

# Der Fall TaClo: Ein endogen gebildetes Neurotoxin als Auslöser für die Parkinson'sche Krankheit?

von

Peter H. Roos und Christina Köhler

## Zusammenfassung

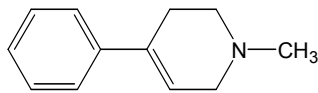
In den Organismus aufgenommene Fremdstoffe entfalten ihre schädigenden Wirkungen oftmals selektiv in bestimmten Organen (Organotropie). So beeinflusst 1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin, TaClo, Stoffwechselforgänge in bestimmten Bereichen des Gehirns offenbar derart, dass es zur Ausbildung eines Morbus Parkinson kommen kann. Interessanterweise entsteht TaClo im Organismus aus einer Fremdstoffkomponente und endogenem Tryptamin. Der Bildung von TaClo stehen Verstoffwechslung und Ausscheidung gegenüber. Die Geschwindigkeiten zuführender und abführender Prozesse bestimmen Konzentration und Verweildauer von TaClo und seinen Metaboliten in der Zelle. Wir haben uns mit dem Stoffwechsel von TaClo durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme, Cytochrome P450, beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass mehrere P450-Enzyme beteiligt sind und dass enzymspezifisch unterschiedliche Metabolite gebildet werden. Für den TaClo-Stoffwechsel im Gehirn ist das Vorkommen von Cytochromen P450 in den verschiedenen Gehirnregionen bedeutsam. Tatsächlich lassen sich hier relevante P450-Enzyme, wie CYP1B1 und CYP3A, nachweisen. TaClo kann aber nicht nur als P450-Substrat fungieren, sondern auch als Inhibitor P450-abhängige Stoffwechselwege blockieren. Somit sind zahlreiche Wechselwirkungsmöglichkeiten von TaClo mit dem P450-System vorhanden. Jetzt besteht die Aufgabe in der Identifizierung der für die Auslösung eines Morbus Parkinson relevanten P450-Enzyme und Metabolite.

## Einleitung

Die Erforschung der Ursachen sowie auslösender oder begünstigender Faktoren für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson (MP) hat einen enormen Auftrieb durch die Entwicklung molekularbiologischer Techniken erfahren. So wurde intensiv versucht, Korrelationen zwischen dem Auftreten eines MP und solchen genetischen Polymorphismen zu finden, die für die Pathogenese relevante Proteine betreffen. Hierzu gehören unter anderem auch Cytochrome P450 (CYP), von denen insbesondere das CYP2D6 und seine Allele in Bezug auf die MP-Inzidenz untersucht wurden. Allerdings sind die Ergebnisse hier nicht sehr überzeugend, und die Frage ist offen, inwieweit CYP2D6-Polymorphismen einen Zusammenhang mit einem MP erkennen lassen. Es sind aber auch so genannte ‚high penetrating genes‘ gefunden worden, die in klarer Beziehung zur Ätiogenese eines MP stehen. Hier sind  $\alpha$ -Synuclein und Parkin zu nennen (Polymeropoulos et al. 1997; Kitada et al. 1998).

Eine mechanistische Verbindung zwischen Cytochromen P450 und MP besteht darin, dass diese Enzyme exogene und endogene Substanzen in krankheitsauslösende Stoffwechselprodukte überführen können oder aber den Umbau von Schadstoffen bewerkstelligen. In den letzten Jahren wurde nämlich deutlich, dass neben der genetischen Komponente als Basis für die Entstehung eines MP bestimmte Fremdstoffe als krankheitsinitiierend in Betracht zu ziehen sind (Gorrell et al. 1996; Warner & Schapira 2003). Ein Impuls zur verstärkten Suche

nach solchen Substanzen kam aus der Beobachtung, dass es bei einigen Drogenabhängigen nach Verabreichung ‚nicht sauberen‘ Heroins zu parkinsonähnlichen Symptomen kam. Die auslösende Komponente konnte schließlich als 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin (MPTP) identifiziert werden (Abb. 1).



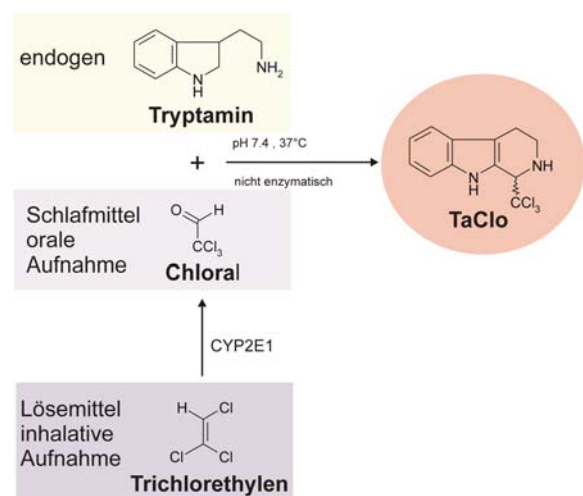
**Abb. 1: Struktur von MPTP**

Die Herausforderung war nun, nach Strukturanalogen oder Vorstufen zu fahnden, die in biologischen Systemen auftreten beziehungsweise entsprechend umgewandelt werden können. Tatsächlich wurden solche Substanzen gefunden. An dieser Stelle soll auf das so genannte TaClo aus der Gruppe der  $\beta$ -Carboline näher eingegangen werden. Es wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Bringmann (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) entdeckt (Bringmann et al. 1992, 1995) und nachfolgend unter verschiedenen Aspekten eingehend untersucht (Grote et al. 1995; Janetzky et al. 1995; Sonntag et al. 1995; Rausch et al. 1995; Bringmann et al. 2000; Riederer et al. 2002). Unsere Projektgruppe ‚Biomarker und Fremdstoffwirkungen‘ kooperiert zum Thema TaClo mit der Gruppe von Prof. Bringmann unter dem Aspekt ‚Wechselwirkungen von TaClo mit dem Cytochrom P450-System‘.

## Woher stammt TaClo?

TaClo (1-Trichlormethyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolin) kann sich auf nicht-enzymatischem Wege aus den beiden Komponenten Tryptamin (Ta) und Chloral (Clo) bilden. Dass dies nicht nur im Reagenzglas, sondern offenbar auch im lebenden Organismus passiert, konnte sowohl für die Ratte als auch für den Menschen gezeigt werden (Bringmann et al. 1995, 1999). Tryptamin ist ein Metabolit des Aminosäurestoffwechsels und entsteht im Organismus durch Decarboxylierung von Tryptophan. Die zweite Kom-

ponente Chloral ist ein heute immer noch verabreichtes Schlafmittel (Chloralhydrat). Es kann somit dem Organismus direkt als Medikament zugeführt werden oder aber – und das ist der arbeitstoxikologisch relevante Weg – es entsteht nach Exposition in einer vom Cytochrom P450-Enzym CYP2E1 katalysierten Reaktion aus Trichlorethylen (TRI). Letzteres wird in der Industrie als Lösungsmittel verwendet. Tatsächlich konnte ein Zusammenhang zwischen langjähriger ‚Tri‘-Exposition und dem Ausbruch eines MP wahrscheinlich gemacht werden (Guehl et al. 1999).



**Abb. 2: Bildung von TaClo im Organismus**

## Was bewirkt TaClo?

Üblicherweise interagieren Substanzen und so auch TaClo mit verschiedenen Zielstrukturen im Organismus und führen so zu einer ganzen Reihe von Effekten. Im Hinblick auf einen Morbus Parkinson kann man einschränkend die spezifischen Effekte auf das Zielorgan oder Zielgewebe mit den jeweils charakteristischen Funktionen betrachten, d.h. auf das Gehirn oder noch gezielter auf die Substantia nigra. Allerdings fallen unter die TaClo-Wirkungen auch solche, die für alle Zellen gültig sind wie zum Beispiel Effekte auf Komponenten der mitochondrialen Atmungskette. Aufgrund der Wirkungsvielfalt wird es schwierig, einzelne Prozesse oder auch miteinander verwobene Vorgänge mit ihren Synergismen für die Auslösung eines MP verantwortlich zu machen.

Von TaClo ausgehende Wirkungen sind zum Beispiel:

- Erniedrigung der zellulären Dopamin-Aufnahme.
- Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette.
- Hemmung der Tyrosinhydroxylase-Aktivität vermutlich über eine Interaktion mit Proteinkinase A.
- Blockierung der zellulären Serotoninaufnahme über den 5-Hydrotryptamin-Rezeptor auf indirektem Wege (keine direkte Interaktion mit dem Rezeptor).

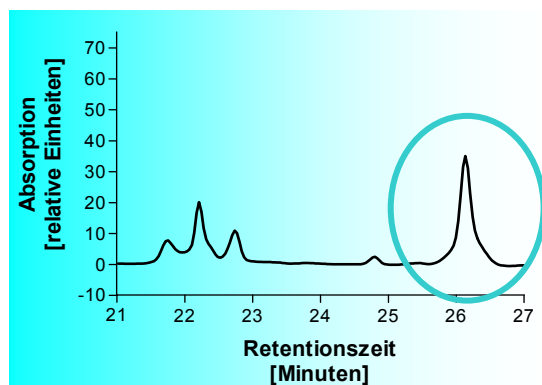
## TaClo und Cytochrome P450

Die in einer Zielzelle wirksame TaClo-Konzentration wird von dessen Ein- und Austransport sowie von Synthese- und Abbau-Geschwindigkeit bestimmt. Für den Übertritt über die Cytoplasma-Membran ist aufgrund der Lipophilie des Moleküls offenbar kein Transportsystem notwendig (Brückner 2000). Die Synthese aus den direkten Vorläufermolekülen Tryptamin und Chloral verläuft nicht-enzymatisch, während für die Bildung von Chloral aus Trichloethylen die Aktivität von CYP2E1 geschwindigkeitsbestimmend ist. Wir haben die Frage nach der Verstoffwechslung von TaClo untersucht, wobei es sowohl um die entstehenden Metabolite als auch die beteiligten CYP-Enzyme geht. Des Weiteren wollten wir wissen, ob TaClo als Inhibitor in den CYP-abhängigen Stoffwechsel eingreift.

### *TaClo als CYP-Substrat*

Unsere Ergebnisse zeigen, dass TaClo ein Substrat für mehrere verschiedene Cytochrome P450 ist (Köhler et al. 2003). Zu den beteiligten Enzymen gehören auch solche, die konstitutiv exprimiert sind, wie CYP2C11, CYP3A und eventuell CYP2E1. Die letzten beiden sind zudem im hier interessierenden Zielorgan, dem Gehirn, vorhanden, allerdings mit unterschiedlicher Verteilung in den verschiedenen Hirnregionen (McFadyen et al. 1998; Hedlund et al. 2001). Dies bedeutet, dass gebildetes TaClo sofort ein Angriffspunkt für diese Enzyme sein kann. Nicht bedeutet dies aber, dass

damit auch schädliche Wirkungen schnellstens neutralisiert werden, da gebildete Primärmetabolite oftmals ein größeres Schadenspotenzial besitzen als die Ausgangssubstanz. Als Metaboliten konnten wir 6-Hydroxy-TaClo, 8-Hydroxy-TaClo sowie Norharman finden. Eine besonders hohe Aktivität bei der TaClo-Umsetzung zeigen CYP3A-Enzyme, die die Bildung eines bisher nicht eindeutig identifizierten Metaboliten katalysieren (Abb. 3).



**Abb. 3: Trennung von TaClo-Metaboliten durch HPLC. Ausschnitt aus einem Chromatogramm. Eingekreist: Signal des präferenziell durch CYP3A-Enzyme gebildeten Metaboliten. Die drei aufeinander folgenden Peaks zwischen 21 und 23 min konnten als 6-Hydroxy-TaClo, Norharman und 8-Hydroxy-TaClo identifiziert werden**

Aus den Befunden ergeben sich eine Reihe von Fragen und Anregungen:

- Von Interesse ist die Struktur des bisher nicht identifizierten Metaboliten und die Frage nach seinem schädigenden Potenzial.
- Um Toxifizierungs- und Detoxifizierungsprozesse im Zielgewebe verstehen zu können, ist die Frage nach Enzymspezifitäten und -Kapazitäten der Phase II, also der sekundären Konjugationsprozesse, bedeutsam.
- Die Identifizierung der maßgeblich am TaClo-Metabolismus beteiligten Enzyme liefert Kriterien für eine Suche nach relevanten Polymorphismen im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Tri-Expositionen und einem Morbus Parkinson. Nach unseren ersten Ergebnissen erscheinen hier CYP3A-Enzyme als geeignete Kandidaten. Allele

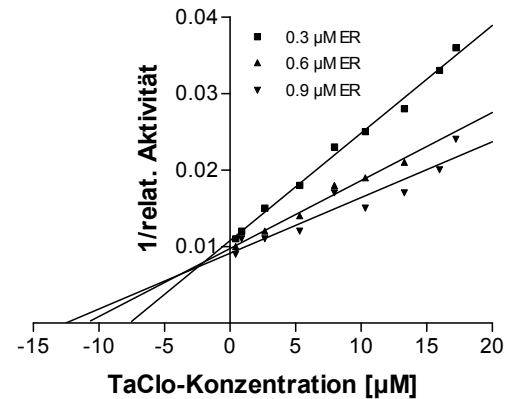
dieser Enzyme sind allerdings in diesem Kontext bisher nicht untersucht worden. Bekannt ist aber, dass CYP3A4 an der N-Demethylierung des Parkinsonauslösers MPTP (s. Abb. 1) beteiligt ist (Coleman et al. 1996). Erwähnenswert ist, dass vom CYP3A4 und vom CYP3A5 je mindestens 25 Allele bekannt sind.

### **TaClo als CYP-Inhibitor**

Einige Studien haben gezeigt, dass TaClo am Cytochrom P450 spektrale Veränderungen im Bereich zwischen 380 und 430 nm bewirkt, die auf Ligandenwechselwirkungen mit dem Häm-Eisen hindeuten. Mikrosomen mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Cytochrom P450-Enzymen ergeben qualitativ und quantitativ voneinander differierende Spektren, ein Zeichen für unterschiedliche Wechselwirkungen von TaClo mit individuellen CYP-Enzymen. Ein möglicher Effekt der TaClo-Bindung an Cytochrome P450 ist die Hemmung ihrer enzymatischen Aktivität, was von uns näher untersucht wurde.

Mit Hilfe von Rattenlebermikrosomen unterschiedlicher CYP-Zusammensetzung sowie mit heterolog exprimiertem CYP1B1 haben wir in Verbindung mit spezifischen Substraten die Hemmwirkung von TaClo analysiert (Abb. 4). Es zeigte sich, dass alle bekannten Enzyme der CYP1-Familie, CYP1A1, CYP1A2 sowie CYP1B1, vermutlich über unterschiedliche Mechanismen effizient durch TaClo gehemmt werden. Die Inhibitorkonstanten mit Ethoxyresorufin (ER) als Substrat liegen zwischen 1,5 und 3,5  $\mu\text{mol/L}$ . Die Hemmbarkeit von CYP2B1 ist geringer ( $K_i = 7,9 \mu\text{mol/L}$ ). CYP2E1 wird in seiner Aktivität als Chlorzoxazon-6-hydroxylase offenbar nur partiell durch TaClo beeinträchtigt. Zu erwähnen ist, dass CYP1A1 in vielen Bereichen des Gehirns exprimiert wird und dass CYP1B1 und CYP2E1 in Teilbereichen vorkommen (McFayden et al. 1998; Rieder et al. 2000). Die von Hedlund et al. (1998) mit Vorbehalt positiv beschiedene Frage ‚2B or not to 2B?‘ nach der Existenz von CYP2B-Enzymen im Gehirn kann heute mit einem klaren ‚Ja‘ beantwortet werden (Miksys et al. 2003;

Schoedel et al. 2001). Somit kann TaClo in verschiedenen Bereichen des Gehirns modulierend auf den Stoffwechsel von Fremdstoffen und gegebenenfalls endogenen Substraten wirken.



**Abb. 4: Bestimmung der Inhibitorkonstanten von TaClo für die CYP1A1-abhängige Ethoxyresorufin-O-deethylierung mit dem Dixon-Plot. Die einzelnen Punkte stellen ermittelte Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substrat- (0,3, 0,6 und 0,9  $\mu\text{mol/L}$  Ethoxyresorufin) und TaClo-Konzentrationen dar.**

### **Ausblick**

Die durch Cytochrome P450 gebildeten TaClo-Metabolite konnten von uns in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bringmann (Universität Würzburg) weitgehend identifiziert werden. Allerdings wird von Cytochromen P450 der CYP3A-Unterfamilie ein bisher unbekannter Metabolit in vergleichsweise hoher Effizienz gebildet. Zum einen gilt daher dieser Substanz unsere Aufmerksamkeit, zum anderen richten wir unser Augenmerk auch auf die CYP3A-Enzyme, die im Zusammenhang mit einem MP bisher keine Berücksichtigung gefunden haben. Nach Identifizierung und chemischer Synthese des unbekannt Metaboliten können seine Effekte in *in vitro*-Testsystemen studiert werden. Auf der Seite der CYP3A-Enzyme kann versucht werden, Zusammenhänge zwischen Allelen und der MP-Inzidenz aufzuspüren.

### **Danksagung**

Die Beschäftigung mit dem Thema ‚Parkinson‘ geht insbesondere auf Anregungen von

und Kooperationen mit Prof. H. Przuntek und Prof. W. Kuhn (Neurologische Universitätsklinik, Ruhr-Universität Bochum) zurück. Die speziellen Arbeiten zum TaClo wären ohne die Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Bringmann (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) nicht möglich gewesen. Wir bedanken uns an dieser Stelle bei den genannten Personen für konzeptionelle Anregungen beziehungsweise für die Unterstützung bei analytischen Arbeiten sowie für die Bereitstellung von TaClo und seinen Derivaten.

## Literatur

- Bringmann G, Friedrich H, Feineis D (1992) Trichloroharmanes as potential endogenously formed inducers of Morbus Parkinson: synthesis, analytics, and first in vivo-investigations. *J Neural Transm Suppl* 38: 15-26.
- Bringmann G, God R, Feineis D, Wesemann W, Riederer P, Rausch WD, Reichmann H, Sontag KH (1995) The TaClo concept: 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline (TaClo), a new toxin for dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl* 46: 235-244.
- Bringmann G, God R, Fahr S, Feineis D, Fornadi K, Fornadi F (1999) Identification of the dopaminergic neurotoxin 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline in human blood after intake of the hypnotic chloral hydrate. *Anal Biochem* 270: 167-175.
- Bringmann G, Bruckner R, Mossner R, Feineis D, Heils A, Lesch KP (2000) Effect of 1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline (TaClo) on human serotonergic cells. *Neurochem Res* 25: 837-843.
- Brückner RRK (2000) Synthese von [<sup>14</sup>C]-TaClo-Untersuchungen zum Metabolismus und neurotoxischen Potential eines hochhalogenierten Tetrahydro-β-carbolins. Würzburg, Univ., Diss.
- Coleman T, Ellis SW, Martin IJ, Lennard MS, Tucker GT (1996) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4 - implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 685-690.
- Gorrell JM, DiMonte D, Graham D (1996) The role of the environment in Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 104: 652-654.
- Grote C, Clement HW, Wesemann W, Bringmann G, Feineis D, Riederer P, Sontag KH (1995) Biochemical lesions of the nigrostriatal system by TaClo (1-trichloro-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline) and derivatives. *J Neural Transm Suppl* 46: 275-281.
- Guehl D, Bezard E, Dovero S, Boraud T, Bioulac B, Gross C (1999) Trichloroethylene and parkinsonism: a human and experimental observation. *Eur J Neurol* 6: 609-611.
- Hedlund E, Gustafsson JA, Warner M (2001) Cytochrome P450 in the brain; a review. *Curr Drug Metab* 2: 245-263.
- Janetzky B, God R, Bringmann G, Reichmann H (1995) 1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline, a new inhibitor of complex I. *J Neural Transm Suppl* 46: 265-273.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608.
- Köhler Ch, Bringmann G, Feineis D, Tschirbs S, Roos PH (2003) Interaction of the neurotoxin TaClo with the cytochrome P450 system: Metabolism by and inhibition of CYP-enzymes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367, Suppl 1: R127.
- McFayden MC, Melvin WT, Murray GI (1998) Regional distribution of individual forms of cytochrome P450 mRNA in normal adult human brain. *Biochem Pharmacol* 55: 825-830.
- Miksys S, Lerman C, Shields PG, Mash DC, Tyndale RF (2003) Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* 45: 122-132.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A et al. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047.

Rausch WD, Abdel-mohsen M, Koutsilieri E, Chan WW, Bringmann G (1995) Studies of the potentially endogenous toxin TaClo (1-trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline) in neuronal and glial cell cultures. *J Neural Transm Suppl* 46: 255-263.

Rieder CR, Parsons RB, Fitch NJ, Williams AC, Ramsden DB (2000) Human brain cytochrome P450 1B1: immunohistochemical localization in human temporal lobe and induction by dimethylbenz(a)anthracene in astrocytoma cell line (MOG-G-CCM). *Neurosci Lett* 278: 177-180.

Riederer F, Luborzewski A, God R, Bringmann G, Scholz J, Feineis D, Moser A (2002) Modification of tyrosine hydroxylase activity by chloral derived beta-carbolines in vitro. *J Neurochem* 81: 814-819.

Schoedel KA, Sellers EM, Tyndale RF (2001) Induction of CYP2B1/2 and nicotine metabolism by ethanol in rat liver but not rat brain. *Biochem Pharmacol* 62: 1025-1036.

Sontag KH, Heim C, Sontag TA, God R, Reichmann H, Wesemann W, Rausch WD, Riederer P, Bringmann G (1995) Long-term behavioural effects of TaClo (1-trichloro-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline) after subchronic treatment in rats. *J Neural Transm Suppl* 46: 283-289.

Warner TT, Schapira AH (2003) Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 (Suppl 3): S16-S23.

# Arbeitsphysiologie *heute*

## Bd. 5 (2003/2004)

*Themenband*

*„Neurophysiologische Grundlagen  
und Anwendungsaspekte“*

Herausgegeben von

H.M. Bolt  
B. Griefahn  
H. Heuer



Dortmund



---

ISBN 3-9808342-1-2

Alle Rechte vorbehalten.

© 2003 *IfADo*

Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund  
Ardeystr. 67, D-44139 Dortmund  
Tel.: 0231/1084-0  
Fax: 0231/1084-308  
<http://www.ifado.de>

Druck: Koffler bitprint, Dortmund

Printed in Germany

---

# Vorwort

Der hiermit vorgelegte Jahresband 2003/2004 von „Arbeitsphysiologie heute“ hat sich die Aufgabe gestellt, Grundlagen und Anwendungsaspekte aus dem Bereich der Neurophysiologie, wie sie im *IfADo* betrieben werden, zusammenzustellen und sichtbar zu machen.

Dies geschieht auf dem Hintergrund von Veränderungen im Kompetenzprofil des Instituts, die sich derzeit abzeichnen. Die klassischen Organsysteme der Arbeitsphysiologie sind das Herz-Kreislauf- und das Muskel-Skelett-System, die für die Beurteilung körperlicher Arbeit von ausschlaggebender Bedeutung sind. Mit dem Abbau physischer Belastungen treten nun Reaktionen in den Vordergrund, die durch neue Belastungsprofile hervorgerufen und/oder nur durch verfeinerte physiologische und biochemische Analysen nachweisbar sind. In diesem Zusammenhang gewinnt die Physiologie des zentralen Nervensystems für das Institut eine zentrale Position als Mittler zwischen subtilen Belastungswirkungen unterschiedlicher Art und körperlichen Beschwerden oder Erkrankungen. Diese Entwicklungslinien wurden auch anlässlich der Evaluation des Instituts durch den Senat der WGL zu Beginn des Jahres 2003 deutlich gemacht.

Der vorliegende 5. Band von „Arbeitsphysiologie heute“ enthält fachübergreifend Beiträge aus unterschiedlichen Projektgruppen, die sich mit unterschiedlichen neurophysiologischen und neurotoxikologischen Aspekten befasst. Die Auswahl der Beiträge des vorgelegten Bandes soll damit zeigen, dass auch in Zukunft dem hier umschriebenen Felde fachübergreifend neue Akzente zu setzen sind.

Dortmund, im Herbst 2003

Die Institutsleitung des *IfADo*