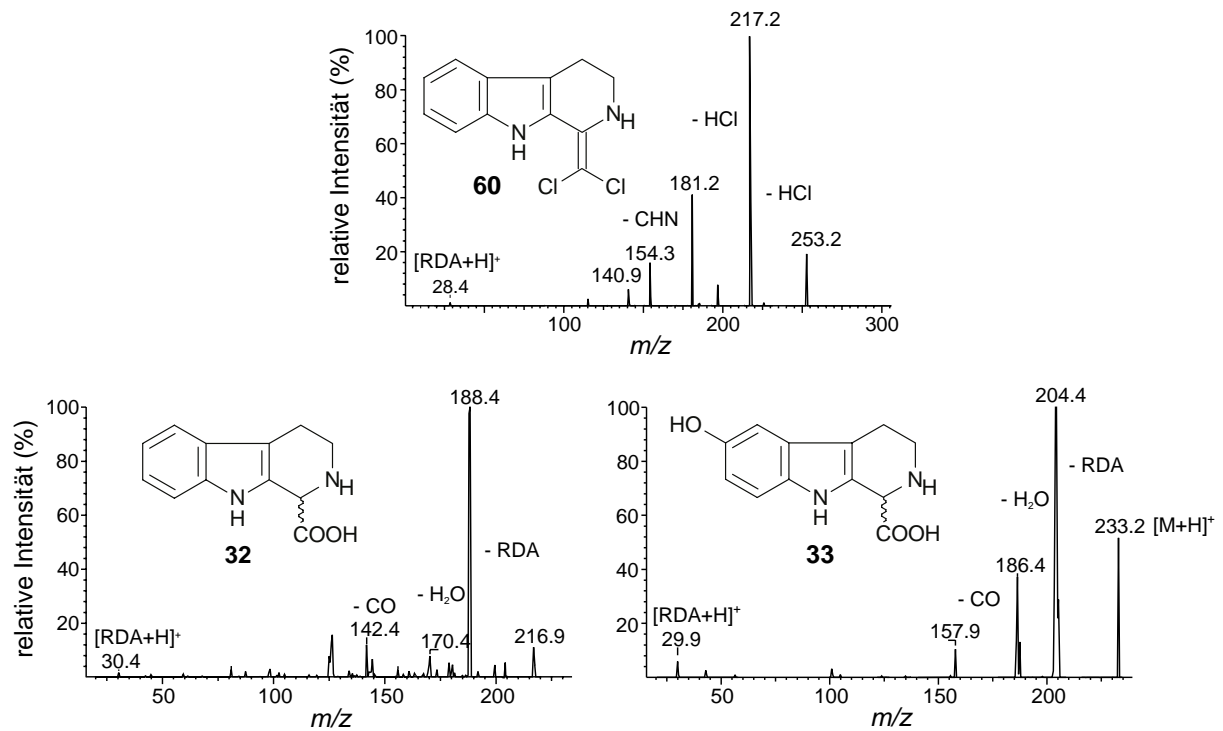
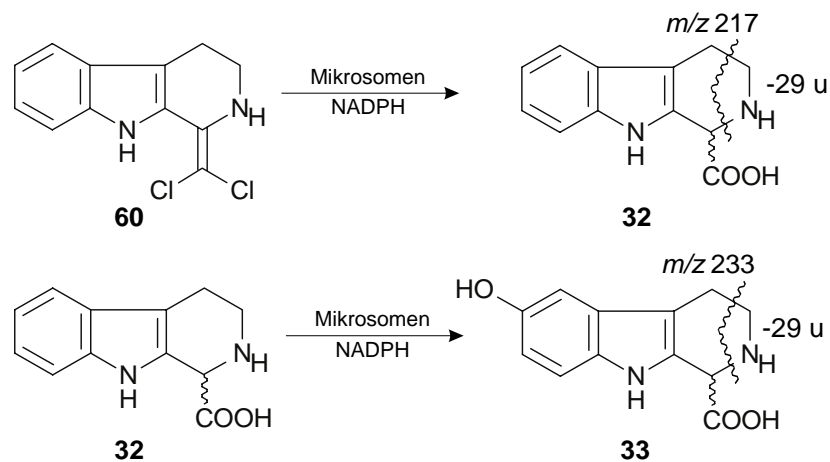


Abb. 44. Produktionenspektrum von $\text{CCl}_2\text{-THBC}$ (**60**), TaGly (**32**) und HO-TaGly (**33**)



Schema 13. Weitere Verstoffwechslung der TaClo-Metabolite $\text{CCl}_2\text{-THBC}$ (**60**) und TaGly (**32**) in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen und NADPH

8.2 Metabolisierung von TaClo in neuronalen PC12-Zellen

PC12-Zellen werden, wie in Kap. 4 ausführlich geschildert, zur Erforschung einer Vielzahl neurologischer Fragestellungen - wie z.B. der Frage nach der Wirkungsweise von Neurotoxinen - verwendet. Das Neurotoxin TaClo (**6**) wirkt auf diese PC12-Zellen toxisch (ED_{50} der LDH-Freisetzung = 250 μM) und löst bei einer Konzentration von 250 μM

apoptotischen Zelltod aus. PC12-Zellen, die Axon- und Dendritenfortsätze in Gegenwart von Wachstumsfaktoren ausbilden und neuronale Marker exprimieren, sind weithin als Modellsystem für dopaminerge Neuronen anerkannt. Es schien daher interessant, ob und inwieweit TaClo (**6**) in diesen Zellkulturen einer raschen Metabolisierung unterliegt. Also wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welche TaClo-Abkömmlinge in den Zellen auftreten oder in das Kulturmedium abgegeben werden.

Dazu wurden PC12-Zellen und die überstehende Nährlösung nach zweitägiger Inkubation mit TaClo·HCl (**6**·HCl) über C18-Kartuschen aufgereinigt und anschließend mittels HPLC-MS-MS unter Verwendung von SRM-Experimenten analysiert.

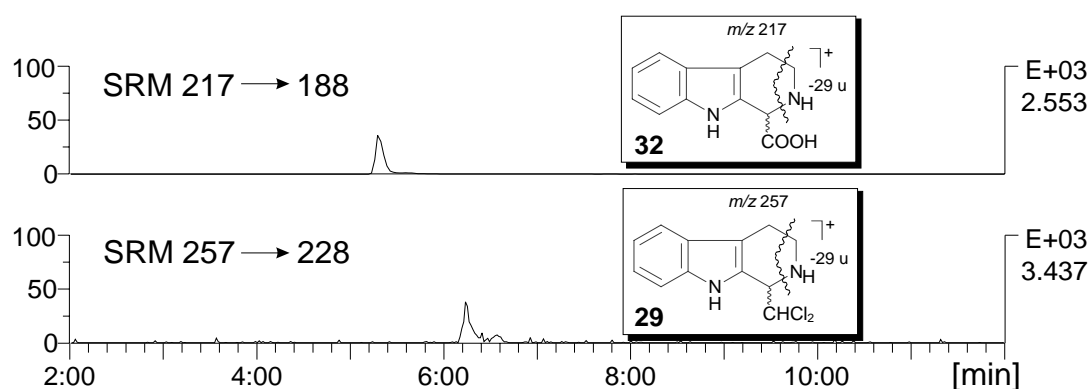


Abb. 45. Detektion der TaClo-Metabolite TaGly (**32**) und CHCl₂-THBC (**29**) nach Inkubation von PC12-Zellen mit TaClo (**6**)

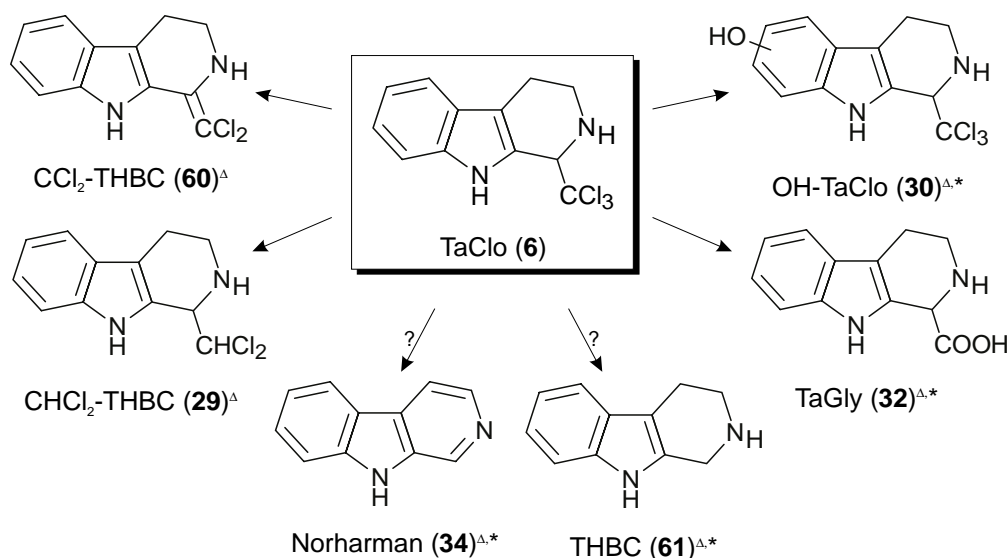
Anders als im Rattenorganismus, in dem die in Schema 11 dargestellten Verbindungen Norharman (**34**) und HO-TaClo (**33**) mit dem Urin ausgeschieden werden,^[121] unterliegt TaClo (**6**) in PC12-Zellen nur einer Hydrodehalogenierung zu CHCl₂-THBC (**29**), einhergehend mit einer vollständigen Dechlorierung zur Carbonsäure TaGly (**32**) (siehe Abb. 45). Interessanterweise findet offensichtlich keine Hydroxylierung in neuronalen Zellen statt. Das als Hauptmetabolit in Ratten gefundene HO-TaClo (**33**) konnte nicht detektiert werden.

In früheren pharmakokinetischen Studien mit [¹⁴C]-markiertem TaClo an der Ratte^[72] beobachtete man eine nur langsame Abnahme der Radioaktivität innerhalb von 48 h zu 35% über die Niere und zu ca. 65% über den Darmweg. Lang anhaltende hohe Aktivitäten in der Leber und im Dünndarm ließen auf einen ausgeprägten hepatischen 'First-Pass'-Effekt schließen. Die gewonnenen *in-vitro*-Befunde mit Rattenlebermikrosomen und PC12-Zellen bekräftigen den Befund der überwiegend stattfindenden Verstoffwechslung von TaClo (**6**) in der Leber: Bei der Umsetzung von **6** mit Lebermikrosomen wurden weitaus mehr TaClo-Metabolite gefunden als in neuronalen PC12-Zellen.

8.3 Tierexperimentelle Studien an Ratten und Mäusen – Identifizierung von TaClo und Metaboliten im Urin der Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit standen uns Urinproben von Ratten und Mäusen zur Verfügung, die mit einer täglichen Dosis an TaClo (0.8 mg/kg, *i.p.*) behandelt worden waren. Anhand dieser Proben sollten nochmals die Verstoffwechslungsprodukte von TaClo (**6**) bei der Ausscheidung näher untersucht und darauf geachtet werden, ob der erstmals in den Lebermikrosomenexperimenten gefundene Metabolit CCl₂-THBC auch im Urin dieser Tiere auftaucht. Besonders interessant erschien uns außerdem die Frage, ob TaClo spezies-spezifisch abgebaut wird, wie es auch schon die Studien zur enantiomer-differenzierenden Metabolisierung in Ratten und Mäusen (siehe Kap. 7) andeuteten, im Urin verschiedener Tierarten also jeweils unterschiedliche Verstoffwechslungsprodukte zu finden sind.

Wie in Schema 14 ersichtlich, wurden tatsächlich im Rattenurin weit mehr TaClo-Abkömmlinge gefunden als im Mäuseurin.



Schema 14. TaClo-Metabolite im Urin TaClo-behandelter Ratten (Δ) und Mäuse (*)

In der Ratte wurden der TaClo-Metabolit CCl₂-THBC detektiert sowie die auch schon von Brückner^[121] gefundenen Verstoffwechslungsprodukte CHCl₂-THBC (**29**), OH-TaClo (**30**), TaGly (**32**), Norharman (**34**) und THBC (**61**). Dagegen wurden im Mäuseurin das dehydrohalogenierte und das hydrodehalogenierte Produkt (CCl₂-THBC, **29** und CHCl₂-THBC, **29**) nicht beobachtet. In Ratten und Mäusen findet also offensichtlich eine unterschiedliche Verstoffwechslung statt. Da THBC und Norharman auch in Kontroll-experimenten mit unbehandelten Ratten und Mäusen als endogene Alkaloide detektiert werden konnten und Versuche mit [D₄]-TaClo leider nicht existierten, ist die eindeutige Zuordnung dieser Verbindungen als Metabolisierungsprodukte von TaClo nicht möglich.

8.4 Suche nach Hydroxy-TaClo in Blut- und Urinproben Chloralhydrat-behandelter Patienten

Schließlich galt es zu prüfen, ob auch im Menschen die in Ratten bzw. Mäusen detektierten Abbau-Produkte entstehen. Hierfür wurden alle Humanproben untersucht, in denen TaClo (**6**) detektiert worden war (siehe Kap. 5.3 und Kap. 5.4). Schwierigkeiten bereiteten die geringe Konzentration und die kleine Anzahl der Proben, so daß zunächst nur nach dem von Brückner^[121] zugeordneten Hauptmetaboliten OH-TaClo (**30**) und dessen *O*-glucuronierter Form **31** gesucht wurde. Weder in den Urin- noch in den Blutproben Chloralhydrat-behandelter Patienten wurde jedoch **30** und **31** gefunden.

Fazit:

In-vitro-Versuche mit Rattenlebermikrosomen und PC12-Zellen verdeutlichen nochmals, daß TaClo vermutlich bei der Passage durch die Leber mit einem ausgeprägten hepatischen 'First-Pass'-Effekt verstoffwechselt wird: Bei der Umsetzung von TaClo (**6**) mit Rattenlebermikrosomen wurden weitaus mehr TaClo-Abkömmlinge gefunden als bei der Umsetzung mit neuronalen Zellen. In zukünftigen Metabolisierungsstudien mit **6** gilt es daher, vor allem die biläre Verstoffwechslung, z.B. in Gallenfistelungsexperimenten, näher zu untersuchen, um dadurch den Hauptmetabolisierungsweg von TaClo über die Leber aufzuklären.

Aufgrund der unterschiedlich gefundenen Metaboliten in Ratten und Mäusen [CCl₂-THBC (**60**) und auch CHCl₂-THBC (**29**) wurden nicht im Mäuseurin gefunden] kann von einer Spezies-spezifischen Verstoffwechslung ausgegangen werden. In weiteren Studien zur Elimination von TaClo (**6**) sollte deshalb auf die verschiedenen Metabolisierungsarten in den Organismen eingegangen werden, so daß sich schließlich die Verstoffwechslung von TaClo im Menschen aufklären läßt.

9 Untersuchungen zur Stereostruktur von Naturstoffen

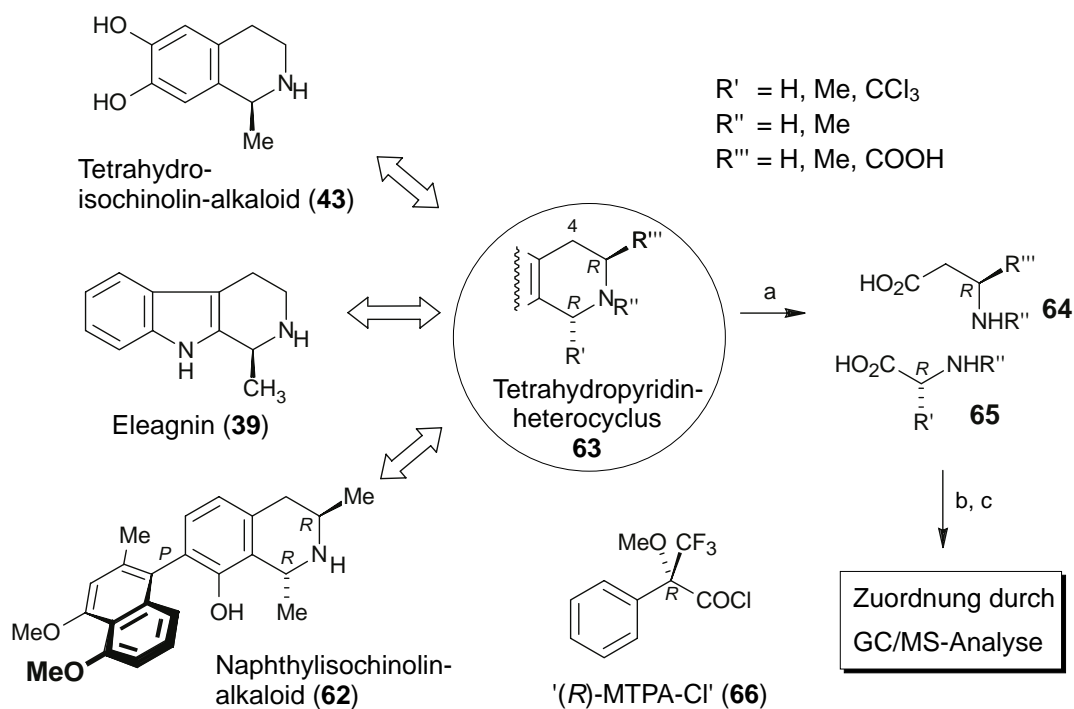
Wie schon in Kap.7, S. 69 erwähnt, ist die Kenntnis der absoluten Konfiguration eines Naturstoffes oft von großem Interesse bei der Aufklärung der Biogenese der Verbindung. Aber auch in der Pharmazeutischen Industrie wird ein großes Augenmerk auf die Bestimmung der Stereostruktur von Medikamenten gelegt, da Enantiomere meist sehr unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften besitzen, und daher im menschlichen Körper unterschiedliche Wirkungen hervorrufen können.^[184]

Die Bestimmung der Stereostruktur stellt oft ein großes Problem dar und ist meist nur mit großem experimentellem Aufwand lösbar. Oft schlägt die Interpretation der CD-Spektren aufgrund einer zusätzlich vorhandenen dominierenden Biarylachse [wie z.B. bei Naphthylisochinolin (62), siehe Schema 15] fehl^[192,193] oder es sind keine geeigneten Vergleichsdaten vorhanden. In seltenen Fällen gelingt es, die optisch aktiven Verbindungen zu kristallisieren und ihre absolute Konfiguration anhand ihrer Röntgenstruktur zu lösen. Die absolute Konfiguration einer Verbindung kann manchmal durch Partial- oder Totalsynthese eines Enantiomers gelöst werden. Dieser Weg der Konfigurationsaufklärung ist jedoch sehr arbeitsintensiv und langwierig.^[184]

Eine einfache chemische Methode, die zur Aufklärung von Substanzen mit Tetrahydropyridinheterocyclus 63 (siehe Schema 15) angewendet werden kann, wurde in unserer Gruppe etabliert und verbessert.^[194,195]

Dank oxidativem Abbau konnte in unserem Arbeitskreis die absolute Konfiguration schon einer Reihe von Naturstoffen aufgeklärt werden. So läßt sich durch die Technik des Ruthenium-katalysierten Abbaus die Stereostruktur von Tetrahydroisochinolin [z.B. Salsolinol (43)]^[196-198] und Tetrahydro- β -carbolin [z.B. Eleagnin (39)]^[195] (siehe Schema 15) bestimmen. Die Methode ist in Kombination mit NMR-Untersuchungen ebenfalls gut geeignet für die Aufklärung der Konfiguration von Substanzen mit einer dominanten Biarylachse [z.B. Naphthylisochinoline wie Dioncophyllin A (62)], deren Bestimmung mittels anderer Methoden nicht oder nur schwerlich möglich ist.^[199]

Die Methode des oxidativen Abbaus basiert auf der Fähigkeit von Rutheniumtetroxid, den Aromaten unter Ringöffnung zu Carbonsäuren zu spalten. Diese Oxidation führt zu kleinen, einfach zu analysierenden Aminosäuren (siehe Schema 15).



Schema 15. Ru(VIII)-katalysierter oxidativer Abbau von Tetrahydropyridinheterocyclen mit anschließender Analyse und Zuordnung der absoluten Konfiguration mittels GC/MS. (a) RuCl_3 , NaIO_4 ; (b) MeOH , SOCl_2 ; (c) '(R)-MTPA-Cl' [(R)-Moshersäurechlorid], NEt_3

Die absolute Konfiguration dieser Aminosäuren kann nach Veresterung und anschließender Umsetzung mit Moshersäurechlorid leicht per GC/MS-Trennung und Vergleich mit Referenzsubstanzen bekannter Konfiguration ermittelt werden (siehe Schema 15). Da der oxidative Abbau auch schon mit kleinen Mengen (bis zu 0.5 mg) des Analyten möglich ist, eignet er sich besonders für die Aufklärung der Stereostruktur von Naturstoffen, da diese oft nur in geringen Mengen vorliegen.^[195]

9.1 Aufklärung der absoluten Konfiguration chiraler benzylicher Alkohole und deren Ester oder Ether durch Ruthenium-katalysierten oxidativen Abbau

In der vorliegenden Arbeit sollte der bestehende oxidative Abbau^[195] auf Substanzen mit chiraler benzylicher OH-Funktion erweitert werden. Chirale α -hydroxylalkylaryl-Partialstrukturen **67** (siehe Abb. 46) sind in einer Reihe von Naturstoffen enthalten, darunter z.B. Dihydrophenanthrene, **68**,^[200] Benzofurane wie Verbindung **69**,^[201] Anthrachinone des Typs **70**^[202,203] und Benzopyrane wie z.B. **71**.^[204] Solche Partialstrukturen werden aber auch in Substanzen synthetischen Ursprungs gefunden, wie z.B. nach Hydrosilylierungen/Oxidationen von Stilbenen oder nach Reduktion oder Alkylierung von Acetophenonen oder Benzaldehyden, wenn neue chirale Wasserstoff- oder

Alkylübertragungsreagenzien getestet werden,^[205-208] wie es u.a. bei dem axialchiralen Biaryl **72** der Fall war.^[209]

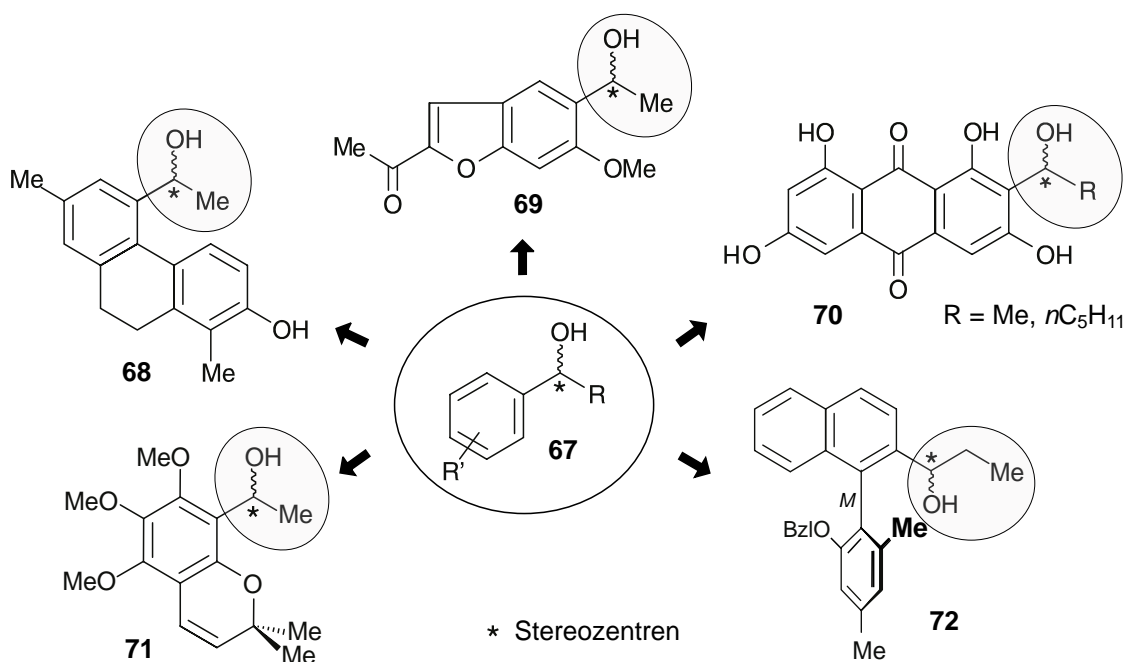
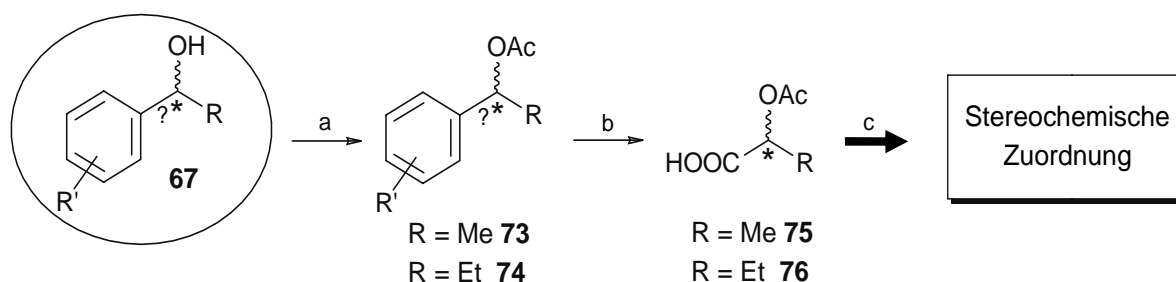


Abb. 46. Aromatische Naturstoffe und ein synthetisches Produkt mit chiraler α -hydroxyalkyl-Seitenkette

Für die Aufklärung der absoluten Konfiguration solcher sekundärer Alkohole existieren zwar bereits einige Methoden,^[210-213] von vielen dieser Substanzen ist jedoch immer noch nicht die absolute Konfiguration am Stereozentrum bekannt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den bereits etablierten oxidativen Abbau auf die Substanzklasse des Typs **67** zu erweitern.^[214] Ähnliche Abbau-Methoden wurden schon in der Literatur beschrieben, jedoch konnte dort das Verfahren nur mit größeren Mengen (1 mmol) durchgeführt werden.^[215,216]



Schema 16. Der oxidative Abbau von Substanzen mit Partialstruktur **67**: (a) AcCl, NEt₃; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) GC-MS Analyse an chiraler Phase

Zunächst war es notwendig, die Hydroxy-Funktion zu schützen, um den Abbau dieser labilen Gruppe, also des Stereozentrums zu verhindern. Die ungeschützten Alkohole des Typs **67** wurden nicht näher untersucht, da man aus den literaturbekannten Untersuchungen^[215,216] und

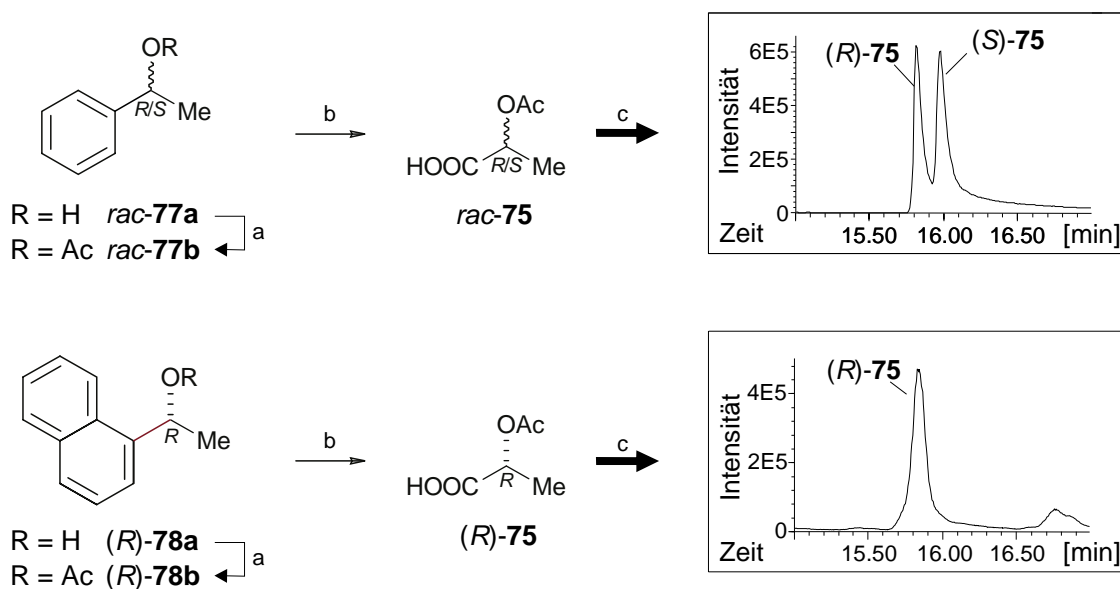
aus eigener Erfahrung von einer Oxidation der OH-Gruppe ausgehen mußte. Nach Derivatisierung mit Acetylchlorid erhielt man den Ester-geschützten benzyllischen Alkohol des Typs **73** und **74** (siehe Schema 15). Zunächst wurden leicht zugängliche Testsubstanzen dem oxidativen Abbau unter bereits etablierten Standardbedingungen unterzogen.^[195,217] Tatsächlich fand man, zunächst unter achiralen GC-Bedingungen, wie vermutet, die leicht GC-gängigen α -Acetoxycarbonsäuren (**75**, **76**, siehe Schema 16). Deshalb wurde ein GC-MS-Verfahren entwickelt, welches die Trennung der Acetat-geschützten chiralen Carbonsäuren **75** und **76** erlaubte. Verbindungen **75** und **76** konnten per GC-Analyse an einer chiralen CDX-B Säule ohne weitere Derivatisierung getrennt werden. Der 'massensensitive Detektor' (MSD) wurde im 'selected ion monitoring' mode (SIM mode) betrieben. Mit dieser Technik wurden nur die signifikanten Ionen von **75** und **76** herausgefiltert und detektiert. Dadurch wurden eine gute Nachweisempfindlichkeit und eine hohe Selektivität erzielt, so daß die Durchführung des oxidativen Abbaus auch mit kleinen Mengen des Analyten möglich war. Die absolute Konfiguration der getrennten Enantiomere von **75** bzw. **76** wurde durch Koelutionsexperimente mit Referenzsubstanzen bekannter Stereostruktur ermittelt. Die Strukturen und charakteristischen Ionen der beiden Carbonsäuren (**75**, **76**) sowie die relativen Intensitäten und Retentionszeiten sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10. Struktur, GC-Retentionszeiten (t_R) und charakteristische Ionen der α -Acetoxypion- und buttersäuren (**75** und **76**) (benutzte GC-Säule: CDX-B)

Struktur		t_R (min)	m/z	rel. Int. (%)
	(<i>R</i>)- 75	16.1	43 [CO ₂] ⁺ 87 [M-CO ₂ H] ⁺	100 30
	(<i>S</i>)- 75	16.3		
	(<i>R</i>)- 76	18.1	43 [CO ₂] ⁺ 101 [M-CO ₂ H] ⁺	100 24
	(<i>S</i>)- 76	18.5		

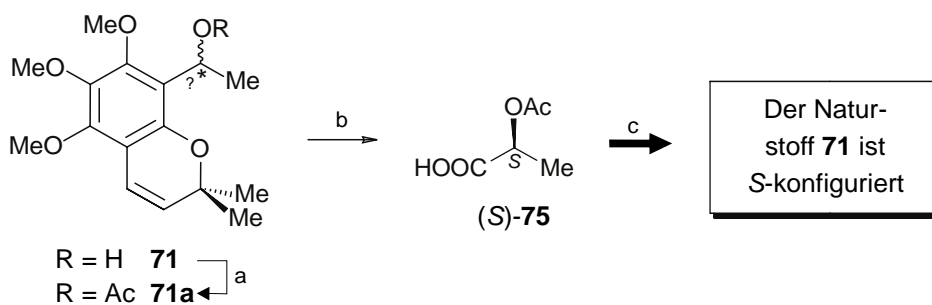
9.1.1 (α -Hydroxyethyl)aryl-Verbindungen

Die Funktionsfähigkeit des Abbauverfahrens wurde zunächst mit leicht zugänglichen Testsubstanzen erprobt.^[214] Dazu wurde, wie in Schema 17 zu sehen, racemisches 1-Phenylethanol (*rac*-77a) mit Acetylchlorid geschützt und mit RuCl₃/NaIO₄ umgesetzt. Man erhielt racemische α -Acetoxypropionsäure (*rac*-75; Schema 17). Enantiomerenreines (*R*)- α -(1-Naphthyl)ethanol (*R*-78a) wurde ebenfalls derivatisiert und dem Abbauverfahren unterzogen. Die GC-MS-Analyse zeigt enantiomerenreines (*R*)-75. Es fand also keine Racemisierung während der Oxidation des Aromaten statt (siehe Schema 17).



Schema 17. Die Methode des oxidativen Abbaus angewendet auf 1-Phenylethanol (77) und α -(1-Naphthyl)ethanol (78) und Zuordnung der absoluten Konfiguration durch chirale GC-MS-Analyse (a) AcCl, NEt₃; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) GC-MS-Analyse an chiraler CDX-B-Phase

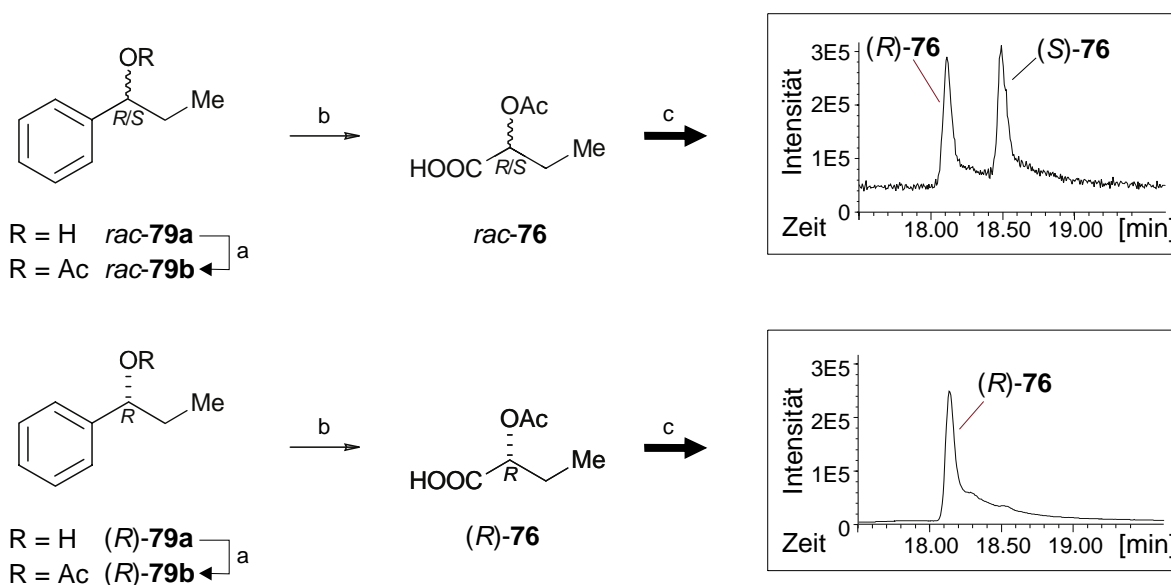
Die so erprobte Technik wurde zur Stereoanalyse des Benzopyrans **71** eingesetzt (siehe Schema 18). Der Naturstoff **71** wurde aus Blättern von *Melicope ptelefolia* (Rutaceae) im Arbeitskreis von Prof. G. Adam (Institut für Pflanzenbiologie, Halle) isoliert^[204] und uns zur Strukturaufklärung zur Verfügung gestellt. Wie erwartet, konnte mit Hilfe des oxidativen Abbaus die absolute Konfiguration schnell und in einem analytischen Maßstab ermittelt werden: Acetylierung von **71** und anschließender oxidativer Abbau führte zu (*S*)- α -Acetoxypropionsäure (*S*-75), dessen absolute Konfiguration durch GC-MS-Analyse zugeordnet wurde. Aufgrund des erlaubten Rückschlusses auf die Stereostruktur der Ausgangsverbindung wurde dem Naturstoff **71** *S*-Konfiguration zugeordnet (siehe Schema 18).



Schema 18. Aufklärung der absoluten Konfiguration des natürlichen Benzopyrans **71**, isoliert aus Blättern von *Melicope ptelefolia* (Rutaceae),^[204] mit Hilfe der Methode des oxidativen Abbaus (a) AcCl, NEt₃; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) GC-MS-Analyse an chiraler CDX-B-Phase

9.1.2 (α -Hydroxypropyl)aryl-Verbindungen

In ähnlicher Vorgehensweise konnte die Methode zur Aufklärung der Stereostruktur von α -Acetoxypropylaromaten des Typs **79** (siehe Schema 19) erweitert werden.^[214] Wieder wurde zunächst der Abbau mit einfachen, leicht zugänglichen Verbindungen erprobt. So wurden nach Acetylierung und Oxidation des aromatischen Alkohols *rac*-**79** und des enantiomerenreinen *R*-**79a**^a die erwarteten α -Acetoxybutansäuren, *rac*-**76** und (*R*)-**76**, über GC-MS detektiert.

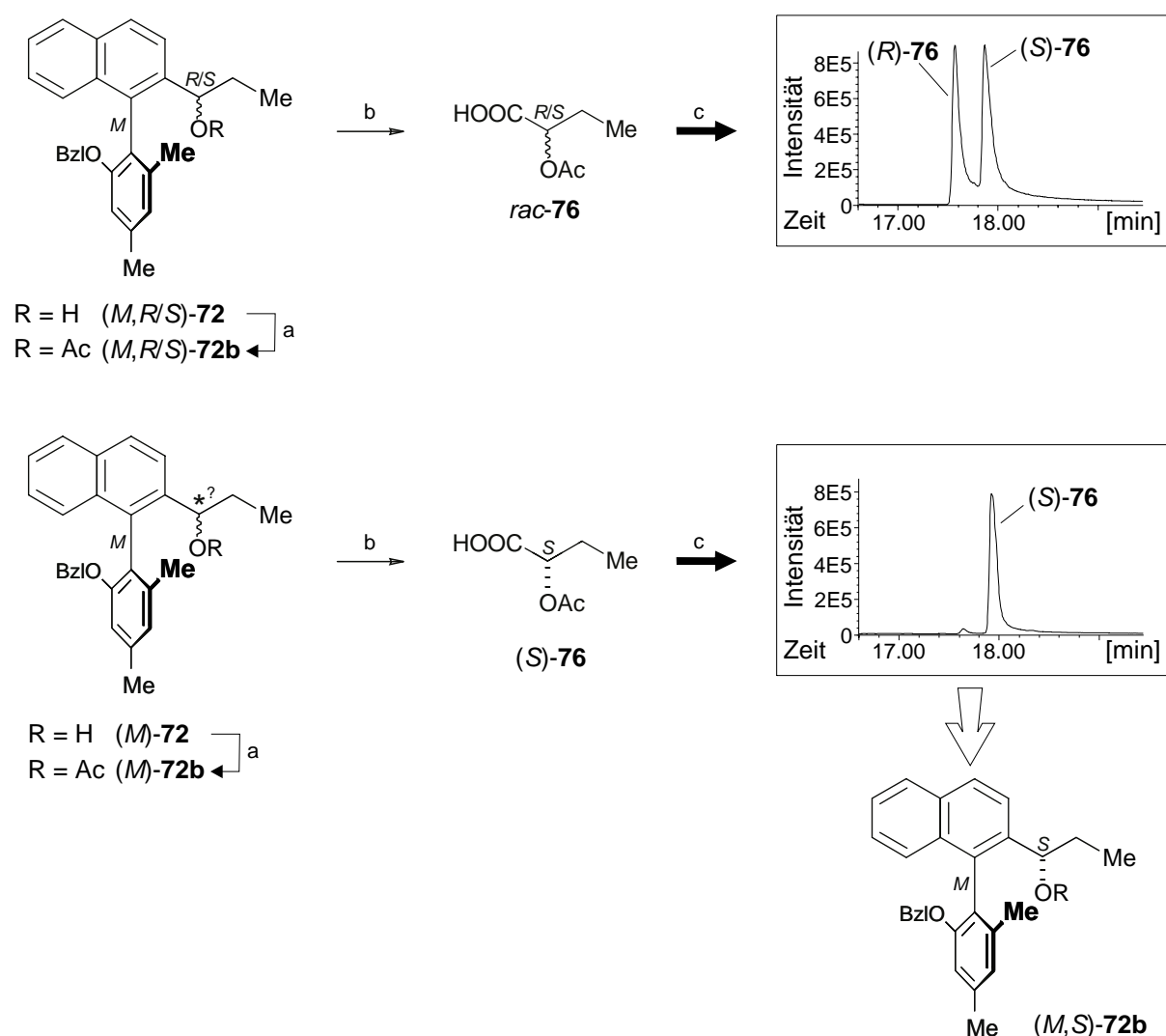


Schema 19. Ergebnisse des oxidativen Abbaus von racemischem und enantiomerenreinem α -Phenylpropanol [*rac*-**79** und (*R*)-**79**]: (a) AcCl, NEt₃; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) GC-MS-Analyse an chiraler CDX-B Phase

^a (*R*)-**79a** wurde in unserem Arbeitskreis durch asymmetrische Addition von Diethylzink an Benzaldehyd hergestellt^[218]

Die Methode wurde zur Aufklärung der Konfiguration des benzylichen Stereozentrums des Biaryls **72** (siehe Schema 20), einer durch atrop-selektiven Alkylierung des konformativ instabilen Biarylaldehyds in unserem Arbeitskreis erhaltenen Substanz^[208,209,219] angewendet:

Die Zuordnung der axialen Konfiguration der Verbindung **72** gelang mit Hilfe der CD-Spektroskopie.^[209] Jedoch war die Aufklärung des benzylichen Stereozentrums aufgrund der im CD-Spektrum dominanten Biarylachse nicht möglich. Hier konnte nun der Ruthenium-katalysierte oxidative Abbau eingesetzt werden. Die Anwendung der Methode führte zu *rac*-**76** für das Biaryl (*M,R/S*)-**72** und zu dem reinen Enantiomer (*S*)-**76** für das reine Isomer von **72**. Dieses Isomer konnte dementsprechend als (*M,S*)-**72** (siehe Schema 20) identifiziert werden. Der oxidative Abbau ermöglicht also eine einfache und schnelle Zuordnung der absoluten Konfiguration von Verbindungen mit benzylichem Stereozentrum.



Schema 20. Derivatisierung und Abbau von (*M,R/S*)-**72** und der diastereomerenreinen Verbindung (*M*)-**72** mit unbekannter Konfiguration am benzylichen Stereozentrum und anschließende Stereoanalyse der Produkte: (a) AcCl, NEt₃; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) GC-MS-Analyse an chiraler CDX-B-Phase

9.1.3 (α -Methoxyethyl)aryl-Verbindungen

In vielen Naturstoffen, wie z.B. in dem Benzofuran **80**,^[201] in Benzopyranen wie **81**,^[204] Dihydrophenanthrenen, z.B. **82**^[200] oder in Anthrachinonen des Typs **83**^[203] (siehe Abb. 47), ist die benzyliche Sauerstofffunktion in *O*-methylierter Form enthalten. Bei den meisten dieser Verbindungen ist die absolute Konfiguration noch nicht aufgeklärt.

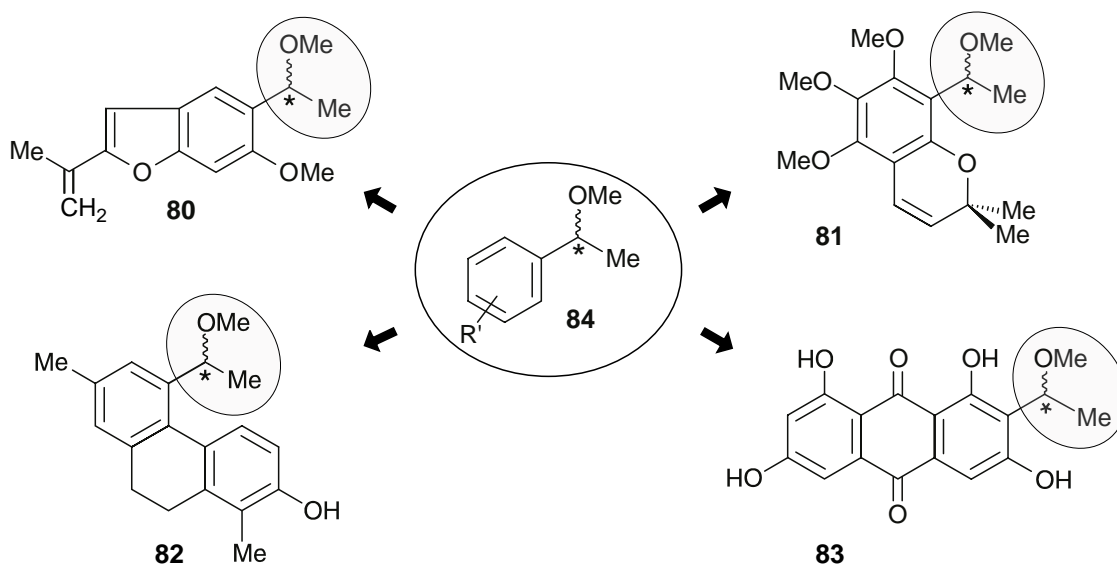


Abb. 47. Naturstoffe mit chiralen (α -Methoxyethyl)aryl Gruppen

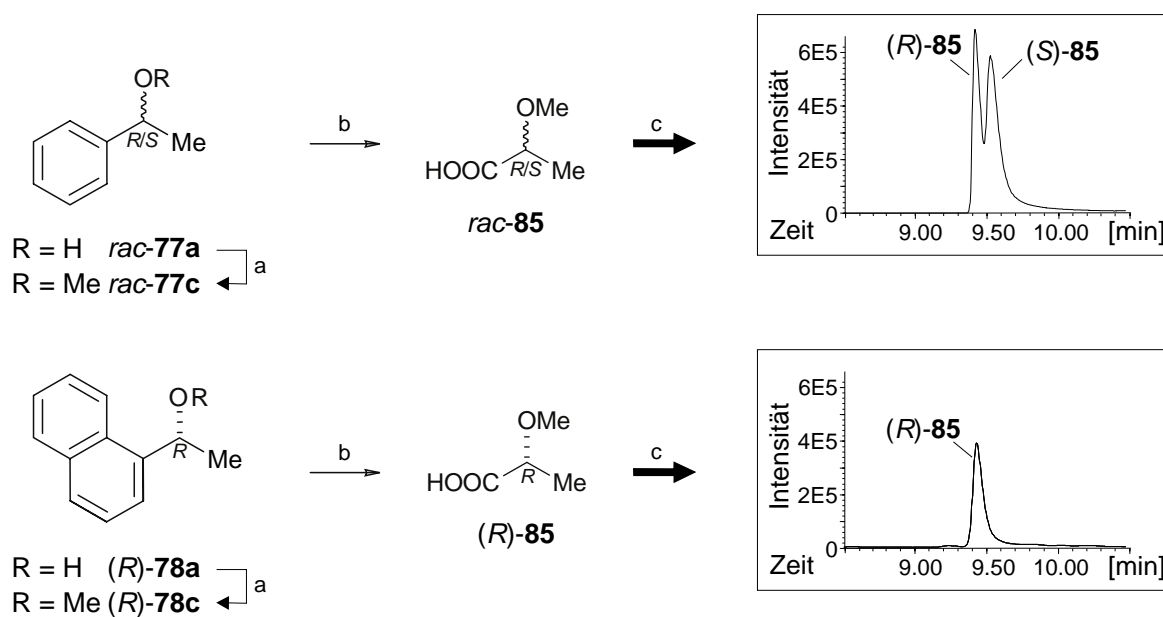
Deshalb wurde der oxidative Abbau auf Substanzen des Typs **84** erweitert.^[214] Wie erwartet, wurde nach der Reaktion von *rac*-**77c** mit $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$ racemische α -Methoxypropionsäure (**85**) im Gaschromatogramm wiedergefunden werden (siehe Schema 21).

Die Trennung von racemischem **85** wurde, ohne weitere Derivatisierung, durch GC-MS-Analyse an chiraler β -DEX-325-Säule erzielt. Durch Koelutionsexperimente mit (*R*)-**85**^a wurden die Signale dem entsprechenden Enantiomer zugeordnet (siehe Tab. 11).

Tab. 11. Strukturen, GC-Retentionszeiten (t_R) und charakteristische Ionen von α -Methoxypropionsäure (**85**) (benutzte GC-Säule: β -DEX 325)

Struktur		t_R (min)	m/z	rel. Int. (%)
	(<i>R</i>)- 85	9.45	58 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{H}_2]^+$	100
	(<i>S</i>)- 85	9.55		

^a (*R*)-**85** wurde nach Literaturvorschrift^[220] hergestellt.

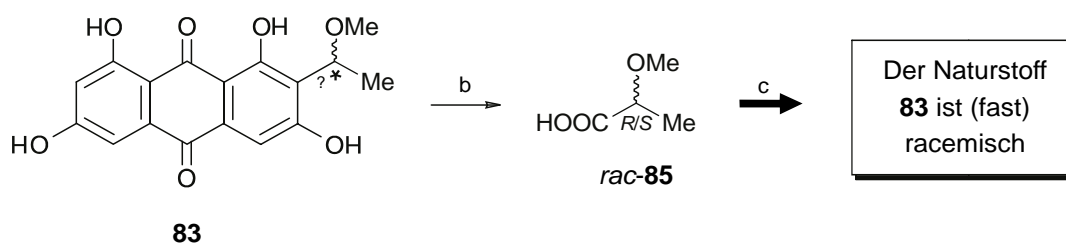


Schema 21. Ergebnisse des oxidativen Abbaus der (α -Methoxyethyl)aryl-Ether *rac*-**77c** und (R)-**78c**: (a) NaH, Me₂SO₄; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) GC-MS-Analyse an chiraler β -DEX-325-Phase

Der oxidative Abbau von (R)-**78c**, das aus käuflichem enantiomerenreinem (R)-**78a** hergestellt worden war, lieferte das Signal des enantiomerenreinen (R)-**85** im Gaschromatogramm. Wie bei der Oxidation von α -Arylarylaceten des Typs **73** oder **74** (siehe Schema 16, S. 84) wurde auch hier keine Racemisierung beobachtet.

Die erste Anwendung der erweiterten Abbau-Methode fand der Naturstoff **83** (siehe Schema 22). 1,3,6,8-Tetrahydroxyanthrachinon **83** war im Arbeitskreis Proksch aus einem in der Literatur nicht beschriebenen Pilz der Gattung *Microsphaeropsis* isoliert worden.^[203] Nach oxidativem Abbau dieses Naturstoffs wurde *per* GC-MS racemisches **85** ohne einen deutlichen Enantiomerüberschuß gefunden (siehe Schema 22). Dies deutet darauf hin, daß **83** fast racemisch in der Natur vorkommt.

Aufgrund eines Vergleichs von experimentell ermittelten mit quantenmechanisch berechneten CD-Spektren wurde dem Anthrachinon **83** die R-Konfiguration zugeordnet. Der unerwartet niedrige $\Delta\epsilon$ -Wert von **83** deutete jedoch auf einen teilweise racemische Charakter des Naturstoffs hin, was wahrscheinlich eine Konsequenz der konfigurativen Instabilität der benzyliischen Alkoholfunktion ist. Der oxidative Abbau bestätigte diese Annahme nochmals: Das Anthrachinon **83** liegt in der Natur racemisch, mit nur einem kleinen Überschuß des R-Enantiomers vor.



Schema 22. Aufklärung der absoluten Konfiguration des natürlichen Anthrachinons **83** mit Hilfe des oxidativen Abbaus: (b) RuCl_3 , NaIO_4 ; (c) GC-MS-Analyse an chiraler β -DEX-325-Phase

9.2 Der Naturstoff Isoshinanolon

Isoshinanolon (**86**, siehe Abb. 48)^[221] ist ein in zahlreichen Pflanzenfamilien, wie z.B. Iridaceae,^[222] Plumbaginaceae,^[223,224] Dioncophyllaceae,^[225,226] Nepenthaceae,^[229] Ancistrocladaceae^[194,199,227,228] und Ebenaceae^[221,230-232] enthaltenes natürliches Tetralon. Der acetogenine Naturstoff **86** wird, ähnlich wie Plumbagin (**87**) in Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae hauptsächlich unter verschiedenen chemischen, physikalischen und biologischen Stressbedingungen, anscheinend alternativ zur unter Normalbedingungen ablaufenden Entstehung acetogener Naphthylisochinolin-Alkaloide,^[199] gebildet.^[233,234]

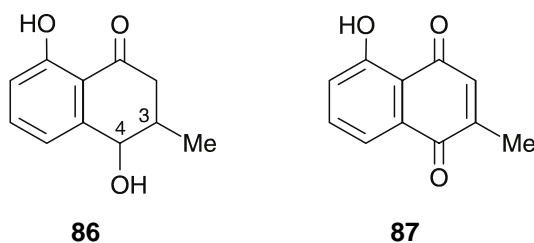


Abb. 48. Isoshinanolon (**86**) und Plumbagin (**87**)

Erstaunlicherweise wurde diesem wichtigen Naturstoff nur wenig Aufmerksamkeit bezüglich seiner Stereoanalyse zuteil. Isoshinanolon (**86**) besitzt vier mögliche stereoisomere Formen (siehe Abb. 49), **86a** (*cis*) und **86b** (*trans*, 'epi-Isoshinanolon')^[230] und deren Enantiomeren *ent*-**86a** ('neo-Isoshinanolon')^[222] und *ent*-**86b** (wieder 'epi-Isoshinanolon' genannt).^[224]

Die relative Konfiguration von Isoshinanolon (**86**) kann leicht durch $^1\text{H-NMR}$ -Analyse der Kopplungskonstanten für das Dublett des Protons an C-4 zweifelsfrei zugeordnet werden. Die Kopplungskonstante zwischen C-3 und C-4 beträgt für das *cis*-Isomer 2.5 Hz und für das *trans*-Isomer 7.5 Hz. Die meisten Pflanzen, in denen Isoshinanolon (**86**) gefunden wurde, produzieren bevorzugt das *cis*-Isomer. Ausnahmen bilden hier *Diospyros canalicata*^[219] und *Plumbago scandens*,^[224] in denen neben dem *cis*- auch das *trans*-Isomer isoliert wurde.

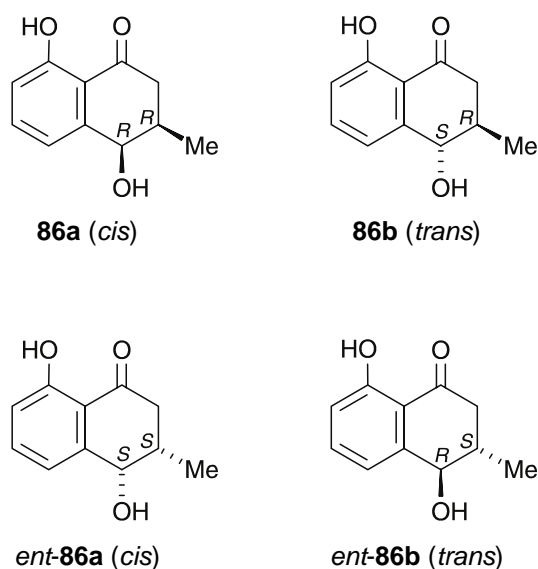


Abb. 49. Die vier möglichen stereoisomeren Formen von Isoshinanolon (**86**)

Im Rahmen von Arbeiten an *Dioncophyllum thollonii* wurden in unserer Gruppe *cis*- und *trans*-**86** isoliert und näher untersucht. Anfängliche Versuche der Konfigurationszuordnung der beiden *cis*-Isomere anhand ihrer Drehwerten führten zu uneinheitlichen Ergebnissen^[235] aufgrund von stark variierenden α_D -Werten in der Literatur: Wie in Tab. 12 ersichtlich schwanken die Drehwerte zwischen -7° ^[221] und $+200^\circ$.^[225]

Aufgrund der starken Variation der Drehwerte vermuteten einige Autoren,^[222,231] daß es sich bei den vermessenen Proben um Enantiomergemische handelte. Erste Versuche zur Aufklärung der absoluten Konfiguration wurden 1973 von Tezuka *et al.*^[221] anhand von *cis*-**86** aus *Diospyros maritima* durchgeführt. Durch Vergleich der CD-Spektren des Dibenzoates von **86** mit denen des Dibenzoates des verwandten Naturstoffes Shinanolon (**88**) (siehe Abb. 50) wurde **86a** die 3*R*,4*R*-Konfiguration zugeordnet.

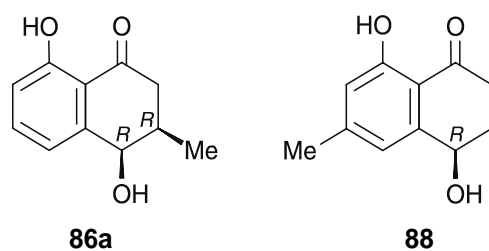


Abb. 50. *cis*-Isoshinanolon (**86**) und das strukturell verwandte Shinanolon (**88**). Die Konformation wurde über CD-Spektren zugeordnet

Tab. 12. Literaturübersicht der stark variierenden α_D -Werte von Isoshinanolon (**86**) aus unterschiedlichen Pflanzen und daraus abgeleitete Konfigurationszuordnungen

Pflanzenmaterial	Relative Konfig.	Absolute Konfiguration ^a	$[\alpha]_D$ (Lösungsmittel)
IRIDACEAE			
<i>Aristea ecklonii</i> ^[222]	<i>cis</i>	3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ^b (teilweise rac?) ^[221,223]	+24° (CHCl ₃)
PLUMBAGINACEAE			
<i>Plumbago zeylanica</i> ^[223]	<i>cis</i>	3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ^b [221]	+24.17° ^c
<i>Plumbago scandens</i> ^[224]	<i>cis/trans</i> ^e	3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> /3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ^g (4:1) ^[221,223]	+19.7° (CHCl ₃)
<i>Ceratostigma minus</i> ^[236]	<i>cis</i>	3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> /3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ^g (1:8) ^[224]	d
<i>Ceratostigma willimottianum</i> ^[237]	<i>cis</i>	3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> /3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ^g (1:15) ^[224]	d
NEPENTHACEAE			
<i>Nepenthes thorelii</i> ^[229]	<i>cis</i>	3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ^{f,g} [221,224]	+20.2° (CHCl ₃ ; <i>c</i> 0.2)
DIONCOPHYLLACEAE			
<i>Dioncophyllum tholloni</i> ^[225]	<i>cis</i>	h ^[221]	+200° (CHCl ₃ ; <i>c</i> 1)
<i>Habropetalum dawei</i> ^[226]	<i>cis</i>	3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ^b [221]	+33° (CHCl ₃ ; <i>c</i> 0.97)
ANCISTROCLADACEAE			
<i>Ancistrocladus barteri</i> ^[194,199]	<i>cis</i>	3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ^b [221]	+20° (CHCl ₃)
<i>Ancistrocladus cochinchinensis</i> ^[227]	<i>cis</i>	3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ^{f,g} [221,226]	positiv ^d
EBENACEAE			
<i>Diospyros maritima</i> ^[221]	<i>cis</i>	3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ^{b,c}	-7° (CHCl ₃ ; <i>c</i> 0.078)
<i>Diospyros canaliculata</i> ^[230]	<i>cis/trans</i> ^e	3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> /3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ^[221] (1:1)	+16° ^d
<i>Diospyros samoensis</i> ^[231]	<i>cis</i>	racemisch?	0° (CHCl ₃ ; <i>c</i> 1)
<i>Diospyros siamang</i> ^[232]	<i>cis</i>	3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ^g	d
<i>Diospyros wallichii</i> ^[232]	<i>cis</i>	3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ^g	d

^aZuordnung durch Vergleich mit den in der angegebenen Literatur zitierten Daten

^bVorläufige oder unsichere Zuordnung (z.B. anhand von widersprüchlichen α_D -Werten)

^cZuordnung anhand von CD-Untersuchungen des Dibenzoates

^dNicht angegeben

^eNicht getrennt

^fKonfiguration ist im Text nicht erwähnt, jedoch graphisch abgebildet

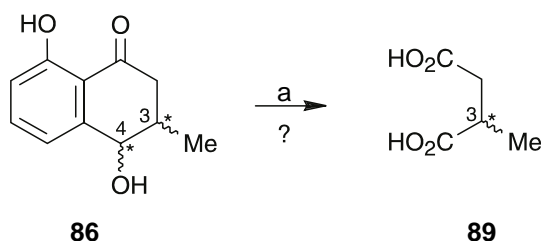
^gEs werden keine Argumente angegeben

^hZuordnung nicht möglich

Die (4*R*)-Konfiguration des Shinanolons (**88**) wurde anhand der Exciton-Chirality-Methode^[212] bestimmt. Da die Ringkonformation entscheidend für den Verlauf eines CD-Spektrums ist, beeinflussen sowohl konformative Wechselwirkungen des eingeführten Benzoatrestes mit der benachbarten Methylgruppe in **86**, als auch das zusätzliche Stereozentrum an C-3 den Verlauf des CD-Spektrums von Isoshinanolon (**86**) im Vergleich zu Shinanolon (**88**). Eine Zuordnung der absoluten Konfiguration nur aufgrund der CD-Spektren ist daher als kritisch zu betrachten und wird selbst vom Autor^[221] nicht als ausreichend beweiskräftig erachtet. Aufgrund dieser Widersprüche in der Literatur sollte im Rahmen dieser Arbeit eine sichere Methode zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Isoshinanolon (**86**) ausgearbeitet werden.^[238]

9.2.1 Aufklärung der absoluten Konfiguration von Isoshinanolon

Für die Bestimmung der Stereostruktur von **86** wurde der schon oben (Kap. 9, S. 82) erwähnte oxidative Abbau herangezogen. Nach Kenntnissen aus der Literatur^[195,215,216,239] sollte eine Umsetzung von Isoshinanolon (**86**) mit RuCl₃/NaIO₄ zur Oxidation des aromatischen Ringes und einem zusätzlichen Verlust einer C₁-Einheit (C-4) führen. Demnach sollte 2-Methylbernsteinsäure (**89**) entstehen (siehe Schema 23).

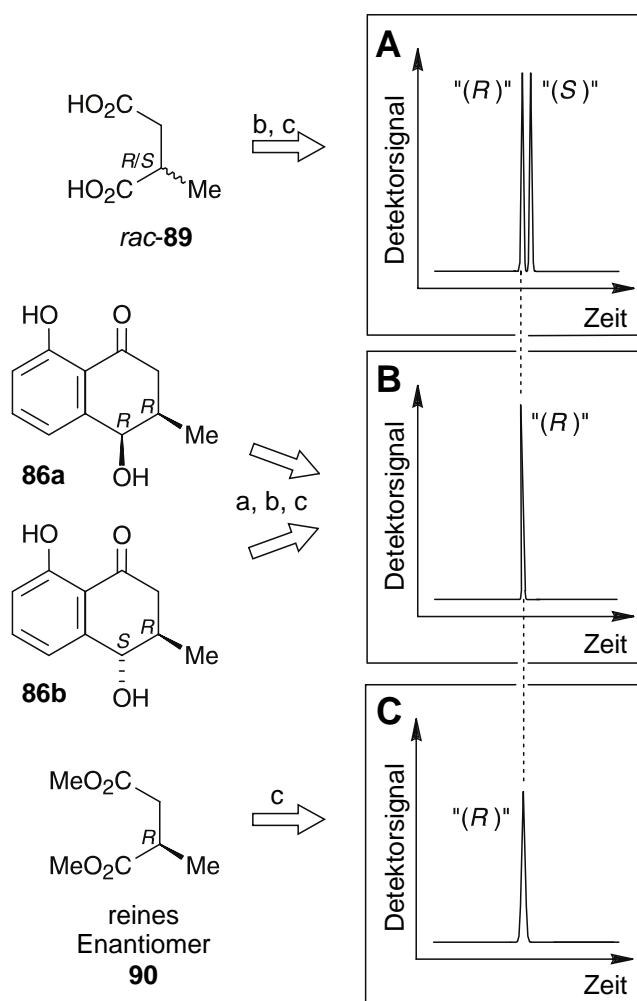


Schema 23. Erwarteter oxidativer Abbau von Isoshinanolon (**86**) zu Methylbernsteinsäure (**89**): (a) RuCl₃/NaIO₄

Anfängliche Abbauprodukte wurden, um wertvolles natürliches **86** zu sparen, mit partialsynthetisch hergestelltem Isoshinanolon^a durchgeführt. Der unter Standardbedingungen^[195] durchgeführte oxidative Abbau von **86** lieferte auch tatsächlich 2-Methylbernsteinsäure (**89**), das nach Veresterung mit MeOH/SOCl₂ als 2-Methylbernsteinsäuredimethylester (**90**) mit GC-MSD als einzig detektierbares Fragment von **86** mit den Massen [*m/z* (rel. Int.) 129 (27), 128 (18), 101 (14), 100 (11), 87 (10), 69 (11), 59 (100)] nachgewiesen wurde. Ein identisches Massenspektrum wurde von käuflichem Material gefunden. Als Nächstes galt es, für das Abbauprodukt eine geeignete Enantiomerenanalytik zu erstellen. Dies wurde durch Gaschromatographie des Diesters von **89** an einer chiralen β-DEX-325-Kapillarsäule erreicht.

^a Isoshinanolon (**86**) wurde von K. Messer^[240] durch LiAlH₄-Reduktion (in Anlehnung an eine literaturbekannte Vorschrift^[221]) aus Plumbagin (**87**) hergestellt.

Die Zuordnung der beiden beobachteten Signale zu der absoluten Konfiguration der Enantiomere erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten nach Analyse von käuflichem enantiomerenreinem 2-(*R*)-Methylbernsteinsäuredimethylester (*R*-**90**, Aldrich) unter gleichen analytischen Bedingungen. Das frühere Signal mit einer Retentionszeit von $t_R = 13$ min konnte eindeutig dem *R*-Enantiomer zugewiesen werden, während das *S*-Enantiomer bei $t_R = 13.1$ min eluiert (siehe Schema 24).



Schema 24. GC-MS-Gaschromatogramme von racemischem (A) und (*R*)-konfiguriertem 2-Methylbernsteinsäuredimethylester (**90**) (C) sowie Ergebnisse des oxidativen Abbaus von *cis*- und *trans*-Isoshinanolon (**86a** und **86b**) aus *D. thollonii* (B). Reaktionsbedingungen: (a) RuCl_3 , NaIO_4 ; (b) MeOH , SOCl_2 ; (c) Gaschromatographie an einer chiralen β -DEX-325-Säule

Mit dieser erstellten Methode wurde der Abbau von *cis*- und *trans*-Isoshinanolon (**86**), das in unserer Arbeitsgruppe^[241] aus *D. thollonii* isoliert worden war, durchgeführt. Nach Veresterung und GC-MSD-Analyse konnte das Signal des *R*-Enantiomeres von **90** beobachtet werden (siehe Schema 24). Beide Isomere lagen in enantiomerenreiner Form vor. Aufgrund

der aus NMR-Untersuchungen bekannten relativen Konfiguration wurden deshalb den Naturstoffen **86a** und **86b** die absoluten Konfigurationen $3R,4R$ und $3R,4S$ zugewiesen.

Die Methode des oxidativen Abbaus erlaubte zusätzlich die Erstellung eines chiralen HPLC-Verfahrens zur Aufklärung der absoluten Konfiguration des Naturstoffes **86**: Nach Trennung der vier Stereoisomere an chiraler HPLC-Phase wurden den erhaltenen Signalen durch Koelutionsexperimente mit den vier individuellen Tetralon-Isomeren ihre absolute Konfiguration zugeordnet (siehe Abb. 51). Durch Anwendung der erhaltenen chiralen HPLC-Analytik ist es in Zukunft möglich die relative und absolute Konfiguration jedes isolierten Isoshinanolons (Mischung) schnell und sicher aufzuklären.^[238]

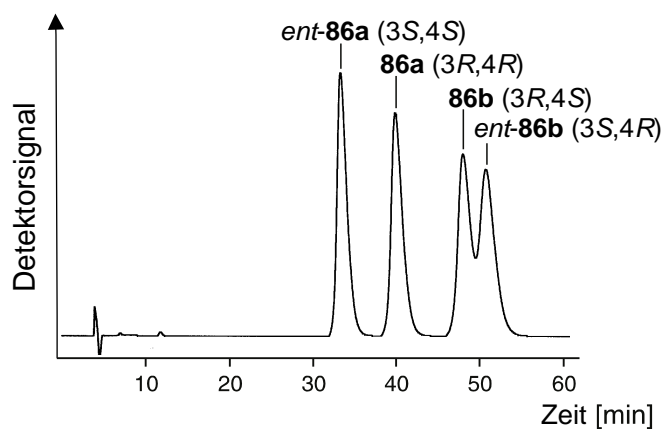
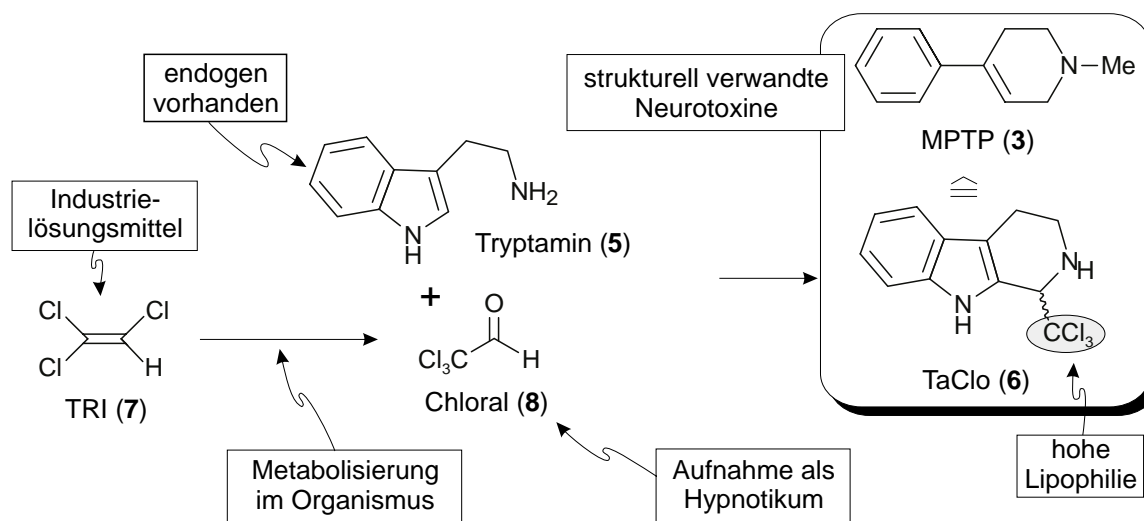


Abb. 51. Chirale HPLC der vier Stereoisomere von Isoshinanolon (Chiralcel OD-H) und Zuordnung der absoluten Konfigurationen

10 Zusammenfassung

Die kausalen Ursachen, die zur Auslösung der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson führen, sind noch immer unklar. Man nimmt heute an, daß das Absterben dopaminergener Neurone im Mittelhirn von Parkinsonpatienten multifaktoriell ausgelöst wird. Genetische Prädisposition sowie endogene und exogene Umweltgifte wie etwa Substanzen, die strukturelle Ähnlichkeit mit dem bekanntesten dopaminergen Neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,5-tetrahydropyridin, **3**, siehe Schema 25)^[21,22] besitzen, werden als Hauptursachen für die Entstehung des Parkinsonsyndroms diskutiert.^[14,15,56]



Schema 25. Mögliche Entstehung des Neurotoxins TaClo (**6**) und strukturelle Verwandtschaft zu MPTP (**3**)

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit einer neuen Klasse von neurotoxisch wirksamen Tetrahydro- β -carbolinen, die sich von Trichloracetaldehyd (Chloral, **8**) ableiten. Die wohl prominenteste Verbindung in dieser Reihe ist TaClo (1-Trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin, **6**), das im menschlichen Körper nach Aufnahme des Schlafmittels Chloralhydrat (**8**·H₂O) durch Pictet-Spengler-Kondensation mit dem endogen vorhandenen Tryptamin (**5**) gebildet wird.^[31] Zusätzlich scheint die Bildung von TaClo (**6**) aus dem Industrielösungsmittel TRI (Trichlorethylen, **7**), das im Organismus zu Chloral (**8**) metabolisiert wird, möglich (siehe Schema 25).^[24] Die über **8** eingeführte große CCl₃-Gruppe erhöht die Lipophilie von TaClo (**6**), die Passage der Blut-Hirn-Schranke ist erleichtert.^[25] In der Tat haben zahlreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* gezeigt, daß TaClo (**6**) toxische Prozesse in dopaminergen und serotonergen Systemen zu induzieren vermag.^[29]

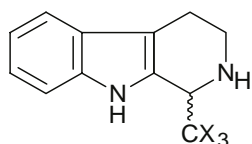
Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, die *in-vivo*-Entstehung und Metabolisierung von TaClo (**6**) im Menschen sowie den Einfluß dieses Neurotoxins auf die DNA herauszuarbeiten und näher zu untersuchen.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

TaClo schädigt die DNA, wie Versuche an zellfreier DNA und *in-vitro*-Experimente an PC12-Zellen belegen.

- In Belichtungsexperimenten mit DNA wurden Radikalprozesse initiiert, wie sie ähnlich auch in der Zelle, z.B. durch oxidativen Streß stattfinden können. Es wurde gezeigt, daß TaClo (**6**) bei Belichtung ($\lambda = 300$ bzw. 350 nm) in Gegenwart von DNA eine reaktive Spezies bildet, die das Phosphat-Zucker-Gerüst der DNA schädigt.
- In einer vergleichenden Studie mit den TaClo-analogen β -Carbolenen TaBro (1-Tribrommethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin, **41**), TaFlu (1-Trifluormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin, **40**) und Eleagnin (1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin, **39**) wurde beobachtet, daß die unterschiedlichen Tendenzen der Halogene F, Cl, und Br homolytische Bindungsspaltung einzugehen, in etwa mit dem Ausmaß der DNA-schädigenden Wirkung dieser Verbindungen korrelierte (siehe Tab. 13). Damit wird deutlich, daß das DNA-toxische Potential von TaClo in engem Zusammenhang mit der für dieses Molekül charakteristischen CCl_3 -Gruppe steht.^[79]

Tab. 13. Vergleich der Plasmid-DNA-schädigenden Wirkung von Eleagnin (**39**) und der Trimethylhalogen-tetrahydro- β -carboline **6**, **40** und **41** bei Belichtung



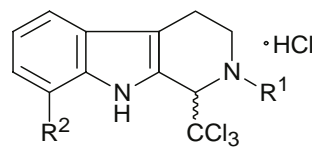
X	Schädigender Effekt auf pBR322-DNA (300 nm, 1 mM, 10 min)	
H	39	40%
F	40	28%
Cl	6	38%
Br	41	49%

- Untersuchungen zur Wechselwirkung von TaClo mit Kalbsthymus-DNA lieferten uneinheitliche Ergebnisse. TaClo (**6**) scheint nur eine geringe DNA-Bindungsaffinität zu besitzen, wie Verdrängungsversuche mit **6** in Gegenwart von DNA nach Interkalation mit Ethidiumbromid zeigen. Erst die Zugabe eines großen Überschusses an **6** bewirkte eine kleine Abschwächung der gemessenen Emissionsintensität.^[79]
- Weiterhin wurde untersucht, ob TaClo fähig ist, in einer Fenton-ähnlichen Reaktion ein reaktives Intermediat zu bilden, das DNA-spaltende Prozesse initiieren kann. Tatsächlich war im Dunkeln in Gegenwart von Cu(II) eine verstärkte schädigende Wirkung von TaClo auf pBR322-DNA festzustellen. Anhand der charakteristischen UV-Absorption eines Cu(I)-Komplexes wurde die Bildung von Cu(I) verfolgt. Aufgrund der DNA-

fragmentierenden Wirkung von Cu(I) selbst, ist es jedoch bislang unklar, ob die bei den TaClo/Cu(II)-Experimenten festgestellte DNA-Schädigung auf ein reaktives TaClo-Intermediat oder auf Cu(I) zurückzuführen ist.^[79]

- TaClo (**6**), fünf *N*-Alkylderivate (**44-47**) sowie 8-Methyl-TaClo (**48**) zeigten eine hohe Cytotoxizität gegenüber neuronalen PC12-Zellen (siehe Tab. 14). Der zellschädigende Effekt lag bei allen in der ungefähr gleichen Größenordnung, wobei *N*-Hexyl-TaClo (**47**) über eine geringfügig stärkere Cytotoxizität gegenüber diesen Neuronen-ähnlichen Zellen verfügt. Dies ließ sich auf die leicht erhöhte Lipophilie dieser Verbindung und die daraus resultierende schnellere passive Aufnahme in die Zelle zurückführen. Die direkte Korrelation der Cytotoxizitäten der untersuchten Derivate mit ihrer Fähigkeit, den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zu inhibieren (siehe Tab. 14), verdeutlichen den unspezifischen Aufnahmemechanismus durch Diffusion in die Zelle.^[97]

Tab. 14. Vergleich der schädigenden Wirkung der TaClo-Derivate **6**, **44-48** auf PC12-Zellen mit dem Potential dieser Verbindungen, den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette zu inhibieren

					
R ¹	R ²		Cytotox. gegenüber PC12- Zellen ED ₅₀ [μM]	Inhibierung von Komplex I IC50 [μM] ^[99]	
H	H	6	250	200	
Me	H	44	200	150	
Et	H	45	300	300	
<i>n</i> Bu	H	46	310	250	
<i>n</i> Hexyl	H	47	120	150	
H	Me	48	190	200	

- Wie Untersuchungen der DNA aus TaClo-inkubierten PC12-Zellen zeigten, schädigt das Neurotoxin **6** die Zellen je nach Konzentration mit unterschiedlichen Mechanismen. Bei niedriger Konzentration (250 μM) wurde Apoptose anhand der charakteristischen DNA-Fragmentierung nachgewiesen. Auch bei Parkinsonpatienten vermutet man, daß die dopaminergen Neuronen durch diese Art von Zelltod zugrunde gehen. In hohen Konzentrationen tauchte diese DNA-Spaltung nicht mehr auf, die Zellen gingen nekrotisch zugrunde.^[97]

Die endogene Bildung von TaClo in Chloralhydrat-behandelten Patienten und die *in-vitro*-Entstehung von **6** aus Trichlorethylen (**7**) wurde eindeutig bewiesen (siehe Schema 25, S. 97).^[72,123]

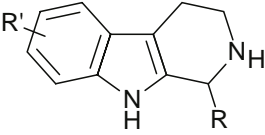
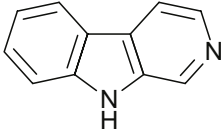
- Basierend auf der für Tetrahydro- β -carboline typischen Retro-Diels-Alder-Fragmentierungen wurden, unter Ausnutzung des Isotopenmusters der Cl₃-Verbindung, SRM-Experimente entwickelt, die einen zweifelsfreien Nachweis geringster Mengen des Neurotoxins **6** auch aus komplexer Matrix mittels HPLC-ESI-MS-MS erlauben. Durch parallele Detektion von [D₄]-TaClo, welches vor der Aufarbeitung zu der zu bestimmenden Probe gegeben wurde, gelang die Abschätzung der TaClo-Konzentration in den Analysenlösungen.^[123]
- Mit dieser Methode wurde im Blut von neun der 16 mit Chloralhydrat behandelten Patienten TaClo (**6**) detektiert. Der Nachweis des Neurotoxins **6** gelang außerdem in drei der insgesamt acht Urinproben von Kindern, denen ebenfalls das Schlafmittel **8** verabreicht worden war. Die hohen Blutwerte an **6** im Blut eines Jungen der lange Jahre große Dosen (täglich ein Gramm) Chloralhydrat (**8**·H₂O) zu sich genommen hatte, gaben einen ersten Hinweis auf die Anreicherung des lipophilen TaClo im menschlichen Körper.
- Wie die Umsetzung von Tryptamin (**5**) und TRI (**7**) in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen und NADPH zeigte, muß tatsächlich von einer Entstehung von TaClo aus dem Industrielösungsmittel **7** ausgegangen werden. Dieser Befund wurde zusätzlich bestätigt durch den Nachweis von TaClo (**6**) im Blut einer Frau, die sehr wahrscheinlich einer Trichlorethylen-Exposition ausgesetzt war.
- Die Ergebnisse der Umfrage bei Parkinsonpatienten die Kontakt mit Trichlorethylen hatten, erhärtete die Vermutung eines Zusammenhanges zwischen Trichlorethylen und der Parkinsonschen Krankheit: Die ersten Parkinsonsymptome traten bei den Umfrageteilnehmern ca. fünf Jahre vor dem statistischen Erkrankungsalter auf. Die Teilnahme überdurchschnittlich vieler Patienten mit familiärer Veranlagung für die Krankheit ließ auf eine genetische Hypersuszeptibilität gegenüber Neurotoxinen schließen.

Stereostrukturelle Aspekte der Bildung und Verstoffwechslung von TaClo wurden aufgeklärt und TaClo-Metabolite in *in-vitro*- und *in-vivo*-Proben identifiziert.^[123]

- Wie HPLC-MS-MS-Untersuchungen an chiraler Phase von TaClo im Blut eines Chloralhydrat-behandelten Jungen zeigten, entsteht das Neurotoxin **6** in racemischer Form im menschlichen Körper. TaClo (**6**) wird also wahrscheinlich nicht enzymatisch, sondern spontan durch Pictet-Spengler-Kondensation gebildet.

- Zusätzlich wurden Hinweise auf eine enzymatische Metabolisierung von TaClo gefunden: TaClo (**6**) lag in einigen Urinproben von Ratten, die mit dem Neurotoxin **6** behandelt worden waren, in einem *S*-Enantiomer-Überschuß vor.
- *In-vitro*-Versuche zur Metabolisierung von TaClo mit Rattenlebermikrosomen und neuronalen PC12-Zellen verdeutlichten die ausgeprägte Verstoffwechslung in der Leber: Nach Umsetzung von TaClo mit Lebermikrosomen beobachtete man weitaus mehr TaClo-Abkömmlinge als mit PC12-Zellen (siehe Tab. 15)
- Wie *in-vivo*-Untersuchungen der Stoffwechselprodukte von TaClo im Urin von TaClo-behandelten Ratten und Mäusen zeigten, findet wahrscheinlich eine Spezies-spezifische Metabolisierung statt (siehe Tab. 15).
- Der in früheren Arbeiten gefundene Hauptmetabolit OH-TaClo (**30**) wurde in keiner humanen Probe, in der im Vorfeld TaClo detektiert worden war, gefunden.

Tab. 15. Metabolisierungsprodukte von TaClo (**6**) *in vitro* und *in vivo*

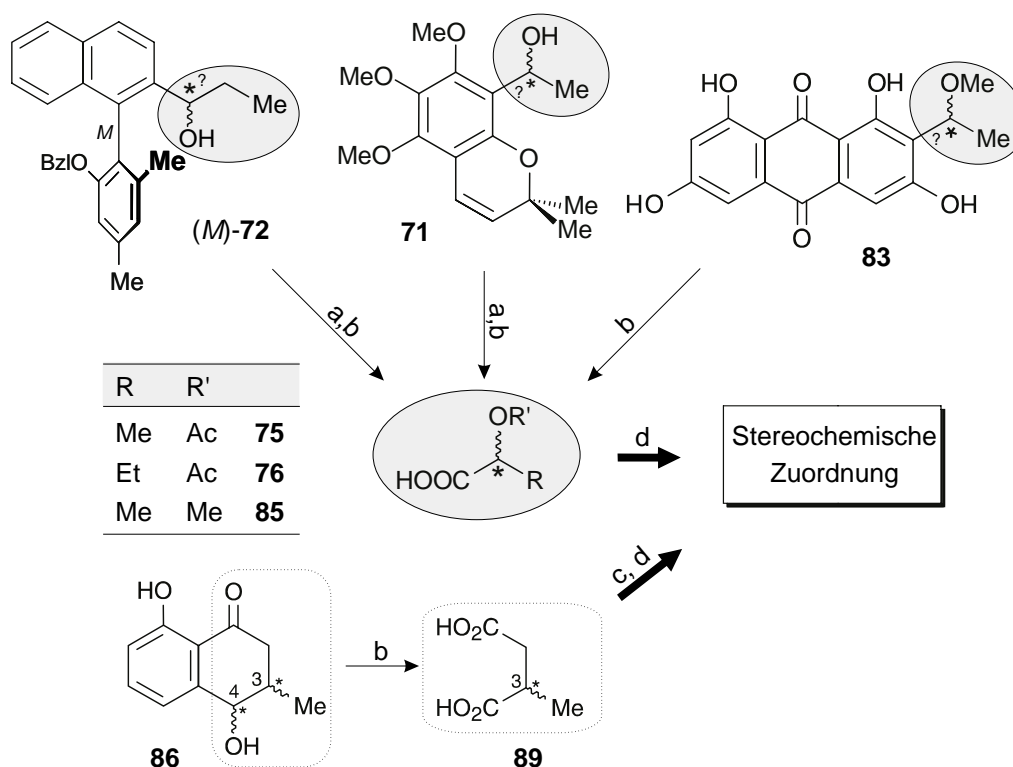
	R'	R		Mikrosomen	PC12 Zellen	Mäuseurin	Rattenurin	Human-proben
	OH	H	30	+	-	+	+	-
	H	CCl ₂ =	60	+	-	-	+	n.d.
	H	CHCl ₂	29	+	+	-	+	n.d.
 Norharman (34)	H	H	61	-	-	(+)	(+)	n.d.
	H	COOH	32	+	+	+	+	n.d.
	OH	COOH	33	+	-	-	-	n.d.
			34	-	-	(+)	(+)	n.d.

+ eindeutig als Metabolisierungsprodukt von TaClo identifiziert
 (+) keine eindeutige Identifizierung als Metabolisierungsprodukt
 - kein Metabolisierungsprodukt von TaClo
 n.d. wurde nicht untersucht

Es gelang, die bereits im Arbeitskreis etablierte Methode des oxidativen Abbaus^[195] zur Aufklärung der absoluten Konfiguration von Tetrahydropyridin-Heterocyclen [z.B. Eleagnin (**39**)] auf Substanzen mit benzyli-scher Hydroxy- oder Metylether-Gruppe zu erweitern.^[203,214,238]

- Geringe Mengen (1-2 mg) an Substanzen, die in benzyli-scher Position eine chirale Sauerstofffunktion besitzen, wurden durch Ruthenium-katalysierte Oxidation zu GC-gängigen Säuren abgebaut (siehe Schema 26), deren absolute Konfiguration nach

Trennung an chiraler Phase durch Vergleich mit enantiomerenreinem Referenzmaterial bestimmt wurde. Diese Zuordnung erlaubte den Rückschluß auf die absolute Konfiguration der Ausgangsverbindungen. Unter Verwendung dieser Methode wurde dem aus Blättern von *Melicope ptelefolia* (Rutaceae) stammenden Benzopyran **71** sowie dem in unserer Arbeitsgruppe durch stereoselektive Alkylierung synthetisierten Biaryl **72** die *S*-Konfiguration an benzylicher Position zugeordnet.^[214] Das Anthrachinon **83**, isoliert aus einem Pilz der Gattung *Microsphaeropsis*, wurde als teilweise racemisch identifiziert.^[203]



Schema 26. Zuordnung der absoluten Konfiguration der Verbindungen **71**, **72**, **83** und **86** (Isoshinanolon) durch die Methode des oxidativen Abbaus (a) AcCl, NEt₃; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) MeOH, SOCl₂; (d) GC-MS-Analyse an chiraler Phase

Ebenfalls durch Ruthenium-katalysierten Abbau wurde die absolute Konfiguration von Isoshinanolon (**86**), dessen Stereostruktur bis dahin in der Literatur^[194,199,221-232] widersprüchlich beschrieben worden war, aufgeklärt. Der Naturstoff **86** aus *Dioncophyllum thollonii* wurde zu Methylbernsteinsäure (**89**) abgebaut und die absolute Konfiguration nach Veresterung mit MeOH/SOCl₂ durch 'chirale' GC/MS-Analyse bestimmt (siehe Schema 26). Mit der ermittelten *R*-Konfiguration von Methylbernsteinsäure (**89**) wurde schließlich, unter Kenntnis der relativen Konfiguration von **86** aus NMR-Untersuchungen, dem Naturstoff **86** die absolute Konfiguration *3R,4R* für *cis*- und *3R,4S* für *trans*-Isoshinanolon zugeordnet.^[238]

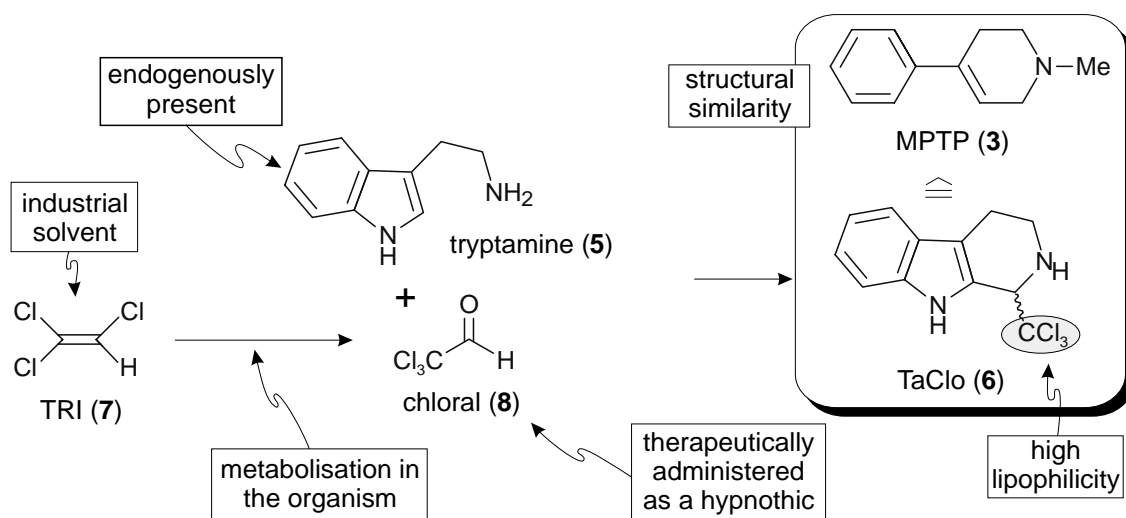
Ausblick:

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die neuropharmakologische Aktivität des hochhalogenierten β -Carbolins TaClo (**6**) zu einem großen Teil auf die instabile CCl_3 -Gruppe im Molekül zurückzuführen ist. TaClo bildet sich im menschlichen Organismus nicht nur nach Aufnahme des Hypnotikums Chloral, sondern entsteht offenbar auch nach Exposition zu dem früher gebräuchlichen Industrielösungsmittel TRI, wodurch eine Verbreitung des Heterocyclus **6** in weiten Teilen der Bevölkerung nicht auszuschließen ist. Im Hinblick auf die Beantwortung der komplexen Frage, ob das dopaminerge Neurotoxin **6** tatsächlich an der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit beteiligt sein könnte, sind in Zukunft noch weitere Untersuchungen nötig, die die Relevanz des Neurotoxins für einen neurodegenerativen Krankheitsprozess belegen. In diesem Zusammenhang sollte vor allem die Bioaktivierung von TaClo näher betrachtet werden: es gilt zu klären, ob TaClo analog MPTP durch Aktivierung mit Enzymen wie z.B. den Monoaminoxidasen A und B verstoffwechselt wird oder aufgrund einer inhibierenden Wirkung auf die Tyrosinhydroxylase, ähnlich wie andere Neurotoxine, Störungen im Catecholmetabolismus induziert.

Auch die Frage, inwieweit TaClo oder ein aktiver TaClo-Metabolit die DNA beeinflusst oder verändert, gilt im Zusammenhang zur neurotoxischen Aktivität von TaClo näher zu betrachten. Zukünftige Studien zu diesen Fragestellungen sollen dazu beitragen, das tatsächliche Potential des dopaminergen und serotonergen Neurotoxins TaClo für den Krankheitsverlauf des Morbus Parkinson beim Menschen genauer abschätzen zu können.

11 Summary

Causative factors responsible for nerve cell death in neurodegenerative diseases like Parkinson's disease (PD) still remain unknown. The hypothesis that PD is the result of the interaction of multiple factors causing an age-related selective loss of dopaminergic neurons in the midbrain of patients suffering from PD has recently been challenged: genetic predisposition, endogenously formed compounds or environmental toxins structurally related to the well-known dopaminergic neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, **3**, see Scheme 25)^[21,22] may play an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease.^[14,15,56]



Scheme 25. Formation of the neurotoxin TaClo (**6**), structurally closely related to MPTP (**3**)

Our research efforts focus on a new class of neurotoxic tetrahydro- β -carbolines which derive from trichloroacetaldehyde (chloral, **8**). The most prominent representative of this new class of highly halogenated heterocycles is TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, **6**), which was found to occur in the human body after application of the hypnotic chloral hydrate (**8**·H₂O). TaClo is speculated to be formed spontaneously *in vivo* by a Pictet-Spengler-type condensation from chloral (**8**) and the endogenously present tryptamine (**5**).^[31] The formation of TaClo is also assumed to take place after exposure to the industrial solvent TRI (trichloroethylene, **7**) which is metabolized to chloral in the organism (see Scheme 25).^[24] Due to the high lipophilicity of the CCl₃ group, TaClo was found to easily penetrate the blood-brain barrier.^[25] Several *in vivo* and *in vitro* studies revealed TaClo (**6**) to be capable to induce toxicity to dopaminergic and serotonergic neurons.^[29]

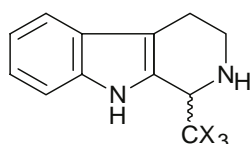
Major objectives of this work dealt with investigations concerning the *in vivo* occurrence of TaClo in man (*e.g.*, after intake of chloral hydrate) and its metabolism in mammalian organisms. Furthermore, for the first time, the potential of TaClo to trigger DNA damaging processes was studied more closely.

The following results were obtained:

TaClo is able to damage the DNA as shown in experiments with cell-free plasmid DNA and *in vitro* experiments using PC12-cells.

- In irradiation experiments with cell-free plasmid DNA radical processes were induced, which can also be conceivable in the cell, *e.g.* caused by oxidative stress. After irradiation ($\lambda = 300$ resp. 350 nm) TaClo in the presence of DNA formed a reactive species which damaged the phosphate-sugar-scaffold of the DNA.
- A comparative study with TaClo analogs such as TaBro (1-tribromomethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, **41**), TaFlu (1-trifluoromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, **40**), and eleagnine (1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, **39**) resulted in the following findings: the different tendencies of the halogens F, Cl, and Br involved to produce radicals by homolytic bond cleavage correlate in part with the extent of DNA damaging effects exhibited by **6**, and **39-41** (see Tab. 13). Thus, it became obvious that the light-induced formation of reactive species (probably radicals) resulting in a distinct toxicity of the β -carbolines **6** and **41** towards DNA is strongly influenced by the huge trichloro- and tribromomethyl groups of TaClo and TaBro.^[79]

Table 13. Comparison of the DNA nicking effects exhibited by eleagnine (**39**) and the trihalogenetetrahydro- β -carbolines **6**, **40**, and **41** after irradiation.



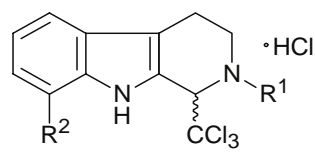
X		damaging effect on pBr322-DNA (300 nm, 1 mM, 10 min)
H	39	40%
F	40	28%
Cl	6	38%
Br	41	49%

- Studies on the interaction of TaClo with calf-thymus DNA gave inconsistent results. Due to the small displacement of intercalated ethidium bromide by TaClo in the presence of DNA, TaClo seems to have a small DNA binding affinity. Only a large excess of TaClo exhibited a small decrease of emission intensity.^[79]
- Furthermore, it was examined whether TaClo is able to undergo a Fenton-like reaction producing a reactive TaClo-derived intermediate that might be involved in nicking processes towards DNA. Indeed, the damaging potential of TaClo towards DNA was increased in the presence of Cu(II) in the dark. With the characteristic UV absorption of a Cu(I) complex, the formation of Cu(I) was traced. Due to the damaging potential of Cu(I),

it is not clear whether the damaging effect in the experiments with Cu(II) salts resulted from TaClo or from the formed Cu(I) ions.^[79]

- TaClo, five of its *N*-alkyl derivatives (**44** – **47**), and 8-methyl-TaClo (**48**) showed a high cytotoxicity against neuronal PC12 cells (see Tab. 14). All cell-damaging effects were observed to be in the same level, with a slightly higher cytotoxicity of *N*-hexyl-TaClo (**47**) against the neuron-like PC12 cells. Due to the higher lipophilicity of **47**, there is a distinct passive uptake into the cells. Moreover, the strong correlation between the cytotoxicities of the tetrahydro- β -carbolines examined and their ability to inhibit the complex I of the mitochondrial respiratory chain (see Tab. 14) hints at an unspecific uptake mechanism by diffusion into the cells.^[97]

Table 14. Comparison of the damaging effect exhibited by the TaClo-derivatives **6**, **44** – **48** with their potential to inhibit the mitochondrial respiratory chain

		R ¹	R ²	Compound	cytotoxicity of TaClo against PC12-cells ED ₅₀ [μ M]	inhibition of complex I IC50 [μ M] ^[99]
	H	H	6	250	200	
	Me	H	44	200	150	
	Et	H	45	300	300	
	<i>n</i> Bu	H	46	310	250	
	<i>n</i> Hexyl	H	47	120	150	
	H	Me	48	190	200	

- Monitoring by gel electrophoresis of scissions to DNA isolated from PC12 cells after incubation of TaClo showed that TaClo is capable to induce cell damage according to two different mechanisms: At low concentrations (250 μ M), apoptosis was detected by its characteristic DNA fragmentation pattern. This kind of cell death is also supposed to be involved in the dopaminergic death of neurons in Parkinson's disease. At higher concentrations, DNA fragmentation was no longer observed. PC12 cells died necrotically.^[97]

It has been proven that TaClo is formed in patients after application of chloral hydrate. TaClo formation from trichloroethylene (see Scheme 25, p. 104) was detected in *in vitro* after incubation of the solvent and tryptamine with liver microsomes.^[72,123]

- Applying on-line coupling of high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS), a sensitive assay for the

determination of TaClo was elaborated. Based upon the typical retro-Diels-Alder fragmentation reaction, selected reaction monitoring (SRM) experiments were performed by monitoring the molecular ion peaks of TaClo, m/z 289 (for $[^{35}\text{Cl}_3]\text{TaClo}$) and m/z 291 (for $[^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}_2]$ isotopomer). Detection of the resulting fragments, m/z 260 and m/z 262, with the expected statistical chlorine isotopic intensities of 100:96 confirmed the identity of the TaClo molecule. Addition of $[\text{D}_4]\text{-TaClo}$ as internal standard to the human whole blood samples prior to workup allowed a reliable estimation of the TaClo concentrations endogenously present.^[123]

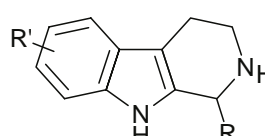
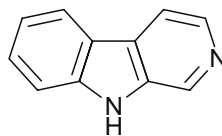
- TaClo was detected in blood samples of nine out of 16 patients treated with chloral hydrate. The detection of the neurotoxin was also achieved in three out of eight urine samples of children after intake of **8**. The high values of **6** found in a boy treated with high doses of chloral hydrate (**8**·H₂O) (daily dose: 1 g), are first hints of an accumulation of the lipophilic TaClo in the human body.
- As obvious from the detection of TaClo in rat liver microsomes after incubation of tryptamine (**5**) with TRI (**7**) in the presence of NADPH, the formation of TaClo after exposition to the industrial solvent **7** has to be considered. The first detection of TaClo (**6**) in blood samples of a woman, who was exposed to trichloroethylene in a dry cleaners' factory, corroborated the condensation of the TRI metabolite chloral with tryptamine to possibly occur *in vivo*.
- A survey on patients suffering from PD, who had contact with trichloroethylene, confirmed the assumption of a relationship between TRI and Parkinson's disease: First parkinsonian symptoms had appeared about five years before the statistical age the illness mainly becomes manifest. Due to the fact that a familial disposition to PD amongst the patients participating in this survey was higher than the statistical average, a genetic hypersusceptibility against neurotoxins could be deduced from these results.

First results concerning the mechanism of the spontaneous formation of TaClo in man and the participation of enzymatically mediated pathways in the metabolic degradation of TaClo in mammalian organisms were achieved. Novel TaClo metabolites were identified in *in vivo* and *in vitro*.^[123]

- As demonstrated by HPLC-MS-MS experiments employing a reversed-phase chiral HPLC column for the separation of the two TaClo enantiomers, TaClo was found to be racemically present in a blood sample of an epileptic boy treated daily with 1 g of chloral hydrate. Therefore, TaClo (**6**) is supposed not to be formed enzymatically, but spontaneously by a Pictet-Spengler-type condensation from tryptamine and chloral.

- (*R*)-TaClo and (*S*)-TaClo seem to behave pharmacokinetically different. Our findings from animal studies on rats and mice hint at an enzyme-catalyzed degradation of the initially racemic TaClo with a significant preference for the (*R*)-configured enantiomer to be converted into (presumably more polar) metabolites. The predominant excretion of (*S*)-TaClo may also account for a better absorption or distribution of the (*R*)-enantiomer in the organism, and therefore, a more rapid renal elimination of the (*S*)-antipode.
- *In vitro* studies using rat liver microsomes and neuronal PC12 cells showed a pronounced metabolic degradation of TaClo resulting in the formation of mostly polar metabolites (see Table 15). Halogen-free tetrahydro- β -carbolines such as tryptoline-1-carboxylic acid (**32**) and metabolites resulting from a Cl/H exchange such as 1-dichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (**29**) were mainly identified. Interestingly, incubation of TaClo with liver microsomes led to the production of four TaClo metabolites, while only two of these compounds were detected in PC12 cells exposed to TaClo (see Table 15).
- Although hydroxylation of the TaClo molecule in position 6 and 7 was previously found to be the main metabolic degradation reaction^[72] in TaClo-treated rats and mice, OH-TaClo (**30**) could not be identified in human blood or urine samples so far.

Table 15. TaClo metabolites identified *in vitro* and *in vivo*

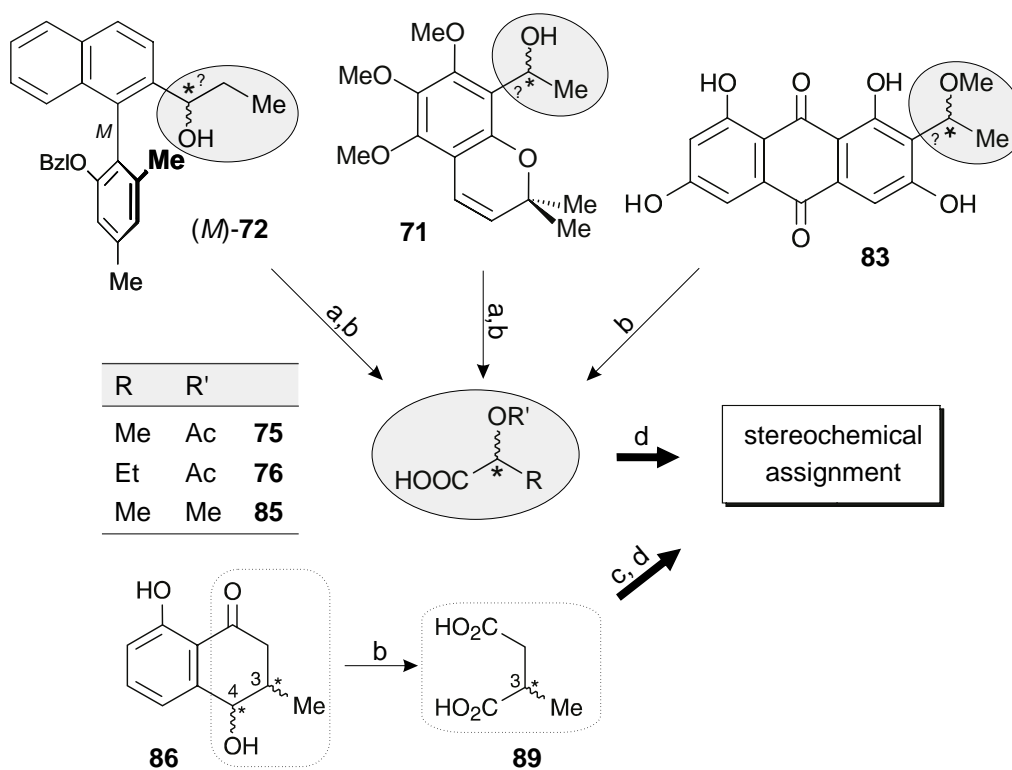
	R'	R		microsomes	PC12-cells	mice-urine	rat-urine	human samples
	OH	H	30	+	-	+	+	-
	H	CCl ₂ =	60	+	-	-	+	n.d.
	H	CHCl ₂	29	+	+	-	+	n.d.
	H	H	61	-	-	(+)	(+)	n.d.
 norharmane (34)	H	COOH	32	+	+	+	+	n.d.
	OH	COOH	33	+	-	-	-	n.d.
			34	-	-	(+)	(+)	n.d.

+ clearly identified as a metabolization product of TaClo
 (+) not clearly identified as metabolization product
 - no metabolization product of TaClo
 n.d. not examined

The established method of oxidative degradation^[195] for the elucidation of the absolute configuration of tetrahydropyridine heterocycles [*e.g.* eleagnine (**39**)] was extended to the degradation of compounds with benzylic hydroxy, or methyl ether groups.^[203,214,238]

- Small amounts (1-2 mg) of compounds with a chiral oxygen function in benzylic position were degraded by Ruthenium-catalyzed oxidation to volatile acids well-suited for GC

analysis (see Scheme 26). The absolute configuration of the degradation products was assigned by comparison with enantiomerically pure reference material allowing a reliable conclusion with respect to the absolute configuration of the target molecules. With this procedure, the benzopyran **71**, isolated from leaves of *Melicope ptelefolia* (Rutaceae), and the biaryl **72**, synthesized in our group by stereoselective alkylation, were identified to be *S*-configured.^[214] The anthraquinone **83**, isolated from a fungus of the genus *Mecrosporaeropsis*, was assigned to be partly racemic.^[203]



Scheme 26. Elucidation of the absolute configuration of **71**, **72**, **83**, and **86** (isoshinanolone) using a Ruthenium-catalyzed oxidative degradation procedure (a) AcCl, NEt₃; (b) RuCl₃, NaIO₄; (c) MeOH, SOCl₂; (d) GC-MS analysis on a chiral phase

- The absolute configuration of isoshinanolone (**86**), a well-known natural product with inconsistent configuration in the literature^[194,199,221-232] was also clearly elucidated using the ruthenium-catalyzed degradation procedure illustrated in Scheme 26. The compound **86** from *Dioncophyllum thollonii* was oxidized resulting in 2-methylsuccinic acid (**89**). The absolute configuration of **89** was assigned after esterification with MeOH/SOCl₂ by subsequent GC-MS analysis on a chiral phase (see Scheme 26). Due to the assigned *R*-configuration of 2-methylsuccinic acid, and with the knowledge of the relative configuration of this intermediate as established by NMR studies, the absolute configuration of the natural product **86** was attributed to be *3R,4R* for the *cis*- and *3R,4S* for the *trans*-isomer.^[238]

Outlook:

The results of the investigations described above clearly support our hypothesis that the neuropharmacological activity of the highly chlorinated tetrahydro- β -carboline TaClo is strongly associated with the highly lipophilic and chemically reactive CCl_3 group at C-1 of this molecule. TaClo was found to be formed in small amounts in elderly patients suffering from Parkinson's disease and in marked concentrations in a young epileptic boy after consecutive intake of the hypnotic chloral hydrate. Moreover, *in vivo* occurrence of TaClo in man has also seriously to be taken into account after exposition to the industrial solvent TRI. This became obvious from *in vitro* studies on rat liver microsomes incubated with tryptamine and TRI: TaClo was clearly identified in significant amounts.

With respect to the complex question whether the dopaminergic neurotoxin **6** is able to induce parkinsonian symptoms in humans, more detailed studies are necessary to prove the relevance of TaClo on the onset of this neurodegenerative illness. For the elucidation of its mode of action, the bioactivation of TaClo should be studied in more depth. It has to be clarified whether TaClo is enzymatically activated similar to MPTP that is known to be metabolized to the toxic agent MPP^+ by the enzymes monoamine oxidase A and B.^[21] Furthermore, comprehensive studies on the influence of TaClo and its metabolites on tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme of catecholamine biosynthesis, are an important task in future, since strong inhibitory effects on this enzyme of neurotoxic agents such as MPTP, salsolinol or other tetrahydroisoquinolines are well-known to contribute to neuronal damage in the dopaminergic system.^[86] By contrast, only few results have been reported in literature concerning the effects of β -carbolines like TaClo on tyrosine hydroxylase.

The mode of action of TaClo and its metabolites causing single-strand scissions on plasmid-free DNA still remains quite speculative. Until now, the chemical nature of the reactive species has not been elucidated. The biochemical and molecular mechanisms underlying the cytotoxicity of TaClo in PC12 cells and related dopamine-producing cell lines are only poorly understood. Therefore, future research efforts should focus particular attention on the DNA-damaging effects of TaClo and related compounds.

EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeine Methoden

1.1 Verwendete Meßgeräte

Infrarotspektren (IR): Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem *Perkin-Elmer-1420*-Spektrometer. $\tilde{\nu}$ bezeichnet die Wellenzahl. Die Intensitäten der Absorptionsbanden sind gekennzeichnet durch: s = stark, m = mittel und w = schwach.

Kernresonanzspektren ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$): $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren wurden an den Spektrometern AC 200, AC 250, DMX 400 der Fa. *Bruker* aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale ist in ppm angegeben. Als interner Standard dienen die Resonanzsignale der Restprotonen des verwendeten deuterierten Lösungsmittels bei $^1\text{H-NMR}$ -Spektren [$\delta(\text{CHCl}_3) = 7.26 \text{ ppm}$, $\delta(\text{CH}_3\text{OH}) = 3.35 \text{ ppm}$], bzw. ihre ^{13}C -Resonanzsignale bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.01 \text{ ppm}$, $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.02 \text{ ppm}$]. Die Multiplizität der Signale wird durch folgende Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben.

Massenspektren: Zur Aufnahme der Elektronenstoß-Massenspektren wurden die Geräte MAT-CH 7 der Fa. *Varian* und MAT 2000 der Fa. *Finnigan* verwendet. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Intensität der Signale bezogen auf den Basispeak ($I = 100\%$) wieder.

Drehwerte: Zur Ermittlung der optischen Aktivitäten diente ein Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer*. Bei einer Spaltbreite von 1 mm wurden die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D$ bei den Wellenlängen $\lambda = 546 \text{ nm}$ und $\lambda = 579 \text{ nm}$ der Quecksilberdampfampe bestimmt. Anschließend extrapolierte man mit Hilfe der Drude-Gleichung^[242] auf die Natrium-D-Linie ($\lambda = 589 \text{ nm}$):

$$\alpha_{589} = \frac{\alpha_{579} \times 3.199}{4.199 - \frac{\alpha_{579}}{\alpha_{546}}} \quad [\alpha] = \frac{\alpha \times 100}{c \times d}$$

α : gemessener Drehwert; c: Konzentration [g/100ml]; d: Schichtdicke [dm].

Circulardichroismus (CD): CD-Spektren wurden an einem *Jobin-Yvon-Dichrograph CD 6* und einem *Jasco-J-715-Spectropolarimeter* aufgenommen und mit der dazugehörigen

Software verarbeitet. Man bestimmte die differentiellen Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ [cm^2/mol] bei einer bestimmten Wellenlänge λ [nm] in dem angegebenen Lösungsmittel.

UV-Vis-Spektrophotometer: Als Zweistrahlphotometer wurde ein Hitachi-U3200-Spektrophotometer benutzt. Außerdem verwendete man das Einstrahlphotometer Cary 50 Conc UV-Visible der Fa. Varian mit dem Datenverarbeitungsprogramm Cary WinUV (Fa. Varian).

Fluoreszenz-Spektrophotometer: Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren diente ein Perkin-Elmer-L550-Lumineszenz-Spektrophotometer. Die Datenauswertung erfolgte mit dem FL-Data-Manager der Fa. Perkin-Elmer.

1.2 Verwendete Geräte zur Probenaufarbeitung

Homogenisation: Das Homogenisieren von Probenmaterial erfolgte an einem IKA[®]-UltraTurax T25 mit dem IKA[®]-Dispergierwerkzeug S25N-86 der Fa. Janke & Kunkel.

Zentrifugation: Zum Zentrifugieren bis 30 000 g_{max} wurde eine Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, ausgestattet mit einem SS34-Rotor verwendet. Zentrifugationen mit höheren Umdrehungszahlen führte man mit der L8-80M-Ultrazentrifuge der Fa. Beckman durch.

Probenkonzentration: Zum Einengen kleinerer, nicht-aggressiver Probenvolumina setzte man den Probenkonzentrator SpeedVac Concentrator SVC 100H der Fa. Savant ein. Außerdem wurden Proben durch Überleiten von getrocknetem Stickstoff eingedampft.

Festphasenextraktion: Es wurden fertig gepackte 3-ml-Extraktions-Säulen (Bond Elut) der Fa. Varian mit 250 mg bzw. 500 mg (bei größeren Probenvolumina) C-18-Absorbermaterial verwendet. Die Festphasenextraktion erfolgte an einer Vakuum-Arbeitsstation Vakuum Manifold der Fa. Resteck/Amchro unter reduziertem Druck.

Sterilfiltration: Zur Sterilisation von kleinen Probenvolumina (ca. 10 ml) dienten Einmal-Filterhalter FP 030/3 (0.2 μm , Pyrogenfrei) der Fa. Schleicher & Schuell.

Mikrofiltration: Zur Abtrennung von Schwebstoffen wurde die Probe auf eine Spritze aufgezogen und schließlich durch 0.2 µm PTFE-Aufsätze der Fa. Whatman filtriert.

1.3 Chromatographische Methoden

1.3.1 Dünnschicht- und Säulenchromatographie (DC und SC)

Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden Kieselgel-DC-Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Fa. Merck verwendet. Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und die Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm. Man verfolgte alle Synthesen dünn-schichtchromatographisch.

Säulenchromatographie (SC) und Säulenfiltration (SF): Als Säulenfüllmaterial diente Kieselgel 0.063 - 0.2 mm der Fa. Merck. Die Säulen wurden naß befüllt.

1.3.2 Flüssigkeitschromatographie (LC)

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC): Versuche zur Enantiomerentrennung mit Normalphase wurden an einer Anlage bestehend aus einer Waters-510-HPLC-Pumpe, einem Rheodyne-7125-Syringe-Loading-Sample-Injector, einem ERC-7215-UV-Detektor und einem Shimadzu-C-R6-A-Chromatopac-Integrator durchgeführt. Als stationäre Phase diente die analytische Säule (250 x 4.6 mm) Chiralcel OD mit einer Chiralcel-OD-Vorsäule (50 x 4.6 mm) der Fa. Daicel. Als mobile Phase wurde *n*Hexan/*i*PrOH (70:30) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min verwendet.

Die Versuchsvorbereitung zur späteren HPLC-MS-MS-Analytik erfolgte an einer Jasco-Anlage, die aus der Pumpe Pu 1580, einem Diodenarray-Detektor Modell MD-1510, einem Online-Entgaser DG-1580-53, einer Mischeinheit LG-1580-02 und einem Ofen CO-1560 bestand. Zur Datenverarbeitung diente das Jasco-Programm Borwin PDA.

HPLC-CD-Kopplung: Das chromatographische System bestand aus einer PU-1580-HPLC-Pumpe der Fa. Jasco, einem Online-Entgaser der Fa. Gastorr und einem Gradientenmischer LG-980-02S (Fa. Jasco). Als CD-Detektor wurde ein J-715-Spectropolarimeter (Fa. Jasco) verwendet, das mit einer über ein Motorventil der Fa. Besta gesteuerten Standard-Flußzelle der Fa. Jasco betrieben wurde. Als Chromatographie-Software diente das Programm Jasco-Borwin Version 1.50, die Visualisierung und Bearbeitung der CD-Spektren erfolgte mit dem mitgelieferten Programmpaket der Fa. Jasco.

HPLC-ESI-MS-MS: Die achiralen HPLC-ESI-MS-MS-chromatographischen Trennungen wurden mit einer Symmetry-C18-Säule (150 x 2.1 mm I.D., 5 µm) der Fa. Waters durchgeführt. Der benutzte binäre Gradient wurde mit einer Spritzenpumpe 14b von Applied Biosystems eingestellt. Als mobile Phase diente Lösungsmittel A, ein 0.1% TFA-H₂O-Gemisch und Lösungsmittel B, ein 0.1% TFA-Acetonitril-Gemisch.

Für Trennungen an achiraler HPLC-Phase wurden folgende Parameter gewählt:

- Pressurize mit 50% B
- 5 min mit 10% B Equilibrierungszeit
- Gradient: $t = 0$ min 10% B
 $t = 1$ min 10% B
 $t = 10$ min 100% B
 $t = 15$ min 100% B

Alle Trennungen wurden mit einer Flußrate von 0.2 ml/min und einem Injektionsvolumen von 5 µl durchgeführt. Die Injektion erfolgte mit einem Sunchrom Thriathlon Autosampler (BAI, Bensheim).

HPLC-MS-MS-Trennungen von Enantiomeren wurden mit einer Chiralcel OD-R (4.6 x 250 mm, Daicel Industries Ltd.) Säule durchgeführt. Für diese Trennungen verwendete man Lösungsmittel A, ein 1% TFA-H₂O-Gemisch, und Lösungsmittel B, ein 1% TFA-Acetonitril-Gemisch. Folgende HPLC-Parameter wurden benutzt:

- Pressurize mit 50% B
- 15 min mit 40% B Equilibrierungszeit
- Gradient: $t = 0$ min 40% B
 $t = 30$ min 40% B
 $t = 31$ min 100% B
 $t = 35$ min 100% B

Die HPLC-MS-MS-Analyse wurde mit einem Triple-Stage-Quadrupol-TSQ-7000-Interface (Finnigan MAT, Bremen) durchgeführt. Stickstoff diente als Sheat- (50 p.s.i.) und Hilfsgas (20 units). Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet. Für die ESI-MS-MS Elektronenspray Ionisierung wurde eine geheizte Kapillare (220°C) benutzt, die gleichzeitig als Repellerelektrode (20 V) diente. Die Elektronenspray Kapillarspannung betrug 3.5 kV. Zur Datenauswertung wurden ein Personal DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring) und das Softwaresystem ICIS 8.1 (Finnigan MAT) verwendet.

1.3.3 Gaschromatographie (GC)

GC mit massenselektivem Detektor (GC-MSD-Kopplung): Der Gaschromatograph HP 5890 Serie II mit On-Column-Injektor der Fa. Hewlett Packard wurde mit direkter Kopplung zum Quadrupol-Massenspektrometer MSD 5971 A der Fa. Hewlett Packard betrieben. Die Temperatur der Transfer-Line betrug dabei 280°C, woraus eine Quelltemperatur von 170°C resultierte. Die Elektronenenergie betrug 70 eV. Als Trägergas kam Helium zum Einsatz. Jede der verwendeten Säulen wurde mit einer desaktivierten Fused-Silica-Vorsäule (3m x 0,53 mm i.D.) der Fa. J&W Scientific geschützt.

Trennsäulen:

Säule 1: Chirale CDX-B Säule der Fa. J&W Scientific

Säulendimensionen: 30 m x 0.25 mm (i.D.), Filmdicke 0.25 µm;

Säule 2: Chirale β-DEX 325 Säule der Fa. Supelco

Säulendimensionen: 30 m x 0.25 mm (i.D.), Filmdicke 0.25 µm;

Säule 3: Fused-Silica-Kapillarsäule Ultra 1 der Fa. Hewlett Packard

Säulensdimensionen: 12 m x 0.22 mm (i.D.), Filmdicke 0.33 µm;

Säule 4: Fused-Silica Kapillarsäule Ultra 2 der Fa. Hewlett Packard

Säulendimensionen: 25 m x 0.32 mm (i.D.), Filmdicke 0.52 µm.

Temperaturprogramme:

Standardprogramm 1: 100°C (5 min), 5°C/min, 150°C (5 min), 10°C/min, 200°C (5 min);

Standardprogramm 2: 80°C (5 min), 5°C/min, 100°C (10 min);

Standardprogramm 3: 150°C, 10°C/min, 250°C (5 min);

Standardprogramm 4: 60°C (3.5 min), 10°C/min, 240°C (2.5 min);

Standardprogramm 5: 40°C (3.5 min), 40°C/min, 230°C (2.5 min).

1.4 Vorbereitung der Versuche

Lösungsmittel: Die Reinigung und Trocknung der verwendeten Lösungsmittel erfolgte nach Standardverfahren unter Schutzgas. Es wurden Lösungsmittel analytischer Reinheit verwendet. Hochreines Wasser gewann man mit Hilfe der Reinstwasseranlage Milli Q der Fa. Millipore mit vorgeschalteter VE-Patrone B 10D. Für die HPLC wurden die Lösungsmittel durch Einleiten von Helium entgast.

Pufferlösungen:

Zur Einstellung des pH-Wertes von Pufferlösungen verwendete man ein pH-Meter Modell 3010 der Fa. Jenway.

Puffer 1: 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA (pH 8.0);

Puffer 2: 5 mM KH_2PO_4 ; 50 mM NaCl (pH 7.4);

Puffer 3: 10 mM EDTA; 50 mM Tris·HCl (pH 8.0); 0.5% SDS;

Puffer 4: 1 mM EDTA; 10 mM Tris·HCl (pH 8.0);

Puffer 5: 0.1 M KH_2PO_4 ; 0.15 M KCl; 1.5 mM EDTA (pH 7.4);

Puffer 6: 0.05 M Tris (pH 7.4).

2 Untersuchungen der DNA-schädigenden Wirkung von TaClo

2.1 Gelelektrophoretische Untersuchungen

Eine aus 1 proz. Agarose und Puffer 1 hergestellte Gelplatte wurde in eine mit Puffer 1 gefüllte Gelelektrophoresekammer gegeben. Nach Auftragen von 10 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung pro Gel-Ladetasche, leitete man über eine Zeitspanne von 1.5 h Strom (89 A, 90 V) durch die Elektrophoresekammer.

2.2 Quantifizierung der DNA-Schädigung

Nach Gelelektrophorese wurde die Agaroseplatte in einem mit Puffer 1 und 0.1 µg Ethidiumbromid gefülltem Bad 0.5 h inkubiert. Die daraus resultierenden Ethidiumbromid-DNA-Banden wurden durch Fluoreszenzanregung sichtbar gemacht. Vorhandene DNA-Banden fotografierte man mit einer Polaroid-Gel-Cam (0.8X Electrophoresis Hood) und einem Polaroid-Pack-Film (3¹/₄ x 4¹/₄, ISO 3000/36°, Belichtungszeit 2 sec, Blende 16). Nach Eingescannen der erhaltenen Fotos mit Easy Photo bestimmte man die Helligkeit der einzelnen Banden mit Image Quant. Die Helligkeit einer Bande verwendete man als Maß zur Quantifizierung der DNA in einer Bande. Die DNA-Schädigung errechnete sich durch Vergleich der offencirkularen (geschädigten) mit der superhelikalen (intakten) DNA abzüglich der Referenzwerte.

2.3 Herstellung der freien Basen

TaClo·HCl (**6**·HCl),^[25] TaBro·HCl (**41**·HCl), TaFlu·HCl (**40**·HCl) sowie Eleagnin (**39**)^[243] waren als Referenzsubstanzen in unserem Arbeitskreis vorhanden. Untersuchungen zur schädigenden Wirkung dieser THBC gegenüber zellfreier DNA wurden (u.a. aufgrund ihres Löseverhaltens im gewählten Puffersystem) mit den jeweiligen freien Basen der Verbindungen durchgeführt. Zur Herstellung der freien Base versetzte man die Hydrochloride mit einer 2 N NH₃-Lösung und extrahierte anschließend mit CH₂Cl₂. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknen im Ölpumpenvakuum erhielt man die freien Basen als Öle, die nach Überprüfung der Reinheit mittels ¹H-NMR-Spektroskopie direkt für Inkubationsexperimente mit pBR322-DNA eingesetzt wurden.

2.4 Belichtungsexperimente

2.4.1 Zeitabhängige Experimente

Die zu testende Verbindung wurde in 22 μl MeCN gelöst (Endkonz. 1 mM für Belichtungsexperimente bei 300 nm, 2 mM für Experimente bei 350 nm) und nach Zugabe von pBR322-DNA (aus *Escherichia coli*, SIGMA, Endkonz. 0.1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) in 88 μl Puffer 2 belichtet. Referenzwerte erhielt man durch zeitgleiche Belichtung einer analogen Lösung ohne Testsubstanz. Nach einer Bestrahlungszeit ($\lambda = 300 \text{ nm}$) von 0, 5, 10, 15 und 30 min bzw. nach einer Belichtungszeit ($\lambda = 350 \text{ nm}$) von 0, 15 und 30 min sowie 1 und 2 h wurden jeweils 20 μl der Reaktionslösung entnommen und mit 5 μl Gelladepuffer (SIGMA) versetzt. Zur monochromatischen Belichtung bei 300 nm diente ein Rayonet RPR-3000 Å (21 W). Die Bestrahlungsexperimente bei 350 nm erfolgten an einer Niedrig-Druck-Hg-Lampe (24 W). Man führte jedes Experiment 4 Mal durch.

Tab. 16. Schädigung von pBR322-DNA in Gegenwart der THBC **6**, **39**, **40** und **41** (Konz. jeweils 1 mM) nach Belichtung ($\lambda = 300 \text{ nm}$)

Zeit [min]	TaClo (6)	Eleagnin (39)	TaFlu (40)	TaBro (41)
0	2%	0%	2%	6%
5	33%	39%	28%	41%
10	39%	42%	30%	50%
15	37%	47%	28%	54%
30	35%	44%	32%	52%

Tab. 17. Schädigung von pBR322-DNA in Gegenwart der THBC **6**, **39**, **40** und **41** (Konz. jeweils 2 mM) nach Belichtung ($\lambda = 350 \text{ nm}$)

Zeit [min]	TaClo (6)	Eleagnin (39)	TaFlu (40)	TaBro (41)
0	2%	4%	3%	8%
15	6%	8%	2%	43%
30	10%	9%	1%	47%
60	20%	17%	3%	53%
90	29%	23%	3%	53%
120	27%	30%	4%	51%
150		32%	2%	

2.4.2 Konzentrationsabhängige Experimente

Die konzentrationsabhängigen Belichtungsexperimente wurden mit 5, 2.5, 2.0, 1.5, 0.5, 0.25 und 0.1 mM (Endkonz.) der zu testenden Verbindungen durchgeführt. Dazu gab man jeweils 2 μ l der Testsubstanz in MeCN mit 8 μ l pBR322-DNA in Puffer 2 (Endkonz. 0.1 μ g/10 μ l) zusammen und belichtete bei einer Wellenlänge von 350 nm (Gerät: Rayonet RPR-3000 Å, 21 W). Referenzdaten wurden durch Belichtung einer analogen Lösung ohne Testsubstanz erhalten. Nach 1 h Belichtungszeit versetzte man die Reaktionsmischung mit jeweils 2.5 μ l Gelladepuffer (SIGMA) und untersuchte die Lösung gelelektrophoretisch.

Tab. 18. Schädigung von pBR322-DNA in Gegenwart der THBC **6**, **39**, **40** und **41** nach Belichtung ($\lambda = 350$ nm, Belichtungszeit = 1 h)

Konz. [mM]	TaClo (6)	Eleagnin (39)	TaFlu (40)	TaBro (41)
0.1	12%	1%	3%	12%
0.25	22%	5%	4%	40%
0.5	25%	11%	3%	43%
1.0	27%	21%	4%	46%
1.5	31%	26%	4%	55%
2.0	32%	25%	6%	47%
2.5	31%	23%	5%	44%
5.0	30%	24%	5%	37%

2.5 Cu(II)-Experimente

Cu(II)-Experimente wurden bei 37°C im Dunkeln durchgeführt. CuCl₂·H₂O und TaClo (Endkonz. jeweils 2 mM) in 2 μ l MeCN wurden mit 8 μ l einer pBR322-DNA-Lösung (Endkonz. 0.1 μ g/10 μ l) in Puffer 2 gemischt. Nach 1.5 h Reaktionszeit gab man 2.5 μ l Gelladepuffer zu und untersuchte die DNA-Lösung gelelektrophoretisch. Referenzdaten erhielt man durch Umsetzung einer Lösung aus MeCN und DNA in Puffer 2 in analoger Weise (MeCN/Puffer 2 = 1:4). Zusätzlich wurde das Experiment mit einer CuCl/DNA-Lösung (2 mM Endkonz. CuCl) sowie mit den Systemen TaClo/DNA und Cu(II)/DNA durchgeführt.

2.6 Versuche mit BCS

Zu einer Lösung aus TaClo (2 mM) und $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2 mM) in MeCN/Puffer 2 (v/v 1:4) wurde 1 mM BCS (Dinatriumsalz der Bathocuproindisulfonsäure) gegeben. Es wurde die UV-Absorptionszunahme bei 480 nm nach Zugabe von BCS gemessen. Ebenfalls in MeCN/Puffer 2 (v/v 1:4) wurden zusätzlich die UV-Absorptionen von jeweils CuCl, $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und TaClo in Gegenwart von BCS gemessen.

2.7 UV-Absorptionsmessungen zur Untersuchung der Wechselwirkung von TaClo mit DNA

Tab. 19. Intensitäten der UV-Spektren einer TaClo-Lösung nach Zugabe von Kalbsthymus-DNA bei $\lambda = 260, 283$ sowie 291.5 nm

Äquiv. DNA \ λ [nm]	260	283	291.5
0	0.4383	0.8502	0.7216
0.5	0.4066	0.8012	0.6788
0.75	0.2286	0.7128	0.6391
1.0	0.1257	0.663	0.6151
1.5	-0.0013	0.5956	0.5820
2	0.0855	0.6123	0.5778
2.5	-0.0215	0.5571	0.5499
4.0	0.1534	0.6273	0.5818
5.0	0.0568	0.6040	0.5719
7.0	-0.1978	0.4527	0.5184
8.0	-0.1679	0.6637	0.6676
10.0	-0.2023	0.4000	0.6644
11.0	-0.2389	0.4332	0.7548
12.0	-0.2085	0.3859	0.7627
13.0	-0.2162	0.2021	0.6321
15.0	-0.1927	0.1187	0.6435

In einem Zweistrahlphotometer nahm man ein UV-Spektrum (200-350 nm) einer $1 \cdot 10^{-4}$ M TaClo-Lösung in Puffer 2 (900 μl) auf. Als Referenz diente eine Küvette mit 900 μl Puffer 2. Nach Zugabe von 0.25 Äquiv. einer Kalbsthymus-DNA-Lösung in Wasser in beide Küvetten,

wurde 2 min gewartet und ein weiteres UV-Spektrum aufgenommen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis man in jeder Küvette eine Endkonz. von 15 Äquiv. DNA erreicht hatte.

In analoger Weise nahm man zusätzlich eine Verdünnungsreihe einer $1 \cdot 10^{-4}$ M TaClo-Lösung in Puffer 2 (900 μ l) auf. Es wurden jeweils gleiche Volumina an Wasser wie bei der Zugabe der DNA-Lösung zugegeben und UV-Spektren aufgenommen.

Tab. 20. Intensitäten der UV-Spektren einer TaClo-Lösung nach Zugabe von H_2O in Volumen analog zur Zugabe von DNA (s.o.) bei $\lambda = 260, 283$ sowie 291.5 nm

$V(H_2O)$ \ λ [nm]	260	283	291.5
0	0.4383	0.8122	0.6823
1.0	0.4129	0.7627	0.6397
2	0.3916	0.7212	0.6020
4.0	0.3535	0.6446	0.5381
7.0	0.3111	0.5634	0.4667
8.0	0.2952	0.5303	0.4397
10.0	0.2525	0.4451	0.3670
13.0	0.2282	0.3995	0.3223
15.0	0.2278	0.3957	0.3957

2.8 Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Wechselwirkung von TaClo mit DNA

Eine $1 \cdot 10^{-4}$ M TaClo-Lösung wurde in einem MeCN/Puffer 2-Gemisch (v/v 1:4) hergestellt und die Lösung durch mehrmaliges Einleiten von Argon und Anlegen von Vakuum entgast. In einer 1 ml Küvette nahm man von 900 μ l dieser TaClo-Lösung ein Fluoreszenzspektrum auf und gab anschließend 0.25 Äquiv. Kalbsthymus-DNA (SIGMA) hinzu. Nach abermaligem Entgasen der Lösung wurde nach insgesamt 3 min ein weiteres Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis man 6 Äquiv. DNA zugegeben hatte.

Tab. 21. Veränderung der Intensität und Verschiebung des UV-Absorptionsmaximums nach Zugabe von Kalbsthymus-DNA zu einer TaClo-Lösung

Äquiv. DNA	λ_{\max}	Intensität
0	361.0	81.048
0.25	363.5	98.965
0.5	362.5	97.598
0.75	363.5	95.758
1	364.0	92.288
1.5	363.0	81.086
2	364.0	73.751
3	362.5	61.993
3.5	363.0	55.461
4	363.0	52.465
4.5	362.0	48.493
5	362.0	43.899
6	360.5	39.118

Zusätzlich wurden in analoger Weise die Fluoreszenzspektren einer Verdünnungsreihe einer $1 \cdot 10^{-4}$ M TaClo-Lösung durch Zugabe des gleichen Volumens an Wasser, wie sie bei den Versuchen mit DNA zugegeben wurden, aufgenommen.

Tab. 22. Veränderung der Intensität und Verschiebung des UV-Absorptionsmaximums nach Verdünnung einer TaClo-Lösung mit H_2O in analogen Volumeneinheiten zur Zugabe von DNA (s.o.)

V (H_2O)	λ_{\max}	Intensität
0	361.0	81.048
0.5	361.0	86.098
1	361.0	94.871
1.5	360.5	103.682
2	362.5	108.707
3	361.0	117.094
4	362.0	124.094
5	359.5	138.223

Zur Aufnahme der Spektren wurden folgende Parameter verwendet:

Wellenlänge:	320 – 530 nm
Anregung:	290 nm
Scan-Geschwindigkeit:	200
Anregungsspalt:	10
Emissionsspalt:	10
Anzahl der Scans:	2

2.9 Untersuchung der Wechselwirkung von TaClo mit DNA über Verdrängungs-experimente mit Ethidiumbromid

Es wurde eine Lösung aus $1 \cdot 10^{-5}$ M Ethidiumbromid in Wasser in eine Küvette gegeben und mit Argon entgast. Nach Zugabe von 0.5 Äquiv. Kalbsthymus-DNA wurde nach 5 min Warten und abermaligem Entgasen wiederum ein Spektrum aufgenommen. Im Folgenden gab man jeweils 1 Äquiv. TaClo (**6**) zu, entgaste, wartete 5 min und nahm jeweils ein Fluoreszenzspektrum auf, bis sich schließlich 28 Äquiv. TaClo in der Lösung befanden.

Tab. 23. Veränderung der Intensität und Verschiebung des UV-Absorptionsmaximums einer Ethidiumbromid-DNA-Lösung nach Zugabe von TaClo (**6**)

Äquiv. TaClo	λ_{\max} [nm]	Intensität
0	592	92
1	591.5	90
2	592	88
3	592	87
5	591.5	85
8	591.5	81
18	592.5	76
28	592.5	73

Folgende Scanparameter wurden benutzt:

Wellenlänge:	560 – 700 nm
Anregung:	546 nm
Scan-Geschwindigkeit:	200
Anregungsspalt:	5
Emissionsspalt:	5
Anzahl der Scans:	2

3 Untersuchungen mit PC12-Zellen

3.1 Zellkulturen

PC12-Zellen wurden in einen Dulbecco's MEM Medium (mit Glutamat-I, Na-Pyruvat und 4500 mg/l Glucose; Life Technologies) versetzt mit 10% Pferdeserum (0.1 µm sterilfiltriert, mykoplasmengetestet, PAN Systems GmbH), 5% fötalem Rinderserum (0.1 µm sterilfiltriert, mykoplasmengetestet, hitzeinaktiviert, PAN Systems GmbH) und 30 mg/l Gentamycin (PAN Systems GmbH) bei 37°C und 5% CO₂- und 95% Luftanteil kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Reagenzien durchgeführt. Alle 2 Tage erneuerte man das Medium der Zellen. Nach weiteren 2-3 Tagen, wenn die Zellflasche zu fast 100% mit Zellen besetzt war, arbeitete man die Zellen auf und setzte eine frische Zellflasche an. Hierfür wurde das Medium entfernt und der Zellgrund mit ca. 10 ml Dulbecco's PBS-Puffer (w/o Calcium + Magnesium, w/o Natriumbicarbonat, Life Technologies) gewaschen. Schließlich wurden die Zellen durch Behandlung mit 5 ml Trypsin (0.05/0.02 proz. in PBS ohne Calcium und Magnesium, PAN Biotech GmbH) vom Zellboden abgelöst und nach Zugabe von 10 ml Medium 10 min bei 2000 U/min (20°C) zentrifugiert. Die im Pellet vorhandenen Zellen wurden in 10 ml PBS-Puffer resuspendiert und abermals 10 min bei 2000 U/min (20°C) zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes nahm man die Zellen in 10 ml Medium auf und bestimmte deren Konzentration mit der Neubauer-Methode. Ca. 1 ml dieser Zellsuspension wurde mit 50 ml Medium in einer 500-ml-Flasche zur weiteren Proliferation in den Brutschrank gegeben.

3.2 Neubauer-Methode

10 µl der zu bestimmenden Zellsuspension gab man mit 10 µl Trypanblau (0.4%, SIGMA) auf eine Neubauerzählkammer und fixierte sie mit einer Glasplatte. Nach Auszählung der vorhandenen Zellen in 16 sichtbaren Quadraten unter dem Lichtmikroskop wurde auf die Zellsuspension hochgerechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen in 16 Quadraten} \cong \text{Anzahl der Zellen in } 0.1 \mu\text{l der Trypanblau-Lösung}$$

3.3 Erste orientierende Untersuchungen zur Cytotoxizität von TaClo

6 Petrischalen (Ø = 5 cm) wurden mit jeweils 10⁶ Zellen bestückt und mit je 4 ml Medium 2 Tage im Brutschrank kultiviert. Daraufhin nahm man das Medium ab und gab TaClo-Medium-Lösungen in Konzentrationen von 0, 10, 100, 250, 500 bzw. 1000 µM in die Petrischalen. Die TaClo-Medium-Lösungen waren zuvor durch Lösen von TaClo-HCl in DMSO/H₂O (v/v 3:1; 50 mM), Sterilfiltration und Verdünnen mit Medium hergestellt worden.

Nach 2 Tagen im Brutschrank wurde die überstehende Lösung abgenommen und 800 μl PBS-Puffer und 160 μl Trypanblau zugegeben. Anschließend fotografierte man die Petrischalen unter dem Lichtmikroskop.

3.4 Darstellung von 8-Methyl-TaClo

Die Darstellung von 8-Methyl-TaClo (**48**) erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von R. God.^[122] 100 mg (0.57 mmol) 7-Methyltryptamin und 120 μl Chloral (**8**) wurden in 5 ml Toluol 35 min unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das verbleibende Rohprodukt durch SC (PE/MTB = 2/1) an Kieselgel gereinigt. Beim Einengen der Produktfraktion erhielt man grünliche Kristalle.

Ausb. 149 mg (0.48 mmol, 85%).

Schmp. 131-133°C (Zers.).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3470 \text{ cm}^{-1}$ (s, Indol NH), 3359 cm^{-1} (s), 3050 cm^{-1} (w, arom. CH), 2970, 2930, 2890, 2840 cm^{-1} (m, CH), 1450 cm^{-1} (s, CH_2), 1300, 1140 cm^{-1} (s), 840, 782 cm^{-1} (s, CCl), 750 cm^{-1} (s, 1,2-Disubstitution).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.57$ (s, 3H, 8- CH_3), 2.89 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, 4-H), 3.16 (q, 1H, $J = 5.8$ Hz, 3-H), 3.69 (q, 1H, $J = 5.8$ Hz, 3-H), 4.99 (s, 1H, 1-H), 7.02-7.03 (m, 2H, 5-H und 7-H), 7.39 (t, 1H, $J = 3.54$ Hz, 6-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): $\delta = 16.92$ (8- CH_3), 22.73 (C-4), 41.63 (C-3), 68.97 (C-1), 70.79 (CCl_3), 102.4 (Ar), 105.8 (Ar), 115.05 (Ar), 117.0 (ArH), 120.5 (ArH), 121.8 (Ar), 124.2 (ArH), 128.67 (Ar).

MS (70 eV); m/z (%): 306/304/302 (1.09/2.77/3.05) [M^+], 268/266 (0.31/0.39) [$\text{M}^+ - \text{HCl}$], 232 [$\text{M}^+ - 2\text{Cl}$], 185 (100) [$\text{M}^+ - \text{CCl}_3$], 168 (14.9), 158 (6.8), 143 (4.3).

3.5 Inkubationsexperimente

Die Cytotoxizitätstests der THBC TaClo (**6**), *N*-Methyl-TaClo (**44**), *N*-Ethyl-TaClo (**45**), *N*-*n*Butyl-TaClo (**46**), *N*-*n*Hexyl-TaClo (**47**) und 8-Methyl-TaClo (**48**) führte man mit den jeweiligen HCl-Salzen, die als Referenzsubstanzen im Arbeitskreis vorhanden waren, durch.

Eine 50 mM Lösung wurde dazu in einer 3:1-DMSO/H₂O-Lösung angesetzt und durch Sterilfiltration sterilisiert. Die jeweiligen Konzentrationen erhielt man durch Verdünnen mit Medium. Die Inkubationsexperimente führte man mit 24-Napfplatten durch. Pro Napf wurden *ca.* $2,5 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Medium angesetzt und 2 Tage lang im Brutschrank kultiviert. Schließlich nahm man das Medium ab und gab pro Napf 1 ml Medium, welches mit der jeweiligen Konzentration (jede Konzentration wurde parallel in vier Nöpfen verwendet) THBC (6, 44, 45, 46, 47 bzw. 48) versetzt war, zu. Die Zellen wurden daraufhin nochmals 2 Tage im Brutschrank kultiviert. Schließlich entfernte man das überstehende Medium und löste den Zellgrund durch Zugabe von jeweils 100 µl 1 proz. Triton-X-100-Lösung in PBS-Puffer ab. Zellmedium und Zellgrund wurden getrennt bis zur LDH-Analyse bei -70°C gelagert.

3.6 LDH-Messungen

LDH-Messungen führte man mit einem LDH/LD-Testatz von SIGMA Diagnostics (EC 1.1.1.27) durch. Dabei konnten die Zellmedienüberstände direkt vermessen werden. Hierzu wurden 30 µl des Zellmediums zu 750 µl der nach Benutzervorlage hergestellten Pyruvat-Lösung gegeben. Die UV-Absorptionsmessung bei 340 nm wurde 30 sec nach dieser Zugabe gestartet. Nach jeweils 1, 2 und 3 min wurde die Extinktion abgelesen. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) bildete man den Mittelwert und setzte diesen in die Berechnung ein:

$$\text{LDH-Aktivität} = \overline{\Delta E}/\text{min} \times 4180$$

Für die LDH-Aktivitätsbestimmung des Zellbodens verdünnte man 10 µl der Zellsuspension mit 990 µl (0.9% NaCl-Lösung). Die Messung erfolgte analog der Messung für Zellüberstand. Die LDH-Aktivität ergab sich nach folgender Gleichung:

$$\text{LDH-Aktivität} = \overline{\Delta E}/\text{min} \times 4180 \times 10$$

Die LDH-Freisetzung der unterschiedlichen Konzentrationen konnte schließlich aus dem Verhältnis der LDH-Aktivität des überstehenden Mediums mit der gesamten LDH-Aktivität (also LDH-Aktivität aus Zellgrund und Zellmedium) bestimmt werden.

3.7 Isolierung von DNA aus PC12-Zellen

Die DNA wurde in Anlehnung an Lit.^[244] isoliert. Das Medium einer 500-ml-Zellflasche wurde nach 2 Tagen Inkubation mit TaClo (6) entfernt und der Zellgrund mit 10 ml Medium nachgewaschen. Nach Ausschwenken mit 10 ml PBS-Puffer inkubierte man die verbleibenden Zellen mit 5 ml Trypsin 1-2 min und zentrifugierte die nach Zugabe von 10 ml Medium erhaltene Zellsuspension 10 min bei 2000 U/min und 20°C . Zu dem erhaltenen Pellet

wurden 1 ml Puffer 3 und 100 µg/ml Proteinase K (Roth, Karlsruhe) gegeben und diese Lösung 12 h bei 37°C stehen gelassen. Nach Zugabe von 50 µg RNase A (von Rinder-Pankreas; Boehringer Mannheim GmbH) in 50 µl Puffer 3 ließ man die Mischung abermals 1 h bei 37°C stehen. Schließlich extrahierte man die DNA aus dieser Lysis mit 1 ml Phenol/Chloroform/*i*-Amylalkohol (24:25:1; Roth) und anschließend mit 1 ml Chloroform. Durch Zugabe von 2 ml Ethanol (+ 0,3 M Natriumacetat) wurde die DNA ausgefällt. Den erhaltenen Niederschlag zentrifugierte man bei 30 000 g_{\max} 15 min (0°C) und wusch das DNA-Pellet nochmals mit 70 % Ethanol. Nach abermaligem Zentrifugieren (30 000 g_{\max} , 5 min, 0°C) wurde das erhaltene Pellet in 150 µl Puffer 4 aufgenommen.

3.8 Bestimmung der DNA – Konzentration

Die Konzentration der isolierten DNA wurde UV-spektroskopisch abgeschätzt. Dafür wurden bei 260 nm und 280 nm die UV-Absorptionen bestimmt. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} konnte als Maß für die Reinheit der isolierten DNA-Lösung benutzt werden.^[245]

A_{260}/A_{280}	
1.8-2.0	Probe "sauber"
0.4	viel Protein in Probe enthalten.

Anhand der Absorption bei 260 nm einer "sauberen" Probe wurde die DNA-Konzentration abgeschätzt:

$$A_{260} = 1 \hat{=} 50 \mu\text{g/ml}$$

3.9 Gelelektrophoretische Untersuchung der isolierten DNA

Jeweils *ca.* 5-10 µg DNA in 10 µl Puffer 4 wurden nach Zugabe von 2.5 µl Gelladepuffer in die Ladentaschen eines 1.5 proz. Agarosegels (hergestellt mit 50 ml Puffer 1), das mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt war, gegeben. Als Standard wurde eine 100 bp DNA-Lösung verwendet. Nach 1 h 45 min Gelelektrophorese (80V, 80 A) in einer mit Puffer 1 gefüllten Elektrophoresekammer konnte die Fluoreszenzanregung der isolierten, aufgetrennten DNA unter dem UV-Schirm betrachtet werden. Das Ergebnis wurde mit einer Polaroid-Gel-Cam (0.8X Electrophoresis Hood) und einem Polaroid-Pack-Film (3¼ x 4¼, ISO 3000/36°, Belichtungszeit 2 sec.,; Blende 16) fotografiert.

4 Qualitative und quantitative Analyse von TaClo

4.1 Festphasenextraktion

Die Aufarbeitung über C18-Festphasenkartuschen erfolgte in Anlehnung an die im Arbeitskreis etablierte Methodik.^[31] Die Kartuschen wurden zunächst, kurz vor der Probenaufgabe, mit 3 ml Methanol und 3 ml H₂O konditioniert. Anschließend saugte man die Probenlösung durch Anlegen eines schwachen Vakuums langsam durch die Kartuschen, wobei darauf geachtet wurde, daß die Festphase stets mit Lösung bedeckt war. Schließlich wusch man die Kartusche mit 2 ml H₂O nach und trocknete sie durch Anlegen eines stärkeren Vakuums. Die Analysenlösung wurde mit 2 ml Methanol von der Festphase eluiert und durch Überleiten von getrocknetem Stickstoff vom Lösungsmittel befreit.

4.2 Aufarbeitung von Serum

Man versetzte bis zu 10 ml Serum mit 2 ml H₂O, 2 ml Acetonitril und dem internen Standard [D₄]-TaClo ([D₄]-**6**; 175 pg/µl; 100 µl). Dieses Gemisch wurde kräftig geschüttelt und 15 min bei 12 000 g_{max} (0-10°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und das Pellet nochmals mit 2 ml H₂O und 2 ml Acetonitril geschüttelt und abermals 15 min bei 12 000 g_{max} (0-10°C) zentrifugiert. Schließlich gab man 4 ml H₂O zu den vereinigten Überständen und zentrifugierte nochmals 30 min bei 12 000 g_{max} (0-10°C). Die erhaltene klare Lösung wurde mit 50 µl 0.1 N NaOH versetzt und sofort der Festphasenextraktion nach Kap. 4.1 unterzogen.

4.3 Aufarbeitung von Blutkuchen

Zu dem zu analysierenden Blutkuchen wurde zunächst der interne Standard [D₄]-TaClo ([D₄]-**6**; 175 pg/µl; 100 µl) gegeben. Nach Homogenisierung des Blutkuchens mit Hilfe eines IKA[®]-Ultra-Turax gab man 2 ml H₂O und 2 ml Acetonitril zu und schüttelte das Gemisch. Schließlich zentrifugierte man das Homogenisat 15 min bei 12 000 g_{max} (0-10°C), trennte den Überstand ab und versetzte den Rückstand mit 2 ml H₂O und 2 ml Acetonitril. Man schüttelte nochmals und zentrifugierte bei 12 000 g_{max} (0-10°C) für 15 min. Die vereinigten Überstände wurden schließlich mit 4 ml H₂O versetzt und abermals zentrifugiert (12 000 g_{max}, 0-10°C, 30 min). Zu der erhaltenen klaren Lösung gab man 50 µl NaOH (0.1 N) und unterzog sie der in Kap. 4.1 beschriebenen Festphasenextraktion.

4.4 Aufarbeitung von Urin

Ca. 10 ml Urin versetzte man mit 2 ml Acetonitril und dem internen Standard [D₄]-TaClo ([D₄]-**6**; 175 pg/μl; 100 μl) und zentrifugierte dieses Gemisch 15 min bei 12 000 g_{max} (0-10°C). Nach Zugabe von 50 μl NaOH (0.1 N) zu dem erhaltenen Überstand unterzog man die Lösung der Festphasenextraktion nach Kap. 4.1.

4.5 Nachweis von TaClo über HPLC-MS-MS

In Vorversuchen wurde die Fragmentierung von TaClo (**6**) in einem Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer unter den in Kap. 1.3.2 (S. 113) beschriebenen Bedingungen der Elektrospray-Ionisation untersucht.

Der Scan des Molekülions ergab: m/z (%) = 289 (100), 291 (97), 293 (31), 295 (3).

Die Tochterionenspektren der einzelnen isotopen Molekülionen von TaClo (**6**) wurden wie folgt detektiert:

MS/MS (15 eV): m/z (%) = 289 (45) [M+H]⁺, 260 (53) [289-CH₂NH], 224 (100) [260-HCl³⁵];

m/z (%) = 291 (37) [M+H]⁺, 262 (74) [291-CH₂NH], 226 (100) [262-HCl³⁵], 224 (49) [262-HCl³⁷];

m/z (%) = 293 (30) [M+H]⁺, 264 (100) [293-CH₂NH], 228 (64) [264-HCl³⁵], 226 (97) [264-HCl³⁷];

m/z (%) = 295 (22) [M+H]⁺, 266 (42) [295-CH₂NH], 228 (100) [266-HCl³⁷].

Zum Nachweis von TaClo (**6**) in sehr geringen Mengen aus komplexer Matrix wurden Experimente im SRM-Modus gewählt: (15 eV): 289→260; 291→262. Sämtliche benutzte HPLC-Parameter sind in Kap. 1.3.2, S. 113 wiedergegeben.

Analoge Experimente wurden mit der deuterierten Verbindung [D₄]-TaClo ([D₄]-**6**) durchgeführt.

Der Scan des Molekülions von [D₄]-TaClo ([D₄]-**6**) ergab: m/z (%) = 293 (100), 295 (97), 297 (31), 299 (3).

Es wurden Tochterionenspektren der isotopen Molekülionen detektiert:

MS/MS (15 eV): m/z (%) = 293 (31) [M+H]⁺, 262 (58) [293-CD₂NH], 226 (100) [262-HCl³⁵];

m/z (%) = 295 (44) [M+H]⁺, 264 (74) [295-CD₂NH], 228 (100) [264-HCl³⁵], 230 (56) [264-HCl³⁷];

m/z (%) = 297 (40) $[M+H]^+$, 266 (96) $[297-CD_2NH]$, 230 (61) $[266-HCl^{35}]$, 228 (100) $[266-HCl^{37}]$;

m/z (%) = 299 (26) $[M+H]^+$, 268 (51) $[299-CD_2NH]$, 230 (100) $[268-HCl^{37}]$.

Zur Detektion des internen Standards $[D_4]$ -TaClo ($[D_4]$ -**6**) wurden, analog zu TaClo (**6**), Experimente im SRM-Modus gewählt: (15 eV): 293→262; 295→264.

4.6 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate bestimmte man durch Aufarbeitung (siehe Kap. 4.2 und 4.3) einer Lösung aus $[D_4]$ -TaClo ($[D_4]$ -**6**; 175 pg/μl; 100 μl) in 10 ml Serum und anschließender Festphasenextraktion (siehe Kap. 4.1). Nach der Probenaufarbeitung gab man TaClo (**6**; 170 pg/μl; 100 μl) zu der erhaltenen Lösung und ermittelte die Peakintensität von TaClo (**6**) und $[D_4]$ -TaClo ($[D_4]$ -**6**) mittels HPLC-MS-MS-Analyse unter Verwendung der in Kap. 4.5 beschriebenen SRM-Experimenten.

Tab. 24. Ermittelte Signalintensitäten zur Bestimmung der Wiederfindungsrate

R(6)	R($[D_4]$ - 6)	Wiederfindungsrate
4751	4349	91%
6897	6450	93%

4.7 Abschätzung der Nachweisempfindlichkeit

Jeweils 10 ml Serum wurden mit $[D_4]$ -TaClo ($[D_4]$ -**6**, 175 pg/μl, 100 μl) und unterschiedlichen Konzentrationen TaClo (**6**, Stammlösung 170 pg/μl) versetzt, aufgearbeitet (siehe Kap. 4.2) und über Festphasenextraktion aufgereinigt (siehe Kap. 4.1). Nach Einengen der erhaltenen Lösung und Aufnahme in 30 μl MeOH analysierte man die erhaltenen Proben mittels HPLC-MS-MS im SRM-Mode (siehe Kap. 4.5).

Quantifizierungsbasis: Fläche

Kurventyp: linear

$$\text{Kalibrierfunktion: } \frac{R(\mathbf{6})}{R([D_4]-\mathbf{6})} = 1.42 \cdot \frac{m(\mathbf{6})}{m([D_4]-\mathbf{6})} + 0.174$$

$$s = 0.366 \text{ ng}$$

$$s_b = 0.079 \text{ ng}$$

$$s_a = 0.119 \text{ ng}$$

$$r = 0.983$$

$$\text{korrigierte Peakfläche: } R_b(\mathbf{6}) = \left(1.42 \cdot \frac{m(\mathbf{6})}{m([\text{D}_4]-\mathbf{6})} + 0.174 \right) \cdot R([\text{D}_4]-\mathbf{6})$$

TaClo (**6**) war mit der verwendeten Methode bis zu einer Konzentration von 0.17 ng in 10 ml Serum zweifelsfrei nachweisbar und quantifizierbar.

Tab. 25. HPLC-MS-MS-Detektion von **6** im Konzentrationsbereich 85 ng bis 0.17 ng aus Matrix-Lösung zur Abschätzung der Detektionsempfindlichkeit

$m(\mathbf{6})$ [ng]	$m([\text{D}_4]-\mathbf{6})$ [ng]	$\frac{m(\mathbf{6})}{m([\text{D}_4]-\mathbf{6})}$	$R(\mathbf{6})$	$R([\text{D}_4]-\mathbf{6})$	$\frac{R(\mathbf{6})}{R([\text{D}_4]-\mathbf{6})}$	$R_b(\mathbf{6})$
85	17.5	4.86	11520	1563	7.37	56969
34	17.5	1.94	1727	784	2.2	16998
17	17.5	0.97	4343	2559	1.7	13092
13.6	17.5	0.78	4091	4190	0.98	7532
10.2	17.5	0.58	8025	7072	1.13	8753
8.5	17.5	0.49	2278	4477	0.51	3925
6.8	17.5	0.39	4568	4881	0.94	7219
1.7	17.5	0.1	4687	13498	0.35	2678
1.36	17.5	0.08	3524	13694	0.26	1985
1.02	17.5	0.06	14768	14846	0.99	7673
0.68	17.5	0.04	1986	9781	0.20	1566
0.34	17.5	0.02	1750	11839	0.15	1140
0.17	17.5	0.01	1267	11097	0.11	881

4.8 Untersuchung von Blutproben Chloralhydrat-behandelter Parkinsonpatienten

Blutproben Chloralhydrat-behandelter Patienten, die wir von der Ruhr-Universität Bochum erhalten hatten, wurden nach Kap. 4.2 bzw. Kap. 4.3 aufgearbeitet und einer Festphasenextraktion nach Kap. 4.1 unterzogen. Daraufhin analysierte man die erhaltene Lösung mittels HPLC-ESI-MS-MS (siehe Kap. 4.5).

Tab. 26. HPLC-ESI-MS-MS-Analyse von Blutproben Chloralhydrat-behandelter Patienten

Patient Nr.	Probe	Peakfläche TaClo (6)	Peakfläche [D ₄]-TaClo	$\frac{289 \rightarrow 260}{291 \rightarrow 262}$	gefundene Menge TaClo [ng]
1	Kuchen	22640	219989	1.00	0.2
1	Serum	9519	384326	1.03	(0.05)
2	Kuchen	6701	173282	1.17	(0.07)
2	Serum	9937	261446	0.78	(0.07)
3	Kuchen	452263	24006	1.00	4.0
3	Serum	39741	18092	1.07	0.5
4	Kuchen	-	9879	-	0
5	Serum	27310	391603	1.00	0.14
6	Kuchen	135870	397182	1.01	0.96
7	Serum	6921	390229	1.00	(0.04)
8	Serum	2717	360391	1.20	0
9	Kuchen	23763	253550	1.00	0.14
9	Serum	2845	350243	1.37	(0.02)
10	Serum	4285	387545	1.05	(0.03)
11	Serum	31681	479442	0.90	4.0
12	Serum	24497	12883	1.02	0.4
12	Kuchen	-	8809	-	0
13	Vollblut	-	10245	-	0
14	Vollblut	16246	19457	0.93	0.14
15	Vollblut	10531	16852	1.15	(0.06)

4.9 Untersuchung von Proben Chloralhydrat-behandelter Kinder

Urin- und Blutproben von Kindern, die mit Chloralhydrat behandelt worden waren, erhielten wir aus der Kinderklinik der Universität Freiburg. Die Urinproben wurden nach Kap. 4.1 über C18-Kartuschen aufgearbeitet und vor der Analyse durch Filtration über PTFE-Aufsätze von Schwebstoffen befreit.

Tab. 27. HPLC-ESI-MS-MS-Analyse von Urinproben Chloralhydrat-behandelter Kinder

Patient Nr.	Probe	Peakfläche TaClo (6)	Peakfläche [D ₄]-TaClo	$\frac{289 \rightarrow 260}{291 \rightarrow 262}$	gefundene Menge TaClo [ng]
16	Urin	-	4554	-	0
17	Urin	2050	9672	0.72	0.2
18	Urin	-	6798	-	0
19	Urin	-	5838	-	0
20	Urin	-	5156	-	0
21	Urin	-	1153	-	0
22	Urin	2528	2124	0.74	0.4
23	Urin	530	1444	0.68	$6.3 \cdot 10^{-3}$
23	Blutkuchen	$410 \cdot 10^3$	10740	0.99	68.8
23	Serum	4891	5440	0.72	1.2

4.10 Untersuchung der Blutproben einer Frau, die über einer Reinigung gewohnt hatte

Die Blutprobe der Frau wurde nach Kap. 4.2 und 4.3 aufgearbeitet, nach Kap. 4.1 aufgereinigt und mittels HPLC-MS-MS unter Verwendung der in Kap. 4.5 beschriebenen Experimente im SRM-Mode analysiert.

Tab. 28. HPLC-MS-MS-Analyse von zwei Blutproben einer Frau, die über einer Reinigung gewohnt hatte

Patient Nr.	Probe	Peakfläche TaClo (6)	Peakfläche [D ₄]-TaClo	$\frac{289 \rightarrow 260}{291 \rightarrow 262}$	gefundene Menge TaClo [ng]
24 (1)	Blutkuchen	637	2810	1.08	0.3
24 (1)	Serum	1899	5663	0.80	0.4
24 (2)	Blutkuchen	1001	2331	0.82	0.5
24 (2)	Serum	3116	7796	0.91	0.5

5 Untersuchungen zur Bildung von TaClo aus TRI

5.1 Aufarbeitung von Rattenlebermikrosomen

Die Präparierung der Rattenlebermikrosomen erfolgte in Anlehnung an Lit.^[150] Bei allen Arbeiten achtete man auf eine ständige Kühlung (Eisbad) der Leberproben. Zu 6-10 g frischer Leber aus 2 Monate alten Lewis-Ratten^[246] wurde Puffer 5 (pro Gramm Gewebe 3 ml Puffer) gegeben und die Mischung unter Verwendung des Ultra-Turax-Homogenisators homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 48 000 g_{\max} (30 min, 0-10°C) nahm man den Überstand ab und zentrifugierte 90 min mit einer Ultrazentrifuge bei 105 000 g_{\max} (0°C). Der erhaltene Rückstand wurde in Puffer 5 resuspendiert und abermals bei 105 000 g_{\max} (60 min, 0°C) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Puffer 5 aufgenommen; die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford^[247] (siehe Kap. 5.2). Die Mikrosomensuspension lagerte man bis zur weiteren Verwendung bei -70°C.^[248]

5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode^[247] bestimmt. Eine Bradford-Stammlösung wurde aus 100 mg Coomassie-Brillant-Blau G250 (Serva 17524) in 50 ml 96% EtOH, 100 ml H₃PO₄ und 850 ml H₂O hergestellt. Diese Lösung wurde filtriert und war bei -4°C über mehrere Monate haltbar. Zunächst erstellte man eine "Eichkurve" unter Verwendung von BSA (Rinderserum-Albumin) bekannter Konzentrationen (0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mg/ml). Hierzu wurden die Verschiebung des Absorptionsmaximums ($\lambda = 595$ nm) der Coomassie-Brillant-Blau-Lösung in Gegenwart von Proteinen gemessen. Man mischte 10 μ l Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Stammlösung und detektierte nach 5 min die Absorption bei 595 nm. Bei der Analyse unbekannter Proteinkonzentrationen wurden 10 μ l der zu untersuchenden Lösung zu 1 ml Bradford-Lösung gegeben und die Absorption bei 595 nm nach 5 min abgelesen. Dabei achtete man darauf, daß die erhaltenen Werte im linearen Bereich der "Eichkurve" lagen. Bei Werten außerhalb dieses Bereiches verdünnte man die Probe entsprechend.

5.3 Metabolisierung von TRI

Die Metabolisierung von TRI (7) wurde in Anlehnung an Lit.^[151] nachvollzogen. Hierfür wurden die nach Kap. 5.1 aufgearbeiteten Rattenlebermikrosomen mit Puffer 6 auf eine Proteinkonzentration von ca. 2-2,5 mg/ml verdünnt. Zu 1 ml dieser Mikrosomenlösung gab man NADPH in Puffer 6 (2 mM Endkonz.). Nach ca. 3 min gab man schließlich TRI (2 mM Endkonz. in MeCN) dazu. Nach weiteren 30 min wurde die Hälfte der Mikrosomenlösung

zum Nachweis der Bildung von Chloral (**8**) mit 0.25 ml Ethylacetat extrahiert, die andere Hälfte wurde mit 0.25 ml Toluol ausgeschüttelt und zur Bestimmung des TRI-Metaboliten Trichlorethanol (**57**) eingesetzt. Beide organischen Phasen wurden bis zur GC-Analyse kühl gelagert.

Zum Nachweis von Chloral (**8**) wurde die Ethylacetat-Phase per GC-MS-Analytik mit der Säule 4, einem Säulenvordruck von 40 kPa und dem Temperaturprogramm 5 untersucht. Die Detektion von Chloral (**8**) erfolgte im SIM-Mode. Für die massenspektroskopische Analyse wurden die charakteristischen Ionen für **8** m/z 113, 111, 82 ($t_R = 3.81$ min) herangezogen.

Der Nachweis von Trichlorethanol (**57**) aus der Toluol-Phase erfolgte ebenfalls per GC-MS-Analytik. Es wurde die Säule 4, mit einem Säulenvordruck von 40 kPa und dem Temperaturprogramm 4 benutzt. Man detektierte im SIM-Mode die für **57** charakteristischen Ionen m/z 115, 113, 84 und 82 ($t_R = 6.70$ min).

5.4 Metabolisierung von TRI in Gegenwart von Tryptamin

Die nach Kap. 5.1 aufgearbeiteten Lebermikrosomen wurden mit Puffer 6 auf eine Proteinkonz. von *ca.* 2-2.5 mg/ml verdünnt und NADPH in Puffer 6 (Endkonz. 2 mM) zugegeben. Nach etwa 3 min wurden TRI (**7**) und Tryptamin-HCl (**5**-HCl) (1 mM bzw. 2 mM) zugegeben. Die Mikrosomenmischungen wurden bei Raumtemp. jeweils 30 min (Probe 1), 1 h (Probe 2), 2 h (Probe 3), 3 h (Probe 3) und 4 h (Probe 4) gerührt. Schließlich wurden 50 μ l 0.1 N NaOH zu den jeweiligen Inkubationsansätzen gegeben, welche anschließend entsprechend der in Kap. 4.1 beschriebenen Anleitung über C18-Kartuschen aufgearbeitet wurden. Das erhaltene MeOH-Eluat befreite man vom Lösungsmittel und nahm den Rückstand in 100 μ l MeOH auf. In der Lösung vorhandenen Schwebstoffen wurden durch Filtration über einen Mikrofilter entfernt und die Lösung der HPLC-ESI-MS-MS-Analyse nach Kap. 4.5 zugeführt.

Zur Untersuchung der Bildung von TaClo (**6**) aus Tetrachlorethylen (**58**) wurden analoge Experimente durchgeführt. Statt TRI (**7**) wurde bei diesen Inkubationsversuchen Tetrachlorethylen (**58**) eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 30 min (Probe 5), 1 h (Probe 6) und 2 h (Probe 7).

Tab. 29. Nachweis von Chloral (**8**), TCE (**57**) und TaClo (**6**) nach Metabolisierung von TRI (**7**) und Tetrachlorethylen (**58**) in Gegenwart von Tryptamin (**5**), Rattenlebermikrosome und NADPH

Probe	Chloral	TCE	TaClo
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	-	+	-
6	-	+	-
7	-	+	-

+ nachgewiesen

- nicht nachgewiesen

5.5 Umfrage bei Parkinsonpatienten zum Umgang mit TRI

5.5.1 Teil I: Angaben zur persönlichen, die Parkinsonerkrankung betreffenden Krankheitsgeschichte

Nachfolgend sind die gestellten Fragen des ersten Teils der Umfrage wiedergegeben. Die Zahlen hinter den möglichen Antworten geben jeweils die Häufigkeit an, mit der sie von insgesamt 82 Umfrageteilnehmern angekreuzt wurden. Die einzelnen Antworten jedes beteiligten Parkinsonpatienten sind in Tab. 30, S.140 zusammengefasst.

1. Alter: Jahre
2. Geschlecht: [♀] weiblich [♂] männlich
3. Körpergröße: m
4. Körpergewicht: kg
5. Alter, in dem (rückblickend), die ersten Parkinson-Zeichen bemerkt wurden:
..... Jahre
6. Welche?
7. Wann wurde deshalb erstmals ein Arzt konsultiert? 19.....
8. Alter bei endgültiger Diagnosestellung "Parkinson"? Jahre
9. Um welchen Typ Parkinson handelt es sich?

- [a] Akinese-Rigor-Dominanztyp (Steifigkeit und Langsamkeit überwiegen) 55
- [b] Äquivalenztyp (alle Kardinalsymptome etwa gleich stark ausgeprägt) 17
- [c] Tremor-Dominanztyp (Zittern steht im Vordergrund) 16
10. Besteht eine **besonders** stark einseitige Ausprägung? [a] Ja 59 [b] Nein 22
 ggf.: welche Seite? links 32 rechts 27
11. Würden Sie, im Vergleich zu anderen Patienten, Ihren Krankheitsverlauf eher wie folgt einschätzen?
- [a] sehr langsam - schleichend – kontinuierlich 44
- [b] ziemlich durchschnittlich 22
- [c] relativ abrupt einsetzend, deutliche Verschlechterung innerhalb weniger Jahre 18
- [d] eher "schubartig" 1
12. Welche Medikamente (Präparat-Gruppe; falls nicht sicher bekannt, bitte Produktname aufschreiben) gegen die Parkinson-Symptome erhalten Sie z.Zt.?
- [a] L-Dopa
- [b] Dopamin-Agonisten
- [c] Amantadine
- [d] Abbau-Hemmer (Selegilinpräparate als MAO-B-Hemmer, Entacapone/Comtess[®] oder Tolcapone/Tasmar[®] (z. Zt. nicht zugelassen) als COMT-Hemmer)
- [e] Anticholinergika
- [f] Budipin
13. Wie war Ihre erste erfolgreiche Einstellung zusammengesetzt? (z.B. "nur L-Dopa, 300 mg" oder "Monotherapie mit einem Dopamin-Agonisten" oder "L-Dopa plus Selegilin", "L-Dopa plus Agonist plus Anticholinergikum")
14. Würden Sie den Erst-Erfolg Ihrer medikamentösen Einstellung im Vergleich zu anderen Patienten eher als gut oder schlecht bezeichnen?
- [a] sehr gut 10
- [b] gut 49
- [c] eher mäßig 13
- [d] ziemlich schlecht 4

- [e] non-Responder 0
15. Falls Sie schon längere Zeit behandelt werden, wie wirkte sich die medikamentöse Einstellung im Verlaufe aus?
- [a] stabil gut 14
- [b] Wirkung nachlassend (ggf. nach wieviel Jahren?) Jahre 44
- [c] Wirkung im Bezug auf ein best. Symptom nachlassend (ggf. welches) 22
- [d] Fluktuationen, on/off-Effekte (ggf. nach wieviel Jahren?)Jahre 23
- [e] Nebenwirkungen unerwünschter Art? (ggf. welche?) 38
16. Wie beeinträchtigend empfinden Sie diese Spätkomplikationen?
- [a] stark beeinträchtigend 28
- [b] mittelstark 17
- [c] im Vergleich zum therapeutischen Nutzen immer noch gut akzeptabel 26
- [d] kaum beeinträchtigend, evtl. eher für mein persönl. Umfeld 2
17. Welche anderen Therapieformen setzen Sie mit Erfolg ein oder haben Sie in der Vergangenheit mit Erfolg eingesetzt? (z.B. Krankengymnastik, stereotaktische Operation, begleitende Therapieformen div. Art)
18. Ist unter der näheren Verwandtschaft ein Fall von Parkinson bekannt?
- [a] Ja 19 [b] Nein 60
19. Waren Sie jemals an Masern erkrankt? [a] Ja 45 [b] Nein 26
- Wenn ja, wann (ca.)? 19.....
- Sind Sie gegen Masern geimpft worden (möglich ca. ab 70er Jahre)?
- [a] Ja [b] Nein
20. Waren Sie jemals an Mumps erkrankt? [a] Ja 25 [b] Nein 45
- Wenn ja, wann? 19.....
- Wie schwer?
21. Waren Sie jemals an Influenza erkrankt? [a] Ja 28 [b] Nein 49
- Wenn ja, wann? 19.....
- Wie schwer?
22. Hatten Sie jemals irgendeine mehr "exotische" oder ungeklärte Virus-Infektion?

[a] Ja 4 [b] Nein 76

Wenn ja, wann? 19.....

ggf. Kurzbeschreibung:

23. Sind bei Ihnen Allergien bekannt? [a] Ja 19 [b] Nein 60

Wenn ja, welche?

24. Wie würden Sie die Neigung Ihres Körpers, bei Infektionen mit Fieber zu reagieren, beschreiben?

[a] bekomme schnell Fieber, u.U. auch höheres 5

[b] durchschnittlich 14

[c] bekomme seltener und nicht so hohes Fieber 25

[d] bekomme so gut wie nie Fieber (höchstens als Kind vielleicht) 23

[e] bin eigentlich nie krank in diesem Sinne 16

25. Würden Sie sich eher als "Abend/Nachtmensch" oder "Frühaufsteher" bezeichnen?

[a] Morgentyp 25

[b] Abendtyp 19

[c] Normalzeitmensch 22

[d] Schwer zu sagen, da mehrmals am Tag starke Schwankungen 13

26. Haben Sie das, was die Schlaf Forscher bei Parkinson als "sleep benefit" bezeichnen, d.h. eine vorübergehende Verbesserung der Beweglichkeit (evtl. auch Abnahme des Rigors) durch Schlaf (sei es der Nachtschlaf und/oder auch ein kurzes Nickerchen tagsüber), erfahren?

[a] ja 26

[b] nur durch den Nachtschlaf 14

[c] nur durch kurze Tagesnickerchen 14

[d] habe hierzu nichts Spezielles bemerkt 18

[e] nein, ich bin nach dem Schlaf eher noch steifer 18

Tab. 30. Antworten der Umfrageteilnehmer zu einzelnen Fragen des ersten Teils (siehe oben) der Fragebogenaktion. In der Tabelle finden sich die Fragen (durchnumeriert, siehe oben) in den Spalten wieder. Die möglichen Antworten auf diese Fragen sind nach dem Alphabet gekennzeichnet (a, b, c ...) und in der Tabelle durch diese Buchstaben wiedergegeben bzw. JA/NEIN wurden mit j/n abgekürzt. Pro Zeile sind alle gegebenen Antworten eines Patienten aufgelistet. Die Patienten sind untereinander nach Einsetzen der ersten Parkinsonsymptome sortiert (Frage 5) und wurden den Nummern 1-82 zugeordnet

Patient \ Frage	1 [a]	2	5 [a]	8 [a]	9	10	11	12	14	15	16	18	24
1	33	♀	20	32	a	a	a	a;c;d	a	a;e	d	n	d
2	44	♂	24	25	a	b	b	a;b;c;d	b	b;d;e	a	n	e
3	51	♀	25	43	b	a	c	a;b;?	b	b;c;e	c	j	d
4	61	♂	26	37	a	c	a	a;b;c	b	b;d;e	c	j	c
5	44	♂	30	30	a	c	a	a;b;c;d	a	a	c	j	e
6	54	♂	33	36	a	a	a	a;b;d	a	b;d	b	n	e
7	56	♂	36	36	b	a	c	a;b;f	b	b;e	a	j	c
8	40	♀	36	36	a	a	c	a;b;c;d	b	b;d;e	c	n	d
9	42	♀	36	39	a	a	a	a;b;d	b	a;e	c	n	d
10	41	♂	36	37	c	b	b	a;b;c	b	b	b	n	c
11	36	♂	36	36	b	a	a	a;b;f	b	e	a	n	c
12	58	♂	38	43	b	b	b	a;b;c	b	b;d;e	a	n	e
13	58	♂	39	53	a;c	a	c	a;b	d	b;c;d	a	n	a
14	57	♂	39	39	a	b	a	a;b;d	b	b;c;d	a	j	d;e
15	56	♂	40	43	b	b	a	a;b;c;d;e	b	b;c;d;e	a	j	b
16	48	♂	40	42	a	a	a	b;d	b	b;c;d;e	a;c	n	b
17	49	♂	40	40	a	c	a	a;b	b	b;d	b	?	d
18	64	♂	40	40	a;c	c	c	a;b;c;e;f	b	b;d;e	a	n	c

Patient \ Frage	1	2	5	8	9	10	11	12	14	15	16	18	24
19	45	♀	41	42	a	b	a	a,b;d	c	c	c	j	b
20	50	♂	42	42	a	a	a	a,b;c,e,f	e	a;d	b	n	d
21	53	♀	42	43	a	a	b	a,b;c;d	b	b,e	c	n	d
22	51	♀	43	43	c	a	a	a,b	a,b	b;c,e	c	n	c
23	66	♂	45	46	a	c	a,b		c			n	e
24	61	♂	45	46	a	b	a	a,b;c;d	b	b;c;d,e	a	n	b
25	64	♂	46	47	a	a	a	a,b;d	b	a,e	c	n	d
26	57	♂	46	55	b	c	a	a,b;d	c	a		j	b
27	59	♂	46	48	a	a	a	a,b;c;d	b	c	c	n	e
28	65	♂	46	50	b	b	b	a,b,f	b	b	c	n	c
29	53	♂	47	48	c	a	a;c	b	a	e	c	n	b
30	71	♂	47	49	a	a	a	a,b;c;d	b	c;d,e	a;c	n	d
31	64	♂	47	51	a	c	a	a,b;c;d,e	a	a;c,e	c	n	c
32	52	♂	47	49	c	b	b	b	c	b	b	n	b
33	69	♀	47	55	a	c	a	a,b;c	b	b;c;d	a	n	d
34	51	♂	48	49	b	b	a	a,b;d	c			j	b
35	61	♂	48	57	a	c	b	a,b;c	b		c	n	c
36	53	♂	48	51	a;c	c	a	a,b;c		b	b	n	c
37	68	♂	48	58	a	a	a	a,b;d	b	c	a	n	c,e
38	61	♂	48	54	a	a	a;c;d					n	c
39	65	♂	49	49	a	a	a	a,b;c;d	b	b;d,e	a	n	d,e
40	64	♂	49	49	a	b	b	a,b;d	b	b;c;d	a;c	n	c

Patient \ Frage	1	2	5	8	9	10	11	12	14	15	16	18	24
41	65	♀	49	53	c	b	c	a,b;c	a	b,d;e	a	n	a
42	58	♂	50	53	a	a	c	a,b;?	c	b;e	a	?	c
43	63	♂	50	50	a;c	b	a	a,b;d	b	a;e	c	n	d,e
44	68	♂	50	52	a	c	c	a	d	b	a	n	e
45	60	♂	50	52	a	a	b	b	b	b;e	a	n	c
46	59	♂	50	54	b	b	b;c	a,b	c	b;e	b	n	b
47	62	♂	50	59	c	c	a	a,b;c;d	b	a		n	c
48	62	♂	51	51	a;b	a	a	a,b;c	b	b;e	a	j	b
49	56	♀	51	53	a	c	b	b;c	a	a;e	c	n	d
50	75	♂	52	52	a	b	a;c	a;d	d	e	d	n	e
51	55	♂	52	54	c	a	d	a,b;d	a	a		n	d
52	55	♂	52	52	b	a	?	a,b;d				n	d,e
53	53	♂	52	52	a	b		a;c;d	a			n	c
54	59	♂	53	53	c	b	b	a,b;c;d	b	c	a	n	b
55	62	♂	53	60	a;c	b	c	a;c	c		a	n	d
56	60	♂	53	54	c	a	b	a,b;d	b	a	c	n	d
57	56	♂	53	54	a	b	a	a;c	c	a;e	c	n	a
58	64	♂	54	54	a	b		a,b;c		b	b	n	e
59	74	♂	54	56	a	b	a	a;c;d;e	b	b;c;d;e	b	n	e
60	58	♂	54	57	a	c	a	a,b;c	b			j	e
61	59	♂	54	56	a	a	a	a;b	a	b	b	n	a
62	55	♀	54	54	a	a	b	a;c	c	e	a	n	b

Patient \ Frage	1	2	5	8	9	10	11	12	14	15	16	18	24
63	60	♂	63	55	a	b	a	a,b;d	b	b;c	b	n	c
64	57	♂	63	55	a	a	a	a,b;e	b	c	c	j	b
65	57	♀	64	57	a	a	a	a,b;d	b			j	c
66	65	♂	65	57	b;c	b	a	a,b;c;d	b	b;d	b;c	j	c
67	66	♂	63	56	a	c	b;c	a,b;c;d	b	b;c	b	n	c
68	66	♂	63	55	a	c	b	a,b	b	b;d	b	n	c
69	63	♂	64	58	a	b	a		b	b	b	n	d
70	70	♂	65	62	a	b	b;c	a,b;c;d	c	b;c;e	a	j	c
71	69	♂	63	58	a	c	b	a,b;d	b	d;e	a	n	b
72	63	♂	63	60	b	b	a	a,b;d	b	a;e	c	j	c
73	60	♀	64	60	b	a	c	a,b	c			j	b
74	71	♂	65	63	b	c	b	a,b;c;d	b	b;d	b;c	n	d;e
75	65	♂	63	59	a	b	a	a,b;c;d	d	a;c;e	a	n	b
76	64	♂	63	61	a	c	c	a,b		b;e	a	n	d
77	68	♂	64	63	a	c	a;c	a,b;c	b	b;e	a	n	d
78	74	♂	65	64	b	b	b	a,b	b	b	a	n	d
79	65	♂	63	64	a	a	a	a,b	b			n	c
80	72	♂	63	65	c	c	b	a;c;d	b	b	c	n	c
81	74	♂	64	65	b	a	b	a,b;c;d	c	b;c;e	b	j	e
82	67	♂	65	65		c	a	a,b	b			j	a

5.5.2 Teil II: Angaben, die sich auf die TRI-Exposition beziehen

Nachfolgend sind die gestellten Fragen des zweiten Teils der Umfrage abgebildet. Die in Klammern gesetzten Zahlen hinter den jeweiligen Antworten geben die Häufigkeit an, mit der sie angekreuzt wurden. Die einzelnen Antworten jedes beteiligten Patienten sind in Tab. 31, S.149 wiedergegeben.

1. In welchem Zeitraum bestand bei Ihnen eine Tri-Exposition?
 von 19..... bis 19.....
 oder einzelne Jahre nennen
2. Welcher Art war der Kontakt zum TRI?

[a] häufiger Hautkontakt	56
[b] hauptsächlich durch das Einatmen von Dämpfen	73
[c] unfallbedingtes Verschlucken	2
[d] über offene Wunden direkter Kontakt zum Blutkreislauf	5
[e] Augenkontakt	10
3. Bestand eine Exposition eher.....?

[a] täglich (= jeden Arbeitstag) ganze Zeit über	16
[b] stundenweise täglich	15
[c] mehrmals pro Woche einige Stunden	17
[d] mehrmals pro Woche ein paar Stunden	22
[e] seltener als einmal pro Woche	13
[f] nur einmalig	1
4. Würden Sie sagen, die Belastung war eher hoch oder geringfügiger?

[a] starke Belastung (Geruch stark wahrnehmbar ganze Zeit über, ständig Hände o.a. im TRI)	37
[b] mäßige Belastung	33
[c] relativ geringe Belastung, aber chronisch	11
5. Hatte das TRI, mit dem Sie in Kontakt kamen bzw. das sich in Ihrem Arbeitsraum befand, längerdauernden Kontakt zu

- [a] Luft (= offen stehende Behälter) 57
- [b] Licht 25
- [c] Hitze 17
6. Gab es Arbeitsschutzmaßnahmen? [a] Ja 13 [b] Nein 60
Wenn ja, welche?
7. Gab es ausreichende Absauganlagen (v.a. bei Erhitzung von TRI)? ("Fenster öffnen" ist keine Absaugung!) [a] Ja 8 [b] Nein 63
8. Waren Ihnen die Giftigkeit von TRI damals bekannt?
- [a] Ja 4
- [b] Nicht in dem Ausmaße wie heute 6
- [c] Nein 72
9. Kam es bei Ihnen, unfallbedingt oder bei hoher mehrstündiger Belastung, auch zu akuten Vergiftungserscheinungen mit TRI?
- [a] Atembeschwerden, auch erst Stunden nach dem Kontakt mit TRI 13
- [b] akute Herzprobleme 2
- [c] "rauschartige" Zustände, auch wenn evtl. als unangenehm erlebt 18
- [d] Bewusstlosigkeit 3
- [e] deutliche akute Bewegungs-, Koordinations- und Sprachstörungen 5
- [f] Verwirrung/Orientierungslosigkeit 5
- [g] Augenreizungen 28
- [h] andere Symptome 14
10. Welche Symptome, die durch eine chronische Belastung mit TRI entstehen können (aber auch auf andere Weise), haben/hatten Sie (sofern diese nicht schon vor dem ersten Kontakt mit TRI bestanden)?
- [a] Kopfschmerzen 32
- [b] Übelkeit, die nicht auf andere Faktoren zurückzuführen ist 12
- [c] Schwindel (dauerhaft oder anfallweise?) 19
- [d] Zittern 13
- [e] Reizung der Augen- und Nasenschleimhaut 25

- | | |
|--|----|
| [f] Tagesschläfrigkeit | 9 |
| [g] Schlafattacken am Tage (evtl. auch beim Einatmen anderer Lösungsmittel/Lack- und Farben-Dämpfen, etc.) | 8 |
| [h] Änderung des Schlaf-Wach-Rhythmus | 5 |
| [i] Kurzzeitgedächtnis- und/oder Wortfindungsstörungen | 15 |
| [j] respiratorische (atmungsbedingte) Probleme | 8 |
| [k] Herzrhythmusstörungen (nicht behandlungsbedürftige) | 15 |
| [l] Herzscheidigungen (ärztlich nachgewiesene) | 1 |
| [m] Hauterkrankungen (sofern nicht anders begründbar) | 6 |
| [n] Krebserkrankungen (welcher Art?)..... | 1 |
| [o] Sehstörungen | 12 |
| [p] andere Symptome | 6 |
11. Würden Sie sich heute als "Alkohol-intolerant" bezeichnen?
- | | |
|--|----|
| [a] Ja | 8 |
| [b] Nicht direkt, aber ich vertrage nicht allzu viel | 30 |
| [c] Nicht direkt, aber ich trinke freiwillig keinen Alkohol/schmeckt mir nicht besonders | 24 |
| [d] Nein | 16 |
12. Falls Sie die vorige Frage nicht mit "Nein" beantwortet haben: War das früher (= vor Ihrer Erkrankung und dem Kontakt mit TRI) anders?
- | | |
|--|----|
| [a] Ja, da habe ich es besser vertragen | 21 |
| [b] Nein, war schon immer so | 20 |
| [c] Weiß ich nicht, da nicht ausprobiert/zu jung | 10 |
13. Sind Sie heute Raucher?
- | | |
|---|----|
| [a] Ja | 3 |
| [b] Höchstens bei Gelegenheit (= nicht täglich) | 1 |
| [c] Nein | 66 |
| [d] Nein, schon beim Einatmen von Zigarettenrauch wird mir schlecht/bekomme ich Luftnot/Kopfschmerzen | 11 |

14. Haben Sie früher (=vor Ihrer Erkrankung und dem Kontakt mit TRI) geraucht?
- [a] Regelmäßig 20
- [b] Manchmal 8
- [c] Nein 53
15. Hatten Sie jemals Kontakt mit anderen Drogen (inkl. Medikamentenmißbrauch)
- [a] Ja [b] Nein
- Wenn ja, welche?.....
- Wie intensiv?.....
16. Hat sich Ihr Körpergewicht während oder nach der TRI-Exposition merklich verändert?
- [a] Ja, zugenommen
- [b] Ja, abgenommen
- [c] Nein, gleichbleibend
17. Haben Sie sich im Verlaufe oder in der Folgezeit der TRI-Exposition in irgendeiner Weise psychisch/seelisch verändert?
- [a] Ja 20 [b] Nein 54
18. Würden Sie sich heute als "affektinkontinent" (affektlabil, rührselig, Gefühlsschwankungen auf relativ geringfügige Ereignisse hin) im weiteren Sinne bezeichnen?
- [a] Ja 41 [b] Nein 18 [c] Weiß nicht 18
19. Haben Sie den Eindruck, dass dies mit der Zeit deutlicher geworden ist?
- [a] Ja 36 [b] Nein 16 [c] Weiß nicht 17
20. Welche Wirkung hat TRI auf Sie?
- [a] sehr angenehm 4
- [b] der Geruch reizt mich nicht, stößt mich aber auch nicht ab 44
- [c] es ekelt mich an 27
21. Haben Sie, im Vergleich zu Ihren Kollegen, besonders "empfindlich" auf TRI reagiert/eine besondere Antipathie dagegen gehabt?
- [a] Ja 13 [b] Nein 39 [c] Weiß nicht 25
22. Sind Bekannte oder Arbeitskollegen ebenfalls mit TRI in Berührung gekommen?

[a] Ja 71 [b] Nein 4

Wenn ja, haben diese Leute auch gesundheitliche Beeinträchtigungen davongetragen? [a] Ja [b] Nein

Welche?

23. Haben Sie im Umfeld von Kleiderreinigungsbetrieben oder sonstiger Industrie gewohnt?

[a] Ja 10 [b] Nein 66

24. Hatten Sie Kontakt mit anderen Lösungsmitteln oder potentiell neurotoxisch wirkenden Stoffen (z.B. Holz-, Pflanzenschutzmittel, Farbe, Lacke oder Reinigungsmittel)?

[a] Ja 58 [b] Nein 14 [c] Weiß nicht 6

25. Zu welchem Industriezweig gehört(e) der Betrieb, in dem das TRI verwendet wurde?.....

26. Kam es, soweit bekannt, an Ihrem Wohnort bzw. im Umkreis des mit TRI arbeitenden Betriebes auch zu Grundwasserverunreinigungen mit TRI?

[a] Ja 2 [b] Nein 29 [c] Weiß nicht 51

27. Haben Sie gegenüber Ihrem (Fach)arzt jemals die Vermutung geäußert, das TRI könne mit Ihrer Parkinson-Erkrankung in Zusammenhang stehen bzw. diese ausgelöst haben?

[a] Ja 17 [b] Nein 62

28. Haben Sie vor Ihrer Parkinson-Erkrankung das Schlafmittel Chloraldurat[®] (Wirkstoff: Chloralhydrat) zu sich genommen?

[a] Ja 2 [b] Nein 75 [c] Weiß nicht 5

Wenn ja, über welchen Zeitraum und in welcher Menge wurde das Schlafmittel eingenommen?Tage,Tabletten pro Tag

Tab. 31. Antworten der Umfrageteilnehmer zu einzelnen Fragen des zweiten Teils (siehe oben) der Fragebogenaktion. In der Tabelle finden sich einzelne wichtige Fragen (durchnumeriert, siehe oben) in den Spalten wieder, deren mögliche Antworten nach dem Alphabet gekennzeichnet (a, b, c ...) in der Tabelle wiedergegeben sind. Antworten mit JA/NEIN/WEISS NICHT wurden mit j/n/w abgekürzt wiedergegeben. Pro Zeile sind alle gegebenen Antworten eines Patienten aufgelistet. Die Patienten sind analog dem ersten Teil sortiert

Patient \ Frage	1	2	3	4	9	10	11	12	13	14	20	21	22	24	25
1	4	a,b;c;d;e	a	a	a;b;c;e;f;g;h	a;b;c;d;e;f;g;h;i;j;k	a	c	d	n	c	j	j	j	Optische Industrie
2	10?	b	e	c	c;g	a;e;f	b	b	a	n	b	n	j	j	Gartenbau
3	4			c			b		a	r				j	Reinigung
4	23	a;b	c	a	a;c;f;g;h	a;e;f;g;i;o	b	a	c	n	b	w	j	j	Elektroindustrie
5	7	a	c	b		a;e	c	c	a	r	c	w	j	n	Nahrungsindustrie
6	12	a;b	c	a	c;g	d;f;i;o	b	a	d	r	b	j	j	j	Elektro-Transformat.
7	3	a;b	b	a		a;b	c	b	c	n	c	j	j	j	Landwirtschaft
8	2	b	a	b	g		c	a	c	n	b	w	n	n	Schuhindustrie
9	11	a;b	c	a	n	a;c	b	b	c	r	b	w	j	w	Reinigung
10	0	a;b	e	b			c	c	c	n	b	n	j	j	Kunststoffverarb.
11	16	a;b;e	d	a	a;c;g;h	a;b;c;d;e;f;g;h;i;j;m;o	c	b	d	n	c	w	j	j	Metall/Automobil
12	1	b	c	b	h	k	a	b	c	n	b	w	j	j	Handelsmarine
13	5	a;b	d	a		g;h;k	d		d	n	b	j	n	j	Elektrotechnik
14	27	b	b	a		p	c	c	c	n				j	Maschinenbau
15	2	a;b	b	a	c;g	d;e;i	d		c	r	b	n	j	j	Metallverarb.
16	4	a;b	c	a	a;f	a;b;c;e;j;k;o	c	b	c	n	b	n	j	j	Edel-Stahlwerk
17	2	a;b	b	b			d		c	n	b	n	j	j	Automobil
18	17	a;b	b	a	g	a;e;l;n	b	b	c	r	c	n	j	n	Medizintechnik

Patient \ Frage	1	2	3	4	9	10	11	12	13	14	20	21	22	24	25
19	25	b	e	b			c	b	c	n	c	w	j	n	Bekleidungsindust.
20	6	b	d	c			d		c	n	b	n	j	j	Hobby
21	10	b	b		g,h	a,e;p	d		c	n		w		j	Wäscherei
22	13	b	c	c		p	a	c	c	n	c	w	j	j	Kleiderreinigung
23	22	a,b	b	a			c		c	r	b	n	j	j	Metallverarb.
24	27	a,b	e	b		a,c;d,i;o	b	a	d	r	c	n	j	j	Textil/Beschichtung
25	12	a,b;e	d	b	a,c;g	a;b;c;e;k	b	c	c	r	c	w	j	n	Metallverarb.
26	1	a;b;e	d	a	h	c;d;e,i;k;m;o	d		c	n	c	w	j	j	Maschinenbau
27	38	a,b	d	b		e;m			c	n	c	w	j	n	Metallverarb.
28	11	a;b;d	b	a	c;e;g,h	c;d;e,i;m;p	b	a	c	r	b	w	j	n	Druckerei
29	10	a;b;e	c	a	g		c	c	c	n	c	w	j	j	Elektroindustrie
30	9	b	e	c	g		d	b	c	n	c	n	j	j	Maschinenbau
31	11	a;b	b;d	b			c	a	c	n	b	n	j	j	Luftfahrtbetrieb
32	10	a	d	b		a;d;k;o	b	a	c	n	b	n	j	j	Metallverarb.
33	12	b	e	a	c;e	i,j	a		d	n	b	w	n	j	Haushalt
34		a,b	e	a	a;g	c;e	c	a	c	r		w	j	j	KFZ-Werkstatt
35	9	a;b;e	c	b	a;c;g	a,f,h;i;k	b	a	c	n	c	w	j	j	Schraubenherst.
36	3	b;d	a	a			b	a	c	n	b	n	j	j	Brillenglasfertigung
37	4	a;b;e	d	a		i			c	r	b	n	j	w	Stahlerz., Gaskraftw.
38	29	a;b	a;c	a;b	g,h	a;b;c;d,f,g,i;k	a	a	d	m	a	n	j	j	Altlastensanierung
39	22	a;b;e	a;b	a	a;d;e;g	a;c;e	b	a	c	n	b	n	j	w	Druckerei
40	7	a;b;c	c;e	a	c;g	a,f	c	b	c	n	b	n	j	j	Metallverarb.

Patient \ Frage	1	2	3	4	9	10	11	12	13	14	20	21	22	24	25
41	28	b	a	a	e;g	a;b;c;d;e;g;i;k;o	b	b	c	n	c	j	j	j	Zellstoffwerk
42	11	a;b;e	a	a	a;f;g;h	a;b;c;e;h;j;o;p	b	a	c	n	c	j	j	j	Metallverarb.
43	34	a;b	e	b	g	a;e;i;j	b	b	d	n	c	j	j	j	Maschinenbau
44	18	a;b	b	b		a;m	d	a	n	r	b	n	j	j	Uhrmacher
45	11	a;b	e	b	a;g	b;o	c	c	n	m	c	n		j	Metallverarb.
46	4	a;b;e	a;f	a	c		b		n	r	b	w	j	w	Apparatebau
47	17	a	a	a	g		b	a	nd	n	b	n	j	j	Metallverarb.
48	15	a;b	d	b	c		c	b	n	n	b	w	j	n	Maschinenbau
49	16			c			b	b	n	m	b			w	Reinigung
50	25	b	d	b			b	b	nc	n	b		j	n	Metallindustrie
51	4	a;b	c	a	b;d	a;f;i;k;p	b	c	n	n	b	n			Kraftwerk
52	2	b	d	a			b;c		n	n		w	j	n	Elektroindustrie
53	20	a;b;c	a;e	b			a		nc	r	b	n	j	n	Maschinenbau
54	24	a;b	a	b	c;h	a	c	a	n	n	c	j	j	j	Elektroindustrie
55	28	b	d	a		a;b;j;o	a		nd	n	c	w	n	j	Metallverarb.
56	<1	a;b;e	a	a	c;g;h	b;c;e	b		n	r	c	n	j	n	Telefonelektriker
57	31	a;b	e	b	n	n	b		n	r	b	n	j	j	chem. Industrie
58	5	a	d	c			d		nc	n	b	w	j	j	Kunststoffverarb.
59	16	a;b	1;b	a		a;e;k	c		nc	n	c	j	j	n	Zahntechn. Lab.
60	23	a	b	b			a	c	n	n	b	n	j	n	Metallverarb.
61	21	a;b	a	a	a	c;k	a	a	n	n	c	j	j	j	Stadtverwaltung
62	8	b	b	b	h	a	c	b	n	n		w	j	n	Labor

Patient \ Frage	1	2	3	4	9	10	11	12	13	14	20	21	22	24	25
63	16	b	d	b		k	d		n	m	a	n	j	j	Forschungslab.
64	9	a;b	d	c	a;c;f;g;h	c;d,e;j;p	d		b	r	b	n	j	j	PE-Verarbeitung
65	1	a;b	d	b		a;b	d		n	n	c	j	j	j	Goldschmied
66	5	a;b;d	a	a	a;c;d;g	a;b;c;o	b	bc	nd	n	b	n	j	j	Lackiererei
67	6	a;b	d	c		b;m	b	a	n	r	b	n	j	j	Metall/Elektroind.
68	17	b	c	b	n		b	b	n	n	b	n	j	j	Maschinenbetrieb
69	27	a;b;d	a	a			b	a	n	m	c	j	j	n	Fotooptik
70	25	a;b	c	b		a;g	b	a	n	n	b	w	j	j	Mineralölverarb.
71	22	a;b	e	c	n		d	b	n	r	b	n	j	j	Elektromonteur
72	5	b	c	b	g	e	d		n	m	b	n	j	n	Optik-Fertigung
73	1	a;b	a	b	h	a;c;k	c		n	n	c	n	j	j	Fußbodenbeläge
74	27	b	d	b	a		c	b	nc	n	b	n	j	j	Drogerie
75	24	b	c	b		e	d		n	n	c	j	j	j	elektr. Setzmasch.
76	5	b	e	b	c		c		nc	n	a	w	j	w	Haus/Spielzeug
77	23	b	b	a	c	a;c;d;k	b	c	n	n	b	n	j	j	Druckerei
78	23	a	c	c		k	c	a	n	m	b	n	j	j	Chemie-Faser Herst.
79	21	a;b	d	a	h		d	b	n	n	b	n	j	j	Apparatebau
80	10	a;b	d;e	b		a	d		n	r	b	n	j	j	Optik/Mechanik
81	27	a;b	b	a		c;d,e;g;i;p	c	b	nc	n	b	n	j	j	Metallindustrie
82	20	a;b	d	b	c;g		d	b	n	m	a	n	j	j	Metallindustrie

5.5.3 Aussagen über den Umgang mit TRI

Am Ende des Fragebogens wurde den Teilnehmern der Umfrage Platz gegeben für weitere Anmerkungen, Kommentare und Erklärungen. Aussagen die im Zusammenhang zur Exposition des Lösungsmittels gemacht wurden sind nachfolgend wiedergegeben:

"Mein Kontakt zu TRI bestand zum Reinigen von Gebrauchtwagen... Damals wurden Fette, Flecken usw. viel mit TRI gereinigt. Das TRI wurde dabei auf einen Putzlappen geschüttet, in die Hand genommen und verarbeitet."

"Unsere Arbeitsanzüge wurden mit TRI gereinigt. ... Ich war damals als Kesselschmied im Lokomotivbau beschäftigt. Dabei wurde viel mit Fett gearbeitet. Um dies zu entfernen, wurde TRI eingesetzt. Es gab damals noch keine Handschuhe. TRI kam dabei mit der Haut in Berührung. Ohne Mundschutz wurde TRI eingeatmet. In der Werkstatt lagerte TRI in offenen Behältnissen, Absauganlagen waren nicht vorhanden."

"In einem Stahlbau wurden Epoxidharz-Verklebungen vorgenommen, die man vorher mit TRI entfettet hatte. Dazu wurden neue Putzlappen verwendet. Die so getränkten Lappen brauchte man auch, um den Arbeitstisch und sonstiges zu reinigen. Hier lagerten auch in offenen Katrons die ummantelten Schweißelektroden. Die Ummantelung konnte sich mit TRI sättigen, was beim Schweißen natürlich giftige Dämpfe freisetzte. Somit war auch klar, warum die Leute immer wieder über Übelkeit, Kopfschmerzen klagten und deshalb viele Ausfalltage hatten."

"..... Meine Aufgabe war es, u.a. sogenannte Bestückungsrahmen aus Metall in einem TRI-Bad zu reinigen. Die TRI-Flüssigkeit befand sich in einer Metallwanne (ca. 3 x 3 Meter), die erhöht auf einem Podest plaziert war. Man stieg eine kleine Treppe hoch und legte die Bestückungsrahmen in das TRI-Bad. Nach einiger Zeit wurden die Rahmen mit einem Haken aus dem TRI-Bad gefischt. Dabei mußte man sich über den Behälterrand beugen"

6 Untersuchungen zur enantiomer-differenzierenden Bildung und Metabolisierung von TaClo

6.1 *In-vitro*-Versuche zur Metabolisierung von TaClo durch Rattenlebermikrosomen

Nach Aufarbeitung von Rattenleber nach Kap. 5.1, S. 134 wurde die Proteinkonzentration der erhaltenen Mikrosomensuspension nach Kap. 5.2, S.134 bestimmt. Man versetzte TaClo (**6**) (77 mmol) mit 50 ml Rattenlebermikrosomen (2 mg/ml) und NADPH (77 mmol) und ließ das Gemisch 24 h rühren. Nach Aufarbeitung über C18-Kartuschen (siehe Kap. 4.1, S. 128) wurde die Lösung mittels HPLC-Analyse an chiraler Normalphase (Chiralcel OD, 4.6 x 250 mm, Fa. Daicel) mit dem Laufmittelgemisch *n*Hexan/*i*PrOH (70:30) bei einem Fluß von 1 ml/min untersucht. *R*-TaClo wurde mit einer Retentionszeit t_R von 18.4 min (Konz. 50.8%) und *S*-TaClo nach 23.8 min (Konz. 49.2%) detektiert. Ein analoges Verhältnis wurde bei der Analyse von TaClo (**6**) ohne Umsetzung mit Lebermikrosomen erhalten.

6.2 Trennung von TaClo an chiraler RP-Phase

Als Versuchsvorbereitung zur späteren HPLC-MS-MS-Analytik wurde zunächst eine Trennung an chiraler RP-Phase von TaClo-Referenzmaterial an einer Jasco-Anlage entwickelt. TaClo wurde an einer Chiralcel OD-R-Säule mit einem Lösungsmittelgemisch von 40% Acetonitril und 60% H₂O und 1‰ TFA mit einer Flußrate von 0.2 ml/min getrennt [t_R (*R*-TaClo) = 20.6 min; t_R (*S*-TaClo) = 21.7 min].

Die Signale wurden über CD-Spektren, die man mittels HPLC-CD im Stop-Flow-Mode detektiert hatte, ihrer absoluten Konfiguration zugeordnet:

CD (*R*-TaClo, MeCN:H₂O = 1:1): $\Phi_{206} +7.6$ mdeg, $\Phi_{217} +0.74$ mdeg, $\Phi_{230} +16.05$ mdeg, $\Phi_{271} -2.73$ mdeg;

CD (*S*-TaClo, MeCN:H₂O = 1:1): $\Phi_{206} -4.21$ mdeg, $\Phi_{217} +3.95$ mdeg, $\Phi_{230} -7.53$ mdeg, $\Phi_{271} +2.37$ mdeg.

6.3 *In-vivo*-Untersuchungen zur Bildung und Metabolisierung von TaClo

6.3.1 Tierexperimentelle Studien

48-h-Sammelurin von 2 Monate alten Wistar-Ratten und C57BL/6-Mäusen, die mit 0.8 mg/kg TaClo (**6**) behandelt worden waren,^[186] wurden analog Kap. 4.1 (S. 128) durch Festphasenextraktion aufgearbeitet. Die gereinigten Proben wurden jeweils in 100 μ l MeOH

aufgenommen und mittels HPLC-MS-MS-Analytik an chiraler RP-Phase (Chiralcel OD-R, 4.6 x 250 mm, Fa. Daicel, HPLC-Einstellungen siehe Kap. 1.3.2, S. 113) untersucht. Die Detektion der Enantiomere erfolgte mittels HPLC-MS-MS-Methoden: In SRM-Experimenten wurden die Retro-Diels-Alder-Abspaltungen 289 → 260, 291 → 262 (siehe auch Kap. 4.5) detektiert.

6.3.2 Analyse einer humanen Blutprobe

Außerdem wurde die aufgearbeitete (siehe Kap. 4, S. 128) Blutprobe eines Chloralhydrat-behandelten Jungen (Patient 23) einer Enantiomer-differenzierenden Analyse an einer Chiralcel OD-R analog der oben beschriebenen Vorgehensweise unterzogen.

Tab. 32. HPLC-ESI-MS-MS-Analyse von *in-vivo*-Material an chiraler RP-Phase (Chiralcel OD-R, 4.6 x 250 mm)

Probe	Integral (<i>R</i>)-TaClo	Integral (<i>S</i>)-TaClo	<i>er</i> (<i>R/S</i> -TaClo)
Rattenurin 1	8915	44303	17:83
Rattenurin 2	9573	11398	46:54
Rattenurin 3	20805	53062	28:72
Rattenurin 4	19625	25035	44:56
Mäuseurin 5	4958	3611	58:42
Patientenblut 23	117086	121014	49:51

7 Untersuchungen zum Metabolismus von TaClo

7.1 Nachweis der TaClo-Derivate mittels HPLC-MS-MS

HPLC-MS-MS-Analysen zum Nachweis der TaClo-Derivate wurden in Anlehnung an Arbeiten von Brückner^[121] unter Verwendung von SRM-Experimenten durchgeführt. Die in Tab. 33 aufgelisteten Verbindungen wurden an einer Symmetry-C18-Säule (150 x 2.1 mm I.D., 5 µm) mit den in Kap. 1.3.2, S. 113 angegebenen HPLC-Parametern getrennt. Durch Vergleich mit Retentionszeiten von synthetischem Referenzmaterial wurde der Nachweis der Verbindungen überprüft.

Tab. 33. SRM-Experimente zum Nachweis von TaClo-Metaboliten

Name	SRM	[eV]	<i>t_R</i> [min]
OH-TaClo (30)	305→276	15	5:40
<i>N</i> -Me-TaClo	303→260	15	10:15
CCl ₂ -THBC (60)	253→217	15	6:00
CHCl ₂ -THBC (29)	255→226	15	6:24
CH ₂ Cl-THBC (91)	221→192	15	5:27
TaGly (32)	217→188	15	5:32
[D ₄]-TaGly ([D ₄]- 32)	221→190	15	5:32
OH-TaGly (33)	233→204	15	2:53
THBC (61)	173→144	15	5:48
[D ₄]-THBC ([D ₄]- 61)	177→146	15	5:48
OH-THBC (92)	189→160	15	1:50
Norharman (34)	169→115	25	6:01
[D ₂]-Norharman ([D ₂]- 34)	171→115	25	6:00

7.2 Inkubationsexperimente mit Rattenlebermikrosomen

Rattenlebermikrosomen, die gemäß Kap. 5.1 isoliert worden waren, wurden auf eine Proteinkonzentration von ca. 2-2.5 mg/ml verdünnt. Zu 10 ml dieser Lösung gab man 20 mg TaClo-HCl (0.06 mmol) und 50 mg NADPH (0.06 mmol) und ließ diese Mischung 24 h bei Raumtemp. rühren. Nach Aufarbeitung über C18-Kartuschen (siehe Kap. 4.1) analysierte man die Proben nach den in Tab. 33 aufgelisteten Verbindungen mittels HPLC-MS-MS-Analyse (siehe Kap. 7.1).

Zusätzlich setzte man [D₄]-TaClo ([D₄]-**6**) mit Lebermikrosomen um. Nach analoger Aufreinigung (siehe oben) der Reaktionslösung wurde im SRM-Mode nach den Verbindungen [D₄]-TaGly ([D₄]-**32**), [D₄]-THBC ([D₄]-**61**) und [D₂]-Norharman ([D₂]-**34**) gesucht.

Tab. 34. Ergebnisse der Inkubationsexperimenten von Rattenlebermikrosomen mit TaClo (**6**) bzw. [D₄]-TaClo

Detektierte Verbindungen	Nicht detektierte Verbindungen
OH-TaClo (30)	<i>N</i> -Me-TaClo
CCl ₂ -THBC (60)	CH ₂ Cl-THBC (91)
CHCl ₂ -THBC (29)	OH-TaGly (33)
TaGly (32)	
Norharman (34)	
THBC (61)	
[D ₄]-TaGly ([D ₄]- 32)	[D ₂]-Norharman ([D ₂]- 34)
	[D ₄]-THBC ([D ₄]- 61)

7.3 Inkubationsexperimente mit PC12-Zellen

PC12-Zellen wurden gemäß Kap. 3.5 mit TaClo·HCl (**6**·HCl, 250 μM) inkubiert. Nach 2 Tagen löste man die Zellen durch Zugabe von 1 proz. Triton-X-100-Lösung in PBS-Puffer ab und reinigte diesen Zellgrund zusammen mit dem Zellüberstand über C18-Kartuschen (siehe Kap. 4.1) auf. In der erhaltenen Lösung wurde mittels HPLC-MS-MS-Analyse nach den in Tab. 33 aufgelisteten Verbindungen unter Verwendung von SRM-Experimenten gesucht.

Tab. 35. Ergebnisse der Inkubationsexperimenten von PC12-Zellen mit TaClo·HCl (**6**·HCl)

Detektierte Verbindungen	Nicht detektierte Verbindungen
CHCl ₂ -THBC (29)	OH-TaClo (30)
TaGly (32)	<i>N</i> -Me-TaClo
	CCl ₂ -THBC (60)
	CH ₂ Cl-THBC (91)
	OH-TaGly (33)
	Norharman (34)
	THBC (61)

7.4 Untersuchungen zum Metabolismus von TaClo in Ratten- und Mäuseurin

In den aufgereinigten Proben (siehe Kap. 6.3.1, S. 154) von 2 Monate alten, TaClo-behandelten (0.8 mg/kg, *i.p.*) Wistar-Ratten und C57BL/6-Mäusen^[186] wurden nach den in Tab. 33 aufgelisteten Verbindungen, mittels der in Kap. 7.1 beschriebenen HPLC-MS-MS-Experimente gesucht.

Tab. 36. TaClo-Metabolite im Urin TaClo-behandelter Ratten und Mäuse

Name	Ratten	Mäuse
OH-TaClo (30)	+	+
<i>N</i> -Me-TaClo (44)	-	-
CCl ₂ -THBC (60)	+	-
CHCl ₂ -THBC (29)	+	-
CH ₂ Cl-THBC (91)	-	-
TaGly (32)	+	+
OH-TaGly (33)	-	-
THBC (61)	(+)	(+)
Norharman (34)	(+)	(+)

+ sicherer Nachweis
 - kein Nachweis
 (+) kein sicherer Nachweis

7.5 Untersuchungen zum Metabolismus von TaClo in humanen Blut- und Urinproben

In sämtliche humanen Blut- und Urinproben von Chloralhydrat-behandelten Patienten, in denen im Vorfeld TaClo (**6**) nachgewiesen worden war (siehe Kap. 4.8 und Kap. 4.9), wurden die TaClo-Metabolite OH-TaClo (**30**) und OGluc-TaClo (**31**) mittels HPLC-MS-MS im SRM-Mode (305 → 276 und 307 → 278 für **30** und 481 → 452 und 483 → 454 für **31**) gesucht. In keiner Probe konnten die Verbindungen **30** und **31** nachgewiesen werden.

8 Untersuchungen zur Stereostruktur von Naturstoffen mit der Methode des oxidativen Abbaus

8.1 α -Acetoxybutansäure

Racemische α -Acetoxybutansäure (**76**) wurde in Anlehnung an Literatur^[249] ausgehend von racemischer α -Aminobutansäure (Fluka) durch Reaktion mit NaNO_2 in Essigsäure in einer Ausbeute von 80% hergestellt.

Die enantiomerenreine Verbindung (*R*)-**76** wurde nach gleicher Arbeitsvorschrift ausgehend von (*R*)- α -Aminobutansäure (Fluka) erhalten.

$[\alpha]_D^{22} = +30.7$ ($c = 1.3$ in MeOH); Lit.^[249] $+36.2$ ($c = 3.2$ in MeOH).

Alle weiteren spektroskopischen und physikalischen Daten stimmen mit den in der Literatur^[249] zitierten überein.

8.2 α -Methoxypropansäure

Racemische α -Methoxypropansäure (**85**) wurde aus racemischer α -Brompropansäure und NaOMe in einer Ausbeute von 85% nach Literaturvorschrift^[220] erhalten.

Enantiomerenreine α -Methoxypropansäure (*S*-**85**) wurde analog der Literatur^[250] hergestellt.

$[\alpha]_D^{22} = -19.4$ ($c = 1.0$ in CHCl_3); Lit.^[250] -70.5 (reine Flüssigkeit).

Alle weiteren spektroskopischen und physikalischen Daten stimmen mit den in der Literatur^[250] zitierten überein.

8.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Acetylierung von benzylichen Alkoholen

Zu einer Lösung des Alkohols des Typs **67** (ca. 1 mg) in 2 ml Et_2O gab man bei Raumtemp. 3 Äquiv. AcCl und 3 Äquiv. NEt_3 und rührte 6 h. Man gab 2 ml H_2O dazu, extrahierte die Reaktionsmischung mit Et_2O und trocknete die organische Phase über MgSO_4 . Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde die Mischung direkt dem Verfahren des oxidativen Abbaus unterzogen.

8.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Methylierung von benzylichen Alkoholen

Zu *ca.* 1 mg Alkohol des Typs **67** in 1 ml Et₂O wurden 1 Äquiv. NaH und 1 Äquiv. Me₂SO₄ gegeben. Nach 2 h Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml H₂O gestoppt und die Mischung mit 2 ml Et₂O extrahiert. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels wurde die Stereostruktur des Produkts durch Anwendung des oxidativen Abbaus ermittelt.

8.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift zum oxidativen Abbau

Das Verfahren des oxidativen Abbaus wurde analog zu der in der Literatur beschriebenen Technik^[195] durchgeführt.^[217] Zu einer 2-Phasen-Mischung aus 150 µl Acetonitril, 150 µl CCl₄ und 300 µl einer Natriumphosphat-Lösung (9.1 M, pH 6) wurden unter Rühren eine analytische Menge der zu untersuchenden chiralen aromatischen Verbindung (*ca.* 1 mg) und der Katalysators RuCl₃·H₂O (0.1 mg, 0.4 µmol) bei Raumtemp. beigelegt. In einem Zeitraum von 1 h gab man 40 mg (183 µmol) NaIO₄ in kleinen Portionen zu und rührte anschließend nochmals 1.5 h. Zur entstehenden Carbonsäure gab man 700 µl H₂O und rührte nochmals kurz. Die abgetrennte wäßrige Phase wurde 3 Mal mit je 300 µl CHCl₃ gewaschen und in der SpeedVac vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit 1.5 ml MeOH versetzt und die vorhandenen unlöslichen Salze durch Zentrifugation abgetrennt.

8.5.1 GC-MS-Analyse von α -Acetoxypropansäure und α -Acetoxybutansäure

Die nach oxidativem Abbau (durchgeführt nach Kap. 8.5) von α -Acetoxyarylethan- bzw. -propan-Verbindungen erhaltene MeOH-Lösung wurde in der SpeedVac getrocknet, der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und durch Filtration mit einem Mikrofilter von Schwebstoffen befreit. Diese Lösung wurde anschließend mittels GC-MS unter Verwendung von Säule 1 (siehe Kap. 1.3.3, S.115) und Temperaturprogramm 1 (siehe Kap. 1.3.3, S.115) analysiert. α -Acetoxypropansäure (**75**) eluierte nach einer Retentionszeit t_R von 16.1 min (*R*-**75**) bzw. 16.3 min (*S*-**75**) und α -Acetoxybutansäure (**76**) nach $t_R = 18.1$ min (*R*-**76**) und 18.5 min (*S*-**76**). Es wurden die Molekülionenfragmente [CO₂]⁺ ($m/z = 43$) und [M-CO₂H]⁺ ($m/z = 87$ für **75** und $m/z = 101$ für **76**, siehe auch Tab. 10, S.85) detektiert. Koelutionsexperimente mit Referenzsubstanzen bestätigten jeweils die erhaltenen Ergebnisse.

8.5.2 GC-MS-Analyse von α -Methoxypropansäure

Die erhaltene MeOH-Lösung des nach Arbeitsvorschrift 8.5 durchgeführten Abbaus von Verbindungen des Typs **84** wurde in der SpeedVac getrocknet, in CH₂Cl₂ aufgenommen und über einen Mikrofilter von Schwebstoffen befreit. Die CH₂Cl₂-Lösung wurde nach gaschromatographischer Trennung an Säule 2 mit Standardtemperaturprogramm 1 im SIM-mode ('selected ion monitoring mode') durch Detektion des Molekülionfragments [M-CO₂H₂]⁺ ($m/z = 58$) analysiert. Man erhielt für α -Methoxypropansäure (**85**) die Retentionszeiten $t_R = 9.45$ min (*R-85*) und 9.55 min (*S-85*) (siehe Tab. 11, S.89). Koelution mit der Referenzsubstanz lieferte jeweils eine symmetrische Peakerrhöhung.

8.5.3 Analyse von 2-Methylbernsteinsäure

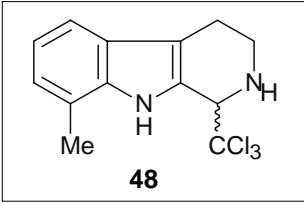
8.5.3.1 Derivatisierung

Die nach dem oxidativen Abbau (durchgeführt nach Arbeitsvorschrift 8.5, S. 160) von Isoshinanolon (**86**) erhaltene MeOH-Lösung von 2-Methylbernsteinsäure (**89**) mußte zunächst zu Methylbernsteinsäuredimethylester (**90**) derivatisiert werden. Dazu wurden 100 μ l (1.4 mmol) frisch destilliertes SOCl₂ bei 0°C unter Rühren zu der MeOH-Lösung gegeben. Nach *ca.* 12 h bei Raumtemp. wurden nochmals 100 μ l SOCl₂ beigelegt und die Reaktionsmischung weitere 6 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittel wurde der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und die erhaltene Lösung direkt der GC-Analyse zugeführt.

8.5.3.2 GC-MS-Analyse von 2-Methylbernsteinsäuredimethylester

Die nach Abbau von Isoshinanolon (siehe Kap. 8.5, S.160) und anschließender Derivatisierung (siehe Kap. 8.5.3.1, S. 161) erhaltene CH₂Cl₂-Lösung wurde an der Säule 2 mit dem Temperaturprogramm 2 und einem Säulenvordruck von 90 kPa Helium analysiert. Es wurden die Ionen im Bereich m/z 40 bis 250 detektiert. 2-Methylbernsteinsäuredimethylester (**90**) wurde nach einer Retentionszeit t_R von 13 min (*R-90*) und 13.1 min (*S-90*) detektiert. Durch Koelutionsexperimente wurden die erhaltenen Ergebnisse nochmals überprüft und bestätigt.

A Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalysen**A 1 Röntgenbeugungsanalyse von 48****Kristallographischer Abschnitt**

Summenformel:	$C_{13}H_{13}N_2Cl_3$	
Molekulargewicht:	303.62	
α [pm]:	719.09(6)	
β [pm]:	936.60(8)	
χ [pm]:	1023.63(8)	
α [Grad]:	101.344(6)	
β [Grad]:		93.100(7)
χ [Grad]:		95.320(7)
V [pm ³]:		671.2(1) × 10 ⁶
Z:		2
d(ber.) [g·cm ⁻³]:		1.502
Kristallsystem:		triklin
Raumgruppe:		P1
Datenaufnahme:		
Diffraktometer:		Siemens P4
Strahlung:		Mo K α
Monochromator:		Graphit
Kristallgröße [mm]:		0.45 x 0.55 x 0.15
Datenaufnahmemodus:		x-scan
Θ -Bereich [Grad]:		1.75 - 27.5
Reziproke Gitterkonstante		$h = -9 \rightarrow 1$ $k = -11 \rightarrow 11$ $l = -13 \rightarrow 13$
Zahl der gemessenen Reflexe:		3804
davon symmetrieunabhängig:		3075
beob. Reflexe $F > 3\sigma(F)$:		2782
Lin. Abs. Koeff. [mm ⁻¹]:		0.66
Abs. Korrektur:		w-scan

Strukturanalyse und Verfeinerung:

Verhältnis Parameter/ F_0 :	16.27
R, R _w :	0.044, 0.050
Größter Differenzpeak:	0.44 eÅ ⁻³
Größte Differenzlücke:	0.39 eÅ ⁻³
verwendetes Programm:	Siemens SHELXTL PLUS

Ortsparameter [$\times 10^{-4}$] und isotrope Temperaturkoeffizienten $U(\text{eq})$ [$\text{pm}^2 \times 10^{-1}$]

	X	Y	Z	U(eq)
Cl(1)	4575(1)	2049(1)	4874(1)	65(1)
Cl(2)	4835(1)	3713(1)	2816(1)	62(1)
Cl(3)	1734(1)	3938(1)	4485(1)	67(1)
C(1)	2123(3)	1407(2)	2654(2)	41(1)
N(2)	1095(3)	443(2)	3376(2)	53(1)
C(3)	-911(3)	565(3)	3494(2)	58(1)
C(4)	-2018(3)	437(2)	2160(2)	47(1)
C(5)	-990(3)	1379(2)	1363(2)	40(1)
C(6)	-1632(3)	1906(2)	207(2)	41(1)
C(7)	-3376(3)	1810(2)	-497(2)	50(1)
C(8)	-3497(4)	2482(3)	-1584(2)	57(1)
C(9)	-1913(3)	3260(3)	-1972(2)	55(1)
C(10)	-163(3)	3387(2)	-1291(2)	46(1)
C(11)	-66(3)	2700(2)	-195(2)	41(1)
N(12)	1452(3)	2637(2)	666(2)	42(1)
C(13)	871(3)	1853(2)	1613(2)	39(1)
C(14)	1539(4)	4196(3)	-1701(2)	58(1)
C(15)	3233(3)	2712(2)	3663(2)	44(1)

Die isotropen Temp.-Koeffizienten U sind definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
ADH	Aldehyd-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Dinatriumsalz von Bathocuproindisulfonsäure
bp	Basenpaare
Bu	Butyl
CD	Circular-Dichroismus
Clo	Chloral
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
DA	Dopamin
DC	Dünnschichtchromatographie
DDC	Dopa-Decarboxylase
DDT	<i>p,p'</i> -Dichlordiphenyltrichlorethan (28)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dopa	3,4-Dihydroxyphenylalanin (2)
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (13)
EC	<i>engl.</i> Effective Dose
ECD	<i>engl.</i> Electron Capture Detector
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Et	Ethyl
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA/Subst. P	γ -Aminobuttersäure plus Substanz P als Kotransmitter
GC	Gaschromatographie
Glu	Glutamat
GTCS	<i>engl.</i> Generalized Tonic Clonic Seizures
HPLC	<i>engl.</i> High Performance Liquid Chromatography
HVA	Homovanillinsäure (14)
HVAld	Homovanillinaldehyd (12)
IC	<i>engl.</i> Inhibitory Concentration
IR	Infrarotspektroskopie

<i>i.p.</i>	intraperitoneal, 'in den Bauchraum'
LDH	Lactatdehydrogenase
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
MAO	Monoaminoxidase
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MPDP ⁺	1-Methyl-4-phenyldihydropyridiniumion (22)
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridiniumkation (4)
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (3)
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenselektiver Detektor
MTB	Methyl- <i>t</i> butylether
MTPA-Cl	α -Methoxy- α -(trifluormethyl)phenylessigsäurechlorid (Moshersäurechlorid)
NAD	Nicotin-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduzierte Form von NAD
NADP	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	reduzierte Form von NADP
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NMR	<i>engl.</i> Nuclear Magnetic Reonance
NOS	Stickstoffoxidsynthase
PE	Petrolether
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RP	<i>engl.</i> Reversed Phase
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SC	Säulenchromatographie
<i>s.c.</i>	subcutan, 'unter die Haut'
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	<i>engl.</i> Selected Ion Monitoring
SRM	<i>engl.</i> Single Reaction Monitoring
Ta	Tryptamin (5)
TaBro	1-Tribrommethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (41)
TaClo	1-Trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (6)
TaClo-TFA	1-Trichlormethyl-2-trifluoracetyl-1,2,3,4-tetrahydro- β - carbolin (50)
TaFlu	1-Trifluormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (40)
TFA	Trifluoressigsäure

TFAA	Trifluoracetylanhydrid
THBC	1,2,3,4-Tetrahydro- β -carolin (61)
t_R	Retentionszeit
TRI	Trichlorethylen (7)
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

LITERATUR UND ANMERKUNGEN

- [1] J. Parkinson, *Essay on the Shaking Palsy*, Sherwood, Neely and Jones, London, **1817**.
- [2] H.-P. Ludin, *Das Parkinsonsyndrom* in: *Psychiatrie, Neurologie, Klinische Psychologie* (Hrsg.: G. Baumgartner, T. Brandt, R. Cohen, O.J. Grüsser, H. Helmchen, L.R. Schmidt), W. Kohlhammer, Stuttgart, Berlin, Köln, **1995**.
- [3] W.C. Gibson, Dr. James Parkinson (1755-1824). *NeuroScience News* **1999**, 2, 11-14.
- [4] C. Trétiakoff, *Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathologie des troubles musculaires et de la maladie de Parkinson*, Jouve, Paris, **1919**.
- [5] A. Carlsson, The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* **1959**, 11, 300-304.
- [6] H. Ehringer, O. Hornykiewicz, Verteilung von Noradrenalin und Dopamin im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des Extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.* **1960**, 38, 1236-1239.
- [7] H.-J. Braune, J.C. Möller, W.H. Oertel, *Erkrankungen der Basalganglien* in: *Aus der Praxis der Neurologie* (Hrsg.: K. Kunze), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1999**, S. 445-453.
- [8] W. Birkmayer, O. Hornykiewicz, Der L-Dopa-Effekt bei der Parkinson-Akinese. *Wien. klin. Wschr.* **1961**, 73, 787-788.
- [9] W. Birkmayer, O. Hornykiewicz, Der L-Dopa-Effekt beim Parkinson-Syndrom des Menschen: Zur Pathogenese und Behandlung der Parkinson-Akinese. *Arch. Psychiat. Nervenkrh.* **1962**, 203, 560-574.
- [10] A. Barbeau, C.F. Murphy, T.L. Sourkes, Excretion of dopamine in disease of basal ganglia. *Science* **1961**, 133, 1706-1707.
- [11] E. Tolosa, M.J. Marti, F. Valldeoriola, J.L. Molinuevo, History of levodopa and dopamine agonists in Parkinson's disease treatment. *Neurology* **1998**, 50 (Suppl 6), S2-S10.
- [12] K.A. Jellinger, Mechanisms of cell death in Parkinson's disease and related disorders. *NeuroScience News* **1999**, 2, 27-35.
- [13] S.M. Goldman, C. Tanner, *Etiology of Parkinson's disease* in: *Parkinson's Disease and Movement Disorders* (Hrsg.: J. Jankovic, E. Tolosa), Williams & Wilkins, Baltimore, **1998**, S. 133-158.
- [14] P. Foley, P. Riederer, Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *J. Neurol.* **2000**, 247 (Suppl. 2), II/82-II/94.

- [15] Y. Mizuno, S. Shimoda-Matsubayashi, H. Matsumine, N. Morikawa, N. Hattori, T. Kondo, *Genetic and Environmental Factors in the Pathogenesis of Parkinson's Disease* in: *Advances in Neurology; Parkinson's Disease* (Hrsg.: G.M. Stern), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, Bd. 80, S. 171-179.
- [16] E.C. Hirsch, B. Faucheux, P. Damier, M. Mouatt-Prigent, Y. Agid, Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* **1997**, 50 (Suppl.), 79-88.
- [17] E.C. Hirsch, Does oxidative stress participate in nerve cell death in Parkinson's disease? *Eur. Neurol.* **1993**, 33 (Suppl. 1), 52-59.
- [18] K.A. Jellinger, Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* **2000**, 107, 1-29.
- [19] G.C. Davis, A.C. Williams, S.P. Markey, M.H. Ebert, E.D. Caine, C.M. Reichert, I.J. Kopin, Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research* **1979**, 1, 249-254.
- [20] J.W. Langston, P. Ballard, Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* **1983**, 309, 310.
- [21] S. Przedborski, V. Jackson-Lewis, R. Djaldetti, G. Liberatore, M. Vila, S. Vukosavic, G. Almer, The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restorative Neurol. Neurosci.* **2000**, 16, 135-142.
- [22] J.-L. Vidaluc, MPTP as a molecular paradigm for neurodegeneration. A review of its connections with relevant molecules. *Curr. Med. Chem.* **1996**, 3, 117-138.
- [23] K. Matsubara, T. Gonda, H. Sawada, T. Uezono, Y. Kobayashi, T. Kawamura, K. Ohtaki, K. Kimura, A. Akaike, Endogenously occurring β -carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: A possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **1998**, 70, 727-735.
- [24] G. Bringmann, R. God, D. Feineis, W. Wesemann, P. Riederer, W.-D. Rausch, H. Reichmann, K.-H. Sontag, The TaClo concept: 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (TaClo), a new toxin for dopaminergic neurons. *J. Neural. Transm.* **1995**, 46 (Suppl.), 235-244.
- [25] G. Bringmann, D. Feineis, C. Grote, R. God, H.-W. Clement, K.-H. Sontag, B. Janetzky, H. Reichmann, W.-D. Rausch, P. Riederer, W. Wesemann, *Highly halogenated tetrahydro- β -carbolines as a new class of dopaminergic neurotoxins* in: *Pharmacology of Endogenous Neurotoxin* (Hrsg.: A. Moser), Birkhäuser, Boston, Basel, Berlin, **1998**, S. 151-169.
- [26] B. Janetzky, R. God, G. Bringmann, E. Reichmann, 1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline, a new inhibitor of Complex I. *J. Neural. Transm.* **1995**, 46 (Suppl.), 265-273.

- [27] B. Janetzky, G. Gille, M. Abdel-mohsen, R. God, W.-D. Rausch, G. Bringmann, H. Reichmann, Effect of highly-halogenated β -carboline on dopaminergic cells culture and on mitochondrial respiration. *Drug Dev. Res.* **1999**, *46*, 51-56.
- [28] C. Grote, H.-W. Clement, W. Wesemann, G. Bringmann, D. Feineis, P. Riederer, K.-H. Sontag, Biochemical lesions of the nigrostriatal system by TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline) and derivatives. *J. Neural. Transm.* **1995**, *46 (Suppl.)*, 275-281.
- [29] G. Bringmann, D. Feineis, R. God, S. Fähr, W. Wesemann, H.-W. Clement, K.-H. Sontag, C. Heim, T.A. Sontag, H. Reichmann, B. Janetzky, W.-D. Rausch, M. Abdel-mohsen, E. Koutsilieri, M.E. Götz, W. Gsell, B. Zielke, P. Riederer, Neurotoxic effects on the dopaminergic system induced by TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline), a potential mammalian alkaloid: *in vivo* and *in vitro* studies. *Biogenic Amines* **1996**, *12*, 83-102.
- [30] K.-H. Sontag, C. Heim, T.A. Sontag, R. God, H. Reichmann, W. Wesemann, W.-D. Rausch, P. Riederer, G. Bringmann, Long-term behavioural effects of TaClo after subchronic treatment in rats. *J. Neural. Transm.* **1995**, *46 (Suppl.)*, 283-289.
- [31] G. Bringmann, R. God, S. Fähr, D. Feineis, K. Fornadi, F. Fornadi, Identification of the dopaminergic neurotoxin 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline in human blood after intake of the hypnotic chloral hydrate. *Anal. Biochem.* **1999**, *270*, 167-175.
- [32] J.V. Bruckner, B.D. Davis, J.N. Blancato, Metabolism, toxicity, and carcinogenicity of trichloroethylene. *Crit. Rev. Toxicol.* **1989**, *20*, 31-50.
- [33] I.I. Kessler, Parkinson's disease in epidemiologic perspective. *Adv. Neurol.* **1978**, *19*, 355-384.
- [34] W.J. Mutch, I. Dingwall-Fordyce, A.W. Downie, J.G. Paterson, S.K. Roy, Parkinson's disease in a Scottish city. *Br. Med. J.* **1986**, *292*, 534-536.
- [35] B. Ferger, Morbus Parkinson. *Deutsche Apotheker Zeitung* **2000**, *140*, 566-571.
- [36] B.S. Schoenberg, *Descriptive epidemiology of Parkinson's disease: disease distribution and hypothesis formulation* in: *Advances in Neurology* (Hrsg.: M.D. Yahr, K.D. Bergmann), Raven Press, New York, **1986**, Bd. 45, S. 277-283.
- [37] M.M. Hoehn, M.D. Yahr, Parkinsonism: Onset, progression, and mortality. *Neurology* **1998**, *50*, 318; *Neurology* **1967**, *17*, 427-442.
- [38] W. Koller, R. O'Hara, W. Weiner, A. Lang, J. Nutt, Y. Agid, A.M. Bonnet, J. Jankovic, Relationship of aging to Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **1986**, *45*, 317-321.
- [39] *Neurotransmitter* in: *Neurowissenschaften* (Hrsg.: E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**, S. 305-312.

- [40] P.-A. Löschmann, J.B. Schulz, *Degenerative Erkrankungen der Basalganglien* in: *Klinische Neurologie* (Hrsg.: T. Herdegen, T.R. Tölle, M. Bähr), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1997**, S. 245-280.
- [41] P. Riederer, Deutsche Parkinson-Studiengruppe; Pharmakotherapie des Morbus Parkinson - Bericht einer Konsenskonferenz. *Neuropsychiatrie* **1995**, *9*, 45-58.
- [42] G.C. Cotzias, P.S. Papavasiliou, R. Gellene, Modification of parkinsonism - chronic treatment with L-dopa. *N. Engl. J. Med.* **1969**, *280*, 337-345.
- [43] W. Birkmayer, M. Mentasti, Weitere experimentelle Untersuchungen über den Katecholaminstoffwechsel bei extrapyramidalen Erkrankungen (Parkinson- und Chorea-syndrom). *Arch. Psych. Z. Ges. Neurol.* **1967**, *210*, 29-35.
- [44] E. Miller, L. Wiener, Ro 4-4602 and levodopa in the treatment of parkinsonism. *Neurology* **1974**, *24*, 482-486.
- [45] J. Kornhuber, J. Bormann, M. Hübers, K. Rusche, P. Riederer, Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel. A human post mortem study. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *206*, 197-300.
- [46] B.M. Strolin, P. Dostert, *In vivo* interaction of cabergolin with rat brain dopamine receptors labelled with [3H] *N-n*-prophyl-norapomorphine. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *187*, 399-408.
- [47] J.P. Bennett, M.F. Piercey, Pramipexol - a new dopamine agonist for the treatment of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **1999**, *163*, 25-31.
- [48] R.J. Uitti, Z.K. Wszolek, Medical treatment of Parkinson's disease. *NeuroScience News* **1999**, *2*, 36-43.
- [49] H. Przuntek, Non-dopaminergic therapy in Parkinson's disease. *J. Neurol.* **2000**, *247* (Suppl. 2), II/19-II/24.
- [50] A. Storch, J. Schwarz, *Morbus-Parkinson: Aktuelle Aspekte der Therapie* in: *Geriatric Praxis*, MMV Medizin Verlag GmbH, München, **1997**, S. 24-28.
- [51] M. Gerlach, P.F. Riederer, *Time Sequence of Dopaminergic Cell Death in Parkinson's Disease: Indications for Neuroprotective Studies* in: *Advances in Neurology; Parkinson's Disease* (Hrsg.: G.M. Stern), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, Bd. 80, S. 219-225.
- [52] D. Blum, S. Torch, N. Lambeng, M.-F. Nissou, A.-L. Benabid, R. Sadoul, J.-M. Verna, Molecular pathway involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **2001**, *65*, 135-172.
- [53] T. Alexi, C. Borlongan, R.L.M. Faull, C.E. Williams, R.G. Clark, P.D. Gluckman, P.E. Hughes, Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **2000**, 409-470.

- [54] H. Mochizuki, H. Mori, Y. Mizuno, Apoptosis in neurodegenerative disorders. *J. Neural. Transm.* **1997**, *50 (Suppl.)*, 125-140.
- [55] J.W. Langston, P. Ballard, J.W. Tetrud, I. Irwin, Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **1983**, *219*, 979-980.
- [56] H. Checkoway, L.M. Nelson, Epidemiologic approaches in the study of Parkinson's disease etiology. *Epidemiology* **1999**, *10*, 327-336.
- [57] B.A.J. Veldman, A.M. Wijn, P. Praamstra, M.W.I.M. Horstink, Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clin. Neurology Neurosurgery* **1998**, *100*, 15-26.
- [58] R. Betarbet, T.B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A.V. Panov, J.T. Greenamyre, Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* **2000**, *3*, 1301-1306.
- [59] M. Baba, Aggregation of α -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease. *Ann. J. Pathol.* **1998**, *152*, 879-884.
- [60] L.S. Forno, L.E. De Lanney, I. Irwin, J.W. Langston, Electron microscopy of Lewy bodies in the parahippocampal region. Comparison with inclusion bodies in the MPTP-treated squirrel monkey. *Adv. Neurol.* **1996**, *69*, 217-228.
- [61] K.S.P. McNaught, P.A. Carrupt, C. Altomare, S. Cellamare, A. Carotti, B. Testa, P. Jenner, C.D. Marsden, Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 921-933.
- [62] T. Nagatsu, Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* **1997**, *29*, 99-111.
- [63] K. Kikuchi, Y. Nagatsu, Y. Makino, T. Mashino, S. Ohta, M. Hirobe, Metabolism and penetration through blood-brain barrier of parkinsonism-related compounds: 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *Drug Metab. Dispos.* **1991**, *19*, 257-262.
- [64] M.A. Collins, M.G. Bigdeli, Tetrahydroisoquinolines *in vivo*: I. Rat brain formation of salsolinol, a condensation product of dopamine and acetaldehyde, under certain conditions during ethanol intoxication. *Life Sci.* **1975**, *16*, 585-602.
- [65] R.J. Cobuzzi Jr., E.J. Neafsey, M.A. Collins, Differential cytotoxicities of *N*-methyl- β -carbolinium analogues of MPP⁺ in PC12 cells: insights into potential neurotoxins in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **1994**, *62*, 1503-1510.
- [66] G. Bringmann, A. Hille, 1-Trichloromethyl-1,2,3,4- β -carboline - A potential chloral-derived indol alkaloid in man. *Arch. Pharm.* **1990**, *323*, 567-569.
- [67] DDT in: *Clinical Toxicology of Commercial Products* (Hrsg.: R.E. Gosselin, R.P. Smith, H.C. Hodge), Williams & Wilkins, Baltimore, **1984**, S. 134-138.

- [68] D. Henschler, Toxizität chlororganischer Verbindungen: Einfluß der Einführung von Chlor in organische Moleküle. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1997-2012.
- [69] D. Henschler, *Der Einfluß von Chlorsubstituenten auf die Toxizität organischer Moleküle* in: *Toxikologie chlororganischer Verbindungen*, VCH, Weinheim, **1994**, S. 22-28.
- [70] G. Bringmann, R. Brückner, R. Mössner, D. Feineis, A. Heils, K.P. Lesch, Effect of 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (TaClo) on human serotonergic cells. *Neurochem. Res.* **2000**, *25*, 837-843.
- [71] W.-D. Rausch, M. Abdel-mohsen, E. Koutsilieri, W.W. Chan, G. Bringmann, Studies of the potentially endogenous toxin TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline) in neuronal and glia cell cultures. *J. Neural. Transm.* **1995**, *46 (Suppl)*, 255-263.
- [72] G. Bringmann, R. Brückner, M. Münchbach, D. Feineis, R. God, W. Wesemann, C. Grote, M. Herderich, S. Diem, K.-P. Lesch, R. Mössner, A. Storch, *TaClo, a chloral-derived mammalian alkaloid with neurotoxic properties* in: *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders* (Hrsg.: A. Storch, M.A. Collins), Kluwer Press/Plenum Publishing Corporation, New York, **2000**, S. 145-150.
- [73] E. Hassoun, M. Bagchi, D. Bagchi, S.J. Stohs, Comparative studies on lipid peroxidation and DNA-single strand breaks induced by Lindan, DDT, Chlordane and Endrin in rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **1993**, *104C*, 427-431.
- [74] B. Epe, D. Ballmaier, W. Adam, C.R. Grimm, G.N. Saha-Möller, Photolysis of *N*-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acid Res.* **1996**, *24*, 1625-1631.
- [75] J. Kagan, Naturally Occurring Di- and Trithiophenes. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1991**, *56*, 87-169.
- [76] F. Bohlmann, G. Grau, Synthese und Bestimmung der absoluten Konfiguration des Angelicasäureesters aus *Aster Nov. Belgii*. *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 2608-2610.
- [77] T.P. Wang, J. Kagan, R.W. Tuveson, G.R. Wang, α -Terthienyl photosensitizes damage to pBR322 DNA. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53*, 463-467.
- [78] W. Adam, D. Ballmaier, B. Epe, G.N. Grimm, C.R. Saha-Möller, *N*-Hydroxypyridinethione als photochemische Hydroxyradikalquellen zur oxidativen DNA-Schädigung. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2326-2328; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2156-2158.
- [79] G. Bringmann, M. Münchbach, D. Feineis, K. Faulhaber, H. Ihmels, Studies on single-strand scissions to cell-free plasmid DNA by the dopaminergic neurotoxin 'TaClo' (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline). *Neurosci. Lett.* **2001**, *304*, 41-44.

- [80] C. de Meester, Genotoxic potential of β -carbolines: a review. *Mutat. Res.* **1995**, 339, 139-153.
- [81] K. Yamashita, H. Ohgaki, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, DNA adducts formed by the comutagens harman and norharman in various tissues of mice. *Cancer Lett.* **1988**, 42, 179-183.
- [82] S. Tamura, T. Konakahara, H. Komatsu, T. Ozaki, Y. Ohata, H. Takeuchi, Synthesis of β -carboline derivatives and their interaction with duplex-DNA. *Heterocycles* **1998**, 48, 2477-2480.
- [83] K. Hayashi, M. Nayao, T. Suyimura, Interactions of norharman and harman with DNA. *Nucleic Acid Res.* **1977**, 4, 3679-2685.
- [84] W. Maruyama, G. Sobue, K. Matsubara, Y. Hashizume, P. Dostert, M. Naoi, A dopaminergic neurotoxin, 1(*R*), 2(*N*)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, *N*-methyl(*R*)salsolinol, and its oxidation product, 1,2(*N*)-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion, accumulate in the nigrostriatal system of the human brain. *Neurosci. Lett.* **1997**, 223, 61-64.
- [85] M. Naoi, W. Maruyama, P. Dostert, Y. Hashizume, *N*-Methyl-(*R*)salsolinol as a dopaminergic neurotoxin: From an animal model to an early marker of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* **1997**, 50 (Suppl.), 89-105.
- [86] M. Naoi, W. Maruyama, *N*-methyl-(*R*)salsolinol, a Dopamine Neurotoxin, in *Parkinson's Disease* in: *Advances in Neurology; Parkinson's Disease* (Hrsg.: G.M. Stern), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, Bd. 80, S. 259-264.
- [87] W. Maruyama, M. Naoi, T. Kasamatsu, Y. Hashizume, T. Takahashi, K. Kohda, P. Dostert, An endogenous dopaminergic neurotoxin, *N*-methyl-(*R*)salsolinol, induces DNA damage in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* **1997**, 69, 322-329.
- [88] Y.-J. Jung, Y.-J. Surh, Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, 30, 1407-1417.
- [89] H.-J. Kim, H.-R. Yoon, S. Washington, I.I. Chang, Y.J. Oh, Y.-J. Surh, DNA strand scission and PC12 cell death induced by salsolinol and copper. *Neurosci. Lett.* **1997**, 238, 95-98.
- [90] L. Flowers, S.T. Ohnishi, T.M. Penning, DNA strand scissions by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones: Role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and *o*-semiquinones anion radicals. *Biochemistry* **1997**, 36, 8640-8648.
- [91] *Zellkulturen* in: *Methoden der Hirnforschung* (Hrsg.: U. Krischka, C.-W. Wallesch, G. Wolf), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1997**, S. 109-138.

- [92] A. Hartley, J.M. Stone, C. Heron, J.M. Cooper, A.H.V. Schapira, Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: Relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **1994**, *63*, 1987-1990.
- [93] K. Kohda, Y. Noda, S. Aoyama, M. Umeda, T. Sumino, T. Kaiya, W. Maruyama, M. Naoi, Cytotoxicity of 1-amino-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-amino-4-phenylpyridinium Ion, 1-amino analogues of MPTP and MPP⁺, to clonal pheochromocytoma PC12 cells. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1249-1253.
- [94] D. Offen, I. Ziv, A. Barzilai, S. Gorodin, E. Glater, A. Hochman, E. Melamed, Dopamine-melanine induces apoptosis in PC12 cells; Possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* **1997**, *31*, 207-216.
- [95] D. Blum, S. Torch, M.-F. Nissou, A.-L. Benabid, J.-M. Verna, Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **2000**, *283*, 193-196.
- [96] L. Hallmann, in: *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Thieme, Stuttgart, **1980**, S. 304-307.
- [97] G. Bringmann, M. Münchbach, D. Feineis, R. Mössner, K.-P. Lesch, H. Reichmann, B. Janetzky, Toxicity of 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline on PC12 cells. *Neurochem. Res.*, in Bearbeitung.
- [98] G. Drucker, K. Raikoff, E.J. Neafsey, M.A. Collins, Dopamine uptake inhibitory capacities of β -carboline and 3,4-dihydro- β -carboline analogs of *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) oxidation products. *Brain Res.* **1990**, *509*, 125-133.
- [99] Diese Arbeiten wurden von PD Dr. B. Janetzky, Institut für Neurologie der Universität Dresden, durchgeführt.
- [100] K.S.P. McNaught, U. Thull, P.A. Carrupt, C. Altomare, S. Cellamare, A. Carotti, B. Testa, C.D. Marsden, Toxicity of PC12 cells of isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurosci. Lett.* **1996**, *206*, 37-40.
- [101] B. Wolozin, C. Behl, Mechanisms of neurodegenerative disorders. *Arch. Neurol.* **2000**, *57*, 120-123.
- [102] L.L. Rubin, Neuronal cell death: when, why, and how. *Br. Med. Bull.* **1997**, *53*, 617-631.
- [103] M.S. Desole, L. Sciola, M.R. Delogu, S. Sircana, R. Migheli, Manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine induce apoptosis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **1996**, *209*, 193-196.
- [104] J. Oberdoerster, A.R. Kamer, R.A. Rabin, Differential effect of ethanol on PC12 cell death. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* **1998**, *287*, 359-365.

- [105] N. Yoshinaga, T. Murayana, Y. Nomura, Apoptosis induction by a dopaminergic neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺), and inhibition by epidermal growth factor in GH3 cells. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 111-120.
- [106] H. Mochizuki, K. Goto, H. Mori, Y. Mizuno, Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **1996**, *137*, 120-123.
- [107] P.D. Rumm, R.T. Takao, D.J. Fox, S.W. Atkinson, Efficiency of sedation of children with chloral hydrate. *Southern Med.* **1990**, *83*, 1040-1043.
- [108] J. Leuschner, N. Beuscher, Studies on the mutagenic and carcinogenic potential of chloral hydrate. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* **1998**, *48*, 961-968.
- [109] B.E. Fox, C.O. O'Brien, K.J. Kangas, A.L. Murphree, K.W. Wright, Use of high dose chloral hydrate for ophthalmic exams in children: A retrospective review of 302 cases. *J. Ped. Ophthalmol. Strab.* **1990**, *27*, 242-244.
- [110] T.W. Rall, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hrsg.: A. Goodman Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor), Pergamon Press, New York, **1990**, Bd. 17, S. 364-365.
- [111] *Martinsdale - The Extra Pharmacopoeia* (Hrsg.: J.E.F. Reynolds), Pharmaceutical Press, London, **1993**, S. 569-570.
- [112] T.G. Powell, L. Rosenbloom, The use of chloral hydrate for refractory childhood epilepsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **1983**, *25*, 524-526.
- [113] M. Thoresen, O. Henriksen, E. Wannag, L. Laegreid, Does a sedative dose of chloral hydrate modify the EEG of children with epilepsy? *Electroencephal. Clin. Neurophys.* **1997**, *102*, 152-157.
- [114] L.D. Reimche, K. Sankaran, K.W. Hindmarsh, G.F. Kasian, D.K.J. Gorecki, L. Tan, Chloral hydrate sedation in neonates and infants - clinical and pharmacologic considerations. *Dev. Pharmacol. Ther.* **1989**, *12*, 57-64.
- [115] G. Bringmann, H. Friedrich, G. Birner, M. Koob, K.-H. Sontag, C. Heim, W. Kolasiewicz, S. Fähr, M. Stäblein, R. God, D. Feineis, Neurotoxic effects on the dopaminergic system induced by TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline), a potential mammalian determination of the dopaminergic neurotoxin 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (TaClo) in biological samples using gas chromatography with selected ion monitoring. *J. Chromatogr. B* **1996**, *687*, 337-348.
- [116] M. Herderich, P. Schreier, HPLC-MS/MS in der Naturstoff- und Lebensmittelanalytik. *GIT Fachz. Lab.* **1996**, *9*, 841-845.
- [117] Ich danke Herrn PD Dr. M. Herderich (Institut für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg) für die Bereitstellung dieses Bildes.
- [118] B. Gutsche, M. Herderich, High-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry for the analysis of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline derivatives. *J. Chromatogr. A* **1997**, *767*, 101-106.

- [119] Herrn Prof. W. Kuhn der Neurologischen Klinik der Ruhr Universität Bochum danke ich für die Bereitstellung der Blutproben.
- [120] Ich danke Herrn Dr. H.-W. Clement, Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie in Kindes- und Jugendalter der Universität Freiburg, für die Beschaffung dieser Blutproben.
- [121] R. Brückner, *Dissertation*, Universität Würzburg, **2000**.
- [122] R. God, *Dissertation*, Universität Würzburg, **1996**.
- [123] G. Bringmann, M. Münchbach, D. Feineis, K. Messer, S. Diem, M. Herderich, H.-W. Clement, C. Stichel-Gunkel, W. Kuhn, 'Chiral' and 'achiral' determination of the neurotoxin TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline) from blood and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, submitted.
- [124] *Trichlorethylen* in: *Römpp Lexikon Chemie* (Hrsg.: J. Falbe, M. Regitz), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1999**, S. 4342-4343.
- [125] K. Soehring, Trichloräthylen. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **1951**, 3, 206-216.
- [126] J. Mc Auley, Trichlorethylene in trigeminal anesthesia. *Br. Med. J.* **1943**, 2, 713-714.
- [127] J.W. Tomczak, J. Kocur, H. Sobotka, Alcohol intoxication in teenagers using inhalant stupeficients. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **1989**, 41, 203.
- [128] D. Henschler, W. Romen, H.M. Elsässer, D. Reichert, E. Eder, Z. Radwan, Carcinogenicity study of trichloroethylene by longterm inhalation in three animal studies. *Arch. Toxicol.* **1980**, 43, 237-248.
- [129] DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), *Trichloräthylen* in: *Gesundheitsschädliche Arbeitstoffe: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten* (Hrsg.: D. Henschler), Verlag Chemie, Weinheim, **1976**.
- [130] DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), *Trichlorethen* in: *Gesundheitsschädliche Arbeitstoffe: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten* (Hrsg.: D. Henschler), Verlag Chemie, Weinheim, **1996**.
- [131] D. Henschler, F. Boser, H.C. Hopf, "Polyneuritis cranialis" durch Vergiftung mit chlorierten Acetylenen beim Umgang mit Vinylidenchlorid-Copolymeren. *Arch. Toxicol.* **1970**, 26, 62-75.
- [132] B.L. Johnson, Nature, extent, and impact of Superfund hazardous waste sites. *Chemosphere* **1995**, 31, 2415-2428.
- [133] WHO (World Health Organization), Trichloroethylene. *Rev. Environ. Health Crit.* **1985**, 50, 133-179.
- [134] R.F. White, R.G. Feldman, I.I. Eviator, J.F. Jabre, C.A. Niles, Hazardous waste and neurobehavioral effects: a developmental perspective. *Environ. Res.* **1997**, 73, 113-124.

- [135] M.N. Kostopoulou, S.K. Golfopoulos, A.D. Nikolaou, K.X. Xilourgidis, T.D. Lekkas, Volatile organic compounds in the surface waters of Northern Greece. *Chemosphere* **2000**, *40*, 527-532.
- [136] A.M. Fan, Trichloroethylene: Water contamination and health risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1988**, *101*, 55-92.
- [137] F.L. Brugnone, L. Perbellini, C. Guiliari, M. Cerpelloni, M. Soave, Blood and urine concentrations of chemical pollutants in the general population. *Medicina del Lavoro* **1994**, *85*, 370-389.
- [138] H.-J. Spott, R. Tiebach, R. Weber, Trichloroethylene in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* **1999**, *42*, 165.
- [139] H.S. Brown, D.R. Bishop, C.A. Rovon, The role of skin absorption as a route of exposure for volatile organic compounds (VOCs) in drinking water. *Am. J. Public Health* **1984**, *74*, 474-484.
- [140] M.J. Ellenhorn, D.G. Barcoloux, *Trichloroethylene* in: *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, Elsevier, New York, **1988**, S. 990-993.
- [141] W. Dekant, A. Schulz, M. Metzler, D. Henschler, Absorption, elimination and metabolism of trichloroethylene: A quantitative comparison between rats and mice. *Xenobiotica* **1986**, *16*, 143-152.
- [142] K.M. Lee, S. Muralidhara, C.A. White, J.V. Bruckner, Mechanisms of dose-dependent kinetics of trichloroethylene: Oral bolus dosing of rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2000**, *164*, 55-64.
- [143] T.B. McCarthy, R.D. Jones, Industrial gassing poisonings due to trichloroethylene, perchloroethylene, and 1,1,1-trichloroethane 1961-1980. *Br. J. Industr. Med.* **1983**, *40*, 450-455.
- [144] K.G. Heglid, C. Briving, H.-A. Hansson, L. Rosengreen, Trichloroethylene: Long-lasting changes in the brain after rehabilitation. *Neurotoxicology* **1981**, *2*, 659-673.
- [145] R.G. Feldman, R.F. White, J.N. Currie, P.H. Travers, S. Lessell, Long-term follow-up after single toxic exposure to trichloroethylene. *Am. J. Ind. Med.* **1985**, *8*, 119-126.
- [146] D. Guehl, E. Bezar, S. Dovero, T. Boraud, B. Bioulac, C. Gross, Trichloroethylene and parkinsonism: a human and experimental observation. *Eur. J. Neurol.* **1999**, *6*, 609-611.
- [147] W. Dekant, M. Metzler, D. Henschler, Novel metabolites of trichloroethylene through dechlorination reaction in rats, mice, and humans. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 2021-2027.
- [148] G. Müller, M. Spassovski, D. Henschler, Metabolism of trichloroethylene in man. III. Interaction of trichloroethylene and ethanol. *Arch. Toxicol.* **1975**, *33*, 173-189.

- [149] T.R. Torkelson, V.K. Rowe, *Halogenated aliphatic hydrocarbons containing chlorine, bromine and iodine* in: *Patty's Industrial and Toxicology* (Hrsg.: G.D. Clayton, F.E. Clayton), John Wiley & Sons, New York, **1981**, Bd. 2B, S. 3433-3601.
- [150] A.A. Elfarra, R.J. Duescher, C.M. Pasch, Mechanisms of 1,3-butadiene oxidations to butadiene monoxide and crotonaldehyde by mouse liver microsomes and chloroperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, 286, 244-251.
- [151] A.A. Elfarra, R.J. Krause, A.R. Last, L.H. Lash, J.C. Parker, Species- and sex-related differences in metabolism of trichloroethylene to yield chloral and trichloroethanol in mouse, rat, and human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, 26, 779-785.
- [152] *Tetrachlorethylen* in: *Römpp Lexikon Chemie* (Hrsg.: J. Falbe, M. Regitz), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1999**, S. 4460-4461.
- [153] *Verordnung zum Bundesimmissionsschutzgesetz* in: *Bundesgesetzbuch I*, S. 2694.
- [154] *Verordnung zur Emissionsbegrenzung von leichtflüchtigen Halogenkohlenwasserstoffen* in: *Bundesgesetzbuch III*, S. 2129.
- [155] DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), *Tetrachlorethen* in: *Gesundheitsschädliche Arbeitstoffe: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten* (Hrsg.: D. Henschler), Verlag Chemie, Weinheim, **1997**.
- [156] DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), *Tetrachlorethen* in: *Gesundheitsschädliche Arbeitstoffe: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten* (Hrsg.: D. Henschler), Verlag Chemie, Weinheim, **1982**.
- [157] U. Weitbrecht, Beurteilung der Trichloräthylen-Gefährdung im Betrieb. *Zbl. Arbeitmed.* **1957**, 7, 55-58.
- [158] R.D. Stewart, H.H. Gay, D.S. Erley, C.L. Hake, J.E. Peterson, Observations on the concentrations of trichloroethylene in blood and expired air following exposure of humans. *Amer. Industr. Hyg. Ass. J.* **1962**, 23, 167-170.
- [159] R.D. Stewart, H.C. Dodd, H.H. Gay, D.S. Erley, Experimental human exposure to trichloroethylene. *Arch. Environm. Health* **1970**, 20, 64-71.
- [160] K.B. Lehmann, L. Schmidt-Kehl, Die 13 wichtigsten Chlorkohlenwasserstoffe der Fettreihe vom Standpunkt der Gewerbehygiene. *Arch. Hyg. (Berl.)* **1936**, 116, 131.
- [161] S. Nomura, Health hazards in workers exposed to trichloroethylene vapor. I. Trichloroethylene poisoning in an electroplating plant. *Kumamoto med. J.* **1962**, 15, 29-37.
- [162] E.O. Longley, R. Jones, Acute trichloroethylene narcosis. *Arch. environm. Health.* **1963**, 7, 249-252.
- [163] A. Seidler, W. Hellenbrand, B.-P. Robra, P. Vieregge, P. Nischan, J. Joerg, W.H. Oertel, G. Ulm, E. Schneider, Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology* **1996**, 46, 1275-1284.

- [164] G. Bringmann, D. Feineis, R. God, R. Brückner, J.A. Protzen, M. Blank, K. Peters, E.-M. Peters, B. Janetzky, H. Reichmann, Chemical modification of the mitochondrial Complex I inhibitor 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline: Synthesis and evaluation of *N*-alkanoyl derivatives. *Z. Naturforsch.* **2000**, 55c, 620-630.
- [165] C.A. Taylor, M.H. Saint-Hilaire, C.A. Thomas, A.E. Burchard, R.G. Feldman, R.H. Myers, Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genetics* **1999**, 88, 742-749.
- [166] C.M. Tanner, J.W. Langston, Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* **1990**, 40 (Suppl. 3), 17-30.
- [167] J.H. Bower, D.M. Maraganore, S.K. McDonnell, W.A. Rocca, Incidence and parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* **1999**, 52, 1214-1220.
- [168] A.-M. Kuopio, R.J. Marttila, H. Helenius, U.K. Rinne, Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **1999**, 14, 928-939.
- [169] R.J. Uitti, H. Shinotoh, M. Hayward, M. Schulzer, E. Mak, D.B. Calne, Familial Parkinson's disease - a case-control study of families. *Can. J. Neurol. Sci.* **1997**, 24, 127-132.
- [170] H. Payami, K. Larsen, S. Barnard, J. Nutt, Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann. Neurol.* **1994**, 36, 659-661.
- [171] K. Marder, M.X. Tang, H. Mejia, Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: a community-based study. *Neurology* **1996**, 47, 155-160.
- [172] R.J. Marttila, J. Kaprio, M. Koskenvuo, U.K. Rinne, Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology* **1996**, 46, 1044-1050.
- [173] C.D. Ward, R.C. Duvoisin, S.E. Ince, J.D. Nutt, R. Eldridge, D.B. Calne, Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in set of quadruplets. *Neurology* **1983**, 33, 815-824.
- [174] N.E. Bharucha, L. Stokes, B.S. Schoenberg, A case-control study of twin pairs discordant for Parkinson's disease: a search for environmental risk factors. *Neurology* **1986**, 36, 284-288.
- [175] R.C. Duvoisin, R. Eldridge, A. Williams, J. Nutt, D. Calne, Twin study of Parkinson's disease. *Neurology* **1981**, 31, 77-80.
- [176] C.D. Marsden, Parkinson's disease in twins. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1987**, 50, 105-106.
- [177] P. Vieregge, K.A. Schiffke, H.J. Friedrich, B. Muller, H.P. Ludin, Parkinson's disease in twins. *Mov. Disord.* **1990**, 5, 187-194.
- [178] G.B. Steventon, M.T.E. Heafield, R.H. Waring, A.C. Williams, Xenobiotic metabolism in Parkinson's disease. *Neurology* **1989**, 39, 883-887.

- [179] A. Barbeau, M. Roy, S. Paris, T. Cloutier, L. Plasse, J. Poirier, Ecogenetics of Parkinson's disease: 4-hydroxylation of debrisoquine. *The Lancet* **1985**, 2, 1213-1216.
- [180] A. Barbeau, M. Roy, T. Cloutier, L. Plasse, S. Paris, Environmental and genetic factors in the etiology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **1986**, 45, 299-306.
- [181] D.A. Gearhart, M.A. Collins, J.M. Lee, E.J. Neafsey, Increased β -carboline 9N-methyltransferase activity in the frontal cortex in Parkinson's disease. *Neurobiol. Disease* **2000**, 7, 201-211.
- [182] G. De Michele, A. Filla, G. Volpe, Environmental and genetic factors in Parkinson's disease: a case-control study in Southern Italy. *Mov. Disord.* **1996**, 11, 17-23.
- [183] A. Morano, Jiménez-Jiménez F.J., J.A. Molina, M.A. Antolin, Risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in the province of Cáceres, Spain. *Acta Neurol. Scand.* **1994**, 89, 164-170.
- [184] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr. A* **2001**, 906, 3-33.
- [185] G. Bringmann, C. Günther, M. Ochse, O. Schupp, S. Tasler, *Axially chiral biaryls, a multi-faceted class of stereochemically, biosynthetically, and pharmacologically intriguing secondary metabolites* in: *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* (Hrsg.: W. Herz, H. Falk, G.W. Kirby, R.E. Moore, C. Tamm), **2001**, Bd. 82.
- [186] Die Arbeiten wurden von Frau PD Dr. Christine Stichel-Gunkel am Lehrstuhl für Tierphysiologie der Universität Bochum durchgeführt.
- [187] H. Tsuchiya, H. Todoriki, T. Hayashi, Urinary excretion of the enantiomers of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline in unequal abundance implies enzymatic metabolism in man. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1994**, 350, 104-108.
- [188] O. Beck, K.F. Faull, Concentrations of the enantiomers of 5-hydroxymethtryptoline in mammalian urine: implications for *in vivo* biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, 35, 2636-2639.
- [189] K. Matsubara, E.J. Neafsey, M.A. Collins, Novel S-adenosylmethionine-dependent indole-N-methylation of β -carbolines in brain particulate fractions. *J. Neurochem.* **1992**, 59, 511-518.
- [190] K. Matsubara, M.A. Collins, E.J. Neafsey, Mono-N-methylation of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolines in brain cytosol: absence of indole methylation. *J. Neurochem.* **1992**, 59, 505-510.
- [191] K. Matsubara, M.A. Collins, A. Akane, J. Ikebuchi, E.J. Neafsey, M. Kagawa, H. Shiono, Potential bioactivated neurotoxicants, N-methylated β -carbolinium ions, are present in human brain. *Brain Res.* **1993**, 610, 90-96.

- [192] G. Bringmann, K.-P. Gulden, Y.F. Hallock, K.P. Manfredi, J.H. Cardellina II, M.R. Boyd, B. Kramer, J. Fleischhauer, Circular dichroism of Michellamines: Independent assignment of axial chirality by calculated and experimental CD spectra. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7807-7814.
- [193] G. Bringmann, M. Rübenacker, J.R. Jansen, D. Scheutzov, On the structure of the *Dioncophyllaceae* alkaloids Dioncophylline A ("Triphyophylline A") and "O-Methyl-Triphyophylline". *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 639-642.
- [194] G. Bringmann, T. Geuder, M. Rübenacker, R. Zagst, A facile degradation procedure for determination of absolute configuration in 1,3-dimethyltetra- and dihydroisoquinolines. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2067-2070.
- [195] G. Bringmann, R. God, M. Schäffer, An improved degradation procedure for determination of the absolute configuration in chiral isoquinoline and β -carboline derivatives. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393-1403.
- [196] G. Bringmann, M. Wenzel, M. Rückert, K. Wolf, S. Busemann, M. Schäffer, L. Aké Assi, Dioncophyllinol D, the first 4-hydroxylated naphthylisoquinoline alkaloid, from the leaves of *Triphyophyllum peltatum*. *Heterocycles* **1998**, *47*, 985-990.
- [197] G. Bringmann, M. Ochse, M. Michel, Gentrymine B, an quaternary *Ancistrocladus* alkaloid: Stereoanalysis, synthesis, and biomimetic formation from Gentrymine A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 581-585.
- [198] G. Bringmann, F. Teltschik, M. Michel, S. Busemann, M. Rückert, R. Haller, S. Bär, A. Robertson, R. Kaminsky, Ancistrobertsonines B, C, and D as well as 1,2-didehydro-ancistrobertonine D from *Ancistrocladus robertsoniorum*. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 321-332.
- [199] G. Bringmann, F. Pokorny, *The Naphthylisoquinoline Alkaloids* in: *The Alkaloids* (Hrsg.: G.A. Cordell), Academic Press, New York, **1995**, Bd. 46, S. 127-271.
- [200] M.D. Greca, A. Fiorentino, L. Mangoni, A. Molinaro, P. Monaco, L. Previtera, Cytotoxic 9,10-dihydrophenanthrenes from *Juncus effusus*. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3425-3432.
- [201] A. Mitsakos, M. Breuer, H. Budzikiewicz, P. Proksch, Benzofuran derivatives from *Enceliopsis covillei*. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 2243-2244.
- [202] C.P. Gorst-Allam, K.G.R. Pachler, P.S. Steyn, P.L. Wessels, Carbon-13 nuclear magnetic resonance assignments of some fungal C₂₀ anthraquinones; their biosynthesis in relation to that of Aflatoxin B 1. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1977**, 2181-2188.

- [203] G. Brauers, R.A. Edrada, R. Ebel, P. Proksch, V. Wray, A. Berg, U. Gräfe, C. Schächtele, F. Trotzke, G. Finkenzeller, D. Marme, J. Kraus, M. Münchbach, M. Michel, G. Bringmann, K. Schaumann, Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: Novel inhibitors of protein kinases. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 739-745.
- [204] C. Kamperdick, N.H. Van, T.S. Sung, G. Adam, Benzopyrans from *Meliocope ptelefolia* leaves. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1049-1056.
- [205] C. Rosini, L. Franzini, A. Raffaelli, P. Salvadori, Synthesis and applications of binaphthyl C₂-symmetry derivatives as chiral auxiliaries in enantioselective reactions. *Synthesis* **1992**, 503-517.
- [206] M. Shibasaki, H. Sasai, T. Arai, Asymmetrische Katalyse mit Hetero-Dimetall-Verbindungen. *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1290-1311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1236-1256.
- [207] L. Pu, 1,1'-Binaphthyl dimers, oligomers, and polymers: Molecular recognition, asymmetric catalysis, and new materials. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2405-2494.
- [208] G. Bringmann, M. Breuning, S. Tasler, The lactone concept: An efficient pathway to axially chiral natural products and useful reagents. *Synthesis* **1999**, 525-558.
- [209] M. Breuning, *Dissertation*, Universität Würzburg, **1998**.
- [210] A. Horeau, in: *Stereochemistry: Fundamentals and Methods* (Hrsg.: H.B. Kagan), Thieme, Stuttgart, **1977**, S. 52-55.
- [211] B.M. Trost, J.L. Belletire, S. Godleski, P.G. McDougal, J.M. Balkovec, On the use of the *O*-methylmandelate ester for establishment of absolute configuration of secondary alcohols. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370-2374.
- [212] K. Nakanishi, N. Berova, R.W. Woody, in: *Circular Dichroism: Principles and Applications*, VCH, Weinheim, New York, **1994**.
- [213] J. Frelek, M. Geiger, W. Voelter, Absolute configurational assignment of α -hydroxy esters from Cupra A circular dichroism spectra. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 863-868.
- [214] G. Bringmann, M. Münchbach, M. Michel, Determination of the absolute configuration of chiral benzylic alcohols and their esters and ethers, by ruthenium-mediated oxidative degradation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3167-3176.
- [215] M. Kasai, H. Ziffer, Ruthenium tetroxide catalyzed oxidations of aromatic and heteroaromatic rings. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2346-2349.
- [216] H.J. Carlsen, T. Katsuki, V.S. Martin, K.B. Sharpless, A greatly improved procedure for ruthenium tetroxide catalyzed oxidations of organic compounds. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936-3938.
- [217] Ich danke Manuela Michel für die Durchführung des oxidativen Abbaus.

- [218] G. Bringmann, M. Breuning, Enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes using axially chiral 2-aminomethyl-1-(2'-hydroxyphenyl)naphthalene catalyts. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 667-679.
- [219] Ich danke M. Breuning für die Bereitstellung der Verbindung **72**.
- [220] D.P.G. Hamon, V.C. Trenerry, Cyclopropylidene insertion reactions: 2-Methoxy-1,2-dimethylbicyclo[1,1,0]butane. *Austr. J. Chem.* **1980**, *33*, 809-821.
- [221] M. Tezuka, C. Takahashi, M. Kuroyanagi, M. Satake, K. Yoshihira, S. Natori, New naphthoquinones from *Diospyros*. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 175-183.
- [222] V. Kumar, K.M. Meepagala, S. Balasubramaniam, Quinoid and other constituents of *Aristea ecklonii*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1118-1119.
- [223] G.M.K.B. Gunaherath, A.A.L. Gunatilaka, M.U.S. Sultanbawa, S. Balasubramaniam, 1,2(3)-Tetrahydro-3,3'-biplumbagin: A naphthalenone and other constituents from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1245-1247.
- [224] J. Bhattacharyya, V.R. de Carvalho, *Epi*-Isoshinanolone from *Plumbago scandens*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 764-765.
- [225] M. Lavault, J. Bruneton, Alcaloides du *Dioncophyllum thollonii*. *Planta Med.* **1980**, (Suppl.), 17-21.
- [226] S.W. Hanson, M. Crawford, D.P.J. Thanasingh, (+)-Isoshinanolone and 2-methylbenzofuran-4-carbaldehyde from the fish-stunning plant *Habropetalum dawei*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1162-1164.
- [227] N.H. Anh, H. Ripperger, A. Porzel, T.V. Sung, G. Adam, Tetralones from *Ancistrocladus cochinchinensis*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 549-551.
- [228] N.H. Anh, T.V. Sung, H. Ripperger, G. Adam, Some results from chemical study on Vietnamese *Ancistrocladus cochinchinensis*. *Tap chi Hoa hoc* **1996**, *34*, 89-93.
- [229] K. Likhitwitayawuid, R. Kaewamatawong, N. Ruangrunsi, J. Krungkrai, Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Med.* **1998**, *64*, 237-241.
- [230] S.-M. Zhong, P.G. Waterman, J.A.D. Jeffreys, Naphthoquinones and triterpenes from African *Diospyros* species. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1067-1072.
- [231] P. Richomme, B. Papillon, P. Cabalion, J. Bruneton, Naphthoquinones de *Diospyros samoensis*. *Pharm. Acta Helv.* **1991**, *66*, 88-89.
- [232] M. Bin Zakaria, J.A.D. Jeffreys, P.G. Waterman, S.-M. Zhong, Naphthoquinones and triterpenes from Asian *Diospyros* species. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1481-1484.
- [233] G. Bringmann, G. François, L. Aké Assi, J. Schlauer, The alkaloids of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae). *Chimia* **1998**, *52*, 18-28.
- [234] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Rückert, J. Schlauer, The polyketide folding mode in the biogenesis of isoshinanolone and plumbagin in *Ancistrocladus heyneanus* (Ancistrocladaceae). *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8445-8448.

- [235] Diese Arbeiten wurden von Herrn K. Messer durchgeführt. Ich danke ihm für die gute Zusammenarbeit.
- [236] J.-M. Yue, Y. Zhao, Q.-S. Zhao, Z.-W. Lin, H.-D. Sun, H.-M. Wu, J.-F. Xu, Phenolics from *Ceratostigma minus*. *Acta Bot. Sinica* **1998**, *40*, 1035-1039.
- [237] J.-M. Yue, J. Xu, Y. Zhao, H.-D. Sun, Z.-W. Lin, Chemical components from *Ceratostigma willmollianum*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1031-1033.
- [238] G. Bringmann, M. Münchbach, K. Messer, D. Koppler, M. Michel, O. Schupp, M. Wenzel, A.M. Louis, *Cis*- and *trans*-isoshinanolone from *Dioncophyllum thollonii*: Absolute configuration of two 'known', wide-spread natural products. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 693-699.
- [239] G. Bringmann, C. Günther, W. Saeb, J. Mies, R. Brun, L. Aké Assi, 8-*O*-Methyldioncophyllinol B and revised structures of other 7,6'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae). *Phytochemistry* **2000**, *54*, 337-346.
- [240] K. Messer, *Dissertation*, Universität Würzburg, vorauss. **2001**.
- [241] K. Messer, *Diplomarbeit*, Universität Würzburg, **1997**.
- [242] J. Flügge, in: *Grundlagen der Polarimetrie*, Zeiss Verlag, Oberkochen/Württ., **1965**, S. 62.
- [243] G. Bringmann, D. Feineis, R. Brückner, M. Blank, K. Peters, E.-M. Peters, H. Reichmann, B. Janetzky, C. Grote, H.-W. Clement, W. Wesemann, Bromal-Derived Tetrahydro- β -carbolines as Neurotoxic Agents: Chemistry, Impairment of the Dopamine Metabolism, and Inhibitory Effects on Mitochondrial Respiration. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1467-1478.
- [244] L.-J. Zhou, X.-Z. Zhu, Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of Bilobalide. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* **2000**, *293*, 982-988.
- [245] J.R. Whitaker, P.E. Granum, An absolute method for protein determination based on differences in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* **1980**, *109*, 156-159.
- [246] Ich danke Frau Beate Geier, Institut für Virologie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung der Rattenleber.
- [247] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [248] Ich danke Frau PD Dr. Astrid Schön, Institut für Biologie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung der Ultrazentrifuge und des -70°-Tiefkühlschranks.
- [249] T. Kolasa, M.J. Miller, Reactions of α -hydroxy carbonyl compounds with azodicarbonylates and triphenylphosphine: Synthesis of α -*N*-hydroxy amino acid derivatives. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4978-4984.

- [250] N.K. Kochetkov, A.M. Likhoshevstov, V.N. Kulakov, The total synthesis of some pyrolydine alkaloids and their absolute configuration. *Tetrahedron* **1969**, 25, 2313-2323.

DANK

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen herzlich bedanken, deren Unterstützung ich bei der Durchführung dieser Arbeit genießen konnte und die dadurch zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

- Doris Feineis für die stete Diskussionsbereitschaft, die moralische und seelische Unterstützung während aller Arbeitsphasen und das Korrekturlesen dieser Arbeit;
- den Lektoren Stephan Schmitzer, Anne Schmitzer, Michael Wohlfarth, Robert Pfeifer und Kim Messer;
- Manuela Michel danke ich für die tatkräftige Unterstützung beim oxidativen Abbau;
- der gesamten LC-MS-Abteilung, zuvorderst Frau S. Diem und Herrn PD Dr. M. Herderich für die Hilfe bei der Suche nach TaClo und seinen Metaboliten;
- Herrn Dr. H.-W. Clement und Prof. Dr. W. Kuhn für die Beschaffung von Humanblutproben;
- Frau PD Dr. C. Stichel-Gunkel für die Bereitstellung von Tiermaterial;
- Prof. Dr. K.-P. Lesch, Dr. R. Mössner für die Gastfreundschaft in ihren Laboren und die gute Zusammenarbeit beim PC12-Projekt;
- Stefan Keppner für praktische Hilfe im Labor;
- allen Mitarbeitern der Serviceabteilungen der Chemischen Institute der Universität Würzburg;
- meinen Labornachbarn Christian Günther, Kim Messer, Michael Ochse und Babett Schwöbel für alle chemischen Tips und das gute Arbeitsklima;
- Frau Susanne Schäffer für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Umfrage bei Parkinsonpatienten;
- und natürlich allen jetzigen und ehemaligen Arbeitskreiskollegen, die alle zu der erfahrungsreichen und schönen Zeit während der Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

26. Juni 1972 Geboren in Speyer als Tochter von Walter Münchbach und Birgit Münchbach, geb. Ledergerber
- 1978-1982 Besuch der Grundschule in Weingarten/Pfalz
- 1982-1991 Besuch des Friedrich-Magnus-Schwerd-Gymnasiums in Speyer
- 1991-1993 Grundstudium der Chemie an der Universität Kaiserslautern
- 1993-1996 Hauptstudium der Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Dezember 1996 Abschluß des Chemiestudiums mit der Diplomarbeit "GC/MS-Analytik von TaClo in Tier- und Humanblutproben sowie Synthese potentieller TaClo-Metabolite und Tryptophan-abgeleiteter Derivate" unter Anleitung von Prof. G. Bringmann
- April 1997 Beginn der vorliegenden Arbeit
- seit April 1997 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg

Würzburg,