

**Mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese der  
Parkinson-Krankheit und der protektive  
Einfluss von Phenothiazin**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

**Tanja Kromm**

geb. in Sawodoukowsk (Russland)

Mainz, 2019

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Parkinson-Krankheit.....	1
1.1.1	Historie, Prävalenz und Klassifizierung.....	1
1.1.2	Symptomatik und Krankheitsverlauf.....	1
1.1.3	Diagnose und Therapie .....	3
1.1.4	Pathogenese.....	4
1.1.4.1	Das extrapyramidalmotorische System.....	4
1.1.4.2	Neuropathologie.....	5
1.1.4.3	Pathogene Ursachen .....	6
1.1.4.3.1	Morphologie dopaminerger Neurone.....	6
1.1.4.3.2	Dopaminerger Metabolismus, Neuromelanin und Eisen .....	7
1.1.4.3.3	Neuroinflammation und Apoptose .....	8
1.1.4.3.4	Genetik.....	8
1.1.4.3.5	Proteinaggregation.....	9
1.1.4.3.6	Beeinträchtigung der Mitochondrien .....	10
1.1.4.3.7	Oxidativer Stress in der Parkinson-Krankheit.....	10
1.1.5	Antioxidative Neuroprotektion in der Parkinson-Krankheit.....	11
1.2	Untersuchte Substanzen .....	12
1.2.1	Das Antioxidans Phenothiazin .....	12
1.2.2	Das Parkinson-Toxin Rotenon .....	14
1.3	Mitochondrien .....	15
1.3.1	Morphologie der Mitochondrien.....	15
1.3.2	Funktion der Mitochondrien .....	16
1.3.3	Oxidativer Stress.....	17
1.3.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies .....	17
1.3.3.2	Antioxidatives System.....	18

1.3.3.3	Oxidative Schädigung.....	18
1.3.4	Mitochondriale Dynamik.....	19
1.3.4.1	Fission und Fusion.....	19
1.3.4.2	Das Protein Mitofusin 1.....	21
1.3.5	Mitophagie.....	22
1.3.5.1	Mechanismus der Mitophagie.....	22
1.3.5.2	Das Protein PINK1.....	22
1.4	Autophagie.....	24
1.4.1	Autophagie als Bestandteil der Proteinhomöostase.....	24
1.4.2	Autophagie.....	25
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>30</b>
2.1	Material.....	30
2.1.1	Zelllinien.....	30
2.1.2	Plasmide und siRNA.....	30
2.1.3	Antikörper.....	31
2.1.4	Marker und Reagenziensätze.....	32
2.1.5	Chemikalien.....	32
2.1.6	Puffer und Lösungen.....	34
2.1.6.1	Zellkultur.....	34
2.1.6.2	Proteinbiochemie.....	35
2.1.7	Geräte.....	37
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	38
2.2.1.1	Kultivierung der Zelllinien.....	38
2.2.1.2	Kryokonservierung der Zelllinien.....	39
2.2.1.3	Transfektion der Zellen mittels Elektroporation.....	40
2.2.1.3.1	Transfektion für Fluoreszenzfärbung.....	40

2.2.1.3.2	Transfektion zur Erzeugung eines Überexpressionsmodells.....	41
2.2.1.3.3	Transfektion für transiente Herunterregulation .....	41
2.2.1.4	Behandlung der Zellen .....	41
2.2.1.5	Fixierung für Fluoreszenzmikroskopie.....	42
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	42
2.2.2.1	Gesamtproteinisolierung aus Zellen .....	42
2.2.2.2	Proteinquantifizierung .....	43
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.2.2.4	Western Blot Analyse .....	44
2.2.2.5	Immunologische Proteindetektion.....	44
2.2.3	Statistische Auswertung.....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1	Einfluss des Komplex I-Inhibitors Rotenon und des Antioxidans Phenothiazin auf Proteine der Mitophagie.....	46
3.1.1	Komplex I-Inhibition erhöht die Proteinspiegel des Mitophagieproteins PINK1	46
3.1.2	Anstieg der PINK1-Proteinspiegel durch Komplex I-Inhibition beruht auf einem oxidativen Effekt.....	48
3.1.3	Das Antioxidans Phenothiazin vermindert die Rotenon-vermittelte Hochregulation von PINK1.....	50
3.1.4	Der Einfluss von Rotenon und Phenothiazin auf das Mitophagieprotein Parkin und dessen Substrate Mfn1 und Mfn2.....	51
3.2	Die Mitophagieproteine PINK1 und Mitofusin 1 Isoform 3 stehen im Zusammenhang....	53
3.2.1	Überexpression von Mitofusin 1 Isoform 1 erhöht die Proteinspiegel von Isoform 3 und von PINK1.....	53
3.2.2	Der Einfluss von Mitofusin 1 auf PINK1 ist abhängig von der Isoform 3.....	55
3.2.3	Im Gegenzug reguliert PINK1 die Isoform 3 von Mfn1.....	57
3.3	Phenothiazin ist ein potentes Antioxidans .....	60
3.4	Mitochondriale Dynamik unter Einfluss des Komplex I-Inhibitors Rotenon und des Antioxidans Phenothiazin.....	62

3.4.1	Die mitochondriale Morphologie wird durch Rotenon und Phenothiazin beeinflusst.....	62
3.4.2	Die mitochondriale Dynamik wird durch Rotenon und Phenothiazin moduliert.....	64
3.5	Der Einfluss vom Parkinson-Toxin Rotenon und vom Antioxidans Phenothiazin auf den Proteinabbau.....	67
3.5.1	Das Parkinson-Toxin Rotenon verstärkt die Autophagie, wogegen sich das Antioxidans Phenothiazin als protektiv erweist.....	68
3.5.2	Das Proteasom wird durch das Parkinson-Toxin Rotenon nicht beeinflusst .....	71
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
4.1	Verstärkte Einleitung der Mitophagie im Parkinson-Modell wird durch das Antioxidans Phenothiazin vermindert.....	75
4.2	Mitophagie-Proteine unter dem Einfluss des Parkinson-Toxins Rotenon und des Antioxidans Phenothiazin.....	78
4.3	Zwischen den Mitophagieproteinen PINK1 und Mitofusin 1 Isoform 3 besteht ein Zusammenhang.....	80
4.4	Wirkmechanismus des Phenothiazins in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit.....	84
4.5	Verstärkte mitochondriale Dynamik im Parkinson-Modell.....	86
4.6	Die Mitochondrien- und die Proteinhomöostase stehen im Parkinson-Modell in Abhängigkeit.....	90
4.6.1	Erhöhte Mito- und Autophagie im Parkinson-Modell.....	90
4.6.2	Das Proteasom wird im reinen Parkinson-Modell nicht reguliert.....	93
4.7	Die Rolle der Mitochondrien- und der Proteinhomöostase in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit.....	94
4.8	Phenothiazin als präventive Therapiemöglichkeit in der Parkinson-Krankheit .....	96
4.9	Ausblick.....	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>

<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>120</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	120
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	125
8.3	Tabellenverzeichnis.....	127
8.4	Lebenslauf .....	128
8.5	Eidesstattliche Erklärung.....	129
8.6	Danksagung.....	130

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Parkinson-Krankheit

Bei der Parkinson-Krankheit (PD – *Parkinson's disease*) handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die durch den Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra *pars compacta* (SNpc) gekennzeichnet ist. Auch ist die intraneuronale Ablagerung der sogenannten Lewy-Körperchen typisch für diese Erkrankung. In der PD kommt es zu einer Beeinträchtigung der Bewegungsabläufe mit einem typischen Phänotyp.

### 1.1.1 Historie, Prävalenz und Klassifizierung

Die PD wurde nach dem englischen Arzt James Parkinson benannt. Im Jahre 1817 dokumentierte er als Erster diese Erkrankung im Aufsatz „*An essay on the shaking palsy*“ (Parkinson, 1817).

Die PD ist nach der Alzheimer-Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Die Prävalenz der Parkinson-Krankheit nimmt mit steigendem Alter zu und manifestiert sich meist im Alter von 60 Jahren. Während die generelle Prävalenz bei 0,3 % liegt, steigt sie ab dem Alter von 60 Jahren auf 1 % an und kann ab dem 80. Lebensjahr sogar 4 % betragen (Lau und Breteiler, 2006). Aufgrund der demografischen Entwicklung ist in Zukunft mit einer erhöhten Prävalenz zu rechnen.

Die Klassifizierung der PD erfolgt in vier Formen. Am häufigsten tritt die sporadische Form, deren Ursache nicht bekannt ist, mit ca. 75 %, auf. Von der familiären Form sind ca. 5 -10 % der Patienten betroffen, hier geht die Erkrankung mit genetischen Mutationen einher (siehe Abschnitt 1.1.4.3.4) (Thomas und Beal, 2007). Weiterhin gibt es das symptomatische Parkinson-Syndrom, das beispielsweise durch Medikamente, Traumata oder Toxine induziert wird. Das atypische Parkinson-Syndrom beschreibt das Vorliegen anderer neurodegenerativer Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik wie in der PD.

### 1.1.2 Symptomatik und Krankheitsverlauf

Symptome der PD treten erst auf, wenn der Verlust der nigralen, dopaminergen Neurone bei ca. 50 % und des striatalen Dopamins bei ca. 80 % liegt (Fearnley und Lees, 1991).

Die Symptomatik der PD wird in Haupt- und Begleitsymptome unterteilt. Die PD zeichnet sich durch einen charakteristischen Bewegungstyp aus. Hierbei geht der Patient in kleinen Schritten vorne über gebeugt mit fehlender Mitbewegung der Arme und fehlender Mimik. Der Bewegungsbeginn ist erschwert, wobei das Abbremsen der Bewegung in Aktion dem Patienten ebenfalls schwerfällt.

Zu den Hauptsymptomen zählen Bradykinesie bzw. Akinesie, Rigor, Ruhetremor und die posturale Instabilität. Die Bradikinesie beschreibt die Armut an Bewegung bzw. an Mimik, während die Akinesie die Bewegungslosigkeit charakterisiert. Der Rigor stellt eine Versteifung der Muskulatur dar. Dieser tritt anfänglich überwiegend im Schulter- und Nackenbereich auf, was zu einer gebeugten Haltung führt, später schreitet er weiter voran und kann die gesamte Muskulatur betreffen. Das Zittern, das häufig dann auftritt wenn keine Bewegung ausgeführt wird, wird als Tremor bzw. Ruhetremor bezeichnet. Bei der posturalen Instabilität handelt es sich um Gang- und Gleichgewichtsstörungen, bei der sich der Patient gebeugt und kleinschrittig bewegt. Die Begleitsymptome äußern sich in vermehrtem Tränen- und Speichelfluss mit gesteigerter Talgproduktion (Salbengesicht). Die Patienten haben vermehrten Harndrang und niedrigen Blutdruck. Psychische Symptome äußern sich in voranschreitender Demenz, häufig vorliegenden Depressionen und Schlafstörungen. Zu erwähnen ist, dass sich die Symptomatik langsam während des Krankheitsverlaufs entwickelt und sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann.

Histologisch lässt sich der Krankheitsverlauf durch die Braak Stadien für Parkinson (I-VI) beschreiben. Diese unterteilen die Entwicklung der PD anhand von abgelagerten Lewy-Körperchen in den betroffenen Regionen des Gehirns, beginnend im Hirnstamm mit Ausbreitung zum Cortex (Braak et al., 2003). Die Stadien I und II beschreiben die Prodromalphase, die zeitlich sehr variabel ist und zwischen 2 und 50 Jahren andauern kann (Hawkes, 2008; Pont-Sunyer et al., 2015). Hier erfolgen die Ablagerungen der Lewy-Körperchen in Regionen, die für die anfänglichen atypischen Symptome der Krankheit verantwortlich sind. Dazu zählen verminderter Geruchssinn, Obstipation und Schlafstörungen. Auch Muskelverspannungen und Depressionen sind kennzeichnend in dieser Phase (Remy et al., 2005). Ab Stadium III sind in SNpc und Amygdala Lewy-Körperchen eingelagert. Hier setzt die typische Symptomatik der PD ein, weswegen eine klinische Diagnose dieser Erkrankung erst ab diesem Stadium möglich ist. Die Ablagerung der Lewy-Körperchen weitet sich in den Stadien IV, V und VI zerebral weiter aus.

Die Mortalität in erkrankten Patienten ist um ca. 50 % erhöht, wobei sie stark von der Symptomatik und dem Zeitpunkt der Diagnose abhängt (Chen et al., 2006). Todesursachen sind häufig sekundäre Ereignisse, wie Pneumonien und kardiovaskuläre Erkrankungen (Poewe, 2006).

### 1.1.3 Diagnose und Therapie

Liegt nach einer neurologischen Untersuchung des Patienten ein Verdacht auf PD vor, wird ein „L-Dopa-Test“ durchgeführt. Hierbei deutet eine Besserung der Symptome nach der Einnahme des Wirkstoffs Levodopa auf die PD-Erkrankung hin. Bildgebende Verfahren wie Computertomographie oder Magnetresonanztomographie werden herangezogen um andere Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik auszuschließen. Nuklearmedizinische Methoden wie Single-Photonen-Emissions-Computertomographie oder Positronen-Emissions-Tomographie werden verwendet, wenn die Diagnose schwer abzugrenzen ist. Hierbei werden Basalganglien visualisiert, in denen eine verringerte Aktivität auf PD hindeutet (DGN, 2016).

Die PD beruht auf der dopaminergen Neurodegeneration, was zu einer verringerten dopaminergen Transmission im Gehirn führt und so auf Dauer die typische Symptomatik auslöst (siehe Abschnitt 1.1.4.1). Die medikamentöse Therapie erfolgt zurzeit meist symptomatisch und greift überwiegend im Dopamin-Stoffwechsel ein.

Um die Dopamin-Konzentration im synaptischen Spalt zu steigern wird als Basismedikament häufig Levodopa verwendet. Hierbei handelt es sich um carboxyliertes Dopamin, das mithilfe von Decarboxylasehemmern überwiegend im zentralen Nervensystem (ZNS) zu Dopamin verstoffwechselt wird. Mittels Inhibitoren von Dopamin-abbauenden Enzymen, wie der Monoaminoxidase-B oder der Catechol-O-Methyl-Transferase, werden die Dopaminkonzentrationen im synaptischen Spalt gesteigert. Weiterhin gibt es Dopaminrezeptor-Agonisten, die die Wirkung von Dopamin imitieren, indem sie vorwiegend zentrale postsynaptische Dopamin-Rezeptoren stimulieren. Durch den Dopamin-Mangel in der PD, kommt es zu einem Ungleichgewicht in den Neurotransmittern und damit zum Überschuss an Acetylcholin und Glutamat. Dies äußert sich in der Plussyptomatik wie Zittern und Muskelsteifheit. Hiergegen werden NMDA-Rezeptor-Antagonisten und zentral wirksame Anticholinergika verwendet, die die Wirkung des Glutamats und des Acetylcholins verringern (DGN, 2016).

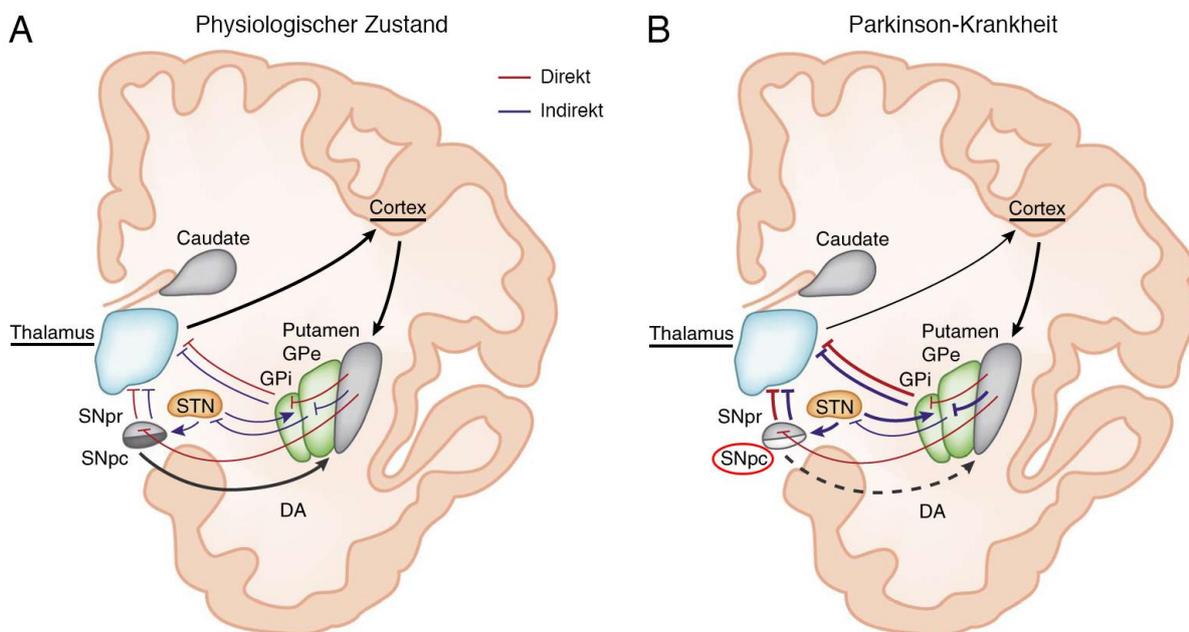
Operative Behandlungsmöglichkeiten werden meistens bei medikamentös austherapierten Patienten gebraucht (Benabid, 2003). Hierbei wird die Tiefen-Hirnstimulation angewendet, bei der Elektroden in betroffene Hirnregionen implantiert werden. Dies ermöglicht eine gezielte Hemmung der Reize und damit eine Abnahme der Symptomatik wie Zittern und Steifheit.

Zusätzlich erfolgt eine Behandlung der individuellen Begleitsymptomatik, die beispielsweise aus Antidepressiva oder Sedativa bestehen kann.

## 1.1.4 Pathogenese

### 1.1.4.1 Das extrapyramidalmotorische System

Das extrapyramidalmotorische System (EPMS) ist für größere Bewegungsabläufe bzw. zur Regulation der Körperhaltung zuständig. In der Pathogenese der Parkinson-Krankheit kommt es zu einer Störung in den Basalganglien des EPMS (Abbildung 1-1). Bei den Basalganglien handelt es sich um mehrere Kerngebiete des Gehirns. Das Herzstück der Basalganglien wird vom Striatum (Putamen und Caudatus) und vom Globus pallidus (GPe - *externus* und GPi - *internus*) gebildet. Hinzu kommen die Substantia nigra (SNpc - *pars compacta* und SNpr - *pars reticulata*) und der Nucleus subthalamicus (STN).



**Abbildung 1-1: Extrapyramidalmotorisches System**

Dargestellt ist das Extrapyramidalmotorische System im physiologischen Zustand (a) und in der Parkinson-Krankheit (b). (a) Die Signalweiterleitung erfolgt über eine große Schleife vom Cortex über die Basalganglien zum Thalamus und wieder zurück zum Cortex. Basalganglien bestehen aus Caudatus, Putamen, Globus pallidus (GPe - *externus*; GPi - *internus*), Nucleus subthalamicus (STN) und der Substantia nigra (SNpc - *pars compacta*; SNpr - *pars reticulata*). SNpc moduliert über Dopamin (DA) die Regelabläufe. (b) In der PD herrscht ein Verlust von dopaminergen Neuronen, weshalb die modulierende Wirkung des Dopamins nachlässt und es zu Störungen im Regelkreislauf mit inhibitorischer Funktion kommt. Modifiziert nach Calabresi et al., 2014.

Die physiologische Funktion der Basalganglien besteht darin, eine spezifische Selektion und Prozessierung von motorischen Bewegungsabläufen zu gewährleisten. Dies erfolgt über eine große Schleife, die Signale vom motorischen Kortex zu den Basalganglien und über den Thalamus

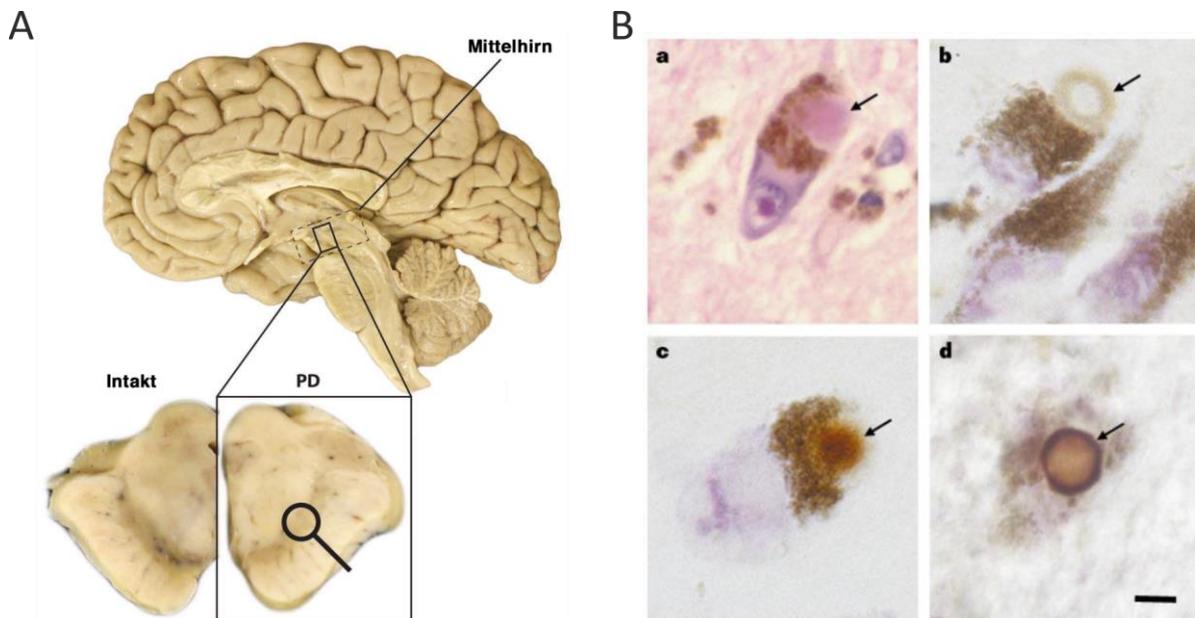
wieder zurück zu motorischen Rindenfeldern weitergibt. Durch die darin befindlichen Regelabläufe, die durch exzitatorische und inhibitorische Rückkopplungsschleifen reguliert werden, wird ein abgestimmtes Handlungsmuster ermöglicht (Calabresi et al., 2014). Hierbei modulieren die dopaminergen Neurone der Substantia nigra *pars compacta* (SNpc) die Regelabläufe. In der Pathogenese der PD kommt es zu einem Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc, was zu einem gestörten Regelkreislauf in den Basalganglien, mit vorwiegend inhibitorischer Funktion, führt. Dies bewirkt eine Hemmung der Signalweitergabe an die motorischen Rindenfelder und führt somit zu einer Abnahme in der Motorik. Gleichzeitig kommt es durch den Dopamin-Mangel zu einer verstärkten Wirkung von anderen Neurotransmittern, wie Acetylcholin, GABA und Glutamat.

#### 1.1.4.2 Neuropathologie

Die Neuropathologie der PD ist durch Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc gekennzeichnet. Dopaminerge Neurone beinhalten Neuromelanin, es kommt demnach durch den neuronalen Verlust zu einer Depigmentierung der SNpc (Abbildung 1-2 A) (Dzamko et al., 2014; Kashihara et al., 2011). Obwohl die PD der dopaminergen Neurodegeneration der SNpc zuzuschreiben ist, da diese quantitativ am stärksten ausgeprägt ist, sind auch andere Neuronentypen betroffen (Acetylcholin, Noradrenalin, Serotonin, Glutamat) (Alexander, 2004). Auch unterliegen weitere Hirnregionen, wie z. B. Locus coeruleus, Raphe-Kerne oder Hippocampus der Degeneration (Dauer und Przedborski, 2003). Dies trägt auch zur Pathogenese bei, beispielsweise geht die Beeinträchtigung im Hippocampus, der für die Gedächtnisbildung entscheidend ist, mit der Demenz in der PD einher (Camicioli et al., 2003).

Zu der Neuropathologie der PD zählen weiterhin die Lewy-Körperchen. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Proteinaggregate in Neuronen (Abbildung 1-2 B). Sie stellen rundliche, eosinophile Einschlüsse mit einem Durchmesser von ca. 15 µm dar und beinhalten einen dichten, granulären Kern (Dauer und Przedborski, 2003; Rodriguez et al., 2015). Der Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen stellt das Protein  $\alpha$ -Synuclein dar, welches vorwiegend neuronal exprimiert wird und meist präsynaptisch lokalisiert ist. Weitere Proteine, die in Lewy-Körperchen vorkommen sind beispielsweise das Ubiquitin, das Parkin und Proteine des Cytoskeletts (Wakabayashi et al., 2007). Lewy-Körperchen sind in den betroffenen neurodegenerierten Hirnregionen vorzufinden. Es wird noch diskutiert, ob diese Aggregate für diese Neuronen toxisch und damit ursächlich für die Neurodegeneration sind, oder ob sie aggregieren um die Zelle vor diesen fehlerhaften Proteinen zu schützen (Periquet et al., 2007; Tanaka et al., 2004). Obwohl Lewy-Körperchen als Merkmal bei der *post mortem* Diagnose der PD dienen, sind sie nicht allein

für diese Erkrankung spezifisch. Sie treten beispielsweise ebenfalls in der Alzheimer-Krankheit auf und werden auch in Gehirnen von nicht erkrankten Personen im Laufe der Alterung vorgefunden (Dauer und Przedborski, 2003).



**Abbildung 1-2: Neuropathologie in der Parkinson-Krankheit**

Abgebildet ist die Neuropathologie in der PD. (A) Vergrößerung der SNpc, einer Region im Mittelhirn. In Gesunden (Intakt) pigmentierte SNpc und in Parkinson-Erkrankten (PD) ein Verlust von pigmentierten dopaminergen Neuronen. Modifiziert nach Dzamko et al., 2014. (B) Lewy-Körperchen in pigmentierten Neuronen der SNpc von Parkinson-Patienten (a) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (b) Ubiquitin Immunofärbung, die v.a. den Rand des Lewy-Körperchen anfärbt (c)  $\alpha$ -Synuclein Immunofärbung färbt den Kern des Lewy-Körperchen (d) Doppelfärbung mit Ubiquitin (blau) und  $\alpha$ -Synuclein (braun), die das gesamte Lewy-Körperchen darstellt. Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Aus Dunnett und Björklund, 1999.

#### 1.1.4.3 Pathogene Ursachen

Der genaue Mechanismus, der zur dopaminergen Neurodegeneration in der SNpc und der Bildung von Lewy-Körperchen in der PD führt, ist noch nicht aufgeklärt. Doch gibt es einige pathogene Faktoren, die im Zusammenhang mit der PD beschrieben sind. Sie werden in der Pathogenese dieser multifaktoriellen Erkrankung als Ursachen diskutiert.

##### 1.1.4.3.1 *Morphologie dopaminergener Neurone*

Die dopaminergen Neurone der SNpc sind am stärksten von der Degeneration betroffen. Ursächlich dafür ist der morphologische Aufbau, der sich von anderen Neuronen unterscheidet. Dopaminerge Axone sind in Relation zum Soma um einiges länger und enden in einer sehr

ausgeprägten Verzweigung, wobei dieser Phänotyp in der *SNpc* noch stärker ausgeprägt ist (Matsuda et al., 2009). Zusätzlich weisen dopaminerge Axone der *SNpc* meist keine oder eine verringerte Myelinisierung auf (Braak et al., 2004). Dadurch ergibt sich ein hoher Energiebedarf dieser Neurone einhergehend mit einer nicht isolierten Signalweiterleitung, was bereits durch geringe Störungen in der Energieproduktion zu Beeinträchtigungen in den Neuronen führt (Pissadaki und Bolam, 2013). Dies hat weitere Auswirkungen zur Folge, wie z. B. Proteinaggregation und Beeinträchtigung der Mitochondrien (siehe Abschnitte 1.1.4.3.5 und 1.1.4.3.6), wodurch es schließlich zum Zelltod kommt.

#### *1.1.4.3.2 Dopaminerger Metabolismus, Neuromelanin und Eisen*

Der Dopamin-Metabolismus geht einher mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dopamin wird aus der Aminosäure Tyrosin gebildet und in neuronalen Vesikeln gespeichert. Bei Erregung der Nervenzelle wird Dopamin in den synaptischen Spalt freigesetzt um postsynaptische dopaminerge Rezeptoren zu stimulieren. Anschließend wird es durch präsynaptische Transporter wieder in die Neurone aufgenommen und teilweise wieder in Vesikeln gespeichert. Ein Teil des Dopamins unterliegt dem Abbau durch enzymatische Reaktionen oder der Autoxidation. Relevant für die ROS-Bildung ist der Abbau von Dopamin durch Monoaminoxidase-B, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses entsteht auch bei der Autoxidation von Dopamin, neben dem Superoxidradikal und dem Dopamin-semichinon. Letzteres schädigt Proteine, indem es mit deren Cysteinresten reagiert, es polymerisiert jedoch weiterhin auch zu Neuromelanin, welches die Fähigkeit hat Metallionen zu binden und damit die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen (Graham, 1978; Zecca et al., 2002). Jedoch verhält sich das Neuromelanin in der PD-Pathogenese toxisch, da dieses bei der Neurodegeneration von DA-Neuronen freigesetzt wird und hier als schädigende Substanz agiert, indem es Mikroglia aktiviert und Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, was zum Voranschreiten der Pathogenese führt (Zecca et al., 2006). Untersuchungen bestätigen, dass dopaminerge Neurone der *SNpc* mit mehr Neuromelanin anfälliger für Zerstörung sind als solche mit weniger Neuromelanin (Hirsch et al., 1988). Auch wird aus dem Neuromelanin gebundenes Eisen freigesetzt, welches für oxidative Reaktionen zur Verfügung steht. Erhöhte Eisen-Konzentrationen konnten in den dopaminergen Neuronen der *SNpc* von PD-Patienten beobachtet werden (Oakley et al., 2007). Das Eisen katalysiert die Fenton-Reaktion, wobei Wasserstoffperoxid in ein Hydroxylanion und ein Hydroxylradikal umgewandelt wird. Letzteres stellt eine hochreaktive ROS dar. Zudem trägt das Eisen verstärkt zur Autoxidation von Dopamin bei.

### 1.1.4.3.3 Neuroinflammation und Apoptose

Chronische Neuroinflammation ist kennzeichnend für die PD und konnte in *post mortem* Analysen beobachtet werden. Aktivierte Mikroglia und Astrozyten wurden in der Pathogenese der PD beobachtet, wofür u. a. das aggregierte  $\alpha$ -Synuclein und das Neuromelanin ursächlich sind (siehe Abschnitt 1.1.4.3.2) (Imamura et al., 2003; Lee et al., 2010; Zhang et al., 2005). Dadurch kommt es zur Erhöhung von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die zur Neuroinflammation und Neurodegeneration in der SNpc beitragen (Ferrari et al., 2006). Auch das adaptive Immunsystem scheint betroffen zu sein, da beobachtet werden konnte, dass T-Lymphozyten in das Gehirn einwandern und zur Neurodegeneration in der PD beitragen (Brochard et al., 2009). Die Neuroinflammation und weitere Umstände in dieser multifaktoriellen Erkrankung führen zu einer gesteigerten Apoptose, die in der PD-Erkrankung verstärkt abläuft (Tatton, 2000).

### 1.1.4.3.4 Genetik

Ungefähr 5 – 10 % der Parkinson-Erkrankungen haben genetische Ursachen. Heutzutage sind ca. 30 mutierte Gene beschrieben. Der Einfluss ist zwar noch nicht von allen genau geklärt, doch geben die untersuchten Mutationen näheren Einblick in die Pathogenese der Erkrankung.

Die erste entdeckte Mutation in der PD befand sich im *SNCA* Gen, das für  $\alpha$ -Synuclein kodiert, welches dann in der Zelle aggregiert und zur Bildung von Lewy-Körperchen führt (siehe Abschnitt 1.1.4.2) (Berg et al., 2005). Weitere Genmutationen sind im Bereich der Proteinhomeostase anzutreffen. Die häufigste Mutation in der familiären PD wird durch das Gen *LRRK2* hervorgerufen, welches für ein Protein kodiert, dessen Funktionen im vesikulären Transport, im Zusammenhang mit mitochondrialer Funktion und in der Autophagie anzutreffen sind (siehe Abschnitte 1.3.2 und 1.4) (Paisán-Ruíz et al., 2004; Wallings et al., 2015). Eine weitere Mutation betrifft das Gen *ATP13A2*, welches für ein transmembranäres Protein der Lysosomen kodiert (Ramirez et al., 2006). Die Mutationen in den Genen *Parkin*, *PINK1* und *DJ-1* treten oft in der frühzeitig eintretenden Parkinson-Krankheit (EOPD = *early onset Parkinson's disease*), vor dem 50. Lebensjahr, auf. Alle drei Proteine sind von ihrer Funktion in der Mitophagie anzusiedeln (siehe Abschnitt 1.3.5). Das Protein DJ-1 spielt eine Rolle bei dem Schutz der Mitochondrien gegen oxidativen Stress (Cookson, 2012).

Bei der Betrachtung aller Genmutationen in der PD fällt auf, dass vorwiegend Proteine betroffen sind, die eine wichtige Rolle in der Mitophagie sowie der mitochondrialen Dynamik als auch in der Proteinhomeostase und der Apoptose spielen.

#### 1.1.4.3.5 Proteinaggregation

Ein wichtiges Merkmal der PD ist die Bildung der Lewy-Körperchen, die zum Großteil aus aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein bestehen. Missgefaltetes  $\alpha$ -Synuclein bildet zunächst neurotoxische Oligomere, die anschließend zu Fibrillen aggregieren (Rodriguez et al., 2015). Ein wesentlicher Faktor für diese Veränderungen ist oxidativer Stress (Giasson et al., 2000; Outeiro et al., 2008). Die Aggregate wirken sich störend auf die Zelle aus. Zum einen sind aggregierte Proteine nicht mehr funktional, zum anderen werden zelluläre Vorgänge durch Aggregate gestört, weshalb sie nicht mehr einwandfrei ablaufen können. Dies führt wiederum zur vermehrten Proteinaggregation. Ursächlich für die Proteinmissfaltung ist neben dem oxidativen Stress eine beeinträchtigte Proteinhomeostase. Molekulare Chaperone sind ein wichtiger Faktor der Proteinhomeostase, sie sind in der Lage die Rückfaltung von fehlgefalteten Proteinen zu vollziehen (siehe Abschnitt 1.4.1). Uryu et al. konnten zeigen, dass molekulare Chaperone in Lewy-Körperchen vorzufinden sind. Das weist darauf hin, dass hier die Chaperone der präventiven Refaltung dienen sollen (Uryu et al., 2006). Jedoch werden die Chaperone von den Lewy-Körperchen eingeschlossen, was zur Verringerung von Chaperonen in der Zelle führt und eine Zunahme vom proteotoxischen Stress bewirkt. Dies konnte in *post mortem* Proben von PD-Patienten ermittelt werden (Ebrahimi-Fakhari et al., 2011). Das Ubiquitin-Proteasom-System, ein weiteres System der Proteinhomeostase, scheint auch in der Pathogenese der PD gestört zu sein (siehe Abschnitt 1.4.1). *Post mortem* konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse-Aktivität des 26S-Proteasoms in PD-Patienten beeinträchtigt ist (McNaught und Jenner, 2001). Zudem ist ebenfalls die Autophagie in der PD beeinträchtigt (siehe Abschnitt 1.4.2). In nigralen Neuronen von Parkinson-Erkrankten konnte eine vermehrte Akkumulation von autophagischen Vakuolen nachgewiesen werden (Anglade et al., 1997). Zusätzlich wurde eine gesteigerte Autophagie in Blutzellen von PD-Patienten beschrieben (Prigione et al., 2010). Zum Teil ist dies dem aggregierten  $\alpha$ -Synuclein geschuldet. Dieses wird eigentlich über die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) abgebaut. Mutiertes oder modifiziertes  $\alpha$ -Synuclein hemmt hingegen, durch Bindung an den lysosomalen Rezeptor LAMP-2A, die CMA (Cuervo et al., 2004; Martinez-Vicente et al., 2008). Kompensatorisch kommt es zu einer gesteigerten Bildung von vesikulären Bestandteilen der Autophagie. Die genetischen Mutationen in der PD-Pathogenese, die vermehrt Proteine der Autophagie betreffen, verdeutlichen den wichtigen Einfluss dieses Abbausystems in dieser Erkrankung (siehe Abschnitt 1.1.4.3.4).

#### 1.1.4.3.6 Beeinträchtigung der Mitochondrien

Eine zentrale Rolle der Mitochondrien in der PD wird dadurch bestätigt, dass Mutationen in der PD häufig mitochondriale Proteine, wie PINK1 und Parkin, betreffen (siehe Abschnitt 1.1.4.3.4) (Pickrell und Youle, 2015). Weiterhin herrscht in der PD eine Beeinträchtigung von Komplex I in der Substantia nigra *pars compacta*, die *post mortem* nachgewiesen werden konnte (Schapira et al., 1990). Dadurch läuft die Atmungskette nicht effizient ab, wodurch es zur verringerten mitochondrialen Energieproduktion kommt. Dies wiederum bewirkt erhöhten oxidativen Stress, der die Mitochondrien weiterhin schädigt. In einer Art Teufelskreis kommt es zu weiteren Schädigungen, die in Patientenzellen beobachtet werden konnten (Bender et al., 2006; Hajieva et al., 2018; Toulorge et al., 2016). Hierzu gehören u. a. Deletionen in der mitochondrialen DNA, sowie Beeinträchtigungen in der Elektronentransportkette und der Calcium-Homöostase. Auch kommt es dadurch zu Anomalien in der mitochondrialen Morphologie und Dynamik, was zudem mit einer beeinträchtigten Mitophagie einhergeht (Banerjee et al., 2009; Bose und Beal, 2016; Shefa et al., 2019). Untersuchungen in toxinbasierten Parkinson-Modellen ergaben eine gesteigerte Fission von Mitochondrien (Arnold et al., 2011; Gomez-Lazaro et al., 2008).

#### 1.1.4.3.7 Oxidativer Stress in der Parkinson-Krankheit

Der oxidative Stress stellt einen entscheidenden Faktor in dieser Erkrankung dar (Boerger et al., 2019; Dias et al., 2013). Bei der Betrachtung der bisher aufgeführten pathogenen Ursachen, wird deutlich, dass die Entstehung von ROS multifaktoriell ist. So kommt es beim dopaminergen Metabolismus zur Freisetzung von ROS. Auch die erhöhten Eisenspiegel und die Neuroinflammation führen zu oxidativem Stress, der sich in den vulnerablen dopaminergen Neuronen stark auswirkt. Die Tatsache, dass der Proteinmetabolismus der Zelle gestört ist, trägt zusätzlich dazu bei, dass durch ROS veränderte Proteine nicht abgebaut werden können und ihrerseits vermehrt zur Bildung von ROS beitragen.

Eine sehr wichtige Rolle bei der Entstehung des oxidativen Stresses im Verlauf der PD, spielen die Mitochondrien. Diese sind zum einen die größte Quelle für ROS (siehe Abschnitt 1.3.3). Zum anderen verursacht die Schädigung der Mitochondrien durch eigene und auch extern produzierte ROS, eine vermehrte Entstehung von diesen Spezies. Schließlich führt auch eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Dynamik und der Mitophagie zu verstärktem oxidativen Stress.

Hinzu kommt bei PD-Erkrankten eine verringerte zerebrale Konzentration von Glutathion, einem wichtigen körpereigenen Antioxidans (Sofic et al., 1992). Dieses Ungleichgewicht von oxidativen und antioxidativen Einflüssen zugunsten der Oxidantien stellt ein wesentliches Problem in der Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankung dar.

### 1.1.5 Antioxidative Neuroprotektion in der Parkinson-Krankheit

Der Oxidative Stress nimmt in der Neurodegeneration der PD eine zentrale Stellung ein, dies wurde bereits im Vorherigen ausführlich erläutert (siehe Abschnitt 1.1.4.3.7). Dieser Stress wurde damit zum Angriffspunkt für eine erhoffte präventive neuroprotektive Therapie der PD. Hierfür wurden bisher Antioxidantien unterschiedlichster Art untersucht. Präklinisch erwiesen sich viele dieser Substanzen als protektiv und vielversprechend (Jin et al., 2014; Koppula et al., 2012). Beispielsweise zeigten in Parkinson-Modellen von Nagetieren Vitamin E, Coenzym Q10 und Resveratrol neuroprotektives Potential, um nur einige der protektiven Antioxidantien zu nennen (Clerehugh et al., 2008; Khan et al., 2010; Lan und Jiang, 1997; Roghani und Behzadi, 2001; Sharma und Nehru, 2013). Klinische Studien ergaben bisher jedoch keinen oder nur einen geringen präventiven Effekt (Beal et al., 2014; Jin et al., 2014; Kamat et al., 2008). Eine Meta-Analyse für Coenzym Q10 konnte keinen präventiven Einfluss in der PD erkennen (Negida et al., 2016). Jedoch sind die Daten kontrovers, da es ebenfalls Erkenntnisse gibt, die eine leichte Neuroprotektion für Coenzym Q10 in der PD belegen (Shults et al., 2002; Weber und Ernst, 2006). Weitere klinische Studien liegen vor, die weder für Vitamin E, Vitamin C, Kreatin noch für Caratinoide einen signifikanten protektiven Effekt in der PD zeigten (Etminan et al., 2005; Hughes et al., 2016; Mo und Liu, 2017; Zhang et al., 2002). Doch auch hier gibt es Untersuchungen die eine leichte Protektion beobachten konnten (Etminan et al., 2005; Fahn, 1992; Sarkar et al., 2016; Zhang et al., 2002). Es wird deutlich, dass die neuroprotektive Wirkung von Antioxidantien im PD-Patienten zurzeit nicht eindeutig bewiesen ist. Jedoch gibt es Anhaltspunkte, die dafür sprechen, dass eine antioxidative Therapie sich präventiv auswirken könnte. Ursächlich für die moderaten Effekte der Antioxidantien in der PD könnte eine begrenzte zentrale Bioverfügbarkeit der Substanzen sein (Moosmann und Behl, 2002). Am Beispiel von Vitamin E zeigte sich, dass es aufgrund seiner chemischen Struktur die Blut-Hirn-Schranke nur eingeschränkt passiert (Vatassery, 1998). Die Wirkkonzentrationen der meisten Antioxidantien liegen im Mikro- bis Millimolaren Bereich. Dies ist im Menschen schwierig zu realisieren, da hier mit hohen Substanzkonzentrationen und damit mit erhöhten unerwünschten Arzneimittelwirkungen, bis hin zu toxischen Effekten, zu rechnen wäre (Abner et al., 2011; Ohlow et al., 2017).

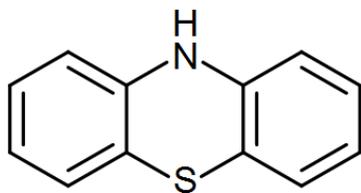
Die Prävalenz der PD ist steigend und die heutige Therapie ist bisher rein symptomatisch, weshalb es wichtig ist nach präventiven Therapiemaßnahmen zu suchen. Die leicht protektiven Tendenzen von Antioxidantien in klinischen Studien und die eindeutige Neuroprotektion in präklinischen Daten zeigen, dass es lohnenswert ist nach antioxidativen therapeutischen Alternativen zu suchen. Doch ist es wichtig sich den Antioxidantien zu widmen, die ein höheres Potential aufweisen als die bisher untersuchten Substanzen. Aufgrund des vielversprechenden

neuroprotektiven Potentials von Phenothiazin wurde diese Substanz in dieser Arbeit analysiert. Dies wird im Nachfolgenden näher erläutert (siehe Abschnitt 1.2.1).

## 1.2 Untersuchte Substanzen

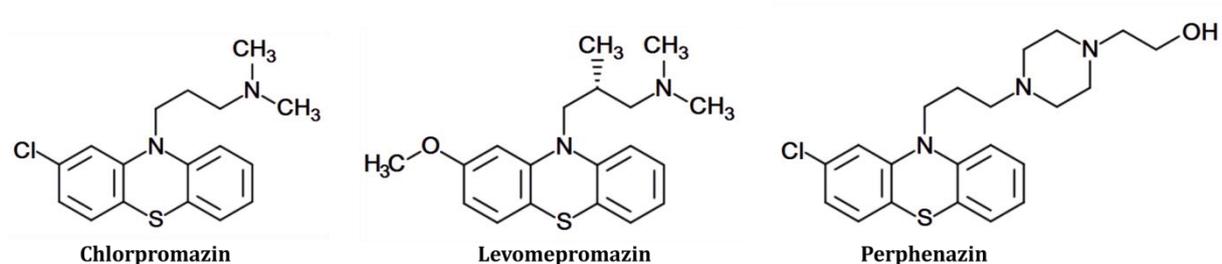
### 1.2.1 Das Antioxidans Phenothiazin

Phenothiazin (PHT) stellt ein Kettenabbruch-Antioxidans dar, das sich bereits seit mehreren Jahrzehnten bei anderen Indikationen als der Parkinson-Krankheit in der pharmakologischen Anwendung befand. Hierbei wurde es als Anthelminthikum, Fungizid, Insektizid und als Mittel gegen Malaria angewendet (Mitchell, 2006; Ohlow und Moosmann, 2011).



**Abbildung 1-3: Phenothiazin**

Chemische Struktur des Phenothiazins.



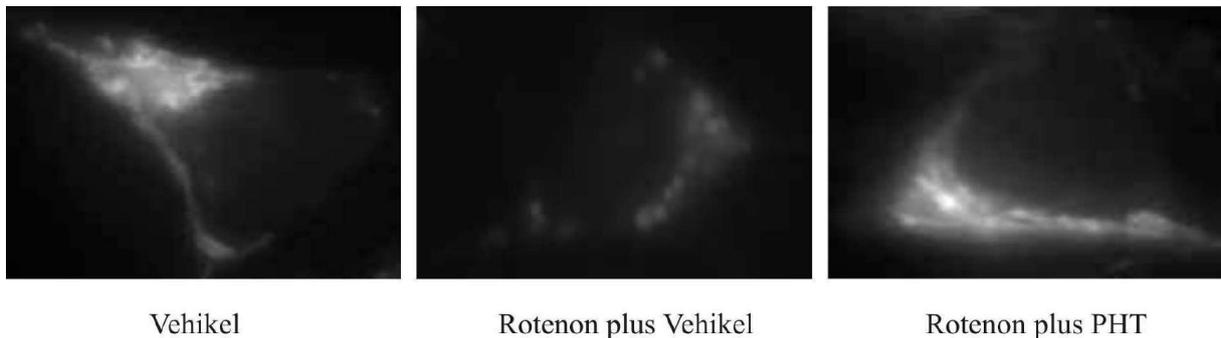
**Abbildung 1-4: Phenothiazin-Derivate**

Angegeben sind die chemischen Strukturen von Chlorpromazin, Levomepromazin und Perphenazin.

In der heutigen Pharmakologie werden zu den Phenothiazinen dessen antipsychotische Derivate gezählt (Abbildung 1-4). Diese sind aufgrund von chemischen Unterschieden von der nicht-antipsychotisch wirkenden Grundsubstanz Phenothiazin zu trennen. Die Wirkung des Kettenabbruch-Antioxidans erfolgt über Wasserstoffabspaltung am elektronegativen Stickstoff-Atom (Abbildung 1-3). Das trizyklische, planare Molekül ist in der radikalischen Form intensiv mesomeriestabilisiert. Damit ist es reaktionsträge und stoppt so die radikalische Kettenreaktion (Moosmann et al., 2001; Murphy et al., 1950).

In den letzten Jahren konnte die neuroprotektive Auswirkung von PHT gezeigt werden (Moosmann et al., 2001; Ohlow et al., 2017). Speziell in der Untersuchung der PHT-Wirkung im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit zeigte sich Phenothiazin protektiv gegen den erhöhten oxidativen Stress und der damit einhergehenden Neurodegeneration im nanomolaren Konzentrationsbereich. Im Krankheitsmodell der PD konnte PHT sowohl dopaminerge Zellen vor der oxidativen Neurotoxizität schützen als auch in Invertebraten die dopaminerge Neurodegeneration verhindern (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010). Neuerdings konnte ebenfalls in Ratten bestätigt werden, dass PHT im Parkinson-Modell neuroprotektiv wirkt, vor oxidativen Schäden schützt und die Überlebensrate der Tiere verlängert (Tapias et al., 2019).

Morphologische Untersuchungen der Mitochondrien in SH-SY5Y Zellen zeigten, dass Phenothiazin in der Lage ist das mitochondriale Membranpotential zu stabilisieren (Christ, 2010). Unter der Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon (siehe Abschnitt 1.2.2), konnte eine Absenkung des mitochondrialen Potentials beobachtet werden (Abbildung 1-5). Durch die Vorinkubation mit PHT wurde das mitochondriale Membranpotential stabilisiert, weshalb der schädigende Einfluss von Rotenon signifikant verringert werden konnte. Somit war PHT in der Lage die Integrität der Mitochondrien während einer Komplex I-Inhibition zu erhalten.



**Abbildung 1-5: Mitochondriales Membranpotential unter der Behandlung mit Rotenon und Phenothiazin**

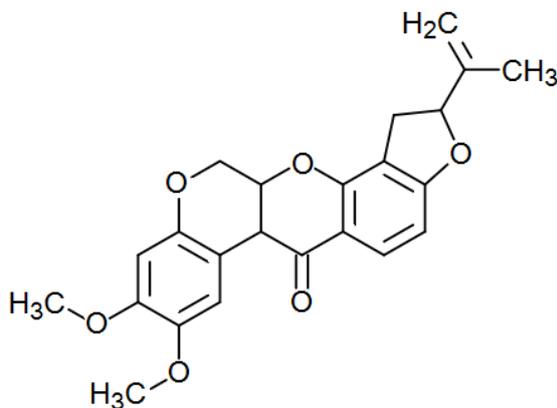
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe des MitoTracker Red in SH-SY5Y Zellen nach 48 h Behandlung mit 150 nM Rotenon in Anwesenheit von 50 nM PHT Phenothiazin oder Ethanol. Aus Christ, 2010.

Phenothiazin erscheint als interessantes Antioxidans, das sich bereits präklinisch als eine neuroprotektive Substanz unter experimentellen Bedingungen in der Parkinson-Pathologie gezeigt hat. Die hochdosierte pharmakologische Anwendung seit mehreren Jahrzehnten im Menschen zeigt seine weitgehende toxikologische Unbedenklichkeit, da erst ab der kumulativen Konzentration von 9 g mit toxischen Effekten beim Erwachsenen zu rechnen ist (Ottmann, 1952). Zudem ist dieser Wirkstoff *in vitro* und in *C. elegans* hoch potent, das einen pharmakologischen Einsatz im nanomolaren Bereich ermöglicht (Moosmann et al., 2001; Ohlow und Moosmann, 2011). Darüber hinaus kann diese Substanz durch ihren lipophilen und niedermolekularen Charakter

die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Tadros und Wahab, 1962). Dies ermöglicht eine Bioverfügbarkeit im ZNS, was in der PD entscheidend ist. Dies sind wesentliche Argumente um das Phenothiazin als mögliche pharmakologische Therapiesubstanz in der Parkinson-Krankheit zu untersuchen.

### 1.2.2 Das Parkinson-Toxin Rotenon

Die Parkinson-Forschung unterliegt gewissen Grenzen, da die tatsächliche *in vivo* Untersuchung nur *post mortem* an Biopsien von Patienten möglich ist. Damit sind diese Analysen rein retrospektiv. Darüber hinaus sind solche Biopsien verhältnismäßig rar und die Hirnregionen werden meistens dann betrachtet, wenn die Neurodegeneration meist schon stark vorangeschritten ist. Um diese Hindernisse zu umgehen, werden häufig toxinbasierte Modelle der PD verwendet. Zu den untersuchten Toxinen zählen oft Rotenon, 6-Hydroxydopamin, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) und Paraquat. Ihr Vorteil ist, dass sie meist den Phänotyp der PD-Erkrankung gut abbilden (Martinez und Greenamyre, 2012; Tieu, 2011).



**Abbildung 1-6: Rotenon**

Chemische Struktur von Rotenon

In dieser Arbeit wurde das Toxin Rotenon verwendet um die PD-Symptomatik auszulösen (Abbildung 1-6). Der Zusammenhang von Rotenon und der Parkinson-Krankheit wurde in epidemiologischen Studien erkannt. Diese ergaben, dass Mitarbeiter von Agrarkulturen, die Rotenon als Pestizid verwendeten, einem erhöhten Risiko ausgesetzt waren an PD zu erkranken (Di Monte, 2003; Tanner et al., 2011). Analysen zeigten, dass Rotenon den Komplex I der Atmungskette inhibiert, der interessanterweise auch in PD-Patienten in seiner Aktivität eingeschränkt ist (Devi et al., 2008; Hartley et al., 1994). Durch die Hemmung von Komplex I mittels Rotenon werden ROS erzeugt, die wiederum Komplex I schädigen wodurch erneut vermehrt ROS generiert werden. Der kumulative oxidative Schaden sorgt für den toxischen,

Parkinson-ähnlichen Effekt von Rotenon (Sanders und Greenamyre, 2013). Bei Untersuchungen im Rattenmodell wurde deutlich, dass Rotenon eine ähnliche Pathologie auslöst wie in erkrankten Parkinson-Patienten. Hier kam es zum Verlust von dopaminergen Neuronen und zu einer Akkumulation von Lewy-Körperchen in der Substantia nigra (Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003). Darüber hinaus wiesen die Ratten eine Symptomatik der Hypokinesie und Regidität auf und ähnelten damit den Parkinson-Patienten. Dies konnte auch in Mäusen bestätigt werden (Inden et al., 2011). Damit zeigt sich, dass Rotenon die Pathogenese der PD abbildet und sich damit als Modellschubstanz für diese Erkrankung gut eignet.

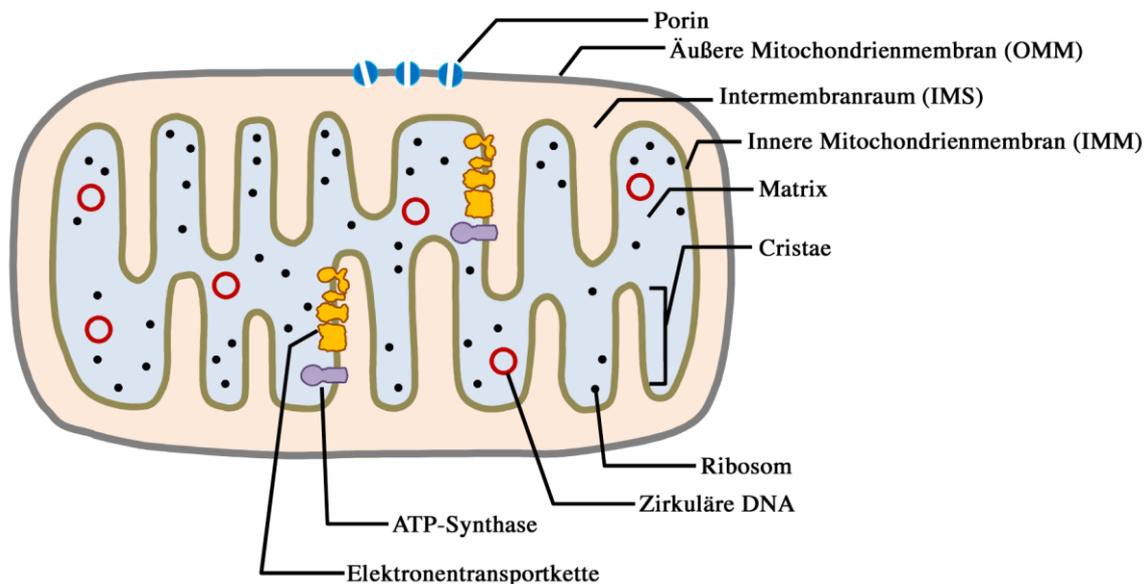
## 1.3 Mitochondrien

### 1.3.1 Morphologie der Mitochondrien

Mitochondrien sind die wichtigsten Energielieferanten der Zelle, da sie durch oxidative Phosphorylierung das meiste Adenosintriophosphat (ATP) erzeugen. Bei den Mitochondrien handelt es sich um zelluläre Organellen, die von einer Doppelmembran begrenzt werden. Damit ergeben sich vier verschiedene Kompartimente, die sich in Aufbau und Funktion unterscheiden (Abbildung 1-7). Außen befindet sich die äußere Mitochondrienmembran (OMM = *outer mitochondrial membrane*) und innen die innere Mitochondrienmembran (IMM = *inner mitochondrial membrane*). Dazwischen liegt der Intermembranraum (IMS = *intermembrane space*). Das Innere des Mitochondriums nennt sich Matrix und wird von der IMM eingeschlossen.

Die OMM wird aus einer Phospholipiddoppelmembran gebildet, die zahlreiche Proteine für Transport, Dynamik und Signalübertragung enthält (Duncan et al., 2013). Sie ist dank der Porine für eine freie Diffusion von kleineren Molekülen ( $\leq 8000$  Da) zugänglich. Größere Moleküle werden aktiv durch TOM-Proteine (*translocase of the outer membrane*) in den IMS transportiert (Ahting et al., 1999). In der IMM sind für den Transport die TIM-Proteine (*translocase of the inner membrane*) zuständig (Mühlenbein et al., 2004). Die IMM unterscheidet sich von der OMM durch ihre passive Undurchlässigkeit und durch ihren hohen Proteinanteil, der geschätzt ein Verhältnis von 3:1 Protein zu Lipid ergibt (Raza Shaikh und Brown, 2013). Hier stellt das Protein Cardiolipin eine Besonderheit dar, da es sonst nur in Prokaryoten vorzufinden ist (Paradies et al., 2014). In der IMM sind zahlreiche Proteine integriert, u. a. gehören dazu die vier mitochondrialen Komplexe I-IV wie auch die ATP-Synthase, die für die Energieproduktion essentiell sind. Die IMM besitzt zahlreiche Ausstülpungen und bildet damit die Strukturen der Cristae. Dies ermöglicht eine große Oberfläche um eine ausreichende ATP-Produktion zu gewährleisten (Cogliati et al., 2013). Die Matrix beinhaltet unzählige Proteine, beispielsweise sind die Enzyme der

Stoffwechselfvorgänge des Zitratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation zu nennen, ebenfalls ist hier die doppelsträngige, zirkuläre mitochondriale DNA (mtDNA) enthalten. Obwohl über 99 % der mitochondrialen Proteine im Zellkern kodiert werden, beinhaltet die mtDNA 37 Gene, die für 13 Proteine der Atmungskette kodieren (Boengler et al., 2011). Zusätzlich kodiert die mtDNA für 2 rRNAs und 22 tRNAs, die zur Translation der mitochondrialen Proteine notwendig sind (Anderson et al., 1981). Pro Zelle können mehrere Tausend Kopien der mtDNA vorliegen (Miller et al., 2003).



**Abbildung 1-7: Das Mitochondrium**

Abgebildet ist das Mitochondrium mit Angabe seiner einzelnen Kompartimente: OMM, IMS, IMM, Matrix. Dargestellt sind die Strukturen der Cristae in denen die Proteine der oxidativen Phosphorylierung eingebettet sind. Weiterhin sind die mtDNA, die Ribosomen und die Porine angegeben. Modifiziert nach Yusoff et al., 2015.

### 1.3.2 Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Funktionseinheiten der Zelle. Sie stellen wichtige Komponenten in der Apoptose, in der Calcium-Homöostase, in der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern, in der Thermogenese und in weiteren Stoffwechselfvorgängen dar (Gunter et al., 2004; Kispal et al., 1999; McBride et al., 2006).

Die Hauptaufgabe der Mitochondrien besteht darin, der Zelle Energie in Form von ATP zur Verfügung zu stellen. Hierfür wird der Zitratzyklus im Mitochondrium benötigt. Dieser wandelt Stoffwechselprodukte von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen im Wesentlichen in  $\text{CO}_2$  und die Reduktionsäquivalente NADH und  $\text{FADH}_2$  um. Diese stehen dann der mitochondrialen Atmungskette, die aus fünf in der IMM eingebetteten Komplexen besteht, zur Verfügung.

Komplexe I bzw. II sind für die Reduktion von NADH bzw. FADH<sub>2</sub> verantwortlich und sind somit für den Übertrag der Elektronen auf den Redoxträger Coenzym Q10 zuständig. Über Komplex III werden diese Elektronen dann auf das Cytochrom c übertragen und im Komplex IV erfolgt anschließend die Reduktion von elementarem Sauerstoff zu Wasser. Während des Elektronentransports werden über Komplexe I, III und IV Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Der dadurch entstehende Protonengradient ermöglicht die Aktivierung der ATP-Synthase, auch Komplex V genannt. Dieses Enzym wandelt ADP (Adenosindiphosphat) und anorganisches Phosphat in ATP um, das anschließend der Zelle für energiekonsumierende Prozesse zur Verfügung steht. Dieser Prozess wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.

### 1.3.3 Oxidativer Stress

Mitochondrien tragen im Wesentlichen zum oxidativen Stress in der Zelle bei, weil sie die Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS = *reactive oxygen species*) darstellen. Oxidativer Stress beschreibt das Ungleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Systemen der Zelle, zugunsten des prooxidativen Systems. Dies geht einher mit der übermäßigen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.

#### 1.3.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Zum oxidativen System der Zelle zählen die ROS. Diese sind reaktive Moleküle, die das Element Sauerstoff beinhalten. Oft handelt es sich um Radikale, die durch ihr freies Elektron sehr instabil und damit reaktiv sind. Aber auch Moleküle nicht radikalischen Charakters mit einer hohen Reaktivität werden zu den ROS gezählt. Zu den ROS gehören hauptsächlich das Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), das Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und das Hydroxylradikal (OH<sup>•</sup>). Diese oxidativen Substanzen wandeln Moleküle in ihrer Umgebung in Radikale und Peroxide um. Letztere propagieren zusätzlich den oxidativen Einfluss, weshalb auch diese zu den ROS zählen (Aitken et al., 1989).

ROS werden enzymatisch beispielsweise von NADPH Oxidasen oder Xanthinoxidasen gebildet, sie entstehen aber auch beim Lipidmetabolismus in den Peroxisomen (Graham, 1978). Die weitest- aus größte Quelle von ROS stellen jedoch die Mitochondrien dar (Chance et al., 1979). Beim Elektronentransport über die Komplexe der Atmungskette entflieht ein Teil der Elektronen diesem Prozess, dies geschieht vermehrt an den Komplexen I und III (Raha et al., 2000; Turrens und Boveris, 1980). Diese Elektronen reagieren mit dem molekularen Sauerstoff in ihrer Umgebung

und bilden somit das Superoxid-Anion ( $O_2^{\bullet-}$ ). Dieses wird zum Großteil durch die Superoxid-dismutase in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt. Das Wasserstoffperoxid kann anschließend im Rahmen der Fenton-Reaktion in Hydroxylanion ( $OH^-$ ) und Hydroxylradikal ( $OH^\bullet$ ) umgewandelt werden. Beim Letzteren handelt es sich um das reaktivste ROS (Chance et al., 1979). Bei dieser Reaktion wirkt zweiwertiges Eisen als Katalysator. Aufgrund der Eisen-Schwefel-Cluster in den Mitochondrien läuft die Fenton-Reaktion in diesen Organellen verstärkt ab.

### 1.3.3.2 Antioxidatives System

Das antioxidative System der Zelle ist ein Kompensationsmechanismus, um sich vor oxidativem Stress zu schützen. Antioxidantien sind in der Lage ROS chemisch zu reduzieren, so wird verhindert, dass ROS ihre schädigenden oxidativen Effekte weiter propagieren. Das antioxidative System wird in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien gegliedert, wobei die letzteren in endogene und exogene Substanzen unterteilt werden. Zu den endogenen Antioxidantien gehören Substanzen, die vom Körper gebildet werden, wie Glutathion, Harnsäure oder Coenzym Q10. Exogene Substanzen, wie Vitamine A, C und E, sowie Carotinoide und Flavonoide, führt der Organismus von außen zu. Zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien zählen die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathionperoxidase. Die gesamte Variabilität des antioxidativen Systems ist wichtig für eine funktionsfähige Zelle, damit sie in der Lage ist, sich auf unterschiedlichen Ebenen vor ROS zu schützen.

### 1.3.3.3 Oxidative Schädigung

Im gesunden Organismus liegt ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Einflüssen vor. Hierbei haben reaktive Sauerstoffspezies physiologische Funktionen in der Signalweiterleitung, in der Regulation der Autophagie und in der Immunabwehr (Chen et al., 2009; Franchini et al., 2013; García-quintans et al., 2016). Beim oxidativen Stress reicht das antioxidative System der Zelle nicht aus um sich den Oxidantien zu entledigen, die Balance ist hier zugunsten des oxidativen Status verschoben. Es besteht ein Überschuss von ROS und von oxidativen Prozessen, die sich schädigend auf die Zelle auswirken.

Beeinträchtigungen am Hauptentstehungsort, nämlich in den Mitochondrien, führen zur mutierten mtDNA (Bender et al., 2006; Shokolenko et al., 2009). Dadurch kommt es zur verringerten Bildung von mitochondrial kodierten Proteinen, die für die Atmungskette und die ATP-Synthese zuständig sind. Zusätzlich kommt es zur verringerten bzw. unzureichenden Respiration durch den direkten Angriff der ROS an diese mitochondrialen Proteine (Rowley et al., 2016). Dies

verstärkt wiederum die Entstehung von ROS, da noch mehr Elektronen der Atmungskette entfliehen und weiter ROS generieren. Zusätzlich kommt es durch Beeinträchtigung intramitochondrialer Prozesse wie beispielsweise der Calcium-Homöostase oder der Apoptose-Regulation zur Vermehrung von oxidativen Einflüssen in der Zelle (Jiang et al., 2008; Hajieva et al., 2018).

Gesamtzellulär betrachtet werden Proteine, DNA und Membranen durch oxidativen Stress geschädigt (Davalli et al., 2016; Granold et al., 2015; Hajieva et al., 2015). Hierbei kann es zu radikalischen Kettenreaktionen kommen, die diesen Prozess verstärken.

Der oxidative Stress tritt im Laufe der Alterung und im Verlauf von zahlreichen Krankheiten, u. a. in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- und der Parkinson-Krankheit, auf (Davalli et al., 2016; Shefa et al., 2019). Die Einflüsse von oxidativem Stress in der Parkinson-Krankheit wurden in Abschnitt 1.1.4.3.7 erläutert.

### 1.3.4 Mitochondriale Dynamik

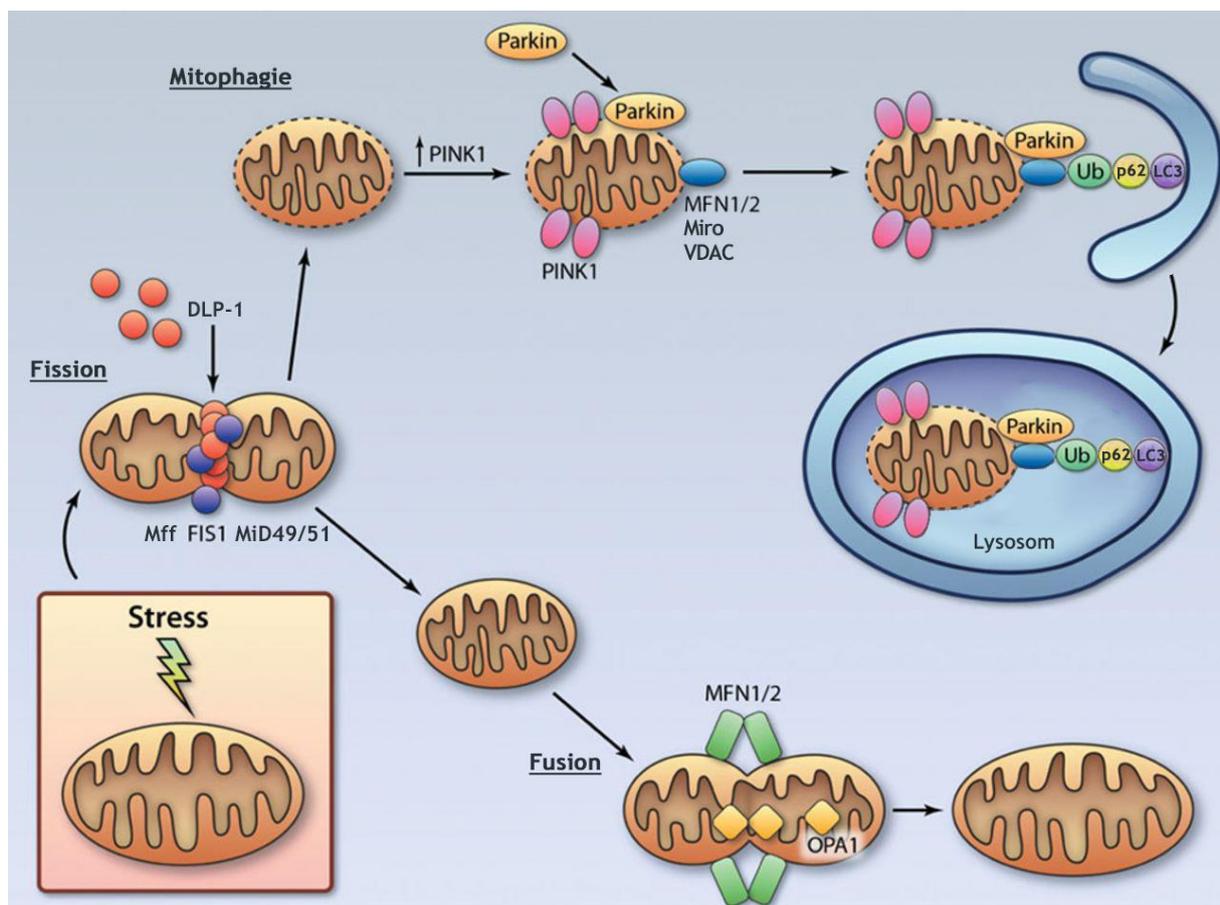
Die mitochondriale Homöostase beschreibt die Balance zwischen der Biogenese, der mitochondrialen Dynamik und dem Abbau von Mitochondrien (Twig und Shirihai, 2015). Die Dynamik der Mitochondrien vollzieht sich in einem großen tubulären Netzwerk innerhalb der Zelle. Hierbei teilen (Fission) und vereinigen (Fusion) sich die Mitochondrien unentwegt (Bereiter-Kahn und Vöth, 1994). Dabei stehen die Mitochondrien immer wieder in Kontakt, wodurch es zur Durchmischung des mitochondrialen Inhalts, bestehend aus Proteinen, Lipiden und mtDNA, kommt (Youle und van der Bliek, 2012). Dadurch wird die Form, Größe und Anzahl der Mitochondrien reguliert und eine Homöostase des mitochondrialen Inhalts über die gesamte Zelle hinweg gewährleistet (Chan, 2012; Chen et al., 2010; Westermann, 2012). Auch dient die mitochondriale Dynamik der energetischen Kopplung von Mitochondrien, die somit eine effektive Energieproduktion ermöglicht. Die mitochondriale Dynamik ist des Weiteren in der Lage Schäden durch intakte Komponenten zu ersetzen. Bei irreparabler Schädigung eines mitochondrialen Abschnitts wird er mittels Dynamik abgesondert und dem Abbau durch Mitophagie zugeführt (Twig et al., 2008).

#### 1.3.4.1 *Fission und Fusion*

Bei der Fission wird ein Abschnitt des mitochondrialen Netzwerkes abgesondert (siehe Abbildung 1-8). Dies geschieht über das Protein DLP-1 (*dynamamin-like protein 1*), das vorwiegend im Zytosol vorliegt (Lee et al., 2016; Losón et al., 2013). Es wird mittels bestimmter Proteine an die OMM rekrutiert, dazu zählen FIS1 (*mitochondrial fission 1 protein*), Mff (*Mitochondrial fission*

factor) und MiD49 bzw. 51 (*Mitochondrial dynamics proteins 49, 51 kDa*) (Losón et al., 2013). Die an der mitochondrialen Oberfläche angelangten DLP-1-Proteine oligomerisieren spiralförmig um das Mitochondrium und schnüren es unter der Hydrolyse von GTP ein, bis das Mitochondrium in zwei Fragmente zerfällt (Ingermann et al., 2005).

Die mitochondriale Fusion ist ein zweistufiger Prozess bei dem die äußere und anschließend die innere Mitochondrienmembran separat fusionieren (siehe Abbildung 1-8) (Song et al., 2009). Die Fusion der äußeren Membran wird durch zwei große membranäre GTPasen, Mitofusin 1 (Mfn1) und Mitofusin 2 (Mfn2), bewerkstelligt (Eura, 2003; Hales und Fuller, 1997). Nachgeschaltet erfolgt die Fusion der inneren Mitochondrienmembran mithilfe des Proteins OPA1 (*Optic atrophy 1*) (Olichon et al., 2002; Song et al., 2009). Dieses ist gleichzeitig für eine Modulation der Cristae-Struktur verantwortlich und ermöglicht so die Erhaltung einer abgestimmten ATP-Synthese (Patten et al., 2014).

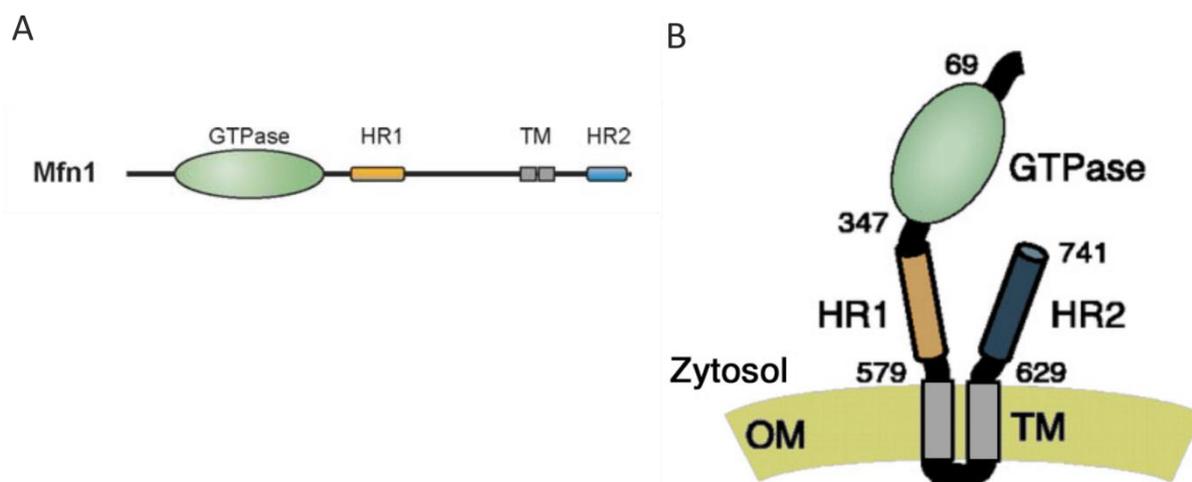


**Abbildung 1-8: Regulation der mitochondrialen Dynamik (Fission und Fusion) und der Mitophagie**  
 Gestresste Mitochondrien werden durch Fission in geschädigten und intakten Part geteilt. Der intakte Part vereinigt sich in der Fusion mit anderen gesunden Mitochondrien. Der geschädigte Part unterliegt der Mitophagie, die schließlich im Lysosom endet. Modifiziert nach Kubli und Gustafsson, 2012.

### 1.3.4.2 Das Protein Mitofusin 1

Das Mitofusin 1 (Mfn1) spielt eine wichtige Rolle in der Fusion von Mitochondrien. In diesem Vorgang ist die Funktion von Mfn1 bislang am besten beschrieben, wobei es ebenfalls bei Prozessen wie der Seneszens oder der Apoptose von Bedeutung ist (Park et al., 2010; Pyakurel et al., 2015).

Strukturell gesehen besteht das Mfn1 aus einer GTPase-Einheit und zwei coiled-coil-Domänen (siehe Abbildung 1-9). Es durchspannt die äußere mitochondriale Membran zwei Mal, sodass die wichtigen Funktionsdomänen zytosolisch vorliegen. Während N-terminal die GTPase-Einheit und die erste coiled-coil Domäne (HR1 = *heptad repeat 1*) vorliegen, ragt C-terminal die zweite coiled-coil Domäne (HR2) ins Zytosol (Fritz et al., 2001; Hales und Fuller, 1997). Im Fusionsmechanismus verbinden sich die HR2-Motive von benachbarten Mitochondrien antiparallel (Cao et al., 2017; Koshiba et al., 2004; Rojo et al., 2002). Die Fusion erfolgt anschließend über die GTPase-Domäne, die GTP zu GDP und Pi hydrolysiert (Ishihara et al., 2004; Yan et al., 2018).



**Abbildung 1-9: Mitofusin 1**

Dargestellt ist das Protein Mitofusin 1. (A) Domänen-Struktur des Proteins mit den jeweiligen funktionalen Einheiten: GTPase-Domäne, zwei coiled-coil Domänen 1 und 2 (HR1 und HR2) und Transmembran-Einheit (TM), modifiziert nach Chan, 2006. (B) Räumliche Mfn1-Darstellung eingebettet in der äußeren Mitochondrienmembran (OM) mit Angabe von einigen Aminosäure-Positionen. Modifiziert nach Koshiba et al., 2004.

Das Protein Mfn1 liegt in drei bekannten Protein-Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Die kanonische Form, die für die mitochondriale Fusion zuständig ist, ist die Isoform 1, die mit 741 Aminosäuren eine Molekülmasse von 84 kDa aufweist. Die Isoform 2 (41 kDa) besteht nur aus den ersten 370 Aminosäuren des Proteins, wobei die letzten vier Aminosäuren verändert sind. Die Isoform 3 allerdings besteht aus insgesamt 630 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 71 kDa. Dieser fehlen im Vergleich zur Isoform 1 die

Aminosäuren 444 – 554 (UniProt, 2019). Die mRNA der Isoform 3 weist im Vergleich zur Isoform 1 durch das alternative Spleißen eine Deletion von zwei Exons (Exon 12 und 13) auf, was dem fehlenden Aminosäurestrang in der Isoform 3 entspricht (AceView, 2019).

### 1.3.5 Mitophagie

#### 1.3.5.1 *Mechanismus der Mitophagie*

Der Begriff „Mitophagie“ wurde erstmals von John J. Lemasters im Jahre 2005 verwendet und beschreibt einen Weg der Autophagie, der spezifisch dem Abbau von Mitochondrien dient (siehe Abschnitt 1.4.2) (Lemasters, 2005). Bisher sind mehrere Wege der Mitophagie beschrieben (Ashrafi und Schwarz, 2013). Hierbei ist die PINK1-Parkin-vermittelte Mitophagie am besten erforscht und befasst sich mit dem Abbau von geschädigten Mitochondrien. Auf diese wird sich im Folgenden bezogen.

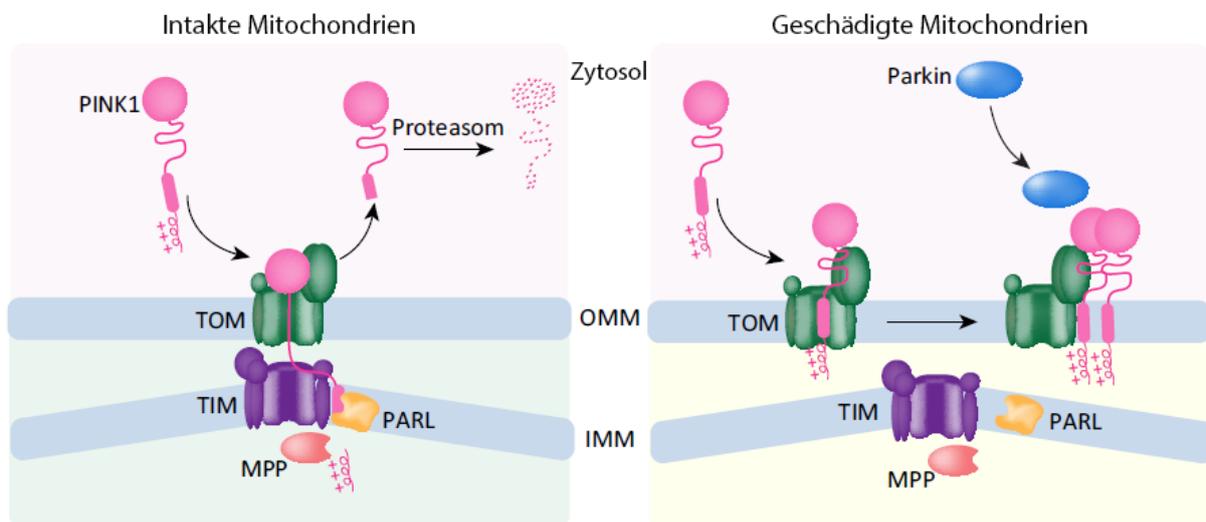
Die mitochondriale Dynamik ist in der Lage geschädigte mitochondriale Anteile mittels Fission von dem mitochondrialen Netzwerk zu trennen. Das abgetrennte Mitochondrium weist ein verringertes Membranpotential auf und wird somit der Mitophagie zugeführt (siehe Abbildung 1-8) (Twig et al., 2008). Nachfolgend akkumuliert die Kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) auf der OMM und rekrutiert die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin durch Phosphorylierung aus dem Zytosol (Jin et al., 2010; Narendra et al., 2010; Schubert et al., 2017). Parkin ist für die Ubiquitinierung der Proteine der OMM zuständig (Bsp.: Mfn 1/2, Miro (*Mitochondrial Rho GTPase 1*), VDAC (*Voltage-dependent anion channel*)) (Sarraf et al., 2013). Aktuell wird Mitofusin 2 als Rezeptor für Parkin diskutiert. Einige Forschergruppen konnten zeigen, dass durch PINK1 phosphoryliertes Mitofusin 2 bei der Rekrutierung von Parkin eine Rolle zu spielen scheint (Chen und Dorn 2013; Gong et al., 2015). An die polyubiquitinierten Proteine der OMM dockt anschließend das Protein p62 an (Geisler et al., 2010). Durch die Bindung an LC3 kommt es zu einer Lokalisierung des geschädigten Mitochondriums an das Phagophor (Kawajiri et al., 2010). Nachfolgend schließt es zum Autophagophor und vollzieht die Verschmelzung mit einem Lysosom zum Autolysosom. Hierin wird das Mitochondrium mittels lysosomaler Hydrolasen abgebaut (siehe Abschnitt 1.4.2).

#### 1.3.5.2 *Das Protein PINK1*

Die Kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) stellt ein wichtiges Molekül zur Einleitung der Mitophagie dar. Es handelt sich hierbei um eine kernkodierte Serin/Threonin-Kinase

(Nakajima et al., 2003). N-terminal befindet sich die transmembranäre Domäne, diese wird C-terminal von einer großen Kinase-Domäne abgelöst, die ins Zytoplasma ragt (UniProt, 2019; Zhou et al., 2008).

Die zelluläre Konzentration von PINK1 ist relativ gering, da dieses Protein in funktionalen Mitochondrien einer proteolytischen Spaltung unterliegt (siehe Abbildung 1-10) (Jin et al., 2010). Durch die Translokasen TOM und TIM wird PINK1 in das Mitochondrium importiert. Mitochondrien-bindende Anteile werden dann durch die Peptidase MPP (*mitochondrial processing peptidase*) und die Protease PARL (*presenilin-associated rhomboid-like protein*) geschnitten (Greene et al., 2012). Die restliche Protein-sequenz wird ins Zytosol freigegeben und unterliegt dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Yamano und Youle, 2013). Im geschädigten Mitochondrium besteht ein verringertes Membranpotential. Als Folge kann die Translokation ins Mitochondriuminnere und die Spaltung durch MPP und PARL nicht mehr erfolgen (Narendra et al., 2010). Stattdessen wird PINK1 durch TOM stabilisiert und akkumuliert dadurch auf der äußeren Mitochondrienmembran (Lazarou et al., 2012; Sekine und Youle, 2018). Dieser Zustand ermöglicht die Rekrutierung von Parkin und damit den Abbau des Mitochondriums durch Mitophagie.



**Abbildung 1-10: PINK1-Import**

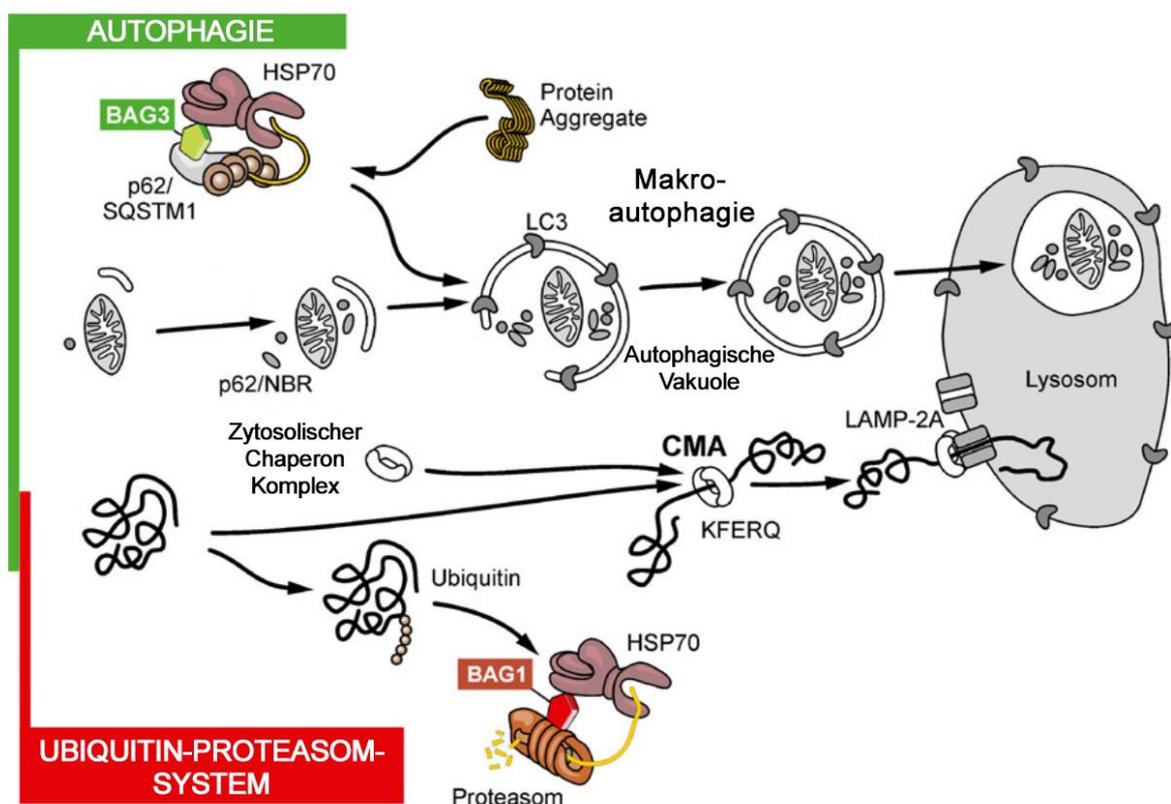
Mechanismus vom PINK1-Import in intakten und geschädigten Mitochondrien. (links) In intakten Mitochondrien wird PINK1 durch TOM und TIM in das Mitochondrium importiert, durch Proteasen (PARL, MPP) geschnitten und zum Abbau ins Zytosol freigegeben. (rechts) In geschädigten Mitochondrien wird PINK1 durch TOM stabilisiert und verbleibt auf der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) um Parkin zu rekrutieren und weitere Schritte der Mitophagie einzuleiten. Modifiziert nach Nguyen et al., 2016.

## 1.4 Autophagie

### 1.4.1 Autophagie als Bestandteil der Proteinhomeostase

Die Proteinhomeostase umfasst Synthese, Faltung, Aufrechterhaltung der Funktionalität und den kontrollierten Abbau von Proteinen. Hierdurch wird ein intaktes Proteom in der Zelle gewährleistet.

Bei Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen kann es zum Funktionsverlust des Proteins und darüber hinaus zu toxischen Auswirkungen auf die Zelle bis hin zum Zelltod kommen (Behl und Ziegler, 2014). Um dies zu verhindern bedient sich die Zelle der Rückfaltung der Proteine in die native Konformation mittels molekularer Chaperone, des Abbaus über das Ubiquitin-Proteasom-System oder über die Autophagie (siehe Abbildung 1-11).



**Abbildung 1-11: Wege des Proteinabbaus**

Dargestellt sind unterschiedliche Wege der Autophagie. Hierbei sind die Makroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) abgebildet, die schließlich beide dem Abbau im Lysosom erliegen. Weiterhin ist das Ubiquitin-Proteasom-System dargestellt. Modifiziert nach Morawe et al., 2012.

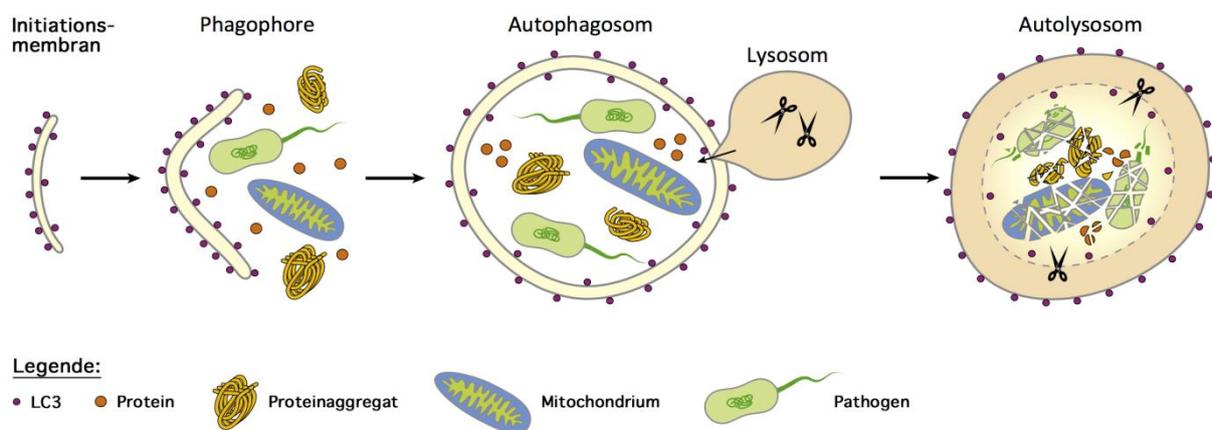
Molekulare Chaperone sind für die richtige Konformation der Proteine zuständig. Sie falten neu entstandene Proteine in ihre native Form, sind aber auch in der Lage fehlgefaltete Proteine zurückzufalten. Weiterhin können Proteine durch Chaperone zum Abbau markiert werden (Hartl et al., 2011). Co-Chaperone assistieren den Chaperonen und beeinflussen somit ihre Aktivität. Eine wichtige Familie von Chaperonen stellen die Hitzeschockproteine (HSP) dar, die durch Stress induziert werden. Ein wichtiges Protein dieser Klasse ist das Chaperon HSP70, da es auf vielfältige Weise die Proteinhomöostase aufrechterhält (Meimaridou et al., 2009). Für dieses Protein sind mehrere Co-Chaperone beschrieben. Beispielsweise werden mittels Co-Chaperonen der BAG-Familie (*Bcl-2-associated athanogene*) am HSP70 polyubiquitinierte Proteine für den weiteren Abbau vormarkiert. Hierbei kennzeichnet BAG1 für die Degradation mittels Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), während BAG3 den Abbau über die Makroautophagie vermittelt (Behl, 2016; Gamerding et al., 2009, 2011; Stürner und Behl, 2017).

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist in der Zelle für den Abbau von kurzlebigen, fehlgefalteten oder nicht mehr benötigten Proteinen vorrangig (siehe Abbildung 1-11). Die Proteine werden über eine Enzym-Kaskade mit Ubiquitin versehen und damit für den Abbau markiert (Morawe et al., 2012). Die Degradation der ubiquitinierten Proteine findet schließlich im zylinderförmigen 26S-Proteasom, einer Protease bestehend aus mehreren Untereinheiten, statt. Im Inneren des 26S-Proteasoms befindet sich die 20S-Einheit, die von 19S-Einheiten (oder 11S-Einheiten) flankiert wird. Während die 19S-Einheit regulatorisch wirkt, stellt die 20S-Einheit den proteolytischen Kern des 26S-Proteasoms dar (Lander et al., 2012). Es ist für die Degradation von Proteinen in Peptide, mit einer Länge von etwa 10 Aminosäuren, zuständig.

## 1.4.2 Autophagie

Es gibt im Wesentlichen drei unterschiedliche Arten der Autophagie, die Mikroautophagie, die Makroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (Morawe et al., 2012). Während es bei der Mikroautophagie zu einer direkten Invagination von abzubauenem Material in die Lysosomen kommt, werden bei der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA = *chaperone-mediated autophagy*) Proteine mit der Peptidsequenz KFERQ von Chaperonen erkannt und dem Lysosom über den LAMP-2A-Rezeptor (*lysosomal-associated membrane protein-2a*) zum Abbau zugeführt (siehe Abbildung 1-11) (Cuervo und Dice, 2000). Die Makroautophagie ist die am besten beschriebene Form der Autophagie und stellt einen evolutionär hoch konservierten Abbauweg der Proteinhomöostase dar. Da die Untersuchungen dieser Arbeit sich auf die Makroautophagie beschränken, wird nachfolgend die Makroautophagie vereinfacht als Autophagie bezeichnet.

Die Autophagie unterliegt mehreren komplexen Signalkaskaden, die am Ende die Bildung der Initiationsmembran einleiten (Abbildung 1-12) (Yang und Klionsky, 2010). Unter anderem ist das Protein WIPI1 (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1*) an der Formierung und der Reifung dieser Membran zuständig. Die Initiationsmembran wächst folgend zu einer Phagophore heran, dies wird als Elongation bezeichnet. Die Phagophore stellt eine Doppelmembran dar, deren Reifung und Elongation u. a. durch mehrere ATG-Proteine (*autophagy-related proteins*) reguliert wird (Proikas-Cezanne et al., 2015). Insgesamt gibt es über 30 ATG-Proteine, die in der Regulation der gesamten Autophagie vorzufinden sind (Mizushima, Yoshimori und Ohsumi, 2011).



**Abbildung 1-12: Makroautophagie**

Darstellung des Ablaufs der Makroautophagie. Hierbei durchläuft der autophagische Vesikel unterschiedliche Zustände. Anfänglich wird eine Isolationsmembran gebildet, die zur Phagophore und anschließend zum Autophagosom heranreift, der in der Lage ist unterschiedliche Substanzen einzuschließen. Durch den Zusammenschluss von Autophagosom und Lysosom erfolgt die Bildung vom Autolysosom, hier erfolgt die Degradation vom vesikulären Inhalt. Modifiziert nach Khaminets et al., 2016.

In der Elongationsphase stellt LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) ein wichtiges Protein dar, da es für die Bindung von abzubauenen Bestandteilen an das Phagophor zuständig ist. Das Präkursorprotein Pro-LC3 wird mithilfe von ATG-Proteinen zum LC3I geschnitten und aktiviert. Anschließend wird es durch den Anhang von PE (Phosphatidylethanolamin) in das LC3II umgewandelt. Dieses ist durch die PE-Gruppe an die Membran der Phagophore gebunden (Kabeya et al., 2004). Daran können unter anderem die Proteine p62/SQSTM1 (*Sequestosome-1*) und NBR1 (*neighbour of BRCA1 gene 1*) binden. Diese werden als Autophagie-Rezeptoren bezeichnet, da sie Bindestellen sowohl für ubiquitinierte Substrate, als auch für LC3II aufweisen (Khaminets et al., 2016; Pankiv et al., 2007). Die so an das Phagophor gebundenen abzubauenen Bestandteile werden durch die Schließung der Doppelmembran in das fertige Autophagosom eingeschlossen. Dieses fusioniert anschließend mit einem Lysosom zu einem Autolysosom,

wessen Inhalt folglich durch lysosomale Hydrolasen abgebaut wird. In den Lysosomen ist ein wichtiges Membranprotein, das LAMP1 (*lysosomal-associated membrane protein-1*), für die Integrität der Lysosomen verantwortlich (Eskelinen, 2006).

Durch den Abbau ermöglicht die Autophagie ein Recycling von zellulären Komponenten. So stellt sie ein Überleben der Zelle sowohl unter Normalbedingungen, vor allem aber bei Stress, wie z. B. im Hungerzustand, sicher. In der Autophagie werden lösliche langlebige Proteine, Proteinaggregate sowie mikrobielle Pathogene abgebaut. Es ist das einzige Abbausystem der Zelle, welches in der Lage ist ganze Organellen abzubauen. Hierbei gibt es Unterformen der Makroautophagie, die für den Abbau bestimmter Organellen zuständig sind. Hier ist eine spezielle Form der Autophagie für Mitochondrien zu nennen, die als Mitophagie bezeichnet wird und im Abschnitt 1.3.5 erläutert wurde.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Parkinson-Krankheit stellt die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar, deren Patienten vor allem unter einem progredientem Verlust an körperlicher Bewegungskontrolle leiden. Der oxidative Stress spielt eine kausale Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung. Hierbei stellen die Mitochondrien einen entscheidenden Faktor dar, da sie die größte Quelle für reaktive Sauerstoffspezies in der Zelle darstellen, gleichzeitig jedoch auf diese empfindlich reagieren (Chance et al., 1979). Die Funktionalität der Mitochondrien wird durch die mitochondriale Homöostase aufrechterhalten. Hierbei stehen Biogenese, mitochondriale Dynamik und Mitophagie in einem engen Zusammenspiel. Störungen in mitochondrialen Funktionen und mutierte Proteine der mitochondrialen Homöostase wurden im Zusammenhang mit der Parkinson-Erkrankung beobachtet (Bender et al., 2006; Cookson, 2012; Toulorge et al., 2016). Doch wie genau die Komponenten der mitochondrialen Homöostase in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit zusammenspielen, wurde bislang noch nicht hinreichend untersucht.

Aufgrund des kausalen oxidativen Einflusses in der PD, könnte das Antioxidans Phenothiazin als eine Therapie-Möglichkeit in Frage kommen. Es stellt präklinisch eine hoch-potente, neuroprotektive Substanz dar, deren protektiver Einfluss auf Mitochondrien bereits beschrieben wurde (Christ, 2010; Hajieva et al., 2009). Wie genau sich die Neuroprotektion von Phenothiazin in der PD auf die mitochondriale Homöostase auswirkt, wurde bislang jedoch nur wenig erforscht.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten der mitochondrialen Dynamik und der Mitophagie in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit und in diesem Zusammenhang die protektive Rolle von Phenothiazin zu untersuchen. Der Komplex I-Inhibitor Rotenon diente hierbei als Modell-Substanz für die Parkinson-Krankheit. Eingangs sollte die Mitophagie unter dem Einfluss vom Komplex I-Inhibitor analysiert werden. Dies wurde mithilfe der Kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) durchgeführt, das ein wichtiges Protein der Mitophagie darstellt. Hierbei galt es den zeitlichen und konzentrationsabhängigen Einfluss, aber auch die Art des Einflusses von Rotenon auf den Mitophagiemarker PINK1 zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte die protektive Wirkung des Antioxidans Phenothiazin auf die Proteinspiegel von PINK1 näher betrachtet werden. Ein weiteres Ziel war es die Auswirkung von Rotenon und Phenothiazin auf Parkin, das ein weiteres Mitophagie-Protein darstellt, und die zwei PINK1-Substrate Mitofusin 1 und 2 zu erforschen. Aufgrund der Erkenntnisse in dieser Arbeit sollte ferner der Zusammenhang zwischen den Proteinen PINK1 und Mitofusin 1 Isoform 3 analysiert werden. Hierzu dienten Überexpressions- und Herunterregulationsexperimente von beiden Proteinen. Da das Phenothiazin in der Lage war die schädigenden Einflüsse von Rotenon auf die Proteine der Mitophagie zu verringern, sollte weiterhin untersucht werden auf welchem

Wirkmechanismus dieser Effekt beruht und wie Potent dieses Antioxidans ist. Die Mitophagie steht im engen Zusammenhang mit der mitochondrialen Dynamik, weswegen der Einfluss von Rotenon und Phenothiazin auf letztere näher analysiert werden sollte. Hierfür standen die mitochondriale Morphologie und die Markerproteine der mitochondrialen Dynamik im Fokus. Ebenfalls wurden weitere mitochondriale Proteine untersucht. Da die Mitophagie eine Unterform der Makroautophagie darstellt, und letztere mit dem Proteasom in Wechselwirkung steht, sollten ferner wichtige Proteine dieser zellulären Systeme unter der Behandlung von Rotenon und Phenothiazin analysiert werden. Hierbei galt es zu ermitteln wie der autophagische Flux unter diesem Einfluss reguliert wurde. In dieser Arbeit sollte auch immer die Beobachtung der präventiven Wirkung von Phenothiazin erfolgen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y (Biedler et al., 1978) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Subklon zur ursprünglichen Zelllinie SK-N-SH, die aus der Knochenmarkbiopsie einer vierjährigen Patientin entnommen wurde. SH-SY5Y-Zellen haben dopaminerge Eigenschaften durch das Vorhandensein von Enzymen wie Tyrosin- und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase und das Aufweisen des Dopamintransporters. Diese Zellen dienen somit als Untersuchungsmodell von dopaminergen Neuronen.

Eine weitere Zelllinie, die für diese Arbeit verwendet wurde, ist die Linie der *human embryonic kidney* 293A Zellen (HEK-Zellen). Sie wurde aus einem Embryo entnommen und von Graham et al. mit DNA-Abschnitten eines Adenovirus immortalisiert (Graham et al., 1977). Diese Zelllinie lässt sich leicht transfizieren und hat eine eher breitflächige Morphologie, die sich gut mikroskopisch untersuchen lässt.

#### 2.1.2 Plasmide und siRNA

**Tabelle 2-1: Plasmide**

Plasmid	Resistenz	Hersteller
pCMV6	Kanamycin	OriGene
pPM-C-HA MFN1	Kanamycin	abm
pCMV6-AC-GFP MFN1	Ampicillin	OriGene
pCMV6-XL5 MFN1	Ampicillin	OriGene
pCMVTNT PINK1 N-myc	Ampicillin	Addgene (Beilina et al., 2005)
pTurboRFP-mito	Kanamycin	evrogen

**Tabelle 2-2: siRNA**

siRNA	Sequenz
nonsense	5'-AUUCUCCGAACGUGUCACG-3'
Mfn1	5'-GAACUCAUGAUUACAUUAG-3'
Mfn1 If3	5'-AAGUCUCCCUAGAUCUUUA-3'
PINK1 #1	5'-UGAAGCCACCAUGCCUACA-3'
PINK1 #2	5'-AGAUGAUGUGGAACAUCUC-3'

### 2.1.3 Antikörper

**Tabelle 2-3: Primärantikörper**

Antikörper	Spezies	Proteingröße [kDa]	Hersteller
BAG3	Kaninchen	74	Proteintech Group
BAG1 (cBAG)	Kaninchen	36	MPI Martinsried
COX IV	Maus	17	Abcam
DLP-1	Maus	79 - 84	BD Transduction
FIS1	Kaninchen	17	Santa Cruz Biotechnology
LAMP1	Kaninchen	90 - 120	Abcam
LC3	Kaninchen	16, 18	Sigma
Mfn1	Kaninchen	86, 71	Santa Cruz Biotechnology
Mfn2	Ziege	86	Santa Cruz Biotechnology
Myc	Maus		Clonetech
OPA1	Maus	80-100	BD Transduction
p62	Meerschweinchen	62	Progen
Parkin	Kaninchen	52	Cell Signaling
PINK1	Kaninchen	66	Santa Cruz Biotechnology
20S-Proteasom	Kaninchen	32	Santa Cruz Biotechnology
TIM23	Maus	23	BD Transduction
TOM20	Kaninchen	20	Santa Cruz Biotechnology
Tubulin	Maus	50	Sigma
Ubiquitin	Kaninchen		Dako
WIPI1	Kaninchen	49	Sigma

**Tabelle 2-4: Sekundärantikörper**

Antikörper	Spezies	Konjugat	Hersteller
anti-Kaninchen	Esel	HRP	Jackson Immunoresearch
anti-Maus	Esel	HRP	Jackson Immunoresearch
anti-Meerschweinchen	Esel	HRP	Jackson Immunoresearch
anti-Ziege	Esel	HRP	Rockland

### 2.1.4 Marker und Reagenziensätze

**Tabelle 2-5: Marker und Kits**

Marker	Verwendung	Hersteller
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Protein-Marker im Acrylamidgel	Thermo Scientific
<i>Pierce® BCA Protein Assay Kit</i>	Proteinquantifizierung	Thermo Scientific

### 2.1.5 Chemikalien

**Tabelle 2-6: Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	GIBCO
1-Methyl-4-Phenylpyridinium-iodid (MPP <sup>+</sup> )I	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Acetylphenothiazin	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40 % (AccuGel)	National Diagnostics
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Antibiotika/Antimykotika (100x)	GIBCO
Bafilomycin A1 (BafA1)	LC Laboratories
Bromphenolblau	BioRad
Buthioninsulfoximin (BSO)	Sigma-Aldrich
Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)	Abcam
Chlorpromazin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Roth
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	GIBCO

dPBS ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )	GIBCO
Essigsäure	Roth
Ethanol (99,8 %)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	AppliChem
Fötale Kälberserum (FCS; <i>fetal calf serum</i> )	Invitrogen
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
HEPES	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Luminol	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Appllichem
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
N,N,N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumpyruvat (100 mM)	GIBCO
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich
Paraquat-dichlorid	Sigma-Aldrich
Phenothiazin	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail, <i>PhosSTOP</i>	Roche
Polyvinylalkohol	Fluka
Ponceau S	AppliChem
p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail, <i>c0mplete</i>	Roche
Rinderserumalbumin (BSA; <i>bovine serum albumine</i> )	Sigma-Aldrich
Rotenon	Sigma-Aldrich
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl) (37 %)	Roth
SDS ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )	Roth
Tris	Roth

Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4 %)	Sigma
Tween® 20	Roth
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (30 % in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
Vitamin E / $\alpha$ -Tocopherol	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Alle Substanzen wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, falls nicht anders angegeben.

#### 2.1.6.1 Zellkultur

##### Zellkulturmedien

###### *Hek-Zellen:*

DMEM (4,5 g/l Glucose)	500 ml
Natriumpyruvat	1 mM
Antibiotika/Antimykotika	1 %
aktiviertes FCS (fötales Kälberserum)	10 %

###### *SH-SY5Y-Zellen:*

DMEM (4,5 g/l Glucose)	500 ml
Natriumpyruvat	1 mM
Antibiotika/Antimykotika	1 %
inaktiviertes FCS	10 %

##### Trypsinlösung (in dPBS)

Trypsin	0,05 %
EDTA	0,02 %

##### Kryomedium zum Einfrieren der Zellen

Zellkulturmedium	90 %
DMSO	10 %

Elektroporationspuffer

KCl	135 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
HEPES	10 mM
EGTA	5 mM
inaktives FCS	25 %

pH auf 7,3 eingestellt und sterilfiltriert

Eindeckmedium

Polyvinylalkohol	10 %
PBS	70 %
Glycerol	30 %
p-Phenylendiamin	0,1 %

2.1.6.2 Proteinbiochemie

Lysispuffer

Tris-HCl	50 mM
SDS	2 %
Saccharose	10 %

Protease Inhibitor Cocktail, *cOmplete* (Roche)  
 Phosphatase Inhibitor Cocktail, *PhosSTOP* (Roche)  
 pH auf 6,8 eingestellt

Ladepuffer 5x (in Glycerol)

Tris-HCl pH 6,8	0,375 M
Bromphenolblau	0,0075 %
SDS	7 %
β -Mercaptoethanol	25 %

Sammelgelpuffer (4x)

Tris-Base	0,6 M
SDS	0,4 %

pH 6,8 mit HCl eingestellt

Trenngelpuffer (4x)

Tris-Base	1,5 M
SDS	0,4 %
pH 8,8 eingestellt	

Laufpuffer

Tris-Base	2,5 mM
Glycin	25 mM
SDS	0,01 %

Transferpuffer

Tris-Base	2 mM
Glycin	20 mM
Methanol	20 %

Ponceau S-Lösung

Ponceau S	0,025 %
Essigsäure	1 %

Blockierungspuffer

Milchpulver	4 %
in TBSt	

PBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
pH auf 7,4 eingestellt	

TBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Tris	25 mM
pH auf 7,4 eingestellt	

TBSt

TBS	1 l
Tween® 20	0,5 %

Chemilumineszenz-Lösung (ECL-Lösung):

## Lösung A:

Tris-HCl	0,1 M
Luminol	0,025 %
pH auf 8,6 eingestellt	

## Lösung B:

para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO	0,11 %
--------------------------------------	--------

**2.1.7 Geräte****Tabelle 2-7: Geräteverzeichnis**

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe, <i>VacuSafe comfort</i>	Integra
Brutschrank	Memmert
Brutschrank	Queue Nunc
Brutschrank (Zellkultur)	Thermo Scientific
Elektroporationsgerät, <i>Nucleofector</i>	Lonza
Feinwaage	Sartorius
Gefrierschränke (-80 °C)	Thermo Scientific
Kühl- und Gefrierschränke (4, -20 °C)	Liebherr
<i>Laser scanning mikroskop 710 (LSM)</i>	Carl Zeiss
Magnetrührer	IKA-Werke
Micro Zentrifuge	Roth
Mikroskop, <i>Olympus CKX31</i>	Olympus
Mikrotititer-Platten-Lesegerät, <i>Multiscan RC</i>	Thermo Labsystems
Mikrowelle	Progress
Netzgerät (Gele / Western Blot), <i>Biometra PowerPack 300</i>	BioRad
pH-Meter, <i>CG 825</i>	Schott
Pipettierhilfe, <i>Pipetboy Accu-jet®pro</i>	Brand

Proberöhrchen-Rotator, <i>Test-tube-rotator</i>	snijders
Schüttelheizblock, <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf
Schüttler, <i>polymax 1040</i>	Heidolph
SDS-PAGE-System, <i>Mini-PROTEAN® 3 Cell System</i>	Bio-Rad
Sterilbank, <i>Herasafe</i>	Heraeus
Sterilbank, <i>SterilGARD III Advance</i>	The Baker Company
Stickstofftank, <i>Arpege 70</i>	Air liquide
Thermozykler, <i>iCycler</i>	BioRad
Tischzentrifuge, <i>Centrifuge 5415R</i>	Eppendorf
Ultraschall-Sonifizierstab, Ultrasonic Prozessor UP50H	Hielscher
Vortexer, <i>MS2 Minishaker</i>	IKA
Waage, <i>BL6100</i>	Sartorius
Waage, <i>TE1533</i>	Sartorius
Wasserbad	Industriegesellschaft
Western Blot Dokumentationssystem, Fusion-SL 350.WL	peqlab
Western-Blot-System, <i>Mini Trans-Blot®</i>	Bio-Rad
Zählkammer, <i>Neubauer-Improved</i>	Optik Labor
Zentrifuge, <i>Multifuge 3 S-R</i>	Heraeus
Zentrifuge, <i>RC-5B Sorvall</i>	Thermo Scientific
Zentrifuge, <i>Universal 32 R</i>	Hettich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien SH-SY5Y und HEK-293A (siehe Abschnitt 2.1.1) erfolgte im Zellkulturmedium unter Standardbedingungen in einem Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C und gesättigter Wasserdampfatosphäre unter der Begasung von 5 % Kohlenstoffdioxid (Hajieva et al., 2009). Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Kryokonservierte Zellen (siehe Abschnitt 2.2.1.2) wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in erwärmtes Zellkulturmedium pipettiert. Um die Zellen von dem DMSO zu befreien, wurden

sie 4 min bei 1200 rpm (*rounds per minute*) bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert, um weiter in Zellkulturschalen (Greiner Bio-One) kultiviert werden zu können. Ein Tag nach dem Aussähen wurde das Medium gewechselt. Um die Zellen für Versuche zu verwenden, wurden sie vorab mindestens zwei Mal passagiert.

Zur Weiterkultivierung der Zelllinien wurden sie zwei Mal wöchentlich passagiert. Dafür wurden Zellen in einer Konfluenz von 80 - 90 % verwendet. Diese wurden mit dPBS gewaschen und anschließend mit der Trypsinlösung inkubiert, bis sich die Zellen von der Schale (Greiner Bio-One) lösten. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion mit serumhaltigem Zellkulturmedium abgestoppt, sodann wurden die Zellen mit der Flüssigkeit von der Schale gespült. Die Zellsuspension wurde in einer Zentrifuge 4 min bei 1200 rpm bei RT pelletiert. Schließlich wurde das Pellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in einer angemessenen Verdünnung für eine weitere Kultivierung in Schalen mit dem Durchmesser von 10 cm ausgesät.

Beim Aussäen von Zellen für Experimente wurden diese mittels einer Zählkammer (*Neubauer-Improved*, Optik Labor) gezählt. Hierfür wurde ein Teil der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau verdünnt. Als hydrophiler Farbstoff diente Trypanblau hierbei zur Ermittlung der Lebendzellzahl, da er in der Lage ist Membranen von toten Zellen zu durchdringen. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Anzahl der Quadrate}} * \text{Verduennungsfaktor} * 10^4$$

Anzahl der Quadrate der Zählkammer = 4

Verdünnungsfaktor von Trypanblau = 2

### 2.2.1.2 Kryokonservierung der Zelllinien

Für die langfristige Aufbewahrung und Rekultivierung der Zellen, wurden diese nach dem Passagieren in einer möglichst frühen Passagennummer kryokonserviert. Dafür wurden die gleichen Arbeitsschritte wie bei der Weiterkultivierung der Zellen (siehe Abschnitt 2.2.1.1) durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass das Zellpellet nach dem Zentrifugieren mit Kryomedium resuspendiert wurde. Dieses enthielt DMSO um die Eiskristallbildung zu verhindern, welche die Zellen zerstören würde. Die Zellsuspension wurde auf 1,5 ml Kryoröhrchen (Greiner Bio-One) aufgeteilt und in einem isopropanolhaltigen Einfrierbehälter (*Mr Frosty™*, Thermo Scientific) über Nacht langsam auf -80 °C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert.

### 2.2.1.3 Transfektion der Zellen mittels Elektroporation

Bei der Transfektion wird fremde DNA bzw. siRNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Eine spezielle Transfektionsmethode stellt die Elektroporation dar. Hierbei wird die Zelle durch das Anlegen eines elektrischen Feldes kurzfristig für DNA- bzw. RNA-Moleküle permeabilisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK- oder SH-SY5Y-Zellen für unterschiedliche Zwecke transfiziert. Zum einen wurde ein Plasmid für Fluoreszenzaufnahmen in die Zellen gebracht. Zum anderen wurden Überexpressions- und Herunterregulationsversuche durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie bei der Methode des Weiterpassagierens vorbereitet und anschließend gezählt (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Die benötigte Zellzahl wurde durch Zentrifugation pelletiert und in dem entsprechenden Volumen an Elektroporationspuffer aufgenommen. Jeweils 300 µl der Zellsuspension wurden in eine Elektroporationsküvette (Sigma-Aldrich) der Spaltgröße 0,4 cm pipettiert. Eine entsprechende Menge an DNA bzw. siRNA wurde hinzugefügt und mit dem *Nucleofector* (Lonza) im Programm T-24 elektroporiert. Anschließend wurden die Küvetten 5 min im Brutschrank ruhen gelassen. Die Zellsuspension wurde dann in entsprechendem Volumen an Zellkulturmedium aufgenommen und auf die jeweiligen Kultivierungsgefäße verteilt. Die Angaben, die bei den unterschiedlichen Transfektions-Experimenten variierten, sind nachfolgend angegeben.

#### 2.2.1.3.1 *Transfektion für Fluoreszenzfärbung*

Um die Mitochondrien zu visualisieren, wurden HEK-Zellen mit dem pTurboRFP-mito Plasmid transfiziert. Dieses kodiert für den Fluoreszenzfarbstoff RFP (*red fluorescent protein*), der an eine mitochondriale Zielsequenz MTS (*mitochondrial targeting sequence*) bindet. Somit wird RFP in den Mitochondrien mittels MTS verankert, was eine mikroskopische Untersuchung der mitochondrialen Morphologie ermöglicht.

Die geeignete Menge an HEK-Zellen wurde im Elektroporationspuffer resuspendiert, bevor die Zugabe von 20 µg pTurboRFP-mito Plasmid erfolgte. Nach der Elektroporation wurden die Zellen im Zellkulturmedium aufgenommen und in eine 24-Loch-Platte, versehen mit Deckgläschen, pipettiert. Die Behandlung dieser Zellen erfolgte nach 48 h, zu einem Zeitpunkt als die Fluoreszenzfärbung der Mitochondrien am stärksten zu sehen war.

### 2.2.1.3.2 *Transfektion zur Erzeugung eines Überexpressionsmodells*

Mithilfe von Plasmiden, welche einen DNA-Abschnitt aufweisen, die für ein bestimmtes Protein kodieren, ist es möglich ein Überexpressions-Modell zu generieren. Mittels Transfektion wird das Plasmid in die Zelle gebracht, dort wird es in die entsprechende RNA transkribiert und an den Ribosomen zum entsprechenden Protein translatiert.

Bei den hier genannten Versuchen wurden geeignete Mengen an HEK- bzw. SH-SY5Y-Zellen mit 30 µg Plasmid pro Elektroporationsküvette transfiziert (Tabelle 2-1). Diese Zellsuspension wurde im Zellkulturmedium auf Schalen von 6 cm Durchmesser ausgesät.

### 2.2.1.3.3 *Transfektion für transiente Herunterregulation*

Bei der vorübergehenden Herunterregulation von Genen mittels siRNA (*small interfering RNA*) kommt das Verfahren der RNA-Interferenz zum Tragen. Hierbei werden kurze RNA-Stränge (siRNA), in dieser Arbeit 19 Basenpaare lang, mittels Elektroporation in die Zelle gebracht. Mittels eines RNA-Protein Komplexes namens RISC (*RNA-induced silencing complex*) bindet die siRNA an komplementäre mRNA. Diese wird schließlich abgebaut, sodass keine Translation in das jeweilige Protein erfolgen kann. Die verwendeten siRNAs wurden bei Eurofins Genomics generiert und bezogen.

Im praktischen Vorgehen wurden HEK- bzw. SH-SY5Y-Zellen in 300 µl Elektroporationspuffer unter Zugabe von siRNA elektroporiert. Für die Herunterregulation von PINK1 wurden 30 µg, für die von Mfn1 150 µg siRNA verwendet (Tabelle 2-2). Die Zellsuspension wurde im Zellkulturmedium ohne Antibiotika/Antimykotika vermengt und auf Schalen mit dem Durchmesser von 6 cm gegeben.

### 2.2.1.4 Behandlung der Zellen

Zellen wurden wie in 2.2.1.1 gezählt, bei Bedarf transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und auf geeignete Zellkulturschalen bzw. 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit den in den Experimenten angegebenen Substanzen. Kontrollen wurden mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt. Abweichend davon erfolgte die Behandlung der Färbung erst 48 h nach der Transfektion bzw. Aussaat (Abbildung 3-10). Die Inkubation mit Bafilomycin A1 erfolgte 4 h bevor die Zellen geerntet wurden (Abbildung 3-14). Bei Behandlungen mit Phenothiazin bzw. mit Vergleichssubstanzen (AcPHT, CPRZ, Vitamin E), wurden die Zellen

immer 3 h vorinkubiert, bevor die Behandlung mit dem Toxin erfolgte. Die Behandlungsdauer war abhängig vom Versuch und ist den jeweiligen Experimenten zu entnehmen.

#### 2.2.1.5 Fixierung für Fluoreszenzmikroskopie

Um die fluoreszenzmarkierten mitochondrialen Strukturen mikroskopisch untersuchen zu können, wurden die Zellen auf dem Deckgläschen fixiert. Das hierfür verwendete Paraformaldehyd (PFA) monomerisiert beim Erwärmen zu Formaldehyd und verbindet dann die Proteinstrukturen kovalent. Dies führt zu einer Konservierung der Zelle.

Die Fixierung erfolgte in HEK-Zellen nach der Transfektion mit dem pTurboRFP-mito Plasmid und der anschließenden Behandlung mit den entsprechenden Substanzen (siehe Abschnitt 2.2.1.4). Dafür wurde das Medium aus der 24-Loch-Platte entnommen und durch dPBS ersetzt, um die Zellen zu waschen. Anschließend wurde mit einer 4 %igen PFA-Lösung (in dPBS) 15 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit dPBS wurden die Zellen mit einer 0,2 %igen Triton X-100-Lösung für 10 min inkubiert. Dies bewirkt eine Permeabilisierung der Zellmembran, sodass der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in die Zelle gelangen kann. DAPI dient zum Anfärben der Zellkerne, indem es an AT-reiche Bereiche der DNA bindet. Die Färbung mit DAPI dauerte 10 min, danach kam ein Waschschriff mit dPBS und es erfolgte das Eindeckeln. Hierfür wurde ein Tropfen Eindeckmedium pro Deckglas auf einen Objektträger gegeben und das jeweilige Deckglas mit der Zellseite auf den Tropfen gelegt. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Deckgläschen am äußeren Rand mit Klarlack versiegelt. Die getrockneten Objektträger wurden mit dem konfokalen *Laser scanning mikroskop 710 (LSM)* von Carl Zeiss analysiert.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Gesamtproteinisolierung aus Zellen

Für die Proteinisolierung wurde das Medium der Zellen entfernt und diese einmal mit dPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in dPBS mechanisch von der Schale geschabt und in ein Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Die Zellen wurden in einer Zentrifuge 5 min bei 4 °C und 3000 g pelletiert und im Lysispuffer, dessen Volumen auf die Größe des Pellet abgestimmt wurde, resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal 10 Sekunden sonifiziert. Durch den Sonifizierungsprozess und durch die Zugabe vom Lysispuffer, wurden die Zellmembranen aufgeschlossen und die Gesamtproteine der Zellen freigelegt. Anschließend wurde eine

Proteinquantifizierung durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert.

#### 2.2.2.2 Proteinquantifizierung

Nach der Zellyse erfolgte die Proteinquantifizierung mittels BCA-Test (*bicinchoninic acid*) (Smith et al., 1985). Hierbei wird die Menge des Proteins über zwei nachgeschaltete chemische Reaktionen ermittelt. Die Peptidbindungen im Protein komplexieren die zweiwertigen Kupfer-Ionen, sodass im basischen Milieu eine Reduktion zu einwertigen Kupfer-Ionen erfolgt. Diese werden dann mit jeweils zwei Molekülen Bicinchoninsäure zu einem violetten Komplex chelatiert, der dann photometrisch Aufschluss über die Proteinkonzentration gibt. Hierbei wurde das *Pierce® BCA Protein Assay Kit* verwendet. Je Proteinprobe wurden 100 µl von Lösung A und 2 µl von Lösung B vermischt. Dies wurde in eine 96-Loch-Platte vorgelegt und mit 2 µl Protein-Lösung versetzt. Als Standard wurde eine Konzentrationsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) im Konzentrationsbereich von 0,032 – 2 mg/ml verwendet, wobei als Kontrolle Lysispuffer diente. Nachdem die Proben 30 min auf dem Heizblock bei 60 °C und 300 rpm inkubiert wurden, wurde die Extinktion bei 560 nm mit dem *Multiscan RC* von Thermo Labsystems gemessen.

#### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dem Verfahren der SDS-PAGE nach Laemmli werden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt (Laemmli, 1970). Hierbei wandern mit Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) denaturierte Proteine im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamid-Gel.

Bei dem Gel handelt es sich um ein diskontinuierliches System, das aus einem Trenn- und Sammelgel besteht und somit fokussierte Proteinbanden ermöglicht. Dabei unterscheiden sich die beiden Gelsorten in Acrylamidkonzentration und pH-Wert. Im weitmaschigen Sammelgel, mit pH 6,8, werden die Proteine zwischen den Leit- (Cl<sup>-</sup>) und den Folgeionen (Glycin) konzentriert. Beim Übertritt ins engmaschige Trenngel ändert sich der pH auf 8,8, was zu einer erhöhten Leitfähigkeit von Glycin führt. Das Glycin dient nicht mehr als Folgeion und ermöglicht damit die Auftrennung nach Molekülmasse.

Zunächst wurde ein Trenngel in der Acrylamid-Konzentration von 12 oder 15 % mithilfe des *Mini-PROTEAN® 3 Cell Systems* in Glasplatten mit 1,5 mm Abstandshalter gegossen. Hierfür diente das Ammoniumpersulfat als Initiator zur radikalischen Polymerisation der Acrylamid-Moleküle. TEMED beschleunigte als Katalysator die Reaktion. Das gegossene Gel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Gelgrenze zu erhalten. Nach der Polymerisation des

Trenngels wurde das Isopropanol mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Trenngel mit Sammelgel, welches aus 4 %iger Acrylamid-Konzentration bestand, überschichtet. Vor der Polymerisation wurde das Gel mit einem Kamm für 10 oder 15 Taschen versehen.

Für die Proteinproben wurden 10 – 20 µg Protein auf ein gleichmäßiges Volumen mit Lysispuffer aufgefüllt. Es wurde Ladepuffer hinzugegeben und bei 99 °C 5 min auf dem Schüttelheizblock bei 600 rpm aufgekocht. Das β-Mercaptoethanol im Ladepuffer bewirkt eine Spaltung der Disulfidbrücken in der Tertiärstruktur des Proteins. Das im Lysispuffer enthaltene SDS denaturiert die Proteine, wodurch diese linearisiert werden und sich das SDS gleichmäßig an die Primärstruktur anlagern kann. Daraus resultiert eine einheitliche negative Ladung und erlaubt somit eine Auftrennung danach. Die so vorbereiteten Proteinproben wurden in die Taschen des Gels pipettiert, während eine Tasche mit dem Größenmarker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* beladen wurde. Der Gellauf erfolgte im Laufpuffer. Zum Reinlaufen ins Trenngel wurde eine Spannung von 60 V gewählt. Anschließend wurden die Proteine bei 150 V im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

#### 2.2.2.4 Western Blot Analyse

Bei der Methode des Western Blots werden die Proteine, die im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die dadurch fixierten Proteine können in weiteren Verfahren analysiert werden.

Das Gel mit den enthaltenen aufgetrennten Proteinen wurde in einer Blotkassette mit einer Nitrocellulose-Membran zusammengebaut. Der Übertrag erfolgte mithilfe des *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell-Systems*. Hier wurde die Blotkassette so eingelegt, dass die negativ geladenen Proteine durch das Gel zur Anode wandern und an die Nitrocellulose binden. Der Transfer erfolgte im Transferpuffer entweder 3 h lang bei 100 V auf 4 °C oder über Nacht bei 40 V und RT. Anschließend wurden die Proteine in Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt, um den gleichmäßigen Übertrag auf die Membran zu überprüfen. Diese wurde nachfolgend 45 min im Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindestellen in der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit TBSt gewaschen.

#### 2.2.2.5 Immunologische Proteindetektion

Um die Protein-Spiegel auf der Trägermembran zu ermitteln, wurde diese mit primären Antikörpern inkubiert (siehe Tabelle 2-3). Hierzu wurde der jeweilige Antikörper in TBSt verdünnt und über Nacht auf der Membran bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Reste des primären Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit TBSt entfernt. Danach erfolgte

eine zweistündige Inkubation mit sekundärem Antikörper, der auch in TBSt angesetzt wurde (siehe Tabelle 2-4). Dieser bindet an den primären Antikörper. Anschließend wurden die Antikörperreste erneut dreifach mit TBSt ausgewaschen, sodann erfolgte die Entwicklung der Trägermembran mit Chemilumineszenz-Lösung (ECL-Lösung). Hierzu wurden je 1 ml Lösung A, 100 µl Lösung B und 10 µl Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung) vermischt, auf die Membran gegeben und mit dem Western Blot Dokumentationssystem, *Fusion-SL 350.WL* (peqlab) entwickelt.

Lösung A ist basisch und enthält Luminol. Der sekundäre Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*HRP = horseradish peroxidase*) gekoppelt. Dieses reduziert das Wasserstoffperoxid zu Wasser, während Luminol oxidiert wird, wodurch eine zur Proteinkonzentration proportionale Chemilumineszenz auftritt. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte densitometrisch mittels des Programms ImageJ.

### 2.2.3 Statistische Auswertung

Für die statistisch ausgewerteten Versuche, wurden jeweils mindestens 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Die genaue Anzahl ist den Abbildungs-Beschriftungen zu entnehmen. In den Auswertungs-Diagrammen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichungen abgebildet. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe vom t-Test berechnet und in den Experimenten wie folgt gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ . Bei nicht signifikanten Ergebnissen mit Regulationen  $\geq 10$  % im Vergleich zur Kontrolle, wurden diese Tendenzen in der Arbeit erwähnt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss des Komplex I-Inhibitors Rotenon und des Antioxidans Phenothiazin auf Proteine der Mitophagie

In der vorliegenden Arbeit wurden mitochondriale Dynamik und mitochondrialer Abbau in zellulären Modellen der Pathogenese der Parkinson-Krankheit analysiert. Hierbei wurde der Komplex I-Inhibitor Rotenon als Parkinson-Toxin verwendet, der sich als Modell-Substanz zur Untersuchung der PD eignet (siehe Abschnitt 1.2.2). Zusätzlich wurde eine mögliche protektive Wirkung von Phenothiazin erforscht.

Morphologische Untersuchungen von Mitochondrien in SH-SY5Y Zellen konnten belegen, dass PHT in der Lage ist das mitochondriale Membranpotential zu stabilisieren (siehe Abbildung 1-5) (Christ, 2010). Während die Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon zu einer Verringerung des mitochondrialen Potentials führte, konnte dieser Effekt durch die Vorinkubation mit PHT signifikant vermindert werden. Dies zeigte, dass PHT in der Lage ist das mitochondriale Membranpotential zu stabilisieren und damit die Integrität der Mitochondrien zu erhalten.

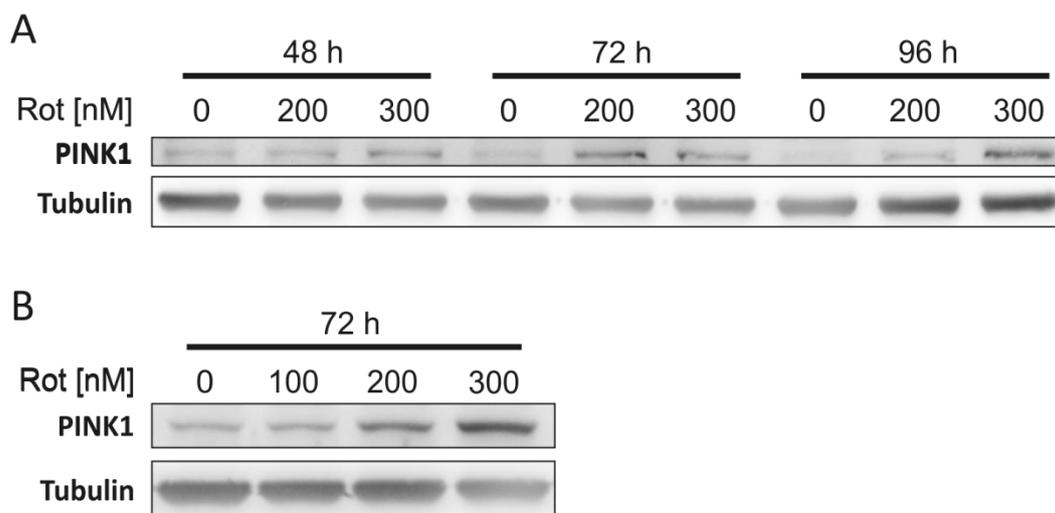
Geschädigte Mitochondrien weisen ein verringertes Membranpotential auf. Aufgrund dessen wird die Mitophagie eingeleitet, die den Abbau von defekten Mitochondrien ermöglicht und damit ein gesundes mitochondriales Netzwerk aufrechterhält (Twig et al., 2008). Die Kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) leitet die Mitophagie ein, indem sie auf der äußeren Membran von Mitochondrien mit verringertem Membranpotential akkumuliert wird (Narendra et al., 2010). Nachfolgend phosphoryliert PINK1 Proteine die sich auf der äußeren Mitochondrienmembran befinden und rekrutiert die Ligase Parkin, die weitere Schritte der Mitophagie in Gang setzt (siehe Abschnitt 1.3.5.1) (Schubert et al., 2017).

#### 3.1.1 Komplex I-Inhibition erhöht die Proteinspiegel des Mitophagieproteins PINK1

Da eine Verringerung des Membranpotentials unter Rotenon von Christ auf morphologischer Ebene beobachtet werden konnte, sollte vorerst der Einfluss von Rotenon auf die Mitophagie untersucht werden (siehe Abschnitt 1.2.1) (Christ, 2010). Hierzu wurden die Proteinspiegel von PINK1 betrachtet, da es sich hierbei um ein einleitendes Protein der Mitophagie handelt, das auf Mitochondrien mit verringertem Membranpotential akkumuliert.

In dieser Arbeit wurden PINK1-Proteinspiegel in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rotenon-Konzentrationen und Inkubationszeiten mittels Western Blot analysiert (Abbildung 3-1 A, B). Als Modell diente die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y, die als dopaminerges experimentelles System gilt (Biedler et al., 1978) (siehe Abschnitt 2.1.1). Diese Zellen exprimieren Enzyme des Dopamin-Stoffwechsels, wie Tyrosin- und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylasen und weisen zudem den Dopamintransporter auf.

Es wurde deutlich, dass die Behandlung mit Rotenon die Proteinspiegel von PINK1, in einer Abhängigkeit von Inkubationszeit und Konzentration vom Toxin, hochreguliert. Bei der Betrachtung der Zeitreihe, konnte bereits nach einer 48-stündigen Toxin-Behandlung eine leichte Zunahme in den Spiegeln von PINK1 unter 300 nM Rotenon beobachtet werden (Abbildung 3-1 A). Nach 72 h war ein Anstieg der PINK1-Proteinspiegel ab einer Rotenon-Konzentration von 200 nM zu verzeichnen. Nach 96 h erfolgte der Anstieg ebenfalls ab 200 nM Rotenon, jedoch waren die Zellen nach 96 h Toxinbehandlung zu stark lädiert, weshalb die Behandlungszeit der weiteren Versuche auf 72 h festgelegt wurde.



**Abbildung 3-1: Die Proteinspiegel von PINK1 werden durch den Komplex I-Inhibitor Rotenon in Abhängigkeit von Behandlungszeit und -konzentration hochreguliert**

SH-SY5Y-Zellen wurden ausgesät und nach 24 h mit der entsprechenden Konzentration an Rotenon (Rot) (100 nM, 200 nM, 300 nM) oder Ethanol behandelt. (A) Nach 48, 72 oder 96 h oder nach (B) 72 h wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dabei wurden die Expressionsspiegel von PINK1 betrachtet, während Tubulin als Ladekontrolle diente.

Bei einer differenzierteren Konzentrationsreihe der Rotenon-Behandlung nach 72 h (Abbildung 3-1 B), wurde deutlich, dass die Expression vom PINK1-Protein erst unter der Behandlung mit 200 nM Rotenon anstieg. Dieser Anstieg war bei 300 nM Rotenon intensiver ausgeprägt, jedoch waren hier die Zellen zu stark geschädigt. Infolgedessen wurden weitere

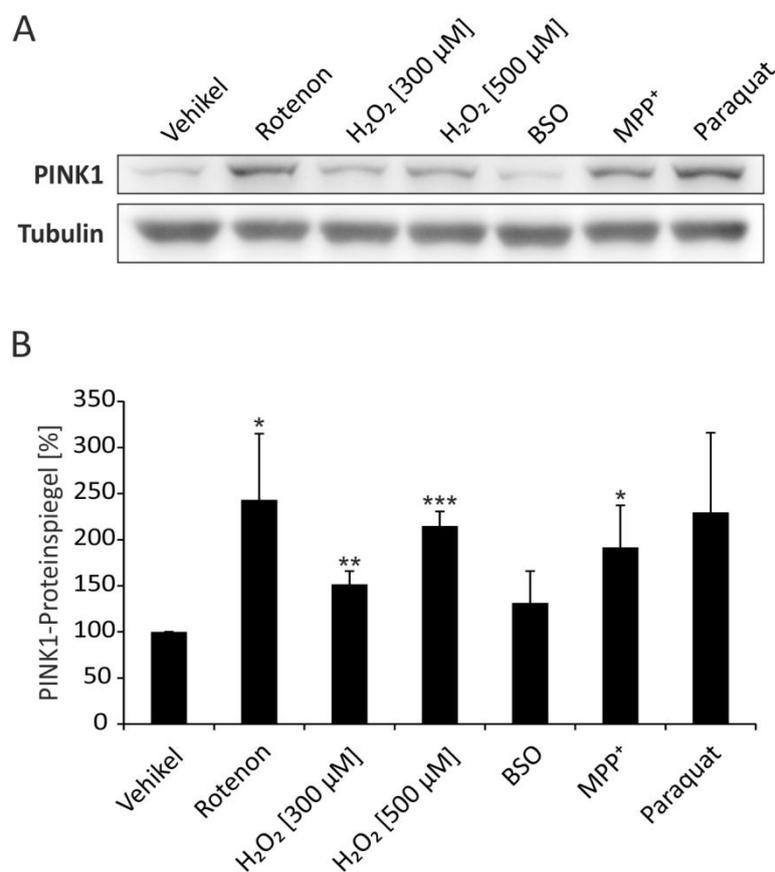
Experimente bei der Rotenon-Konzentration von 200 nM nach 72 h durchgeführt, da hier eine deutliche Veränderung in den PINK1-Proteinspiegeln beobachtet werden konnte. Hierbei war die Zellviabilität im Bereich von ca. 60 %, basierend auf optischer Analyse der Zellmorphologie, für nachfolgende Experimente geeignet.

Rotenon erhöhte demzufolge die Proteinspiegel des Mitophagie-Proteins PINK1 in einer Abhängigkeit von Behandlungszeit und -konzentration.

### **3.1.2 Anstieg der PINK1-Proteinspiegel durch Komplex I-Inhibition beruht auf einem oxidativen Effekt**

Rotenon inhibiert den Komplex I der Atmungskette und generiert dadurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Sanders und Greenamyre, 2013). Es wurde daher untersucht, ob der Einfluss von Rotenon auf die PINK1-Spiegel spezifisch auf einer Komplex I-Inhibition beruht, oder ob der dadurch generierte oxidative Effekt verantwortlich für diese Regulation ist. Um dies zu erforschen, wurden die Zellen mit weiteren oxidativen Substanzen behandelt. Diese weisen unterschiedliche Mechanismen zur Induktion von ROS auf. Das 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) diene als ein weiterer Komplex I-Inhibitor neben dem Rotenon (Murphy et al., 1995). Buthioninsulfoximin (BSO) verhindert die Synthese von Glutathion, welches einen wichtigen antioxidativen Stoff der Zelle darstellt. Damit wird die zelleigene antioxidative Reaktion vermindert, weshalb die ROS-Spiegel ansteigen (Kim et al., 2013). Zudem wurde Paraquat und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eingesetzt. Während Paraquat Elektronen der mitochondrialen Atmungskette abfängt und nachfolgend unterschiedliche ROS generiert, stellt das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eigens ein ROS dar (Gómez-Mendikute und Cajaraville, 2003).

SH-SY5Y-Zellen wurden mit den angegebenen Toxinen für die Dauer von 72 h inkubiert, anschließend wurden die Proteinspiegel von PINK1 mittels Western Blot untersucht (Abbildung 3-2 A). Die Rotenonbehandlung diene als Positivkontrolle, um den Effekt der anderen Toxine im Ausmaß vergleichen zu können. Die Western Blot Analyse zeigte, dass auch der Komplex I-Inhibitor MPP<sup>+</sup> die Proteinspiegel von PINK1 signifikant erhöhte (Abbildung 3-2 B). Gleichzeitig war ein Anstieg in den Proteinspiegeln von PINK1 unter dem Oxidans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erkennbar. Hierbei erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Konzentration von 300 µM die Proteinspiegel von PINK1 signifikant um ca. 50 %. Unterdessen hatte die Konzentration von 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen signifikanten Anstieg von PINK1 um ca. 110 % zur Folge. In dieser Arbeit wurden nicht signifikante Ergebnisse mit Regulationen ≥ 10 % im Vergleich zur Kontrolle, als Tendenzen erwähnt. Somit führte die Behandlung mit Buthioninsulfoximin zu einer leichten Induktion von PINK1, während die Behandlung mit Paraquat einen starken PINK1-Anstieg bewirkte, jedoch waren diese Ergebnisse nicht signifikant.



### Abbildung 3-2: Der Rotenon-vermittelte Anstieg der Proteinspiegel von PINK1 beruht auf einem oxidativen Effekt

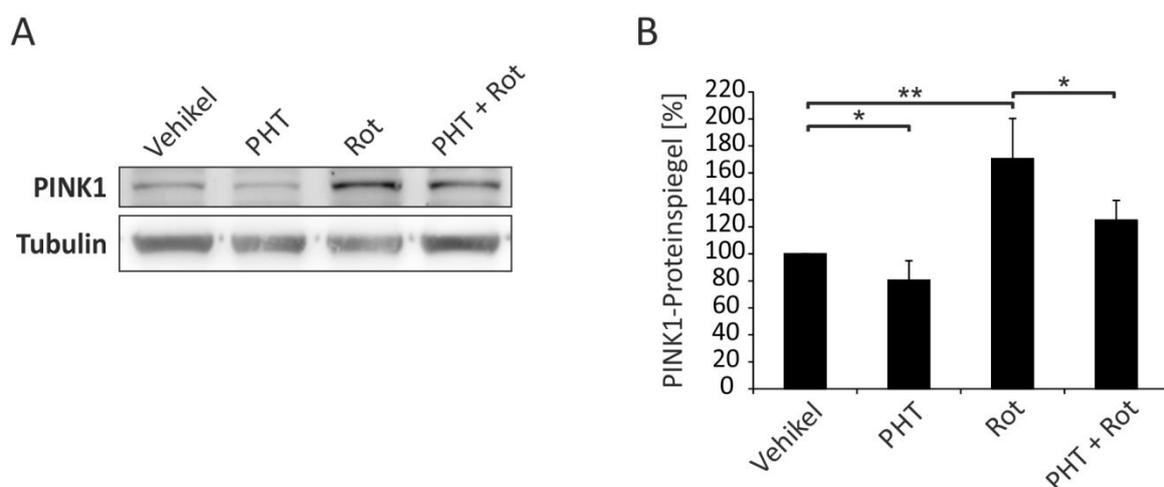
SH-SY5Y-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen für 72 h mit Toxinen oder EtOH behandelt. Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden verwendet: Rotenon 200 nM; Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 300 µM und 500 µM; Buthioninsulfoximin (BSO) 400 µM; 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) 400 µM; Paraquat 150 µM. Anschließend wurden die Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. (A) Repräsentative Blots von Entwicklungen mit Antikörpern gegen PINK1 und Tubulin, letzteres diente als Ladekontrolle. (B) Densitometrische Auswertung der prozentualen Entwicklung von PINK1. Hier fand der Abgleich auf Tubulin statt, nachfolgend wurden die Werte auf die Kontrolle (Vehikel) bezogen. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die mit dem t-Test analysiert wurden (n=3). \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001.

Dies zeigte, dass der Anstieg der Proteinspiegel von PINK1 sowohl unter der Behandlung mit Komplex I-Inhibitoren als auch unter der Einwirkung von anderen, direkt oxidativ wirkenden Substanzen, erfolgte. Damit beruht die verstärkte Expression von PINK1 durch Rotenon nicht auf der spezifischen Inhibition von Komplex I, sondern auf der dadurch ausgelösten Generierung von ROS.

### 3.1.3 Das Antioxidans Phenothiazin vermindert die Rotenon-vermittelte Hochregulation von PINK1

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Proteinspiegel von PINK1 aufgrund des oxidativen toxischen Effektes von Rotenon hochreguliert wurden. Dies deutet womöglich auf eine verstärkte Induktion der Mitophagie durch den Komplex I-Inhibitor hin. Christ konnte auf morphologischer Ebene zeigen, dass durch die Vorinkubation mit PHT das mitochondriale Membranpotential stabilisiert und damit der schädigende Einfluss von Rotenon reduziert werden konnte (siehe Abbildung 1-5) (Christ, 2010). Nun sollte untersucht werden, ob PHT sich auf Proteinebene ebenfalls stabilisierend auf Mitochondrien auswirkt und damit die durch Rotenon induzierte Mitophagie vermindert. Dies sollte bei der Betrachtung der Proteinspiegel des Mitophagieproteins PINK1 näher erforscht werden.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Phenothiazin vorbehandelt. Hierfür hat sich die Konzentration von 100 nM für einen Zeitraum von 3 h, anhand von Vorversuchen, bewährt (nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Behandlung mit 200 nM Rotenon für weitere 72 h. Schließlich wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot analysiert.



**Abbildung 3-3: Phenothiazin verringert den Rotenon-induzierten Anstieg der Proteinspiegel von PINK1**

SH-SY5Y-Zellen wurden ausgesät und nach 24 h mit 100 nM Phenothiazin oder Ethanol behandelt. Nach 3 h erfolgte die Behandlung mit 200 nM Rotenon oder Ethanol. Die Zellen wurden nach 72 h geerntet und die Gesamtlisate mittels Western Blot untersucht. (A) Repräsentative Blots von PINK1 und Tubulin. (B) Densitometrische Auswertung der PINK1-Spiegel, die auf Tubulin abgeglichen wurden. Zu sehen sind prozentuale Veränderungen der PINK1-Proteinspiegel der behandelten Zellen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (Vehikel), bzw. bei der Behandlung mit PHT+Rotenon wurde auf die Rotenonbehandlung abgeglichen. Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test (n=5). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Die Ergebnisse zeigten den bereits bekannten signifikanten Anstieg der PINK1-Proteinspiegel unter der alleinigen Behandlung mit Rotenon (Abbildung 3-3 A, B). Dieser Anstieg konnte durch die Vorinkubation von Phenothiazin signifikant um ca. 65 % verringert werden. Auch die alleinige Behandlung mit PHT zeigte eine leichte signifikante Verringerung im Vergleich zu den Kontrollwerten.

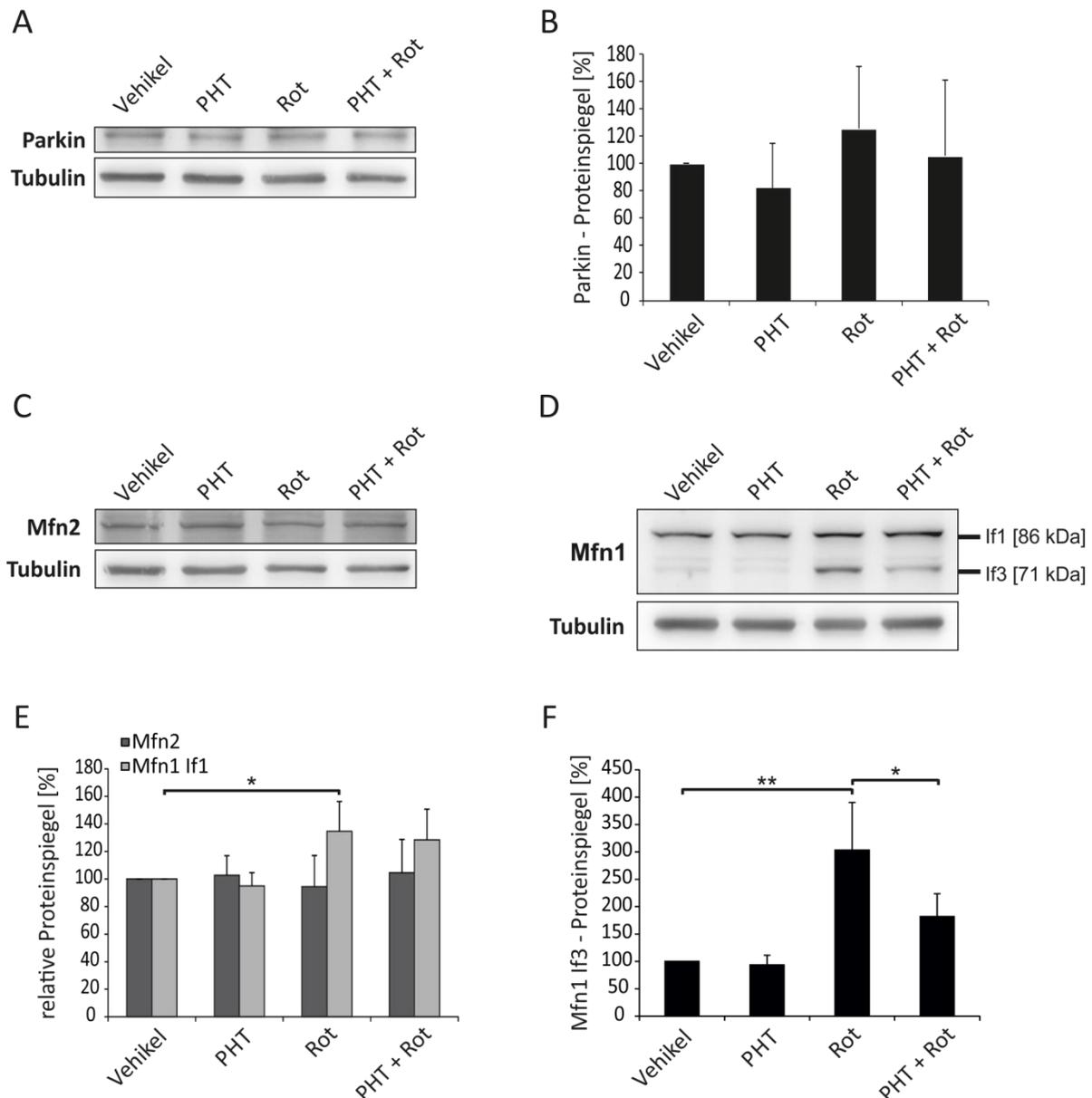
Damit wurde deutlich, dass Phenothiazin in der Lage ist die Rotenon-vermittelte verstärkte Expression von PINK1 zu verringern. Da die Hochregulation von PINK1 durch Rotenon auf einem oxidativen Effekt beruht (siehe Abschnitt 3.1.2), kann angenommen werden, dass der Einfluss von Phenothiazin auf die Proteinspiegel von PINK1 auf seine antioxidative Wirkung zurückzuführen ist.

### **3.1.4 Der Einfluss von Rotenon und Phenothiazin auf das Mitophagieprotein Parkin und dessen Substrate Mfn1 und Mfn2**

Die Kinase PINK1 akkumuliert auf der mitochondrialen Außenmembran (OMM) von geschädigten Mitochondrien und leitet die Mitophagie ein. Hierbei phosphoryliert PINK1 Proteine der OMM und rekrutiert die Ligase Parkin aus dem Zytosol, die diese Proteine ubiquitiniert und damit den Abbau der Mitochondrien einleitet (siehe Abschnitt 1.3.5.1) (Jin et al., 2010; Koyano et al., 2014; Narendra et al., 2010; Sarraf et al., 2013; Schubert et al., 2017). Zu den genannten Proteinen der OMM gehören u.a. die Mitofusine 1 und 2 (Mfn1 und Mfn2). Diese regulieren zum einen die Fusion von Mitochondrien, sie stellen aber auch wesentliche Substrate von Parkin dar, indem sie durch Ubiquitinierung zum Abbau markiert werden (Chen und Dorn, 2013; Eura, 2003; Pickrell und Youle, 2015; Poole et al., 2010; Tanaka et al., 2010). Somit wird eine Fusion von geschädigten Mitochondrien verhindert und damit eine gesunde mitochondriale Homöostase aufrechterhalten. Zu Mitofusin 1 ist noch zu erwähnen, dass von diesem Protein bisher drei Isoformen bekannt sind, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Die Isoform 1 mit 84 kDa ist die kanonische Form, die für die mitochondriale Fusion zuständig ist. Die Isoform 3 hat eine Masse von 71 kDa und unterscheidet sich im Vergleich zur Isoform 1 durch eine Deletion von zwei Exons in der mRNA. Der Isoform 3 fehlen dadurch 110 Aminosäuren verglichen mit der Isoform 1 (siehe Abschnitt 1.3.4.2) (AceView, 2019; UniProt, 2019). Welche Funktion die Isoform 3 in der Zelle ausübt, ist bislang noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Rotenon die Proteinspiegel von PINK1 hochreguliert wurden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Rotenon dadurch auch Einfluss auf die Ligase Parkin und die erwähnten Substrate Mitofusin 1 und 2 ausübt.

In diesem Experiment wurden SH-SY5Y-Zellen wie in 3.1.3 mit Phenothiazin und anschließend mit Rotenon behandelt. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert.



#### Abbildung 3-4: Das Mitophagie-Protein Parkin und dessen Substrat Mfn1 werden durch Rotenon und Phenothiazin moduliert

24 h nach der Aussaat wurden SH-SY5Y-Zellen mit 100 nM Phenothiazin oder Ethanol und nach weiteren 3 h mit 200 nM Rotenon oder Ethanol behandelt. 72 h später wurden die Gesamtlysate mittels Western Blot analysiert. Repräsentative Blots von (A) Parkin, (C) Mfn2 und (D) Mfn1 mit zusätzlicher Angabe der kDa-Größen der Isoformen 1 (If1) und 3 (If3). Densitometrische Auswertungen der Proteinspiegel, normiert auf Tubulin, von (B) Parkin (E) Mfn2 und Mfn1 If1, (F) Mfn1 If3. Dargestellt sind prozentuale Veränderungen der jeweiligen Proteinspiegel bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Vehikel). Im Falle der Behandlung mit Phenothiazin und Rotenon wurden die Proteinspiegel auf die Rotenonbehandlung bezogen. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von unabhängigen Experimenten, die mit dem t-Test analysiert wurden (Mfn1 n=5), (Mfn2 und Parkin n=3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Es stellte sich heraus, dass durch die Behandlung mit Rotenon die Proteinspiegel von Parkin anstiegen. Diese Regulation konnte durch die Vorinkubation mit Phenothiazin verringert werden, jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant (Abbildung 3-4 A, B). Weiterhin wurde deutlich, dass weder die Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor noch mit dem Antioxidans Einfluss auf die Proteinspiegel von Mfn2 ausübte (Abbildung 3-4 C, E). Gleichzeitig bewirkte die Behandlung mit Rotenon einen Anstieg in den Proteinspiegeln von Mfn1. Hierbei kam es zu einer signifikanten Hochregulation in Mfn1 Isoform 1 (If1) bei 86 kDa, die durch die Vorinkubation mit Phenothiazin nicht verringert wurde (Abbildung 3-4 D, E). Interessanterweise war nach der Behandlung mit Rotenon auch eine signifikante verstärkte Expression der Proteinspiegel der Mfn1 Isoform 3 (If3) bei 71 kDa zu beobachten (Abbildung 3-4 D, F). Die Vorbehandlung der Zellen mit Phenothiazin konnte diesen Effekt signifikant um ca. 60 % verhindern. Es fiel ebenfalls auf, dass die Proteinspiegel von Mfn1 If3 durch Toxin und Antioxidans im ähnlichen Ausmaß reguliert wurden wie die Proteinspiegel von PINK1 (siehe Abbildung 3-3).

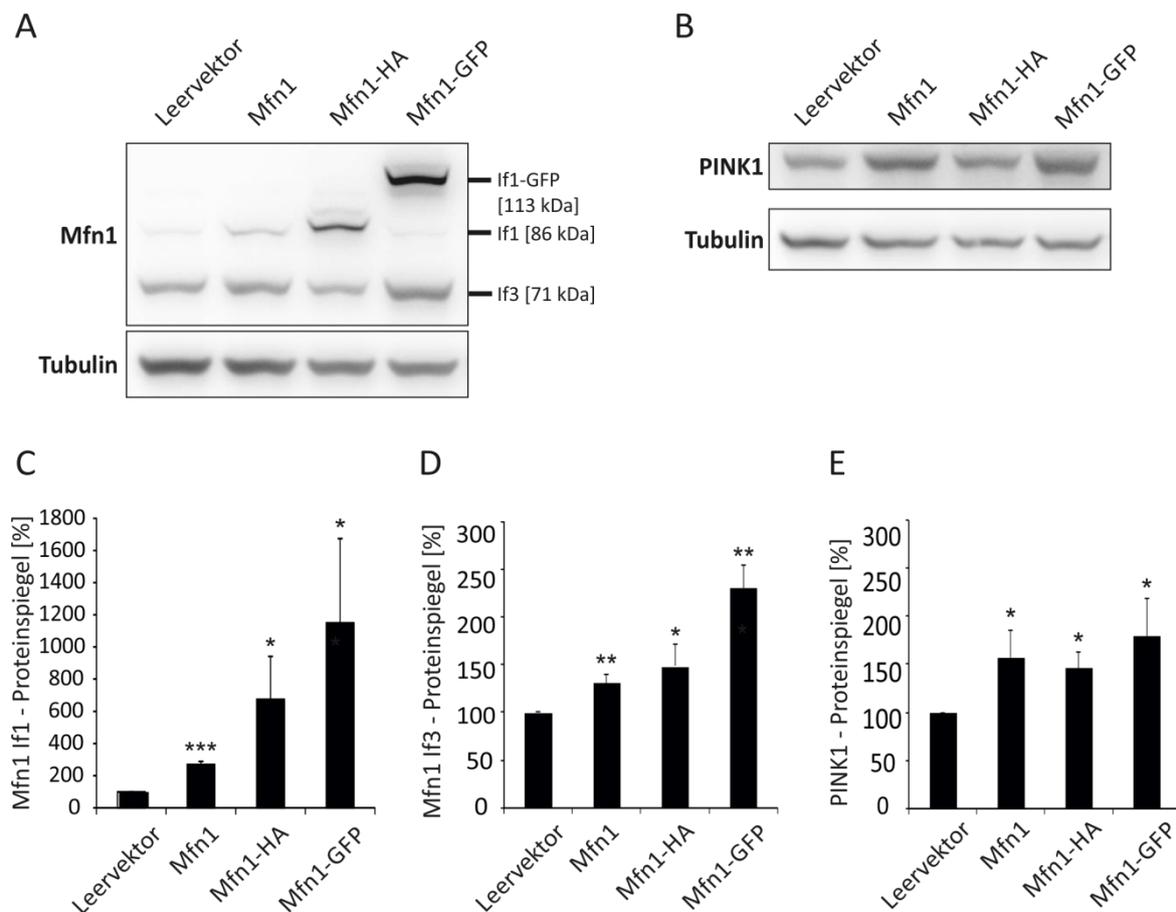
Diese Ergebnisse zeigten, dass die Proteinspiegel von Parkin tendenziell ebenfalls wie die von PINK1 unter der Behandlung mit Rotenon hochreguliert wurden. Hierbei verringerte das Antioxidans Phenothiazin diese Hochregulation. Weiterhin wurde deutlich, dass Mfn2 durch die Behandlung mit Rotenon bzw. mit Phenothiazin nicht beeinflusst wurde. Mfn1 hingegen akkumulierte nach der Behandlung mit Rotenon, was auf verstärkte kompensatorische Fusionsvorgänge hindeutet. Die Proteinspiegel von Mfn1 Isoform 3 wurden durch Rotenon und Phenothiazin ähnlich reguliert wie die von PINK1.

## **3.2 Die Mitophagieproteine PINK1 und Mitofusin 1 Isoform 3 stehen im Zusammenhang**

### **3.2.1 Überexpression von Mitofusin 1 Isoform 1 erhöht die Proteinspiegel von Isoform 3 und von PINK1**

Unter der Behandlung mit Rotenon zeigte sich eine Erhöhung von Mfn1, sowohl in der If1 als auch in der If3. Zusätzlich konnte eine ähnliche Entwicklung zwischen den Proteinen PINK1 und Mfn1 If3 beobachtet werden. Über die If3 von Mfn1 ist bislang nicht viel bekannt, weshalb weder ein Zusammenhang zu dem Mitophagieprotein PINK1 beschrieben ist, noch geklärt ist wie die Isoform 3 reguliert wird. Deswegen sollte anhand von Überexpressionsmodellen von Mfn1 If1 die Abhängigkeit der beiden Isoformen analysiert und eine mögliche Regulation von PINK1 untersucht werden.

Aufgrund der guten Transfektionsrate wurden im Rahmen dieses Experiments humane HEK-Zellen verwendet, die mittels Elektroporation transfiziert wurden (siehe Abschnitt 2.1.1). Um den Effekt eindeutig zu ermitteln, wurden drei unterschiedliche Plasmide, die für Mfn1 kodieren, verwendet: pCMV6-XL5 MFN1 (Mfn1), pPM-C-HA MFN1 (Mfn1-HA) und pCMV6-AC-GFP MFN1 (Mfn1-GFP). pCMV6 diente als Leervektor. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion geerntet und die Proteinlysate mittels Western Blot analysiert.



**Abbildung 3-5: Überexpression von Mitofusin 1 bewirkt Hochregulation der Proteinspiegel von Mitofusin 1 Isoform 3 und von PINK1**

HEK-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV6-XL5 MFN1 (Mfn1), pPM-C-HA MFN1 (Mfn1-HA) und mit pCMV6-AC-GFP MFN1 (Mfn1-GFP) durch Elektroporation transfiziert. pCMV6 diente als Leervektor. Nach 24 h wurden die geernteten Zellysate mithilfe vom Western Blot untersucht. Repräsentative immunreaktive Banden von (A) Mfn1 mit Angaben der kDa für GFP-gebundene If1, If1 und If3 und von (B) PINK1. Tubulin diente als Ladekontrolle. Densitometrische Auswertung der Proteinspiegel von (C) Mfn1 If1 (D) Mfn1 If3 und (E) PINK1. Angegeben sind prozentuale Veränderungen der jeweiligen Proteinspiegel von Zellen mit Funktionsplasmid verglichen mit den Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden. Die statistische Analyse erfolgte mit t-Test und die Daten zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (n=3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

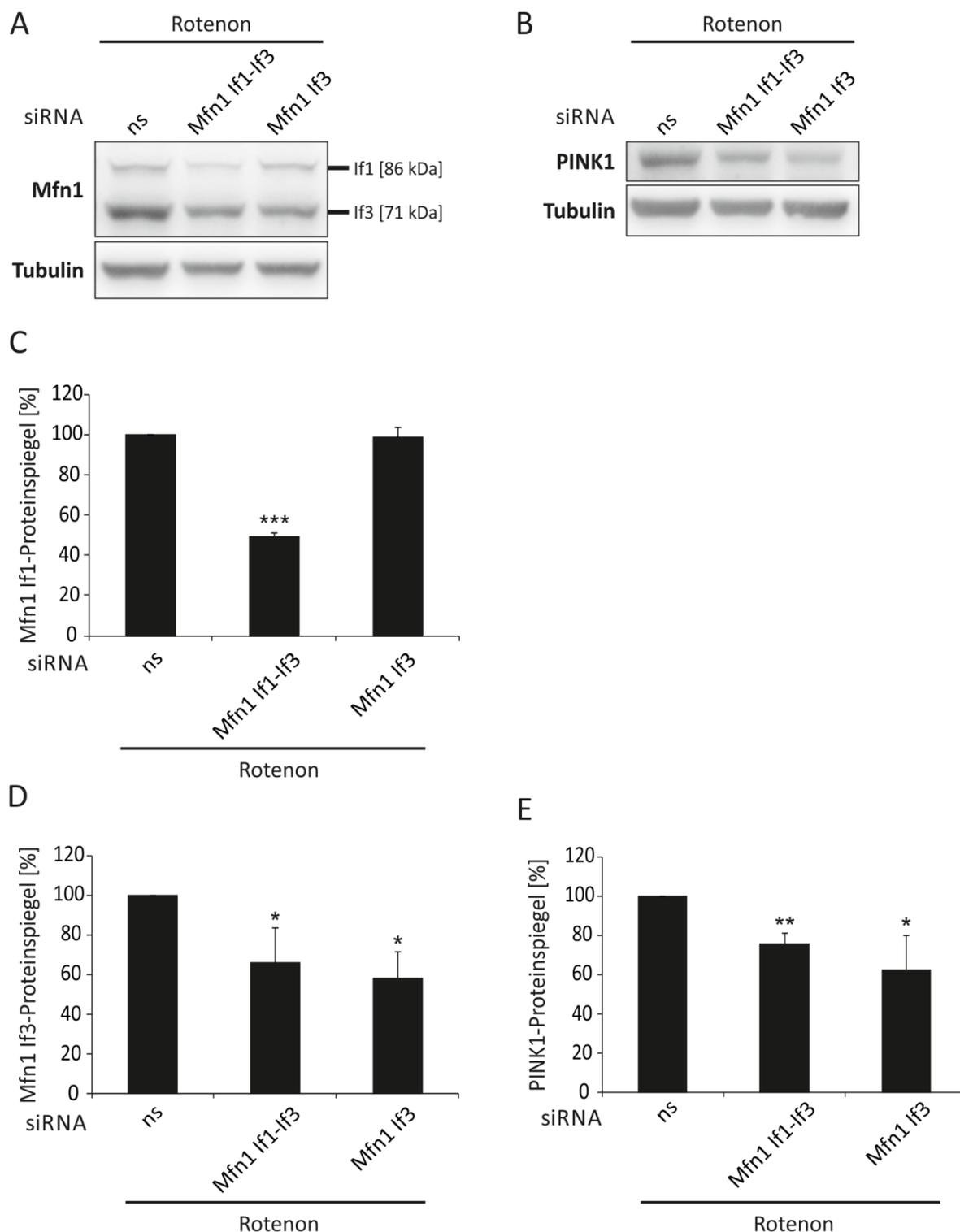
Die erfolgreiche Transfektion der Zellen, sowie die Überexpression von Mfn1 If1 konnte anhand der signifikant erhöhten Proteinspiegel der Isoform 1 bestätigt werden (Abbildung 3-5 A, C). Dies war mit allen drei Plasmiden möglich. Mit dem Plasmid, das für Mfn1 ohne tag kodiert (Mfn1), kam es zu einer Hochregulation der Isoform 1 um den Faktor von 2,5. Mit dem Mfn1-HA Plasmid lag der Faktor der Hochregulation bei ca. 6,5. Dieses konnte man in der Bande etwas oberhalb von 86 kDa aufgrund des HA-tags erkennen. Eine Überexpression um den Faktor 11,5 konnte mit dem Mfn-GFP Plasmid erreicht werden. Dies wurde in der Proteinbande bei 113 kDa sichtbar. Die Bandenverschiebung liegt darin begründet, dass zu der Molekülmasse des Mitofusins 1 (86 kDa) zusätzlich die Molekülmasse des GFP-tags mit 27 kDa hinzukommt. Wie erwähnt, konnte mit jedem Plasmid eine Überexpression von Mfn1 If1 erreicht werden. Hierbei konnte durch die Erhöhung der If1 des Proteins Mfn1 ebenfalls eine deutliche Zunahme der If3 beobachtet werden (Abbildung 3-5 A, D). Die Proteinspiegel der If3 wurden mithilfe des Plasmids Mfn1-HA signifikant um 48 % gesteigert. Die Plasmide Mfn1 und Mfn1-GFP bewirkten eine Zunahme der If3, die hoch signifikant war. Hierbei verstärkte das Plasmid Mfn1 die Proteinexpression von If3 um 31 %, während das Plasmid Mfn1-GFP zu der stärksten Expression von If3 mit 131 % führte. Aufgrund der Beobachtung, dass PINK1 und Mfn1 If3 unter der Behandlung mit Rotenon und Phenothiazin einer ähnlichen Regulation ausgesetzt waren, wurden in diesem Experiment auch die Proteinspiegel von PINK1 untersucht (siehe Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der If1 die Proteinspiegel von PINK1 ähnlich regulierte wie die der If3 (Abbildung 3-5 B, E). Die Überexpression von Mfn1 mithilfe von allen drei Mfn1-Plasmiden bewirkte eine signifikante Zunahme der PINK1-Spiegel. Während das Plasmid, das für Mfn1 kodierte, die Proteinspiegel von PINK1 um 57 % hochregulierte, bewirkte das Mfn1-HA Plasmid eine Zunahme von PINK1 um 47 %. Das Plasmid, das für Mfn1-GFP kodierte, verstärkte die Expression von PINK1 um 80 %.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Überexpression von Mfn1 If1 einen Einfluss auf die Expressionsspiegel von Mfn1 If3 hatte. Hierbei kam es durch die Hochregulation von Mfn1 If1 zu einem Anstieg in den Proteinspiegeln von Mfn1 If3. Gleichzeitig konnte ein ähnlicher Anstieg von PINK1 im Verhältnis zu Mfn1 If3 beobachtet werden, was evtl. auf einen Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen schließen lässt.

### **3.2.2 Der Einfluss von Mitofusin 1 auf PINK1 ist abhängig von der Isoform 3**

Die Überexpression von Mfn1 If1 bewirkte eine Erhöhung der If3. Um zu verifizieren, dass es sich bei dem hochregulierten Protein um die Isoform 3 handelt, wurden Versuche durchgeführt bei denen Mfn1 mit unterschiedlichen siRNAs herunterreguliert wurde. Damit sollte auch

untersucht werden, ob das Protein PINK1 über die kanonische If1 oder die kleinere If3 von Mfn1 beeinflusst wurde.



**Abbildung 3-6: Herunterregulation der Isoformen von Mfn1 zeigt, dass PINK1 durch If3 beeinflusst wird**

HEK-Zellen wurden mit siRNA mittels Elektroporation transfiziert. siRNAs gegen folgende Gene wurden verwendet: Mfn1, Mfn1 If3 (exonübergreifend) und nonsense (ns), letztere diente als Kontrolle. Die Zellen wurden nach 24 h mit

200 nM Rotenon behandelt und nach weiteren 48 h geerntet, um mittels Western Blot analysiert werden zu können. Angegeben sind repräsentative Blots von (A) Mfn1 und (B) PINK1. Tubulin diente bei beiden als Ladekontrolle. Die densitometrischen Auswertungen zeigen die prozentualen Proteinspiegel, bezogen auf ns, von (C) Mfn1 If1, (D) Mfn1 If3 und (E) PINK1. Die Analyse erfolgte mit dem t-Test und zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen (n =3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Es wurden HEK-Zellen mittels Elektroporation mit siRNA gegen Mfn1 transfiziert. Die siRNA Mfn1 If1-If3 bindet an einen Bereich der mRNA, der bei beiden Isoformen (If1 und If3) vorhanden ist. Sie ist somit in der Lage beide Isoformen herunterzuregulieren. Mit der exonübergreifenden siRNA Mfn1 If3 wurde spezifisch die If3 von Mfn1 herunterreguliert. Der mRNA von If3 fehlen im Vergleich zur If1 die Exons 12 und 13, somit bindet siRNA Mfn1 If3 exonübergreifend am Ende von Exon 11 und am Anfang von Exon 14, was die spezifische Herunterregulation von der If3 ermöglicht (siehe Abschnitt 1.3.4.2). Als Kontrolle diente eine nonsense siRNA, die eine unspezifische RNA-Sequenz beinhaltet. Die Zellen wurden 24 h nach der Elektroporation mit Rotenon behandelt, um die basalen Proteinspiegel von Mfn1 If3 zu induzieren. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet, um sie mittels des Western Blots zu analysieren. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Herunterregulation mit siRNA Mfn1 If1-If3, sowohl If1 als auch If3 signifikant herunterreguliert wurden (Abbildung 3-6 A, C, D). Währenddessen kam es bei der Herunterregulation mit siRNA Mfn1 If3 zu einer spezifischen signifikanten Senkung der Proteinspiegel von If3 (Abbildung 3-6 A, C, D). If1 wurde hier weiterhin ähnlich der nonsense-Kontrolle exprimiert. Dies war der Beweis, dass es sich bei dem Protein in der Höhe von 71 kDa um die If3 des Proteins Mfn1 handelte. Aufgrund der bisherigen Beobachtung vom Einfluss zwischen Mfn1 und PINK1 wurde weiterhin untersucht, durch welche Isoform von Mfn1 die Regulation von PINK1 erfolgte. Hierfür wurden während der Herunterregulation von Mfn1 die Proteinspiegel von PINK1 analysiert. Es konnte eine Regulation vergleichbar mit der von Mfn1 If3 beobachtet werden, da beide siRNAs zu einer signifikanten Herunterregulation von PINK1 führten (Abbildung 3-6 B, E). Dadurch dass die alleinige Herunterregulation der If3 mit einer Senkung von PINK1 einherging, wurde deutlich, dass die Regulation von PINK1 durch Mfn1 If3 erfolgte und unabhängig von Mfn1 If1 war.

Diese Resultate bestätigten, dass es sich bei dem Protein mit der Größe von 71 kDa um die Isoform 3 von Mfn1 handelte. Dieses Protein ist in der Lage die Proteinspiegel von PINK1 unabhängig von Mfn1 If1 zu beeinflussen.

### 3.2.3 Im Gegenzug reguliert PINK1 die Isoform 3 von Mfn1

Es zeigte sich, dass Mfn1 If3 die Proteinspiegel von PINK1 beeinflusst, was bisher noch nicht bekannt war. Dies liegt daran, dass es über die Isoform 3 noch nicht viele Untersuchungen gibt

(AceView, 2019; UniProt, 2019). Im Gegensatz dazu wurde der Einfluss von PINK1 auf Mfn1 bereits beschrieben, jedoch wurde hierbei bisher nur die Isoform 1 vom Mfn1 untersucht (Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010; Rakovic et al., 2011). In dieser Arbeit sollte durch die Herunterregulation von PINK1 analysiert werden, inwiefern PINK1 einen regulativen Einfluss speziell auf die Isoform 3 von Mfn1 ausübt.

Es wurden SH-SY5Y-Zellen mittels Elektroporation mit siRNA gegen PINK1 transfiziert. Als Kontrolle wurde nonsense siRNA verwendet. Die Rotenon-Behandlung erfolgte 24 h nach der Elektroporation, um die basalen Proteinspiegel von Mfn1 If3 zu induzieren. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet und mithilfe des Western Blots analysiert.

Es konnte eine Herunterregulation von PINK1 um ca. 25 % erreicht werden (Abbildung 3-7 A, C). Diese war aufgrund der unterschiedlichen Transfektionseffizienz der einzelnen Experimente nicht signifikant, jedoch wurde ein eindeutiger Trend sichtbar. Es wurde deutlich, dass die Herunterregulation von PINK1 zu einer Reduzierung von Mfn1 If3 im ähnlichen Ausmaß führte (Abbildung 3-7 B, D). Dies zeigte, dass PINK1 umgekehrt auch einen Einfluss auf Mfn1 If3 ausgeübt hat.

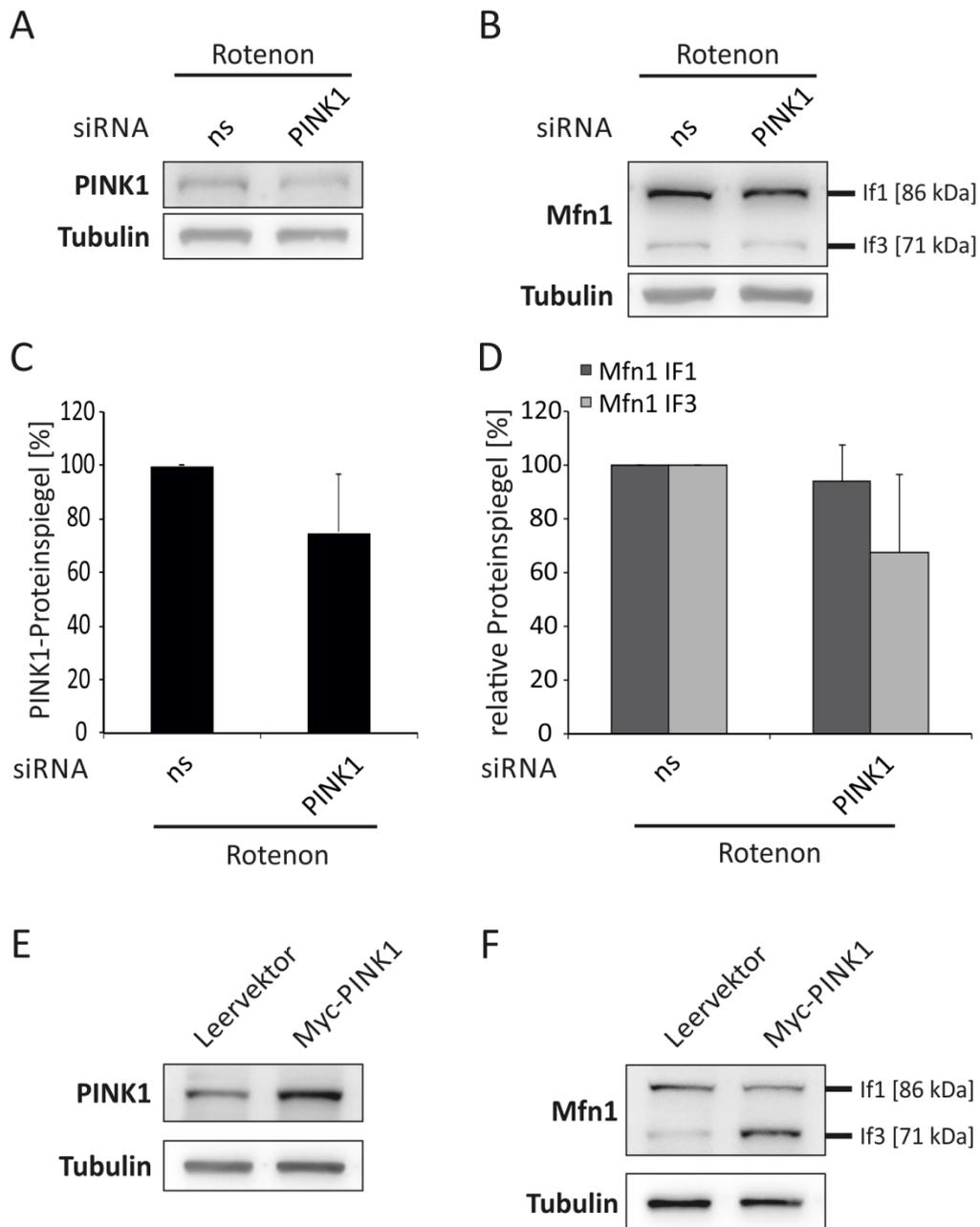
Um weiterhin den Einfluss von PINK1 auf die If3 zu bestätigen, wurde die Überexpression von PINK1 durchgeführt.

SH-SY5Y-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Plasmid pCMVTNT PINK1 N-myc transfiziert, während das Plasmid pCMV6 als Leervektor diente. Die Proteinlysate der Zellen wurden nach 24 h mit dem Western Blot analysiert.

Aufgrund der verstärkten PINK1-Proteinbande, konnte bestätigt werden, dass die Transfektion erfolgreich war (Abbildung 3-7 E). Gleichzeitig waren die Proteinspiegel von Mfn1 If3 hochreguliert, was den Einfluss von PINK1 auf die If3 bestätigt (Abbildung 3-7 F). Darüber hinaus zeigte sich eine Verringerung in der Isoform 1. Dies belegt wiederum, dass die gegenseitige Regulation von PINK1 und Mfn1 If3 unabhängig von der If1 von Mfn1 abläuft.

Die experimentelle Überexpression von PINK1 wurde nur einmal durchgeführt (n=1), weshalb es keine statistische Auswertung von diesem Versuch gibt. Jedoch dient dieses Experiment lediglich dazu die Tendenzen zu ermitteln und die bisherigen Daten zu unterstützen.

Die Ergebnisse der Herunterregulation sowie der Überexpression von PINK1 zeigten, dass dieses Protein die Isoform 3 von Mfn1 regulierte. Hierbei erfolgte die Expression von Mfn1 If3 immer ähnlich der Regulation von PINK1. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der bisherigen Untersuchungen (siehe 3.2.1 und 3.2.2), kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Proteine PINK1 und Mfn1 If3 im Zusammenhang stehen und sich gegenseitig beeinflussen.



### Abbildung 3-7: Regulation von PINK1 bewirkt analoge Regulation der Proteinspiegel von Mfn1 If3

SH-SY5Y-Zellen wurden mittels Elektroporation mit siRNA gegen PINK1 transfiziert, nonsense (ns) siRNA diente als Kontrolle. Nach 24 h wurde mit 200 nM Rotenon behandelt und nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet um mit dem Western Blot analysiert werden zu können. Angegeben sind repräsentative Blots von (A) PINK1 und (B) Mfn1 mit Angabe der kDa für If1 und If3. Tubulin diente bei beiden als Ladekontrolle. Densitometrisch wurden die prozentualen Proteinspiegel bezogen auf ns ausgewertet von (C) PINK1, (D) von Mfn1 If1 und If3. Analysiert wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen mit dem t-Test (n=3).

SH-SY5Y-Zellen wurden durch Elektroporation mit den Plasmiden pCMVTNT PINK1 N-myc und pCMV6, der als Leervektor diente, transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle und es sind immunreaktive Banden angegeben von: (E) PINK1 und (F) Mfn1 mit Angabe der Kilodalton-Größen der If1 und If3 (n=1).

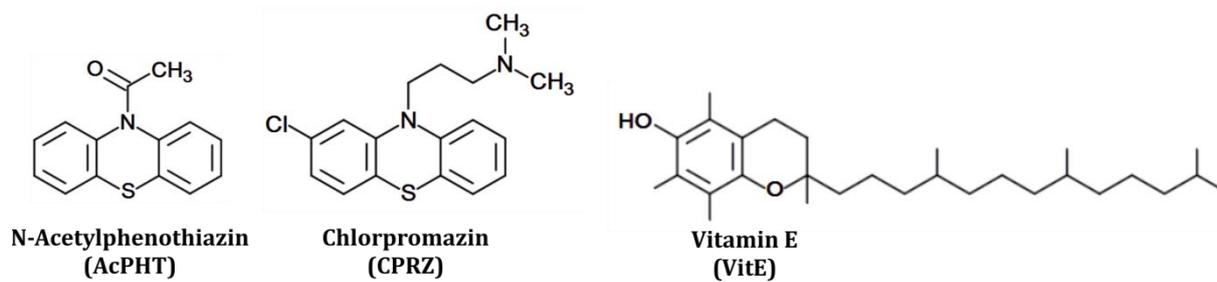
### 3.3 Phenothiazin ist ein potentes Antioxidans

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass Phenothiazin in der Lage ist die Wirkung vom Parkinson-Toxin Rotenon auf das Mitophagie-Protein PINK1 und seinen mutmaßlichen Interaktionspartner Mfn1 If3 abzuschwächen, indem PHT die Rotenon-vermittelte verstärkte Expression dieser Proteine signifikant verringern konnte (siehe Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4). Jedoch konnte bislang nicht belegt werden, dass dieser Effekt von PHT auf einer antioxidativen Wirkung beruhte. Anhand von Vergleichssubstanzen wie Acetylphenothiazin, Chlorpromazin und Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) wurde die Wirkweise von PHT analysiert (Abbildung 3-8). Das Acetylphenothiazin stellt ein N-substituiertes Struktur analogon von Phenothiazin ohne antioxidative Wirkung dar. Das Chlorpromazin ist ein Dopamin-Rezeptor-Antagonist und gehört zu den Neuroleptika, dessen Grundgerüst das Phenothiazin darstellt. Damit wurde untersucht, ob die Wirkung von Phenothiazin auf einer Antagonisierung von Dopamin-Rezeptoren beruht. Währenddessen diente das Vitamin E, aufgrund seiner phenolischen lipophilen Struktur, als eine Vergleichssubstanz mit antioxidativer Wirkung. Mithilfe dieser Substanz sollte ermittelt werden, ob Phenothiazin antioxidativ wirkt und wie potent sich dieses im Verhältnis zu Vitamin E erweist.

Mit den genannten Substanzen wurden SH-SY5Y-Zellen vorbehandelt und anschließend mit Rotenon gestresst. Die Proteinspiegel von Mfn1 wurden mit dem Western Blot untersucht (Abbildung 3-9 A, B).

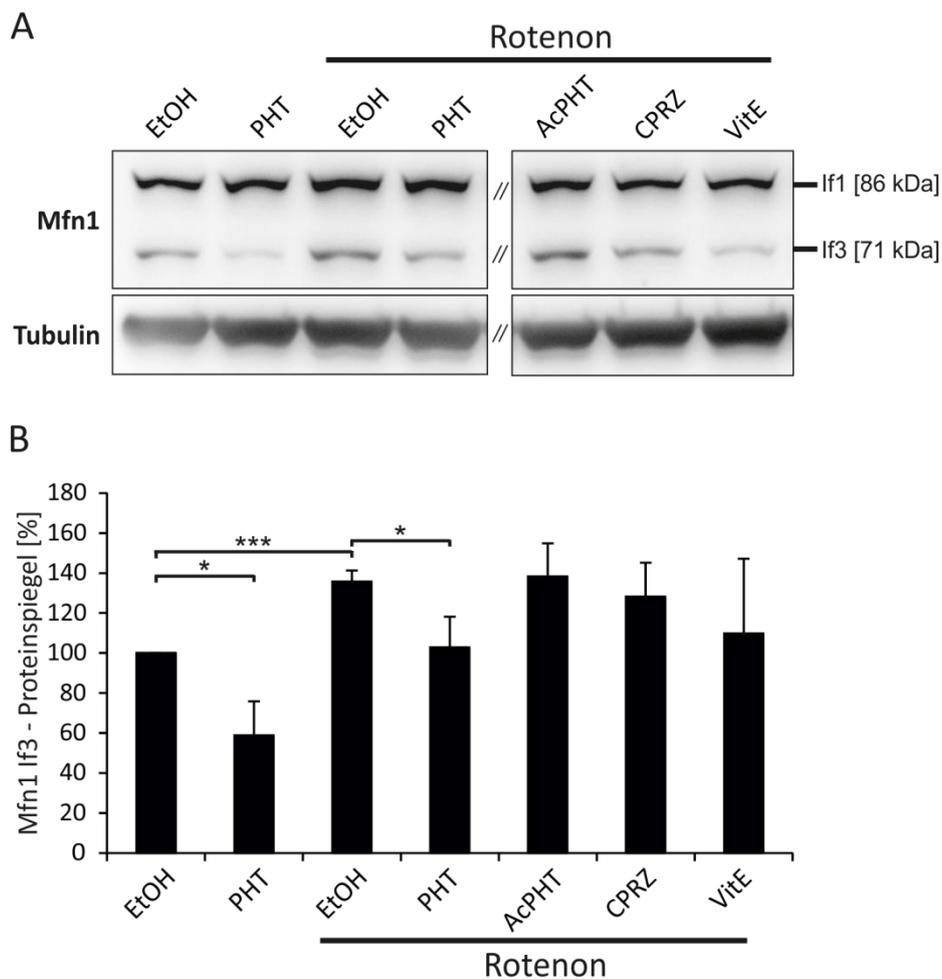
Die Regulation der Proteinspiegel unter der Behandlung mit Rotenon und Phenothiazin entsprach der bisherigen Beobachtung. Hierbei war eine signifikante Zunahme von Mfn1 If3 unter Rotenon zu verzeichnen, die durch Phenothiazin signifikant vermindert werden konnte. Bei der Betrachtung der Vergleichssubstanzen war zu erkennen, dass weder das Acetylphenothiazin noch das Chlorpromazin einen Effekt auf die durch Rotenon erhöhten Spiegel von Mfn1 If3 hatten. Das zeigte, dass die protektive Wirkung des Phenothiazins auf dem Stickstoff-gebundenem Wasserstoff-Atom beruhte und somit antioxidativer Natur war. Der Einfluss von Vitamin E auf die Proteinspiegel von Mfn1 If3 war sehr schwankend. Während in manchen Versuchen eine Protektion beobachtet werden konnte, blieb sie in anderen Versuchen komplett aus. Im Vergleich dazu war mit Phenothiazin immer eine Protektion zu sehen. Würde die Annahme von einer ähnlichen antioxidativen Wirkung von beiden Substanzen bestätigt werden, wäre die Wirkkonzentration zu berücksichtigen. Die Konzentration von Vitamin E betrug  $1 \mu\text{M}$ , während Phenothiazin bereits in der Konzentration von  $100 \text{ nM}$  wirkte.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Wirkweise von Phenothiazin auf die Proteine der Mitophagie auf der Antioxidation beruhte. Diese äußerte sich bereits in einer nanomolaren Konzentration.



**Abbildung 3-8: Vergleichssubstanzen**

Angegeben sind die chemischen Formeln mit den jeweiligen Abkürzungen von N-Acetylphenothiazin, Chlorpromazin und Vitamin E.



**Abbildung 3-9: Die Wirkung von Phenothiazin ist antioxidativ**

SH-SY5Y-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit den Substanzen Phenothiazin 100 nM (PHT), N-Acetylphenothiazin 100 nM (AcPHT), Chlorpromazin 100 nM (CPRZ), Vitamin E 1  $\mu$ M (VitE) oder Ethanol (EtOH) 3 h lang behandelt. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 200 nM Rotenon oder Ethanol. Nach 72 h wurden die Zelllysate mittels Western Blot analysiert. (A) Repräsentative Blots von Mfn1, mit Angabe der kDa der jeweiligen Isoform, und Tubulin, welches als Ladekontrolle diente. (B) Densitometrische Auswertung der angegebenen prozentualen Proteinspiegel von Mfn1 If3. Hierbei wurden die Behandlungen mit PHT bzw. Rotenon auf die Kontrolle (EtOH) abgeglichen. Weitere Behandlungen wurden auf EtOH+Rotenon abgeglichen. Mittelwerte und Standardabweichungen sind von jeweils drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test ( $n=3$ ). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

### **3.4 Mitochondriale Dynamik unter Einfluss des Komplex I-Inhibitors Rotenon und des Antioxidans Phenothiazin**

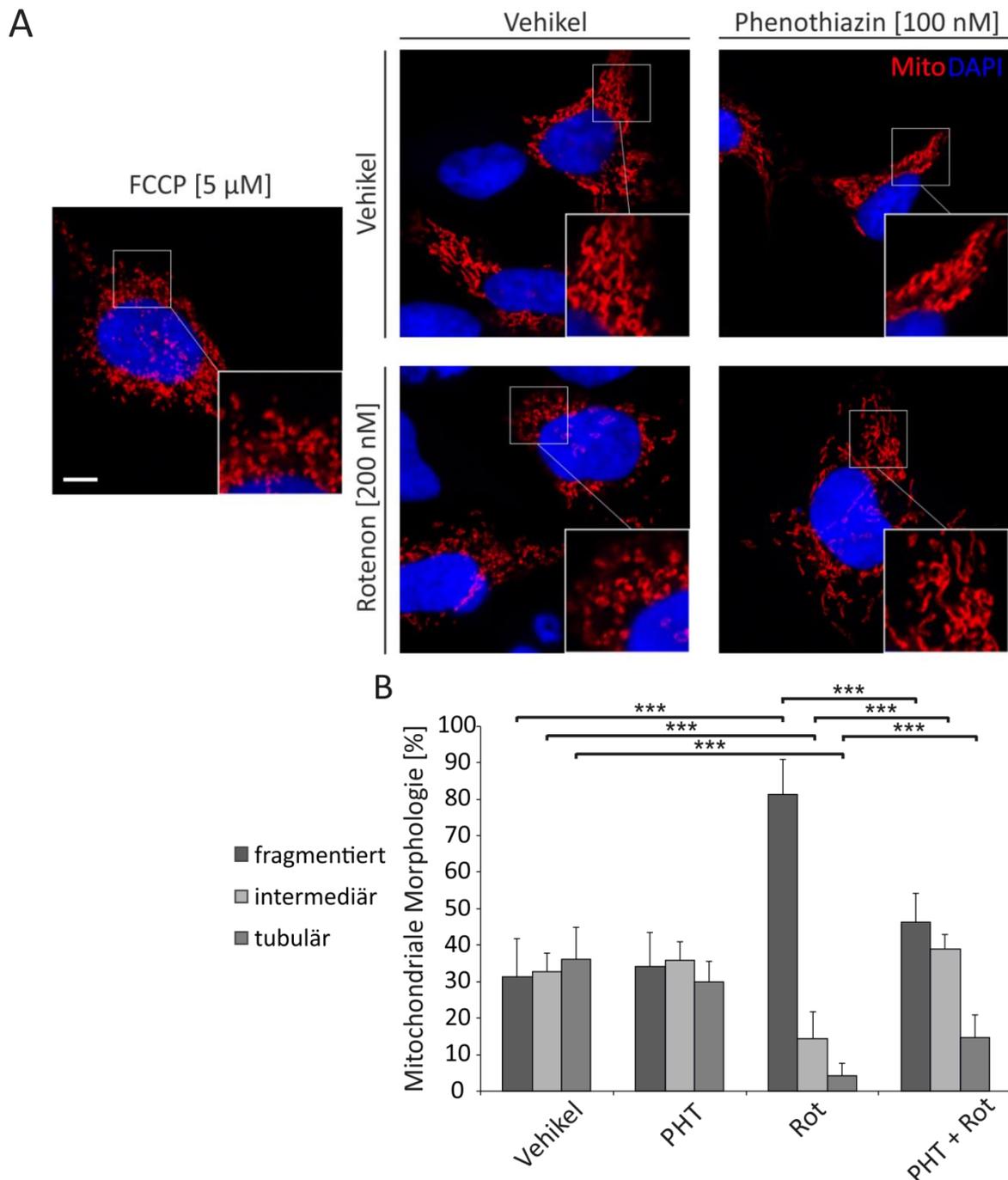
Es wurde deutlich, dass durch die Behandlung mit Rotenon die Proteinspiegel von PINK1 und Parkin induziert wurden, was auf eine verstärkte Mitophagie hindeutet. Phenothiazin konnte den Einfluss von Rotenon auf diese Proteine verringern, was auf einen schützenden Effekt hinweist. Die Mitophagie ist eng verbunden mit der mitochondrialen Dynamik. Letztere kennzeichnet sich durch Fission (Teilung) und Fusion (Verschmelzung) der Mitochondrien (Bereiter-Kahn und Vöth, 1994). Hierdurch wird ein intaktes mitochondriales Netzwerk über die gesamte Zelle hinweg gewährleistet und damit eine effektive Energieproduktion gesichert (siehe Abschnitt 1.3.4) (Chan, 2012; Chen et al., 2010; Westermann, 2012). Mittels Fission ist die Zelle in der Lage, geschädigte Mitochondrien abzusondern und diese dann der Mitophagie zuzuführen (Lemasters, 2005; Twig et al., 2008). Mithilfe der Fusion können erhaltene intakte Mitochondrien sich vereinen und damit die mitochondriale Homöostase aufrechterhalten.

#### **3.4.1 Die mitochondriale Morphologie wird durch Rotenon und Phenothiazin beeinflusst**

Da die Mitophagie und die mitochondriale Dynamik eng miteinander verbunden sind und sich gegenseitig beeinflussen, sollte im Folgenden der Einfluss von Rotenon und Phenothiazin auf die mitochondriale Dynamik untersucht werden.

Hierbei wurden Mitochondrien in HEK-Zellen mittels des pTurboRFP-mito Plasmids rot gefärbt. Anschließend wurden die Zellen behandelt und nach der Fixierung erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). Nachfolgend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 3-10 A).

In der Auswertung erfolgte eine Quantifizierung der Länge der Mitochondrien. Hierbei waren fragmentierte Mitochondrien kürzer als 2  $\mu\text{m}$ , tubuläre Mitochondrien länger als 3  $\mu\text{m}$ , während die intermediären Mitochondrien eine Länge zwischen 2 und 3  $\mu\text{m}$  aufwiesen (Abbildung 3-10 B). FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) stellt einen Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette dar und diente als Positivkontrolle, da eine Behandlung mit dieser Substanz zur starken Fission der Mitochondrien führt (Cereghetti et al., 2010). Dies zeigte sich in der Zelle anhand der vielen punktförmigen roten mitochondrialen Strukturen. In der unbehandelten Kontrolle (Vehikel) ließ sich ein zusammenhängendes, tubuläres, mitochondriales Netzwerk erkennen, welches sich über die gesamte Zelle verteilte. Hierbei lag eine gleichmäßige Verteilung von fragmentierten, intermediären und tubulären mitochondrialen Strukturen vor.



**Abbildung 3-10: Rotenon bewirkt eine verstärkte Fission der Mitochondrien, während Phenothiazin diesen Effekt vermindert**

HEK-Zellen wurden mit pTurboRFP-mito Plasmid transfiziert, um die Mitochondrien zu visualisieren (rot). Nach 48 h wurde entweder mit 100 nM Phenothiazin oder mit Ethanol 3 h vorbehandelt, anschließend erfolgte die Behandlung mit 5 µM FCCP, 200 nM Rotenon oder Ethanol für 6 - 12 h. Die Zellen wurden mit PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt (blau). Die Aufnahmen erfolgten mit dem konfokalen *Laser scanning mikroskop* (LSM). (A) Angegeben sind repräsentative Abbildungen mit Vergrößerungen von ausgewählten Bereichen zur besseren Darstellung der mitochondrialen Strukturen. (B) Auswertung der Länge der Mitochondrien durch das Zählen von RFP-positiven Strukturen pro Zelle. Hierbei galt eine Länge der Mitochondrien unter 2 µm als fragmentiert, die Länge zwischen 2 und 3 µm als intermediär und eine Länge größer als 3 µm als tubulär. Angegeben sind prozentual die Anzahl der jeweiligen Mitochondrienlängen bezogen auf die Gesamtzahl der Mitochondrien pro Zelle. Es wurden jeweils

10 - 18 Zellen pro Versuchsbedingung analysiert. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, hierbei erfolgte die statistische Analyse mit dem t-Test ( $n=3$ ).  $***p \leq 0,001$ . Der Größenskalenwert entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Unter der alleinigen Behandlung mit PHT erwies sich die mitochondriale Morphologie ähnlich der Kontrolle. Im Vergleich zur Kontrolle führte die Behandlung mit Rotenon zu kürzeren und teilweise punktförmigen mitochondrialen Strukturen. Währenddessen ergab die Auswertung eine signifikante Zunahme der fragmentierten Mitochondrien um 260 %. Folglich wurden die intermediären um 55 % und die tubulären Strukturen um 88 % signifikant verringert. Dies deutete morphologisch auf eine Fission der Mitochondrien hin, das sich ähnlich der FCCP-behandelten Positivkontrolle äußerte. Bei einer dreistündigen Vorinkubation mit dem Antioxidans Phenothiazin in einer Konzentration von 100 nM, konnte die Rotenon-abhängige Fission teilweise verhindert werden, da in den Zellen längere mitochondriale Strukturen in einem verbundenen Netzwerk vorlagen. Die Auswertung ergab eine signifikante Abnahme der fragmentierten Mitochondrien um ca. 43 %, währenddessen kam es zu einer signifikanten Zunahme der intermediären Strukturen um ca. den Faktor 2,5 und der tubulären Strukturen um den Faktor 3,5.

Dieses Ergebnis zeigte, dass es unter der Komplex I-Inhibition durch Rotenon zu einer vermehrten Schädigung der Mitochondrien kam, was in der verstärkten Fission der Mitochondrien erkennbar war. Die Vorinkubation mit Phenothiazin wirkte sich protektiv gegen diese Schädigung aus.

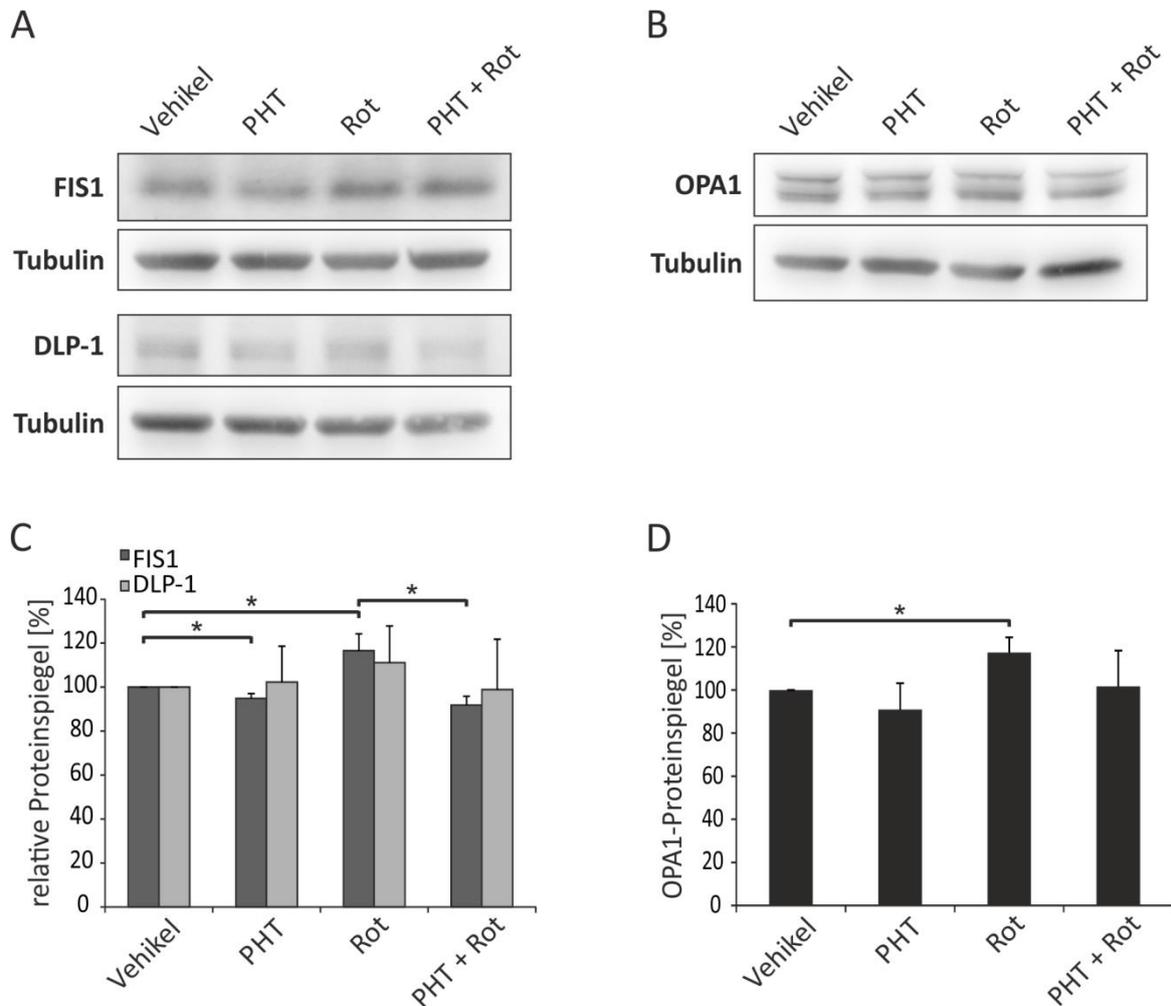
### **3.4.2 Die mitochondriale Dynamik wird durch Rotenon und Phenothiazin moduliert**

Auf morphologischer Ebene konnte ermittelt werden, dass Rotenon eine verstärkte Fission der Mitochondrien bewirkte, wogegen PHT diese Fission verringern konnte. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die erhöhte Fission ebenfalls in den Proteinspiegeln der Marker der mitochondrialen Dynamik vorzufinden ist. Dazu wurden die Proteine FIS1 und DLP-1 untersucht, die für die Fission von Mitochondrien zuständig sind (siehe Abschnitt 1.3.4.1). FIS1 ist ein Protein der OMM (äußeren Mitochondrienmembran), das zytosolisches DLP-1 rekrutiert, welches dann die Fission vollzieht.

Die Zelllinie SH-SY5Y wurde mit Phenothiazin vorbehandelt und anschließend mit Rotenon für 72 h inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden diese mit dem Western Blot untersucht.

Während signifikant erhöhte FIS1-Proteinspiegel unter der Behandlung mit Rotenon zu beobachten waren, wurde diese Erhöhung durch die Vorinkubation von Phenothiazin signifikant vermindert (Abbildung 3-11 A, C). Auch die alleinige Behandlung mit Phenothiazin zeigte eine

signifikante Verringerung der FIS1-Proteinspiegel. Die DLP-1-Proteinspiegel zeigten eine ähnliche Tendenz der Regulation, entsprechend den Proteinspiegeln von FIS1, jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant. Diese Ergebnisse unterstützten die in Abschnitt 3.4.1 beobachtete Steigerung der Fission der Mitochondrien unter dem toxischen Effekt von Rotenon, die durch das Antioxidans Phenothiazin vermindert werden konnte.



### Abbildung 3-11: Phenothiazin verringert die durch Rotenon induzierte mitochondriale Dynamik

SH-SY5Y-Zellen wurden ausplattiert und nach 24 h mit 100 nM Phenothiazin oder Ethanol behandelt. 3 h später wurde 200 nM Rotenon oder Ethanol hinzugegeben. 72 h später wurde geerntet, anschließend wurden die Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Repräsentative Blots von (A) FIS1, DLP-1 und (B) OPA1. Tubulin diente als Ladekontrolle. Densitometrische Auswertungen von (C) FIS1, DLP-1 und (D) OPA1 normiert auf die Kontrolle (Vehikel) bzw. wurde die Behandlung mit Phenothiazin und Rotenon auf die alleinige Rotenon-Behandlung normiert. Zu sehen sind prozentuale Proteinspiegel mit Angabe von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Analyse erfolgte mit dem t-Test (n=3). \*  $p \leq 0,05$ .

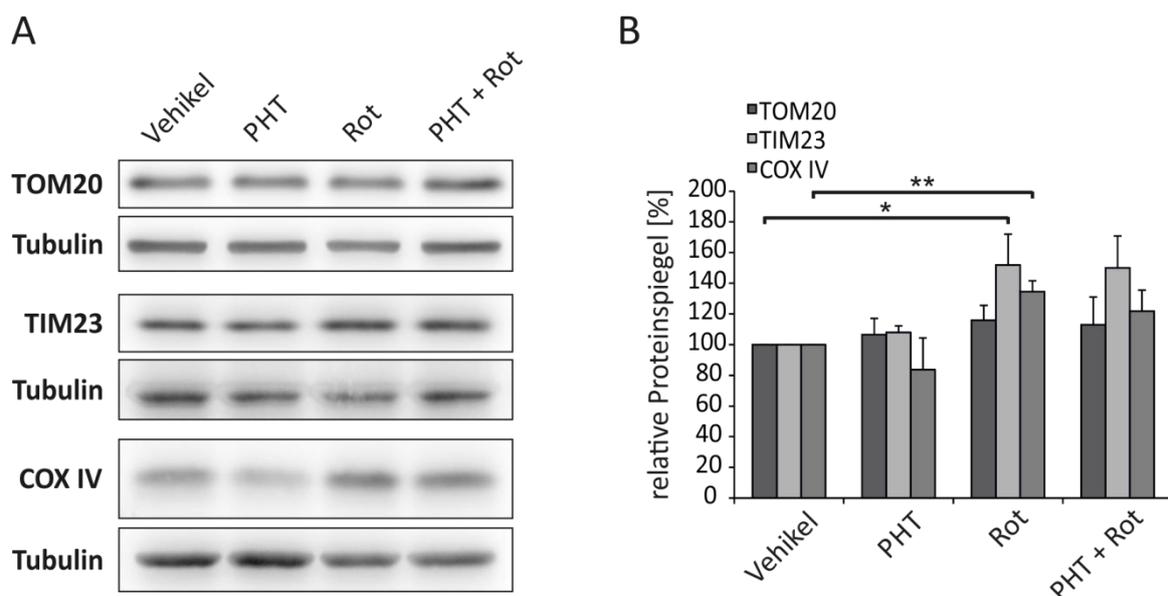
Weiterhin wurde ermittelt, ob unter dem Parkinson-Toxin nur Fission und Abbau der Mitochondrien vorlag, oder ob Kompensationsmechanismen auf Ebene der Fusion stattfanden. Ein

Hinweis auf eine regulierte Fusion gaben bereits die Proteinspiegel von Mfn1 im Abschnitt 3.1.4. Dies ist ein wichtiges Protein der mitochondrialen Fusion der OMM, das durch die Rotenon-Behandlung signifikant hochreguliert wurde. Ein weiteres wichtiges Protein ist OPA1, welches für die Fusion der IMM (innere Mitochondrienmembran) zuständig ist. Nach der Behandlung mit Rotenon konnte eine signifikante Erhöhung in den Proteinspiegeln von OPA1 beobachtet werden (Abbildung 3-11 B, D). Die Zugabe von Phenothiazin zu den Zellen zeigte zwar keine signifikanten Ergebnisse, aber eine eindeutige Tendenz zur Verringerung der verstärkten Expression von OPA1 unter Rotenon.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Rotenon eine gesteigerte Fission bewirkte, was bereits auf morphologischer Ebene beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 3.4.1). Darüber hinaus kam es kompensatorisch zu einer erhöhten Fusion der Mitochondrien. Phenothiazin war in der Lage die Toxin-induzierten genannten Proteinregulationen abzuschwächen.

Die verstärkte Fusion bzw. die kompensatorische Reaktion um Mitochondrien zu erhalten sollte auch auf Ebene von mitochondrialen Proteinen untersucht werden. Hierfür wurden Proteine analysiert, die im mitochondrialen Transport und der Atmungskette eine wichtige Rolle spielen. Zu den Transportproteinen gehören TOM20, welches ein Protein der OMM darstellt, und TIM23 als ein Protein der IMM. COX IV ist eine Untereinheit vom Komplex IV der Atmungskette, der für die Umwandlung von Sauerstoff und für die Bildung von ATP mit verantwortlich ist.

SH-SY5Y-Zellen wurden wie in Abbildung 3-11 behandelt und mithilfe des Western Blots betrachtet.



**Abbildung 3-12: Mitochondriale Proteine werden unter der Behandlung mit Rotenon verstärkt exprimiert**

SH-SY5Y-Zellen wurden nach 24 h mit 100 nM Phenothiazin bzw. Ethanol behandelt. Nach 3 h wurde mit 200 nM Rotenon bzw. Ethanol behandelt. 72 h später wurden die Zellen geerntet und die Zelllysate mithilfe des Western Blots

analysiert. Es wurden die Proteinspiegel von unterschiedlichen Markerproteinen untersucht. (A) Repräsentative Blots von TOM20, TIM23, COX IV und Tubulin. (B) Densitometrische Auswertung der angegebenen prozentualen Proteinspiegel der Proteine von (A) normiert auf Kontrolle (Vehikel) bzw. bei PHT+Rot erfolgte der Abgleich auf Rot. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mit dem t-Test (n=3). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Es konnte gezeigt werden, dass das Protein TOM20 nach der Rotenon-Behandlung nur eine leichte Veränderung im Vergleich zur Kontrolle zeigte, während die Spiegel von TIM23 und COXIV signifikant unter der Behandlung mit Rotenon angestiegen sind (Abbildung 3-12 A, B). Die Behandlung mit Phenothiazin zeigte keinen Einfluss auf die Transport-Proteine TOM20 und TIM23, die Proteinspiegel von COX IV wurden währenddessen unter PHT reguliert. Dieser Einfluss war nicht signifikant, jedoch konnten Tendenzen ermittelt werden. Die COX IV-Proteinspiegel wurden durch PHT verringert und auch in Kombination mit Rotenon zeigte sich eine Abnahme der Proteinspiegel, was auf eine Protektion durch PHT hinweist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zelle als Reaktion auf das Toxin kompensatorisch reagierte und versuchte eine bessere Generierung von ATP und verstärkten Transport von Proteinen in die Matrix sicherzustellen um die Biogenese der Mitochondrien zu steigern.

Die genannten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass es zwar unter dem Parkinson-Toxin Rotenon zu einer gesteigerten Fission der Mitochondrien kam, jedoch kompensatorisch auch die Fusion und die Biogenese dieser verstärkt ablief. Dies wurde durch erhöhte Expression von Proteinen, die im Transport und in der Atmungskette eine wichtige Rolle spielen, bestätigt. Dies deutete an, dass die Zelle durch diese Kompensation versuchte eine gesunde mitochondriale Homöostase zu bewahren. PHT war in der Lage die schädigenden Einflüsse von Rotenon auf Fission, Fusion und auf die Atmungskette zu verringern.

### **3.5 Der Einfluss vom Parkinson-Toxin Rotenon und vom Antioxidans Phenothiazin auf den Proteinabbau**

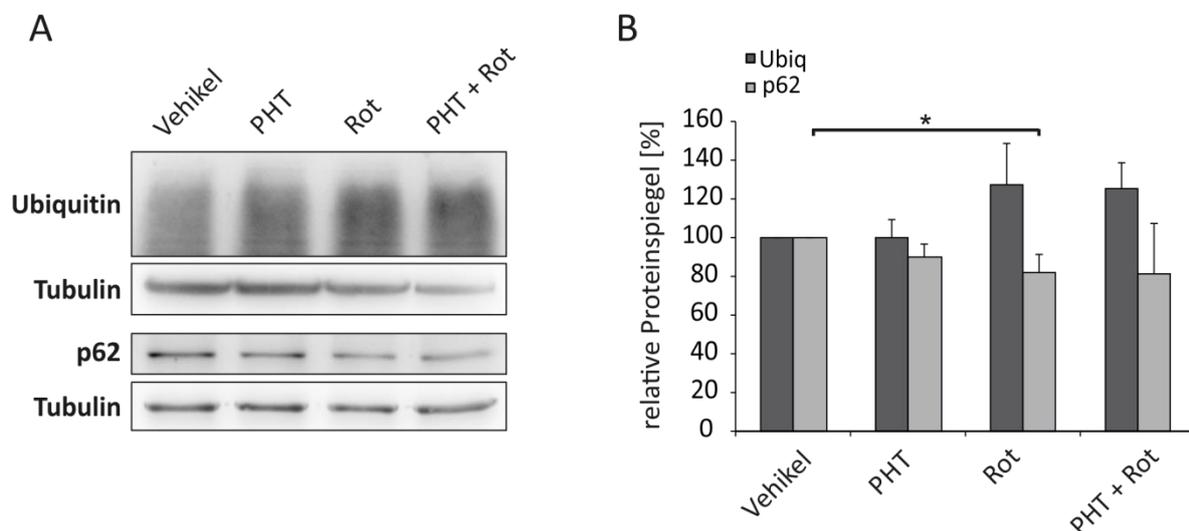
Mitochondriale Biogenese, Dynamik und Mitophagie stellen die Homöostase der Mitochondrien sicher. Die Mitophagie ist eine spezielle Form der Autophagie, letztere führt Proteine und Organellen dem lysosomalen Abbau zu (siehe Abschnitt 1.4.2). Auch das Proteasom ist für den Abbau von Proteinen zuständig (siehe Abschnitt 1.4.1). Der Abbau von Proteinen und Zellorganellen unterliegt einem komplexen Regulationsmechanismus, wobei die genannten Abbauewege sich gegenseitig beeinflussen können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass es unter der Behandlung mit dem Parkinson-Toxin Rotenon zur verstärkten Schädigung von Mitochondrien und damit zu einer Steigerung der Mitophagiemarker kam. Daher sollte

weiterhin untersucht werden, ob die Einflüsse von Rotenon mit weiteren Auswirkungen auf die Mitochondrien- und Protein-Homöostase einhergehen. Dafür wurden Proteine der Mitophagie, der Autophagie und des Proteasoms betrachtet. Zusätzlich wurde analysiert inwiefern sich das Antioxidans Phenothiazin hier als protektiv erweist.

### 3.5.1 Das Parkinson-Toxin Rotenon verstärkt die Autophagie, wogegen sich das Antioxidans Phenothiazin als protektiv erweist

Bei dem Abbau der Mitochondrien mittels Mitophagie, kommt es zunächst zur Akkumulation von PINK1 auf den Mitochondrien. Durch Phosphorylierung von mitochondrialen Proteinen kommt es anschließend zur Rekrutierung von Parkin (Matsuda et al., 2010). Dieses ubiquitiniert anschließend Proteine der OMM und markiert damit Mitochondrien für den Abbau (Sarraf et al., 2013). Anschließend bindet p62 an die ubiquitinierten Proteine und gewährleistet damit die Bindung an die Phagophore, sodass das Mitochondrium lysosomal abgebaut werden kann.

In den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 wurde deutlich, dass Rotenon die Expression der Proteine PINK1 und Parkin induziert, während PHT diesen Effekt verringert. Im Folgenden sollte untersucht werden inwiefern sich Rotenon und Phenothiazin auf die beiden nachfolgenden Proteine von Parkin, nämlich Ubiquitin und p62, auswirkt.



**Abbildung 3-13: Rotenon beeinflusst die Proteinexpression von Ubiquitin und p62**

SH-SY5Y-Zellen wurden ausgesät und 24h später mit 100 nM PHT oder EtOH behandelt. Nach weiteren 3 h wurde mit 200 nM Rotenon oder EtOH behandelt. Die Zellen wurden nach 72 h geerntet und die Zellysate mit dem Western Blot analysiert. (A) Repräsentative Blots von Ubiquitin, p62 und Tubulin, das als Ladekontrolle diente. (B) Densitometrische Auswertung der angegebenen prozentualen Proteinspiegel, die auf die Kontrolle (Vehikel) abgeglichen wurden. Bei der Behandlung mit PHT+Rot wurde auf Rot abgeglichen. Zu sehen sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test (n=3). \*  $p \leq 0,05$ .

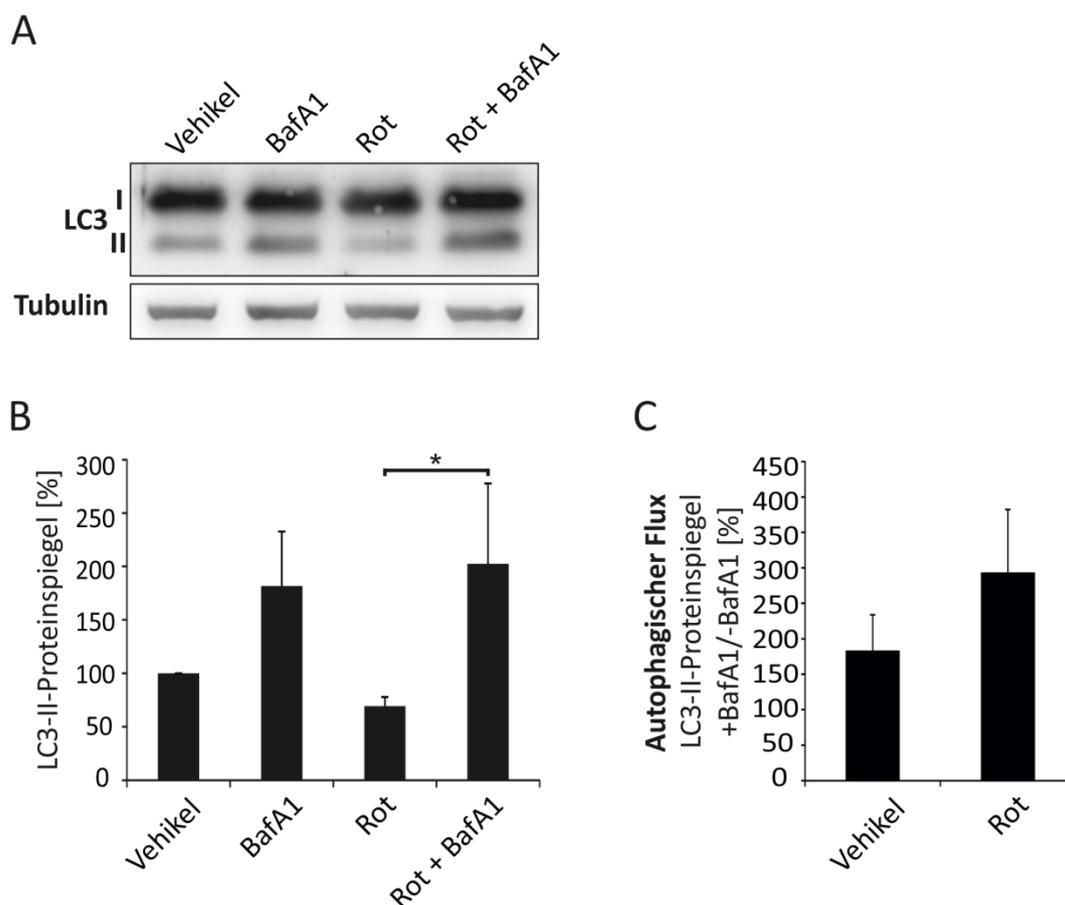
SH-SY5Y-Zellen wurden für die Analyse mit Phenothiazin in einer Konzentration von 100 nM vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 nM Rotenon. Die Zellen wurden nach 72 h geerntet und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 3-13 A, B).

Die Untersuchung von Ubiquitin unter der Behandlung mit Rotenon, ergab tendenziell eine Zunahme der ubiquitinierten Proteine, hierbei zeigte Phenothiazin keinen Einfluss. Bei der Untersuchung von p62 wurde deutlich, dass dessen Proteinspiegel tendenziell unter alleiniger Behandlung mit dem Antioxidans PHT gesunken sind. Unter der Behandlung mit Rotenon wurden die p62-Proteinspiegel signifikant verringert, wobei die zusätzliche Behandlung mit PHT keinen Einfluss auf p62 zeigte.

Aufgrund der Regulation vom Autophagieprotein p62 durch Rotenon, sollte der Einfluss des Komplex I-Inhibitors auf die Autophagie näher untersucht werden. Hierfür wurde das Protein LC3 untersucht. Beim LC3 handelt es sich um ein Protein der Phagophore, das an p62-gekoppelte Substanzen bindet und deren Einschluss und den Abbau im Autophagosom ermöglicht. Der Umsatz der Autophagie, auch als autophagischer Flux bezeichnet, kann mithilfe von Bafilomycin A1 (BafA1) analysiert werden. Dieses stellt einen Inhibitor der Autophagie dar, indem es die Ansäuerung der Lysosomen verhindert. So kann untersucht werden wie viele Autophagosomen für den Abbau gebildet werden.

Hierbei wurden SH-SY5Y-Zellen mit Rotenon und BafA1 behandelt und anschließend im Western Blot analysiert. Es konnte ermittelt werden, dass unter der alleinigen Behandlung mit BafA1 erwartungsgemäß die LC3-II Spiegel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Vehikel) zunahmen (Abbildung 3-14 A, B). Bei der alleinigen Behandlung mit Rotenon nahmen die Proteinspiegel von LC3-II im Vergleich zur Kontrolle ab. Dies verhielt sich ähnlich der Proteinspiegel von p62 (Abbildung 3-13). Bei der Behandlung mit Rotenon und BafA1 kam es zu einem signifikanten Anstieg der Proteinspiegel von LC3-II, verglichen mit denen der alleinigen Rotenon-Behandlung, was einen verstärkten autophagischen Flux andeutet. Folglich wurde dieser näher analysiert (Abbildung 3-14 C).

Dafür wurden die jeweiligen Proteinspiegel der Bafilomycin-Behandlung auf die Proteinspiegel abgeglichen, die nicht mit Bafilomycin behandelt wurden. Zwar war hierbei das Ergebnis nicht signifikant, jedoch konnte tendenziell ein verstärkter autophagischer Flux nach der Behandlung mit Rotenon verzeichnet werden.

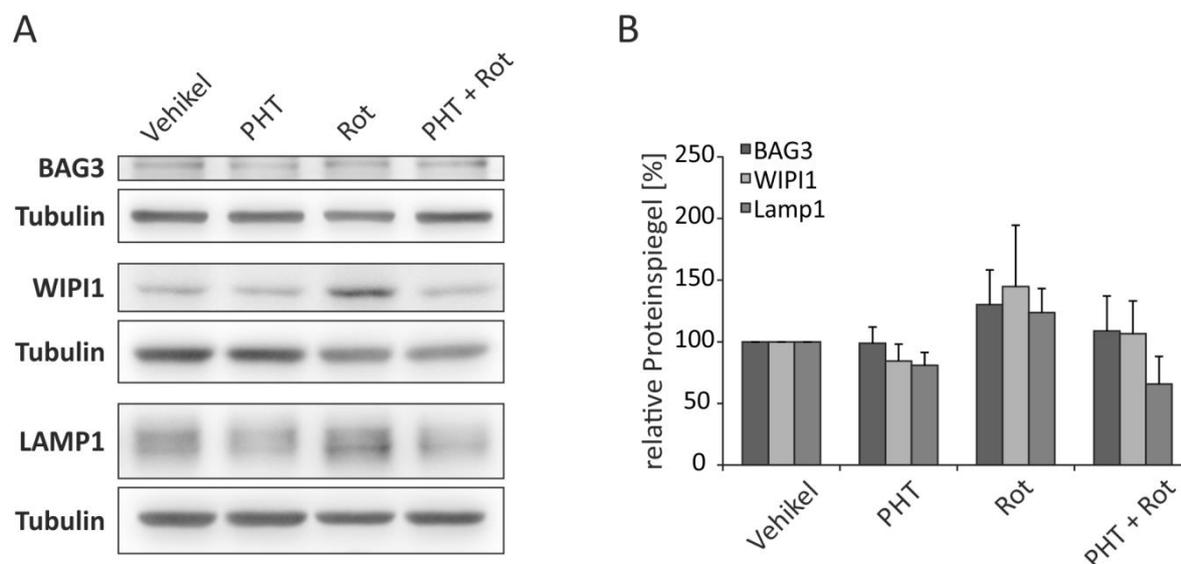


### Abbildung 3-14: Rotenon erhöht den autophagischen Flux

Nach Aussaat der SH-SY5Y-Zellen wurde nach 24h mit 200 nM Rotenon oder mit EtOH behandelt. 68 h später wurde mit Bafilomycin A1 in der Konzentration von 1 $\mu$ M oder mit DMSO behandelt. Nach weiteren 4 h wurden die Zellen geerntet und die Gesamtllysate mit Western Blot analysiert. (A) Repräsentative Blots von LC3 und Tubulin, das als Ladekontrolle diente. (B) Densitometrische Auswertung von prozentualen Proteinspiegeln von LC3II, abgeglichen auf die unbehandelte Kontrolle (Vehikel). Beim t-Test der Rotenon-Behandlungen, wurde auf Rotenon abgeglichen (Rot = 1). (C) Darstellung des autophagischen Flux. Berechnet wurde der Quotient von jeweiliger Behandlung mit BafA1 gegen Behandlung ohne BafA1. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mit dem t-Test (n=3). \*  $p \leq 0,05$ .

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass unter Rotenon die Mitophagie verstärkt ablief und es zu einem erhöhten autophagischen Flux kam. Jedoch deuten die reduzierten Proteinspiegel von p62 und LC3-II unter der Rotenon-Behandlung an, dass die Autophagie verringert abläuft. Aufgrund dieser diskrepanten Erkenntnisse, sollte der Einfluss von Rotenon und PHT auf die Autophagie näher analysiert werden. Hierfür wurden weitere Autophagie-Marker betrachtet. Die bisher untersuchten Marker liegen im Bereich der Elongation der Phagophorenmembran. Nachfolgend wurden Proteine der Initiation der Autophagie und des lysosomalen Abbaus analysiert (siehe Abschnitt 1.4.2). Das Protein BAG3 führt Proteinaggregate der Autophagie zu, während WIPI1 in der Initiierung der Phagophore seine Funktionen aufweist. Demgegenüber fungiert LAMP1 als lysosomaler Marker.

Hierbei wurden SH-SY5Y-Zellen analog zu Abbildung 3-13 analysiert. Die Proteinspiegel von allen drei Proteinen, namentlich BAG3, WIPI1 und LAMP1, waren unter der Behandlung mit Rotenon hochreguliert (Abbildung 3-15 A, B). Dies bestätigt den verstärkten autophagischen Flux. Die Proteinspiegel von allen drei untersuchten Proteinen konnten durch die Vorinkubation mit Phenothiazin vermindert werden. Allerdings war die Regulierung dieser Proteine sowohl unter Toxin- als auch unter Antioxidansbehandlung nicht signifikant.



#### Abbildung 3-15: Autophagiemarker werden durch Rotenon und Phenothiazin moduliert

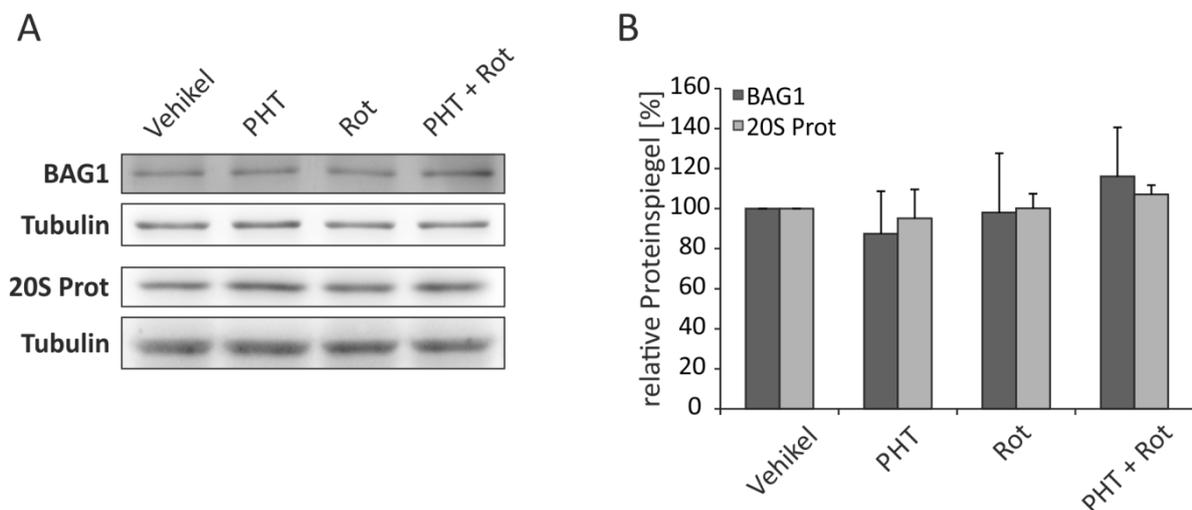
Die Zellen der Linie SH-SY5Y wurden 24 h nach dem Aussäen mit 100 nM PHT oder EtOH behandelt. Nach 3 h wurde mit 200 nM Rotenon oder EtOH behandelt. 72 h später wurden Zellysate mittels Western Blot untersucht. (A) Repräsentative Blots von BAG3, WIPI1, LAMP1 und Tubulin. Letzteres diente als Ladekontrolle. (B) Densitometrische Auswertung der angegebenen prozentualen Proteinspiegel, die auf die Kontrolle (Vehikel), bzw. bei PHT+Rot auf Rot abgeglichen wurden. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte mit dem t-Test (n=3).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Parkinson-Toxin Rotenon sowohl die Mitophagie als auch den autophagischen Flux induzierte. Hierbei konnte das Antioxidans Phenothiazin tendenziell den Einfluss von Rotenon teilweise vermindern.

### 3.5.2 Das Proteasom wird durch das Parkinson-Toxin Rotenon nicht beeinflusst

Proteasom und Autophagie sind zwei Abbauege der Zelle, die eng nebeneinander koordiniert werden (siehe Abbildung 1-11). In Abschnitt 3.5.1 konnte ermittelt werden, dass unter der Behandlung mit Rotenon die Proteinspiegel vom Co-Chaperon BAG3 verstärkt exprimiert wurden. Dies deutet eine verstärkte Bildung von Proteinaggregaten unter dem Parkinson-Toxin an, was für die Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankung bereits beschrieben ist

(siehe Abschnitt 1.1.4.3.5). Fehlgfaltete Proteine können ebenfalls über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden. Im Abschnitt 3.5.1 konnte eine verstärkte Ubiquitinierung von Proteinen nach der Behandlung mit Rotenon ermittelt werden. Ubiquitinierte Proteine können sowohl über die Autophagie als auch über das Proteasom abgebaut werden. Um zu untersuchen ob Rotenon und Phenothiazin ebenfalls das Proteasom beeinflussen, wurden im folgenden Abschnitt wichtige Marker des proteasomalen Abbaus analysiert. Hierbei wurde das Augenmerk auf das 20S-Proteasom gelegt, das den proteolytischen Kern des Proteasom-Komplexes darstellt. Auch das Co-Chaperon BAG1 wurde untersucht, welches einen Komplex mit dem Chaperon HSP70 bildet. Dieser führt abzubauenende Substanzen dem Proteasom zu (Gamerdinger et al., 2009).



**Abbildung 3-16: Rotenon hat keinen Einfluss auf die Expression von Markern des Proteasoms**

SH-SY5Y-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 100 nM Phenothiazin oder Ethanol behandelt. Nach 3 h erfolgte die Behandlung mit 200 nM Rotenon oder Ethanol. Geerntet wurde nach 72 h, anschließend wurden die Gesamtlysate mit dem Western Blot untersucht. Es wurde mit dem cBAG -Antikörper, der unter anderem BAG1 bindet, entwickelt. Weiterhin wurden immunreaktive Banden vom 20S-Proteasom und von Tubulin, welches als Ladekontrolle diente, angegeben. (A) Repräsentative Blots und (B) Densitometrische Auswertung der angegebenen prozentualen Proteinspiegel, die auf die Kontrolle (Vehikel) abgeglichen wurden. Im Falle der gleichzeitigen Behandlung mit Phenothiazin und Rotenon, wurde auf die alleinige Rotenon-Behandlung abgeglichen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test (n=3).

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Phenothiazin in einer Konzentration von 100 nM behandelt, bevor die Zugabe von 200 nM Rotenon erfolgte. Die Zellen wurden nach 72 h geerntet und mittels Western Blot analysiert.

Die Western Blots zeigten, dass die Proteinspiegel vom 20S-Proteasom und von BAG1 unter der Behandlung mit Rotenon keinen wesentlichen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle darstellten (Abbildung 3-16 A, B). Unter der Behandlung mit Phenothiazin kam es zur Regulierung der

BAG1-Spiegel, was evtl. auf Kompensationsreaktionen zur Verringerung des basalen oxidativen Stresses hindeutet, jedoch äußerte sich dieser Effekt nicht signifikant.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Parkinson-Toxin Rotenon keinen Einfluss auf die Expression proteasomaler Proteine hat.

## 4 Diskussion

Die Parkinson-Krankheit stellt eine neurodegenerative Erkrankung dar, die sich durch voranschreitenden Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra *pars compacta* (SNpc) und durch intrazelluläre Proteinaggregate, den Lewy-Körperchen, kennzeichnet. Der oxidative Stress spielt in dieser Erkrankung einen wesentlichen kausalen Faktor, da er für viele pathogene Veränderung in der PD ursächlich ist (siehe Abschnitt 1.1.4.3.7) (Boerger et al., 2019; Dias et al., 2013). Die Mitochondrien stellen hierbei die größte Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar, und sind damit für einen Großteil des oxidativen Stresses in der Zelle verantwortlich. Somit spielen diese Organellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit (Banerjee et al., 2009; Bose und Beal, 2016; Shefa et al., 2019). Dies wurde durch Untersuchungen bestätigt, die in Parkinson-Patienten Störungen in den Mitochondrien und der mitochondrialen Homöostase nachgewiesen haben. Hierbei wurden beispielsweise Beeinträchtigungen vom Komplex I in der mitochondrialen Atmungskette und Deletionen in der mitochondrialen DNA beschrieben (Bender et al., 2006; Schapira et al., 1990). Die Bedeutung der Mitochondrien in der PD wird ebenfalls dadurch bestätigt, dass familiäre Formen der PD häufig mit Mutationen in den Genen *Parkin*, *PINK1* und *DJ-1* einhergehen (Cookson, 2012). Hierbei handelt es sich um Proteine, die wichtige Funktionen in der mitochondrialen Homöostase aufweisen.

Die Funktion der Mitochondrien wird durch die mitochondriale Homöostase aufrechterhalten (Twig und Shirihai, 2015). Diese besteht aus der mitochondrialen Biogenese, der Fission und der Fusion, sowie der Mitophagie (siehe Abschnitt 1.3). Die mitochondriale Homöostase ist ein komplexes System, in dem sich jede einzelne Komponente regulierend auf die anderen Komponenten auswirken kann.

Es wird deutlich, welchen entscheidenden Faktor die Mitochondrien und deren Homöostase in der Pathogenese der PD spielen, weswegen in dieser Arbeit nähere Untersuchungen auf Ebene der Mitochondrien und deren Homöostase und Dynamik gemacht werden sollten. Dies sollte dazu dienen die pathogenen Mechanismen der PD näher zu untersuchen um diese Erkrankung besser zu verstehen. Ebenfalls sollten für diesen Zweck die Abhängigkeiten der einzelnen Komponenten der mitochondrialen Homöostase untersucht werden. Diese wurden in der bisherigen Erforschung der PD häufig nicht berücksichtigt, weshalb die Literatur überwiegend abgegrenzte Einblicke entweder in die Fission, die Fusion oder die Mitophagie beschreibt (Chu et al., 2013; Frank et al., 2012; Gao et al., 2015; Peng et al., 2016; Ramonet et al., 2013; Solesio et al., 2013).

Die Parkinson-Krankheit stellt die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit steigender Prävalenz dar. Die Tatsache, dass die derzeitige Therapie rein symptomatisch erfolgt, stellt für die Patienten eine unbefriedigende Situation dar. Wie bereits beschrieben, spielt der oxidative

Stress eine kausale Rolle in der Pathogenese der PD. Deshalb könnte eine antioxidative Therapie sich als protektiv in dieser Erkrankung erweisen. Ein antioxidativer Ansatz in der kausalen Therapie der PD, konnte sich bereits präklinisch als erfolgsversprechend zeigen (Jin et al., 2014; Koppula et al., 2012). Jedoch konnte dies in klinischen Daten meist nicht verifiziert werden (Etminan et al., 2005; Negida et al., 2016; Weber und Ernst, 2006). Vermutlich liegt es an der Komplexität des menschlichen Organismus weshalb die Antioxidantien nicht an ihren zerebralen Wirkort gelangen. Somit ist es wichtig nach Substanzen zu suchen, die sich aufgrund ihrer molekularen Struktur und ihrer antioxidativer Potenz im menschlichen Gehirn effektiver anreichern können. Das Phenothiazin (PHT) stellt eine solche vielversprechende Substanz dar. Es handelt sich um ein neuroprotektives Antioxidans, welches seine Potenz präklinisch bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich entfaltet. Untersuchungen belegen die neuroprotektive Wirkung von PHT im Modell der Parkinson-Krankheit (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010; Moosmann et al., 2001; Tapias et al., 2019). Nun sollte in dieser Arbeit ermittelt werden, wie sich das Antioxidans PHT auf die mitochondriale Homöostase im Parkinson-Modell auswirkt.

#### **4.1 Verstärkte Einleitung der Mitophagie im Parkinson-Modell wird durch das Antioxidans Phenothiazin vermindert**

Die Mitophagie stellt eine Unterform der Autophagie dar und ist für den spezifischen Abbau von Mitochondrien verantwortlich (Lemasters, 2005). Hierbei kommt es auf geschädigten Mitochondrien zu einer Akkumulation der Kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*), die wiederum die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin aus dem Zytosol rekrutiert (siehe Abschnitt 1.3.5.1) (Jin et al., 2010; Narendra et al., 2010; Schubert et al., 2017). Nachfolgend werden mitochondriale Proteine ubiquitiniert um das Mitochondrium an das Autophagosom binden zu können (Kawajiri et al., 2010; Sarraf et al., 2013). Der Abbau der Mitochondrien erfolgt schließlich im Autolysosom analog zu der Autophagie (siehe Abschnitt 1.4.2).

Christ konnte auf morphologischer Ebene in SH-SY5Y Zellen zeigen, dass es unter der Behandlung mit dem Parkinson-Toxin Rotenon zu einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials kam (siehe Abbildung 1-5) (Christ, 2010). Hierbei konnte mithilfe der Vorinkubation mit dem Antioxidans PHT das mitochondriale Potential stabilisiert und damit die Integrität der Mitochondrien erhalten werden.

In dieser Arbeit sollte die Erkenntnis von Christ näher analysiert werden. Hierzu wurden Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt. Da eine Verringerung im Membranpotential der Mitochondrien zu einer Akkumulation von PINK1 auf der äußeren Mitochondrienmembran führt

und damit die Mitophagie eingeleitet wird, sollten vorerst die Proteinspiegel von PINK1 unter der Einwirkung vom Rotenon untersucht werden.

Als Modell wurde in dieser Arbeit überwiegend die humane Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y verwendet, da sie sich als dopaminerges experimentelles System etabliert hat (Biedler et al., 1978) (siehe Abschnitt 2.1.1). Die genannten Zellen exprimieren Enzyme des Dopamin-Stoffwechsels, wie Tyrosin- und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylasen und verfügen über den Dopamin-transporter. Bei Untersuchungen im Zusammenhang mit Transfektionen bzw. Mikroskopie wurden die humanen HEK-Zellen verwendet, da sie leicht zu transfizieren sind und sich aufgrund der breitflächigen Morphologie gut mikroskopisch untersuchen lassen.

Beim Rotenon handelt es sich um einen Komplex I-Inhibitor, der als Modells substanz für die Parkinson-Krankheit dient. Es bildet einen guten Phänotyp mit zahlreichen typischen Einflüssen der PD-Erkrankung ab (Martinez und Greenamyre, 2012; Tieu, 2011). Hierzu zählen u. a. die verringerte Aktivität von Komplex I und die verstärkte Generierung von ROS, die in Parkinson-Patienten beschrieben wurde (siehe Abschnitt 1.2.2).

Es konnte in dieser Arbeit ermittelt werden, dass unter der Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor, abhängig von Inkubationszeit und Toxinkonzentration, die Proteinspiegel von PINK1 hochreguliert wurden (Abbildung 3-1). Dies unterstützte die Annahme, dass das verringerte Membranpotential unter der Behandlung mit Rotenon, das von Christ beobachtet wurde, zu einer verstärkten mitochondrialen Akkumulation von PINK1 führte (Christ, 2010). Dies deutete auf eine verstärkte Einleitung der Mitophagie hin.

Rotenon hemmt den Komplex I in den Mitochondrien, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert werden (Hartley et al., 1994; Li et al., 2003). Bislang ist ungeklärt, ob der beschriebene Effekt auf das Mitophagie-Protein PINK1 auf der spezifischen Komplex I-Inhibition oder auf der nachfolgenden unspezifischen oxidativen Reaktion beruht. Um dies zu untersuchen, wurden PINK1-Proteinspiegel unter der Behandlung mit weiteren oxidativen Substanzen analysiert (Abbildung 3-2). Es stellte sich hierbei heraus, dass die Hochregulation der PINK1-Proteinspiegel, die unter der Rotenon-Behandlung zu verzeichnen war, auch mit dem anderen Komplex I-Inhibitor, dem MPP<sup>+</sup>, signifikant bewirkt werden konnte. Das hätte vermuten lassen, dass der Einfluss auf PINK1 durch die Komplex I-Inhibition zustande kommt. Jedoch konnte ebenfalls unter der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das eigens eine reaktive Sauerstoffspezies darstellt, eine signifikante Induktion von PINK1 beobachtet werden. Diese Induktion konnte bei zwei unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M) verzeichnet werden. Hierbei war die Intensität des PINK1-Anstiegs bei der höheren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration verstärkt ausgeprägt, was in einem stärkeren Grad der Schädigung ersichtlich war. Tendenziell war ebenfalls unter der

Behandlung mit Paraquat, welches durch Interaktion mit den Elektronen der mitochondrialen Atmungskette ROS generiert, eine Hochregulation von PINK1 zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt von Rotenon auf die PINK1-Proteinspiegel auf der Generierung von ROS beruht. Dieser Effekt trat abgeschwächt ebenfalls unter der Behandlung mit Buthioninsulfoximin (BSO) auf. Dieses hemmt die Glutamatcysteinligase und verhindert damit die Synthese vom Antioxidans Glutathion, weshalb anschließend ROS nicht ausreichend abgefangen werden können (Drew und Miners, 1984). Die Wirkung des BSO ist demnach indirekt oxidativ, weshalb eventuell die gewählte Behandlungskonzentration von 400  $\mu\text{M}$  zu gering war um einen eindeutigen signifikanten oxidativen Effekt auszulösen (Yamada et al., 2011).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass der Einfluss des Komplex I-Inhibitors Rotenon auf die Proteinspiegel von PINK1 und damit auf die Mitophagie auf einem oxidativen Effekt beruht.

Wie bereits erwähnt, sollte in dieser Arbeit der protektive Einfluss von PHT in der Parkinson-Pathogenese untersucht werden. Es gibt bereits Hinweise auf neuroprotektiven Einfluss von PHT im Bereich der PD in Invertebraten, in Nagern und in dopaminergen zellulären Systemen (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010; Tapias et al., 2019). Auch die erwähnte Untersuchung von Christ konnte verdeutlichen, dass mittels Vorinkubation von PHT das mitochondriale Membranpotential stabilisiert werden konnte, sodass die Toxizität des Rotenons abgeschwächt werden konnte (Christ, 2010). Der Einfluss von PHT in der Parkinson-Pathogenese sollte hier näher analysiert werden, dazu wurden die Proteinspiegel von PINK1 unter dessen Einfluss untersucht. Es stellte sich heraus, dass mittels Vorbehandlung mit Phenothiazin der Rotenon-abhängige Anstieg der PINK1-Proteinspiegel signifikant um 65 % verringert werden konnte (Abbildung 3-3). Hierbei wirkte das Phenothiazin in der Konzentration von 100 nM, wodurch die hohe protektive Effizienz dieses Antioxidans deutlich wurde. Das Phenothiazin war außerdem in der Lage bereits basale PINK1-Proteinspiegel, die nicht mit Rotenon behandelt wurden, signifikant leicht zu verringern. Dies zeigte, dass dieses Antioxidans in der Lage war basalen oxidativen Stress zu reduzieren. Aufgrund der Tatsache, dass die verstärkte Proteinexpression von PINK1 unter dem Einfluss von Rotenon auf einem oxidativen Effekt beruht (siehe Abbildung 3-2), kann vermutet werden, dass der Einfluss von PHT auf seiner antioxidativen Wirkung basiert.

Bei der Betrachtung der Regulation von PINK1 unter der Behandlung mit Rotenon, fiel auf, dass der Anstieg von PINK1 immer stark ausgeprägt war. Wie bereits erwähnt, bildet die Behandlung mit Rotenon ein gutes Parkinson-Modell ab, weshalb davon auszugehen ist, dass in der Pathogenese der PD PINK1 eine wichtige Rolle spielt. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass Mutationen im *PINK1*-Gen familiäre Formen der PD verursachen (Cookson, 2012; Morais et al., 2007;

Racovic et al., 2011). Hierbei kommt es oft zum Ausbruch der frühzeitig eintretenden PD (EOPD).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Rotenon durch das Propagieren von oxidativem Stress die Mitophagie verstärkt initiierte. Eine Vorbehandlung mit Phenothiazin wirkte sich protektiv aus, indem es einen großen Teil der ROS abfing. Damit wurden weniger Mitochondrien der Mitophagie zugeführt.

## **4.2 Mitophagie-Proteine unter dem Einfluss des Parkinson-Toxins Rotenon und des Antioxidans Phenothiazin**

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Mitophagie unter dem Einfluss vom Parkinson-Toxin Rotenon vermehrt eingeleitet wurde. Gleichzeitig wurde dies durch die Vorinkubation mit Phenothiazin vermindert. Nachfolgend sollte der Einfluss von Rotenon auf den weiteren Ablauf der Mitophagie untersucht werden, indem weitere Proteine dieses Abbauweges betrachtet werden sollten. Hierbei wurde ebenfalls die Rolle von PHT untersucht.

Nachdem die Kinase PINK1 auf geschädigten Mitochondrien akkumuliert, rekrutiert sie die Ligase Parkin aus dem Zytosol (Jin et al., 2010; Narendra et al., 2010; Schubert et al., 2017). Diese ubiquitiniert nachfolgend Proteine der OMM und löst damit den nachfolgenden Einschluss des Mitochondriums ins Autophagosom aus, der mit dem mitochondrialen Abbau im Autolysosom endet (siehe Abschnitt 1.3.5.1). Zwei der Proteine der OMM, die von Parkin ubiquitiniert werden, sind die Proteine Mitofusin 1 (Mfn1) und Mitofusin 2 (Mfn2). Diese beiden stellen somit Substrate von Parkin dar, sie fungieren jedoch ebenfalls als Proteine der mitochondrialen Fusion (siehe Abschnitt 1.3.4.1) (Eura, 2003; Gegg et al., 2010; Hales und Fuller, 1997; Poole et al., 2010). Durch den Abbau der Mitofusine können diese nicht mehr zur Fusion beitragen. Damit wird eine Verschmelzung von geschädigten Mitochondrien verhindert, um eine gesunde Homöostase der Mitochondrien zu gewährleisten (Tanaka et al., 2010; Wiedemann et al., 2013).

Bei der Untersuchung der Proteinspiegel von Parkin unter dem Einfluss von Rotenon und Phenothiazin wurde deutlich, dass dieses Protein tendenziell ähnlich reguliert wurde wie die Proteinspiegel von PINK1 (siehe Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4). Zwar war diese Regulation nicht signifikant, was auf die großen Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten zurückzuführen ist, jedoch konnte ein eindeutiger Trend beobachtet werden. Darüber hinaus konnte der Anstieg von Parkin unter Rotenon von Peng et al. und von Lee et al. sowohl in adrenalen Tumorzellen der Ratte als auch in humanen Retinalzellen signifikant bestätigt werden

(Lee et al., 2014; Peng et al., 2019). Dies bekräftigte die Erkenntnis der verstärkten Mitophagie unter dem Einfluss von Rotenon. Die Vorinkubation mit PHT konnte den Anstieg von Parkin verringern, weswegen man hier von einem protektiven Einfluss ausgehen kann.

Bei der Betrachtung der Substrate von Parkin wurde gezeigt, dass die Proteinspiegel von Mfn2 unter der Behandlung mit Rotenon und Phenothiazin nicht verändert wurden (Abbildung 3-4). Demgegenüber kam es unter der Rotenon-Behandlung zu einer signifikanten Hochregulation der Proteinspiegel von Mfn1. Dies zeigte, dass die beiden Proteine Mfn1 und Mfn2 auf die Behandlung mit dem Parkinson-Toxin Rotenon unterschiedlich reagierten. Dies erschien zunächst überraschend, da beide Proteine in der mitochondrialen Fusion sehr eng interagieren können und dadurch in der Lage sind die Fusion gemeinsam in heterotypischen Dimeren Mfn1-Mfn2 zu vollziehen (Gegg, 2003; Koshiba et al., 2004). Jedoch ist inzwischen bekannt, dass die Funktionsspektren beider Proteine relativ unterschiedlich sind. Während Mfn1 überwiegend in der Fusion agiert und hier scheinbar auch das wichtigere Protein von beiden darstellt (Chen et al., 2003; Cipolat et al., 2004), ist das Spektrum von Mfn2 etwas vielfältiger. Es agiert auch in Signalwegen unabhängig der Fusion, wie beispielsweise in der Apoptose und der Zellproliferation (Chen et al., 2004; Neuspiel et al., 2005; Wu et al., 2016). Darüber hinaus kann die Fusion ebenfalls über homotypische Dimere Mfn1-Mfn1 vollzogen werden. Somit schien die unterschiedliche Reaktion beider Proteine unter der Behandlung mit Rotenon nachvollziehbar. Mfn2 unterlag demnach keiner Veränderung unter Rotenon, was auf eine untergeordnete Rolle von Mfn2 in der mitochondrialen Dynamik zurückzuführen wäre. Die Proteinspiegel von Mfn1 hingegen wurden unter Rotenon hochreguliert. Scheinbar wurde Mfn1 unter diesen Versuchsbedingungen nicht abgebaut, sondern akkumulierte. Dadurch, dass dieses Protein hauptsächlich in der Fusion fungiert, lässt sich herleiten, dass es unter dem Einfluss von Rotenon zu einer verstärkten Fusion der Mitochondrien kam. Dies könnte eine Kompensationsreaktion auf die vermehrte Mitophagie darstellen, in der das intakte restliche mitochondriale Netzwerk eine verstärkte Fusion durchläuft, um den Austausch der verbliebenen gesunden mitochondrialen Komponenten zu ermöglichen und damit die mitochondriale Homöostase zu gewährleisten. In Bezug auf Phenothiazin, hatte dieses Antioxidans keinen Einfluss auf die Proteinspiegel von Mfn1, was darauf schließen lässt, dass die verstärkte Fusion unter der Behandlung mit Rotenon nicht verringert wird.

Bei der Untersuchung von Mfn1 und Mfn2 gab es keinen Hinweis darauf, dass diese Proteine als Substrate von Parkin fungierten, da sie im Parkinson-Modell nicht verstärkt abgebaut wurden. Demgegenüber kam es beim Mfn1 sogar zum Anstieg der Proteinspiegel, was auf eine erhöhte Fusion schließen lässt. Jedoch ist zu erwähnen, dass es neben Mfn1 und Mfn2 weitere Proteine gibt, die in der Lage sind den PINK1-Parkin-Abbau einzuleiten (Kubli und Gustafsson, 2012; Sarraf et al., 2013). Vermutlich agieren hier andere Proteine als Mitophagie-Substrate und

ermöglichen damit den weiteren Ablauf der Mitophagie. Beispielsweise wären Miro (*Mitochondrial Rho GTPase 1*) und VDAC (*Voltage-dependent anion channel*) zu nennen.

Bei der Untersuchung von Mfn1 fiel zusätzlich eine Veränderung in der Isoform 3 (If3) dieses Proteins auf (siehe Abbildung 3-4). In den Proteinspiegeln der If3 kam es unter der Behandlung mit Rotenon zu einem signifikanten Anstieg. Hier führte die Vorbehandlung mit Phenothiazin zur signifikanten Reduktion um 60 % in den Proteinspiegeln der If3. Auffällig war ebenfalls, dass dieses Protein ähnlich dem Protein PINK1 reguliert wurde. Über die Isoform 3 ist bislang noch nicht viel bekannt, weshalb dieses Protein in der vorliegenden Arbeit näher analysiert wurde.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass es unter Rotenon zu einer verstärkten Mitophagie kam, worauf Phenothiazin einen protektiven Einfluss hatte, indem es diesen Effekt verminderte. Weiterhin stellte sich heraus, dass es im Parkinson-Modell zu einer verstärkten Fusion von Mitochondrien kam. Außerdem wurde deutlich, dass unter dem Einfluss von Rotenon und Phenothiazin die Isoform 3 des Fusion-Proteins Mfn1 ähnlich reguliert wurde wie das Mitophagieprotein PINK1.

### **4.3 Zwischen den Mitophagieproteinen PINK1 und Mitofusin 1 Isoform 3 besteht ein Zusammenhang**

Die Regulation der Isoform 3 von Mfn1 unter der Behandlung mit Rotenon schien eine interessante Beobachtung zu sein. Die kanonische Isoform 1 von Mfn1 ist sehr gut beschrieben und ist von ihrer Funktion überwiegend in der Fusion von Mitochondrien anzusetzen (siehe Abschnitt 1.3.4.2) (Chen et al., 2003; Cipolat et al., 2004; Eura, 2003). Von der Isoform 3 ist bisher nur die Protein- und die mRNA-Sequenz bekannt, während die Funktion unerforscht blieb (AceView, 2019; UniProt, 2019). Aus diesem Grund wurde dieses Protein auf seine Funktion und auf dessen Regulation hin untersucht.

Es fiel auf, dass die Proteinspiegel von beiden Isoformen (1 und 3) unter der Behandlung mit Rotenon angestiegen sind. Die erhöhte Regulation der If3 könnte hier entweder auf dem oxidativen Einfluss vom Rotenon oder auf der dadurch bedingten Hochregulation der If1 basieren. Um dies zu analysieren, wurde Mfn1 If1 mithilfe von drei unterschiedlichen Plasmiden überexprimiert. Alle drei Plasmide waren in der Lage die If1 von Mfn1 signifikant zu erhöhen (Abbildung 3-5). Hinzu kam, dass mit der If1-Hochregulation in allen Ansätzen signifikant gesteigerte Proteinspiegel der If3 einhergingen. Dies ließ vermuten, dass die If1 einen regulatorischen Einfluss auf die If3 aufwies. Weiterhin fiel unter der Behandlung mit Rotenon und

Phenothiazin die Ähnlichkeit der Regulation zwischen den Proteinspiegeln von PINK1 und Mfn1 If3 auf. Deswegen wurde auch PINK1 unter dem Einfluss der Überexpression von Mfn1 If1 untersucht. Die Analyse ergab, dass auch die Proteinspiegel von PINK1 signifikant hochreguliert wurden und sie verhielten sich ähnlich den Proteinspiegeln von Mfn1 If3. Damit wurde deutlich, dass durch die Überexpression von Mfn1 If1 ebenfalls eine Überexpression in Mfn1 If3 erzeugt werden konnte. Hiermit ging ebenfalls eine Hochregulation von PINK1 einher.

Bisher wurde angenommen, dass das vom Mfn1-Antikörper detektierte Protein mit der Größe von 71 kDa, die Isoform 3 darstellt. Das liegt daran, dass diese Isoform in der genannten Größenordnung beschrieben ist (UniProt, 2019). Jedoch könnte es sich hierbei auch um eine post-translationalen Modifikation, beispielsweise um eine proteolytisch gespaltene Form von Mfn1 If1, handeln. Um dies zu ermitteln, wurde mittels RNA-Interferenz die Expression von Mfn1 reduziert (Abbildung 3-6). Hierbei wurde eine siRNA gewählt, die an einer RNA-Sequenz bindet, die sowohl bei If1 als auch If3 vorhanden ist. Eine weitere siRNA war spezifisch für die If3, da sie diese exonübergreifend bindet. Der If3 fehlen im Vergleich zur If1 Exon 12 und 13, die genannte siRNA If3 bindet am Ende von Exon 11 und am Anfang von Exon 14 und ermöglicht so ihre Spezifität.

Es konnte gezeigt werden, dass die unspezifische siRNA sowohl die Proteinspiegel von If1 als auch von If3 signifikant reduzierte, wohingegen die spezifische If3 siRNA nur die Proteinbande bei 71 kDa signifikant verringern konnte. Das bedeutet folglich, dass es sich beim Protein mit der Größe von 71 kDa um die If3 handelt. Da PINK1 bisher einer ähnlichen Entwicklung wie die If3 unterlag, wurde auch dieses Protein in dem Herunterregulationsversuch untersucht. Hierbei kam es zu einer signifikanten Abnahme von PINK1 entsprechend der If3-Proteinspiegel. Dies zeigte, dass der Einfluss auf PINK1 über die If3 ausgeübt wurde und unabhängig von der If1 erfolgte. Dadurch wurde deutlich, dass es sich bei dem beobachteten Protein tatsächlich um Mfn1 If3 handelte und dass die Regulation von PINK1 über diese If3 erfolgte.

Bislang gab es keine Erkenntnisse darüber, dass Mfn1 einen Einfluss auf PINK1 ausübt, jedoch war bislang auch die Funktion der If3 nicht bekannt. Umgekehrt ist ein Einfluss von PINK1 auf Mfn1 bereits beschrieben, hierbei dient PINK1 zum Abbau von Mfn1 (Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010; Rakovic et al., 2011). Da ein Einfluss von PINK1 auf die If1 beschrieben ist und die If3 in der Lage ist PINK1 zu regulieren, wurde untersucht, ob diese Kinase auch in der Lage ist die Proteinspiegel der If3 zu verändern. Hierfür wurde PINK1 mittels siRNA herunterreguliert und anschließend wurden die Proteinspiegel von Mfn1 betrachtet (Abbildung 3-7). Es wurde hierbei deutlich, dass die Herunterregulation von PINK1 mit einer Abnahme der Proteinspiegel von Mfn1 If3 einherging. Aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der Herunterregulation

zwischen den jeweiligen Experimenten, war dieses Ergebnis nicht signifikant, jedoch konnte eine eindeutige Tendenz ermittelt werden. Das zeigt, dass umgekehrt PINK1 ebenfalls in der Lage ist die If3 von Mfn1 zu regulieren.

Zur Bestätigung dieser Regulation, wurde weiterhin eine Überexpression von PINK1 durchgeführt und es stellte sich heraus, dass auch hier eine Hochregulation von PINK1 mit einer Erhöhung von If3 einherging (Abbildung 3-7). Die If1 hingegen wurde abgesenkt. Das bestätigt, dass die If1 ein Substrat von PINK1 darstellt und bei erhöhten PINK1-Spiegeln verstärkt abgebaut wird. Daher ist der Einfluss zwischen If3 und PINK1 unabhängig von der If1. Zu erwähnen ist, dass die Überexpression von PINK1 nur einmal durchgeführt wurde, weshalb es dazu diente Tendenzen zu ermitteln. Die Tendenz, die hier beobachtet wurde, unterstützt die Annahme, dass die beiden Proteine in einer Abhängigkeit stehen.

Der Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen PINK1 und Mfn1 If3 äußerte sich darin, dass jedes Protein in der Lage war das jeweils andere Protein zu regulieren und das in einem ähnlichen Ausmaß wie es selbst reguliert wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in dieser Arbeit erstmals die Funktion vom Protein Mfn1 If3 untersucht wurde. Offensichtlich handelt es sich dabei um ein Protein, welches im Zusammenhang mit PINK1 steht und wahrscheinlich von seiner Funktion in der Mitophagie einzuordnen ist. Der Grund für die Interaktion zwischen den beiden Proteinen PINK1 und Mfn1 If3 könnte in einer Stabilisierungsfunktion liegen.

Durch die Herunterregulation von Mfn1 If3 kam es zu verringerten PINK1-Spiegeln. Dies zeigte, dass PINK1 ohne Mfn1 If3 nicht auf der OMM stabilisiert werden konnte. Somit wurde deutlich, dass Mfn1 If3 vermutlich ein Stabilisierungsprotein für PINK1 darstellt. Gleichzeitig zeigte sich in dieser Arbeit, dass nach Regulation von PINK1 eine ähnliche Regulation von Mfn1 If3 erfolgte. Dies lässt vermuten, dass PINK1 in der Lage ist Mfn1 If3 zu rekrutieren um auf der mitochondrialen Membran stabilisiert werden zu können.

Die Beobachtung, dass es bei der Überexpression von Mfn1 If1 zu einer Hochregulation in den Proteinspiegeln von If3 und PINK1 kam, ist in dieser Annahme nicht eindeutig einzuordnen. Beim Mfn1 If1 handelt es sich um ein Fusionsprotein. Demgegenüber stellen PINK1 und wahrscheinlich auch Mfn1 If3 Mitophagie-Proteine dar. Ein Protein, welches gleichzeitig die Erhaltung des tubulären Netzwerkes durch Fusion sowie den Abbau der Mitochondrien durch Mitophagie reguliert scheint widersprüchlich. Wahrscheinlich übt die If1 keine regulatorische Funktion auf die If3 aus. Der Effekt, dass If3 und PINK1 unter der Überexpression von If1 ansteigen, wird vermutlich durch die Abhängigkeit der einzelnen Bestandteile der mitochondrialen Homöostase hervorgerufen. Mutmaßlich kommt es durch die Überexpression vom Fusionsprotein Mfn1 If1 zu stark fusionierten mitochondrialen Netzwerken. Diese sind in der Lage den

mitochondrialen Inhalt über das gesamte mitochondriale Kompartiment zu verteilen. Dies dient zur Optimierung von mitochondrialen Funktionen und verhindert die Ansammlung von mitochondrialen Schäden (Chan, 2012; Chen et al., 2010; Westermann, 2012). Schwachstellen im Netzwerk werden besser erkannt um sich dem anschließend entledigen zu können, weshalb in einem interdependenten Netzwerk anschließend eine erhöhte Mitophagie zu erwarten ist. Das wurde durch Anstieg von PINK1 und Mfn1 If3 deutlich. Zwar wird in der Literatur eher gegensätzlich argumentiert, da eigentlich durch die Fission die Mitophagie eingeleitet wird (Chan, 2012; Frank et al., 2012; Twig et al., 2008), doch gibt es auch Erkenntnisse, die diese Annahme bestätigen (Fu et al., 2013).

Grundlegend verwundert es nicht, dass die If3 von Mfn1 eine Funktion in der Zelle aufweist, wenn man das Fusionsprotein OPA1 betrachtet. Dieses vermittelt in enger Zusammenarbeit mit den Mitofusinen 1 und 2 die Fusion der Mitochondrien (Olichon et al., 2002; Song et al., 2009). Die GTPase OPA1 besitzt ebenfalls mehrere Isoformen, die durch alternatives Spleißen generiert werden, die ihre Funktionen in den Mitochondrien aufweisen. Diese reichen von Fusion, über Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie bis zur Erhaltung der mtDNA. Vermutlich ist die Kombination dieser Menge an Isoformen von OPA1 erforderlich um eine mitochondriale Dynamik unter unterschiedlichen zellulären Bedingungen zu ermöglichen (Del Dotto et al., 2017, 2018).

PINK1 wird fortwährend vom gesunden Mitochondrium internalisiert und verbleibt erst auf der OMM, wenn die Organelle ein verringertes Membranpotential aufweist (siehe Abschnitt 1.3.5.2) (Narendra et al., 2010). Hierbei wurde bislang angenommen, dass TOM-Proteine (*translocase of the outer membrane*) für die Stabilisierung verantwortlich sind, jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht ganz geklärt (Lazarou et al., 2012; Okatsu et al., 2015; Sekine und Youle, 2018). Für die If1 von Mfn1 ist beschrieben, dass sie durch ihre HR2-Domäne benachbarte Mitochondrien bindet, damit die GTPase-Domäne die Fusion vollziehen kann (Cao et al., 2017; Koshiba et al., 2004; Yan et al., 2018). Der If3 fehlen im Vergleich zur If1 110 Aminosäuren zwischen der HR1-Domäne und der darauf folgenden Transmembrandomäne (UniProt, 2019). Trotzdem besitzen sowohl die If3 als auch die If1 die gleichen funktionalen Domänen, weshalb die grundsätzlichen Eigenschaften ähnlich sein sollten. Jedoch ist zu vermuten, dass mit der fehlenden Aminosäuresequenz veränderte sterische Verhältnisse einhergehen, somit die Funktionen dieser Domänen von der If1 abweichen sollten. Fakt ist, dass die If3 die äußere mitochondriale Membran (OMM) mit zwei Transmembraneinheiten durchspannt, weswegen sie stabil ans Mitochondrium gebunden ist (siehe Abschnitt 1.3.4.2). Hier könnte sie direkt oder mithilfe von anderen Proteinen in der Lage sein PINK1 auf der OMM zu stabilisieren. Unter dieser Annahme, würde im Falle von mitochondrialer Depolarisation die Kinase PINK1 mittels des

membranständigen Proteins Mfn1 If3 auf der OMM stabilisiert werden, weshalb PINK1 dann die Ligase Parkin aus dem Zytosol rekrutieren könnte. Jedoch ist für alle Dynamin-ähnlichen GTPasen bekannt, dass sie nicht nur membranständig sind, sondern hier auch mit Membranen interagieren (Kar et al., 2017). Beispielsweise gehört DLP-1 ebenfalls zu den Dynamin-ähnlichen GTPasen, und fungiert in der Zelle als ein Protein, das die Fission der Mitochondrienmembranen bewerkstelligt (Ingermann et al., 2005). Die GTPase OPA1 aus derselben Proteinfamilie, vermittelt hingegen die Fusion der inneren Mitochondrienmembranen (Olichon et al., 2002; Song et al., 2009). Folglich sollte auch die If3 von Mfn1 eine Interaktion mit Membranen vollziehen. Es könnte sein, dass die If3 die äußere Mitochondrienmembran so verändert, dass PINK1 dadurch stabilisiert werden kann. Oder die If3 könnte über ein anderes Protein seine Interaktion mit PINK1 regulieren, beispielsweise über die TOM-Proteine, die bereits in diesem Zusammenhang beschrieben wurden (Lazarou et al., 2012; Okatsu et al., 2015; Sekine und Youle, 2018). Jedoch ist hierüber bisher nichts beschrieben.

Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei der Mitophagie um ein System handelt, welches noch nicht gänzlich erforscht ist. In dieser Arbeit wurde das Mfn1 If3 als ein zusätzliches Protein der Mitophagie aufgedeckt und in diesem System auf seine Funktion hin untersucht. Die Proteine Mfn1 If3 und PINK1 stehen eindeutig in einem Zusammenhang, scheinbar ist hier das Mfn1 If3 für die Stabilisierung von PINK1 in der Mitophagie verantwortlich.

#### **4.4 Wirkmechanismus des Phenothiazins in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit**

In dieser Arbeit hat sich das Phenothiazin auf Ebene der Mitophagie als protektiv herausgestellt. Es war in der Lage die toxischen Effekte von Rotenon zu vermindern, indem es die, durch das Toxin induzierte, Mitophagie abschwächen konnte.

Aufgrund der besonderen Redox-Chemie von Phenothiazin wurde in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass der präventive Effekt dieser Substanz auf seine antioxidative Wirkweise zurückzuführen ist (Moosmann et al., 2001; Murphy et al., 1950). Um zu ermitteln, ob die Wirkung von PHT wirklich auf einer antioxidativen Reaktion beruht, wurden die Proteinspiegel von Mfn1 If3 unter der Verwendung von mehreren Vergleichssubstanzen untersucht (Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9).

Hierbei wurde deutlich, dass das Acetylphenothiazin keine protektive Wirkung hatte. Das Acetylphenothiazin stellt eine Vergleichssubstanz mit PHT-Grundgerüst dar, an dessen Stickstoff eine Acetyl-Gruppe bindet. Aufgrund des fehlenden antioxidativ wirkenden Wasserstoff-Atoms

am N-Atom blieb die Protektion aus. Das Chlorpromazin, weist ebenfalls das PHT-Grundgerüst auf, stellt jedoch durch seinen chemischen Substituenten am N-Atom einen Dopamin-Rezeptor-Antagonisten dar und gehört zu den Antipsychotika. Das Chlorpromazin war ebenfalls nicht protektiv, was bestätigt, dass die Wirkung von PHT nicht Dopamin-Rezeptor-vermittelt ist. Schließlich wurde das Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) als eine Vergleichssubstanz mit antioxidativer Wirkung verwendet. Der Einfluss von Vitamin E war zwar nicht sehr stetig, was in der fehlenden Signifikanz zu erkennen war, schien sich aber in der Konzentration von 1  $\mu$ M auf die Rotenon-Behandlung tendenziell protektiv auszuwirken. Im Vergleich dazu war der Effekt von PHT immer stetig und signifikant und äußerte sich in der Konzentration von 100 nM. Dies bestätigt, dass der protektive Effekt von PHT auf seiner antioxidativen Wirkung beruht und belegt dessen protektive Wirkung im Parkinson-Modell im nanomolaren Konzentrationsbereich.

Die Inzidenz in der Parkinson-Krankheit steigt aufgrund des demografischen Wandels. Die Therapie erfolgt momentan symptomatisch, nachdem ca. 50 % der dopaminergen Neurone degeneriert sind (Fearnley und Lees, 1991). Die Behandlung ermöglicht zwar eine Besserung der Symptomatik, jedoch schreitet die Neurodegeneration stetig voran. Somit ist es notwendig ursächliche Therapiemaßnahmen zu finden, die sich protektiv in der Pathologie der PD auswirken und die Pathogenese der Krankheit verlangsamen. Das Phenothiazin könnte ein Arzneistoff mit entsprechendem Wirkungsprofil darstellen.

Phenothiazin verringert präklinisch den zellulären oxidativen Stress und ermöglicht damit eine Neuroprotektion, die bereits mehrfach für diese Substanz beschrieben werden konnte (siehe Abschnitt 1.2.1) (Moosmann et al. 2001; Ohlow et al., 2017; Tapias et al., 2019). Speziell in der Untersuchung der PHT-Wirkung im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit zeigte sich Phenothiazin protektiv gegen den erhöhten oxidativen Stress und der damit einhergehenden Neurodegeneration im nanomolaren Bereich. Im Krankheitsmodell der PD konnte PHT die mitochondriale Depolarisation verhindern und dopaminerge Zellen vor der oxidativen Neurotoxizität schützen (Hajieva et al., 2009). Ebenfalls *in vivo* zeigte sich PHT, sowohl in Invertebraten als auch in Nagern, gegen die dopaminerge Neurodegeneration protektiv (Mocko et al., 2010; Tapias et al., 2019). Somit wäre der antioxidative Ansatz mit PHT als eine präventive Maßnahme gegen das Voranschreiten der PD sinnvoll.

Folglich sollte verstärkt das Augenmerk auf die protektive Wirkung von PHT im Zusammenhang mit der PD und deren Einfluss auf die mitochondriale Dynamik und die Proteinhomöostase gelegt werden.

## 4.5 Verstärkte mitochondriale Dynamik im Parkinson-Modell

Dank bisheriger Erkenntnisse dieser Arbeit wurde deutlich, dass es unter dem oxidativen Einfluss des Komplex I-Inhibitors Rotenon zu einer verstärkten Mitophagie, und somit zu vermehrtem Abbau von Mitochondrien, kam. Die Mitophagie steht im engen Zusammenspiel mit der mitochondrialen Dynamik. Letztere besteht aus den Systemen der Fission (Teilung) und Fusion (Verschmelzung) der Mitochondrien (Bereiter-Kahn und Vöth, 1994). Hierdurch wird ein funktionales mitochondriales Netzwerk der Zelle aufrechterhalten (siehe Abschnitt 1.3.4) (Chan, 2012; Chen et al., 2010; Westermann, 2012; Youle und van der Bliek, 2012).

Mitochondrien sind in der Pathogenese der PD von zentraler Bedeutung (siehe Abschnitt 1.1.4.3.6). In der Parkinson-Krankheit wurden Störungen in den Mitochondrien auf mehreren funktionalen Ebenen beschrieben, was zu geschädigten Organellen führt (Bender et al., 2006; Shefa et al., 2019; Toulorge et al., 2016). Geschädigte Mitochondrien werden der Fission zugeführt, wodurch es zur Abtrennung von defekten Abschnitten dieser Organellen kommt, die anschließend mittels Mitophagie abgebaut werden (siehe Abschnitt 1.3.4.1) (Twig et al., 2008). Im Zusammenhang mit der PD konnte eine gesteigerte Fission beobachtet werden. Dies konnte sowohl in Fibroblasten von PD-Patienten mit Parkin-Mutation, als auch in Toxin-basierten PD-Modellen beobachtet werden (Arnold et al., 2011; Frank et al., 2012; Gomez-Lazaro et al., 2008; Grünewald et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die mitochondriale Morphologie unter dem Einfluss vom Komplex I-Inhibitor Rotenon untersucht. Hierbei lag in den Kontrollzellen ein tubulär verteiltes mitochondriales System vor, das ein ausgewogenes Verhältnis von fragmentierten, intermediären und tubulären Mitochondrien-Strukturen aufwies (Abbildung 3-10). Durch die Behandlung mit Rotenon kam es zu einer signifikanten Zunahme an kürzeren, fragmentierten Strukturen, während tubuläre und intermediäre Mitochondrien verringert vorlagen. Dies zeigte, dass es unter der Einwirkung von Rotenon zu einer verstärkten Fission der Mitochondrien kam und bestätigt damit die genannten Erkenntnisse bisheriger Publikationen (Frank et al., 2012; Gomez-Lazaro et al., 2008). Zusätzlich wurde hiermit deutlich, dass der Komplex I-Inhibitor Rotenon hier als eine adäquate Modell-Substanz zur Untersuchung der Parkinson-Krankheit diene.

Durch die Vorbehandlung mit dem Antioxidans Phenothiazin, konnte die Rotenon-induzierte Fission deutlich verringert werden. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme an fragmentierten Mitochondrien-Strukturen. Gleichzeitig lagen vermehrt intermediäre und tubuläre Strukturen vor. Dies zeigte, dass sich Phenothiazin protektiv gegen den Einfluss von Rotenon auswirkte. Die Protektion äußerte sich bereits in der niedrigen Konzentration von 100 nM. Zu erwähnen ist,

dass unter alleiniger PHT-Behandlung das mitochondriale Netzwerk ähnlich vorlag wie bei unbehandelten Zellen.

Somit wurde deutlich, dass bei der Betrachtung der Mitochondrien auf morphologischer Ebene es unter Rotenon zu einer verstärkten Fission dieser Organellen kam. Die Vorinkubation mit PHT erwies sich hierbei als protektiv.

Die gesteigerte Fission bei der morphologischen Untersuchung der Mitochondrien unter der Behandlung mit Rotenon, wurde nach einem Zeitraum von 6 bis 12 h ermittelt (Abbildung 3-10). Somit stellte es die frühen Auswirkungen von Rotenon auf die Morphologie dar, was sich in einer vermehrten Fission aufgrund des oxidativen Effekts von Rotenon äußerte. Da die bisherigen Betrachtungen der Mitophagie-Marker 72 h nach Rotenonbehandlung erfolgten, könnte vermutet werden, dass die Fission hier bereits anders reguliert sein könnte (Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4). Um dies zu ermitteln, wurden die Proteine der Fission FIS1 und DLP-1 untersucht (Abbildung 3-11). Das FIS1 stellt ein Protein der OMM dar und rekrutiert DLP-1 aus dem Zytosol, welches anschließend die Fission vollzieht (Ingermann et al., 2005; Lee et al., 2016; Losón et al., 2013). Unter der Behandlung mit Rotenon kam es zu erhöhten Spiegeln von beiden Proteinen, hierbei war die Regulation von FIS1 signifikant. Eine ähnliche signifikante Erhöhung von Fis1 und Drp1 unter der Behandlung mit Rotenon konnte ebenfalls von Li et al. in HT-12-Zellen beobachtet werden (Li et al., 2017). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten, dass die Fissions-Vorgänge unter Rotenon ebenfalls nach 72 h verstärkt abliefen.

Die präventive Wirkung von Phenothiazin zeigte sich in der Abnahme der FIS1-Proteinspiegel unter alleiniger Behandlung mit PHT. Die Proteinspiegel von DLP-1 wurden hier nicht verringert, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass es sich um ein zytoplasmatisches Protein handelt, welches erst im Bedarfsfall an Mitochondrien bindet und sie fissioniert. Jedoch bei der kombinierten Behandlung mit Rotenon und Phenothiazin konnten die basalen DLP-1-Spiegel auf Ebene der unbehandelten Kontrolle wiederhergestellt werden. Bei FIS1 kam es sogar zu einer signifikanten Verringerung ähnlich der alleinigen PHT-Behandlung. Dies deutet an, dass der protektive Einfluss von Phenothiazin die Fission komplett verhindert. Jedoch würden bisherige Betrachtungen der Mitophagie-Marker widersprechen, da Phenothiazin fast immer zu einer Absenkung des Effektes von Rotenon führte. Jedoch war diese Reduktion nie auf Kontroll-Ebene, ein Restschaden war immer noch zu erkennen. Eine Erklärung dafür, warum die Fissionsproteine unter zusätzlicher Vorbehandlung mit Phenothiazin so stark gesunken sind, könnte darin liegen, dass die Mitochondrien auf Schädigung primär mit Fission reagieren. Anschließend gehen sie in die Fusion und die Mitophagie über. PHT mildert den toxischen Effekt von Rotenon ab. Somit wäre nach 72 h unter der Vorbehandlung mit PHT die Fission eventuell schon

abgeschlossen und die Mitochondrien wären im kompensatorischen Abschnitt der Mitophagie und der Fusion.

Die erhöhte Fission im Parkinson-Modell konnte hier auf Proteinebene bestätigt werden und unterstützt die bisherigen Beobachtungen. Währenddessen konnte die protektive Wirkung durch Phenothiazin ebenfalls auf Proteinebene bestätigt werden.

Wenn geschädigte Mitochondrien vermehrt fissionieren um sich den schädlichen Anteilen zu entledigen, werden die intakten Anteile anschließend der Fusion zugeführt (siehe Abschnitt 1.3.4.1). Hierbei können intakte Mitochondrien fusionieren, weshalb die mitochondriale Homöostase aufrechterhalten werden kann (Chan, 2012; Chen et al., 2010; Westermann, 2012). Es konnte bereits beobachtet werden, dass die Proteinspiegel vom Fusionsprotein Mfn1 unter der Behandlung mit Rotenon angestiegen sind, was auf eine gesteigerte Fusion hindeutet (Abbildung 3-4). Das Mfn1 dient in den Mitochondrien zur Fusion der äußeren Mitochondrienmembran, währenddessen ist das OPA1 zur Fusion der inneren Mitochondrienmembran zuständig (Eura, 2003; Hales und Fuller, 1997; Olichon et al., 2002; Song et al., 2009). Bei der Untersuchung dieses Proteins, wurde eine signifikante Zunahme der OPA1-Proteinspiegel deutlich, dies bestätigt erhöhte Fusionsvorgänge unter dem Einfluss von Rotenon. Die Behandlung mit Phenothiazin erwies sich zwar nicht signifikant, jedoch tendenziell als protektiv gegen die verstärkte Fusion der Mitochondrien. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung, dass die induzierte Expression vom Protein Mfn1 unter Rotenon durch die Behandlung mit PHT nicht verringert werden konnte.

Die kompensatorische Reaktion um die mitochondriale Homöostase zu erhalten wurde weiterhin auf Ebene von mitochondrialen Proteinen untersucht. Hierfür wurden die mitochondrialen Transportproteine TOM20 und TIM23 gewählt. Zusätzlich wurde COX IV, ein Protein der mitochondrialen Atmungskette analysiert (Abbildung 3-12).

TOM20 und TIM23 sind Translokasen, die für den Import von Proteinen in das Mitochondrium verantwortlich sind. Dadurch, dass 99 % der mitochondrialen Proteine im Kern kodiert werden, sind diese Transportproteine entscheidend, um die mitochondriale Struktur und Funktionalität zu gewährleisten (Boengler et al., 2011). Das TOM20-Protein ist ein Protein der OMM und fungiert als Erkennungs-Rezeptor für mitochondriale Proteine (Ahting et al., 1999). TIM23 ist ein Protein der IMM und ist für den Import von Proteinen in die Matrix und die IMM verantwortlich (Mokranjac und Neupert, 2010; Mühlenbein et al., 2004).

Unter der Rotenon-Behandlung kam es zu einer leichten Zunahme von TOM20 und zu einer starken signifikanten Erhöhung von TIM23. Dies deutete darauf hin, dass die Zelle vermehrt die Expression von mitochondrialen Transportproteinen hochregulierte, um einen verstärkten

Import von mitochondrialen Komponenten zu ermöglichen und damit die Mitochondrien zu regenerieren.

Der Grund für den leichten Anstieg von TOM20 und demgegenüber der starke Anstieg von TIM23 könnte in der Funktion beider Proteine liegen. TOM20 ist ein Erkennungs-Rezeptor des TOM-Komplexes für Präkursorproteine. Es gibt hier zusätzlich noch weitere Erkennungs-Rezeptoren wie das TOM22 und das TOM70 (Brix et al., 1997). Vermutlich wurden diese zusätzlich hochreguliert, weshalb der Einfluss auf Tom20 nicht so stark ausgeprägt war. Das TIM23 stellt hingegen ein zentrales Protein des TIM-Komplexes dar, welches die Pore bildet, durch die der Proteinimport erfolgt. Durch das TIM23 werden einige IMM-Proteine importiert. Noch wichtiger erscheint die Tatsache, dass hierdurch alle Proteine wandern, die für die Matrix bestimmt sind (Mokranjac und Neupert, 2010). Dadurch ist TIM23 unersetzbar und zeigt das volle Ausmaß der Regulation von Transportproteinen der IMM.

Die Hochregulation der Transportproteine scheint eine Kompensation der Zelle auf die erhöhte Rotenon-abhängige Zerstörung der Mitochondrien zu sein. Dies dient der verstärkten Biogenese der Mitochondrien zur Wiederherstellung einer gesunden mitochondrialen Homöostase, was auch in der gesteigerten Fusion unter der Behandlung mit Rotenon zu beobachten war.

Interessanterweise schien PHT den Effekt von Rotenon nicht zu vermindern. Die Transportproteine sind für Mitochondrien sehr wichtig, da die meisten mitochondrialen Proteine kernkodiert sind und durch diese Transporter in die Mitochondrien importiert werden müssen (Ahting et al., 1999; Boengler et al., 2011; Mühlenbein et al., 2004). Vermutlich reguliert die Zelle bereits bei minimalen mitochondrialen Schädigungen die Transport-Proteine hoch, sodass sich diese Organellen mit intakten Proteinen regenerieren können. Da PHT zwar protektiv wirkt, jedoch nicht den gesamten schädigenden Einfluss von Rotenon verhindern kann, bleibt ein restlicher oxidativer Schaden, der auf die Mitochondrien einwirkt. Somit würde dieser auch ausreichen um die Transportproteine hochzuregulieren.

Auch bei dem Protein COX IV war ein signifikanter Anstieg unter der Rotenon-Behandlung zu verzeichnen (Abbildung 3-12). Dieses Protein stellt eine Untereinheit vom Komplex IV der Atmungskette dar, die für die Umwandlung von Sauerstoff und für die Bildung von ATP mitverantwortlich ist (Li et al., 2006). Die Hochregulation von COX IV, und damit vermutlich von Komplex IV, könnte eine kompensatorische Reaktion auf die Komplex I-Inhibition durch Rotenon sein. Somit versucht die Zelle kompensatorisch verstärkt Komponenten der Atmungskette zu generieren um die ATP-Synthese aufrecht zu erhalten. Die zusätzliche Behandlung mit PHT bewirkte tendenziell eine Verringerung der Proteinspiegel von COX IV, was auf die Protektion dieser Substanz gegen den Rotenon-vermittelten oxidativen Stress hinweist. Dieses Ergebnis bestätigt die gegenläufigen Prozesse zur Kompensation des mitochondrialen Schadens durch Rotenon

und geht mit der Beobachtung der vermehrten Transportvorgänge und der erhöhten Fusion von Mitochondrien einher.

Es kam also unter der Rotenon-Behandlung zu einer verstärkten Fission von Mitochondrien, die geschädigte mitochondriale Anteile absonderte. Diese unterlagen dann vermehrt dem mitophagischen Abbau, was in der Hochregulation von Mitophagie-Proteinen erkennbar wurde. Kompensatorisch unterlag der intakte Part des mitochondrialen Netzwerkes verstärkten Fusions-Vorgängen, um die mitochondriale Homöostase über die gesamte Zelle hinweg zu gewährleisten. Um den oxidativen Schaden, ausgehend von Rotenon, zu kompensieren, wurden zusätzlich vermehrt Transportproteine und der Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette hochreguliert. Damit konnte die Zelle verstärkten Proteinimport ermöglichen, um damit den Versuch der Wiederherstellung eines intakten mitochondrialen Netzwerkes zu ermöglichen. Ebenfalls konnte als Kompensationsreaktion die Produktion von ATP verstärkt werden. Dies sollte der Zelle dienen, trotz mitochondrialen Schadens, weiterhin mit Energie versorgt werden zu können. Phenothiazin konnte die Effekte von Rotenon im Rahmen der Fission und der Fusion verringern und zeigte damit sein protektives Potential. Ebenfalls milderte Phenothiazin die Regulation der vermehrten ATP-Produktion unter dem Parkinson-Toxin ab und erwies sich damit als protektiv im wichtigen mitochondrialen System der Atmungskette.

## **4.6 Die Mitochondrien- und die Proteinhomöostase stehen im Parkinson-Modell in Abhängigkeit**

Es wurde in dieser Arbeit deutlich, dass die Mitophagie und die mitochondriale Dynamik im Parkinson-Modell beeinflusst werden. Wie bisher beschrieben, befinden sich beide Systeme in einer Abhängigkeit. Die Mitophagie selbst ist eine Unterform der Autophagie, letztere wiederum steht in enger Regulation mit dem Proteasom um die Proteinhomöostase aufrechterhalten zu können (siehe Abschnitt 1.4) (Lemasters, 2005; Morawe et al., 2012). All diese Systeme agieren in einem abhängigen Netzwerk, weswegen es wichtig ist diese Komponenten in ihren Abhängigkeiten zu betrachten.

### **4.6.1 Erhöhte Mito- und Autophagie im Parkinson-Modell**

Nachdem das Mitophagie-Protein PINK1 die Ligase Parkin aus dem Zytosol rekrutiert, werden mitochondriale Proteine durch Parkin ubiquitiniert (Sarraf et al., 2013). An das Ubiquitin bindet anschließend das Protein p62 (siehe Abschnitt 1.3.5) (Geisler et al., 2010). Zu erwähnen ist, dass

PINK1 und Parkin spezielle Proteine der Mitophagie darstellen. Die Ubiquitinierung und die Bindung von p62 erfolgt jedoch auch beim Abbau anderer Substanzen in der Zelle mittels Autophagie. Die Ubiquitinierung ist ebenfalls erforderlich für den Proteinabbau mittels Proteasom (Morawe et al., 2012).

Aufgrund der hochregulierten Mitophagie-Marker PINK1 und Parkin unter der Einwirkung von Rotenon, wäre eine erhöhte Ubiquitinierung der Mitochondrien zu erwarten (siehe Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4). Dies konnte bei der Betrachtung von Ubiquitin in dieser Arbeit bestätigt werden, da es unter der Rotenon-Behandlung zu einer Zunahme der ubiquitinierten Proteine kam (Abbildung 3-13). Daraus kann schlussgefolgert werden, dass Parkin vermehrt die Proteine der OMM ubiquitiniert.

Unter Einfluss von Rotenon kam es zu einer signifikanten Abnahme der Proteinspiegel von p62. Dies könnte bedeuten, dass die Autophagie verstärkt abläuft und vermehrt autophagische Vakuolen abgebaut werden. Es könnte aber auch bedeuten, dass eine Blockade der Autophagie vorliegt (Bjorkoy et al., 2009; Klionsky et al., 2016). Unter alleiniger Phenothiazin-Behandlung kam es zur Verringerung der p62-Proteinspiegel, wahrscheinlich aufgrund des protektiven Einflusses auf die basalen Autophagie-Spiegel. Unter der Behandlung mit Rotenon und Phenothiazin kam es weder zu einer Änderung der Proteinspiegel von p62 noch von Ubiquitin im Vergleich zur alleinigen Rotenon-Behandlung. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass beide Proteine sowohl in der Mitophagie als auch in der Autophagie fungieren. Weshalb trotz protektiver Wirkung des Phenothiazins geschädigte zelluläre Komponenten über beide Abbauwege vermehrt abgebaut werden und der Effekt sich akkumuliert. Dies wird folgend in diesem Abschnitt näher erläutert.

Da die Regulation vom Protein p62 noch nicht eindeutig etwas über die Regulation der Autophagie aussagen konnte, wurde das Protein LC3 analysiert. Hierbei handelt es sich um ein autophagisches Protein, welches als Bindeglied zwischen p62 und der Phagophore agiert (siehe Abschnitt 1.4.2) (Pankiv et al., 2007). Um LC3 adäquat zu untersuchen, wurden Zellen mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin A1 (BafA1) behandelt. Jener verhindert die Ansäuerung von Lysosomen, weshalb die Regulation von LC3-II beobachtet werden kann. Dadurch können Aussagen über den autophagischen Flux getroffen werden.

In dieser Arbeit kam es unter der alleinigen Behandlung mit BafA1 zu der erwarteten Erhöhung von LC3-II, was eine Akkumulation der autophagischen Vesikel beschreibt (Abbildung 3-14). Unter alleiniger Rotenon-Behandlung kam es zu einer Verringerung in den LC3-II-Spiegeln, ähnlich zu der Beobachtung von p62. Durch die Behandlung mit Rotenon und BafA1 kam es im Vergleich zur alleinigen Rotenon-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg in den LC3-II-Spiegeln. Das zeigte, dass die Autophagie unter der Behandlung mit Rotenon verstärkt ablief. Dies wurde

durch die Betrachtung des autophagischen Fluxes ebenfalls bestätigt. Jener wird dadurch bestimmt, dass ein Quotient zwischen den jeweiligen Behandlungen mit und ohne BafA1 ermittelt wird, anschließend werden die Quotienten von Behandlung vs. Kontrolle verglichen. Dies ergab eine Erhöhung des autophagischen Fluxes unter dem Einfluss von Rotenon. Welcher zwar nicht signifikant war, jedoch eine deutliche Tendenz ausmachte. Aufgrund der verstärkten Autophagie im Parkinson-Modell, wurde deutlich, dass die beobachtete Herunterregulation von LC3-II und p62 unter der Behandlung mit Rotenon auf einem verstärkten Abbau von autophagischen Vesikeln beruht.

Um die Veränderung in der Autophagie näher zu untersuchen, wurden weiterhin Proteine analysiert, die ihre Funktionen in der Initiation der Autophagie aufweisen (siehe Abschnitt 1.4.2). Hierbei wurde BAG3 betrachtet, welches ein Co-Chaperon darstellt, das Proteine dem autophagischen Abbau zuführt (Behl, 2016; Gamerding et al., 2009, 2011; Stürner und Behl, 2017). Weiterhin wurden die Proteinspiegel von WIPI1 betrachtet, das eine wichtige Rolle in der Initiierung der Phagophore spielt (Proikas-Cezanne et al., 2015). Beide Proteine befinden sich vorgeschaltet zu den bisher untersuchten Prozessen.

Die Behandlung mit Rotenon bewirkte bei beiden Proteinen eine Zunahme, die sich jedoch aufgrund der schwankenden experimentellen Werte nicht signifikant äußerte (Abbildung 3-15). Trotzdem kann aufgrund des Ausmaßes der Erhöhung auf eine verstärkte autophagische Einleitung mit vermehrter Bildung der Initiationsmembran geschlossen werden. Die Vorbehandlung mit Phenothiazin führte zu einer Reduktion in diesen Proteinspiegeln, was auf Protektion hinweist.

Das Protein LAMP1 befindet sich in den Lysosomen, die den Inhalt der autophagischen Vesikel schließlich abbauen (Eskelinen, 2006). Damit markiert LAMP1 den Abschluss der Autophagie. Unter der Rotenon-Behandlung kam es zu einer Hochregulation der LAMP1-Proteinspiegel. Dies deutet auf eine verstärkte Bildung von Autolysosomen hin und bestätigt eine verstärkte Autophagie unter Rotenon. Unter der alleinigen Behandlung mit PHT kam es zu einer Absenkung von LAMP1, was die Senkung der basalen Autophagie andeutete. Bei der Behandlung mit Rotenon und PHT kam es auch zu einer Verminderung von LAMP1. Diese war noch stärker ausgeprägt als unter alleiniger PHT-Behandlung, jedoch war die Standardabweichung relativ hoch. Trotzdem könnte diskutiert werden, ob evtl. durch die Behandlung mit Rotenon auch andere lysosomale Abbauwege aktiviert wurden, hierbei wären u.a. die Mikroautophagie und die CMA zu nennen (Morawe et al., 2012). Die starke Absenkung von LAMP1 durch Vorinkubation mit PHT könnte dadurch erklärt werden, dass PHT sich zusätzlich präventiv auf die Mikroautophagie und die CMA auswirkt, weswegen weniger Proteine abgebaut werden und somit weniger Lysosomen vorliegen.

Diese Ergebnisse zeigten einen verstärkten Ablauf der Autophagie im Parkinson-Modell. Dies bestätigt den heutigen Kenntnisstand, dass in der PD-Pathogenese die Autophagie induziert ist. Dies konnte sowohl in Blutzellen von PD-Patienten als auch in Toxin-basierten Modellen beobachtet werden (Chen et al., 2007; Prigione et al., 2010; Zhu et al., 2007). Ebenfalls geht es mit der verstärkten Proteinaggregation einher, die in dieser neurodegenerativen Erkrankung beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 1.1.4.3.5) (Dunnett und Björklund, 1999). Diese Proteinaggregate werden mithilfe der verstärkten Autophagie abgebaut. Gleichzeitig wirkte sich Phenothiazin protektiv auf die Rotenon-vermittelten Effekte aus, indem es dessen Einfluss auf die Autophagie verminderte. Dies bezog sich auf die Initiation und auch auf den Abschluss der Autophagie. Demgegenüber konnte Phenothiazin keine Protektion auf Ebene von den Proteinen p62 und Ubiquitin erzielen. Der Grund könnte darin liegen, dass beide Proteine sowohl in der Mitophagie als auch in der Autophagie fungieren. Es wurde deutlich, dass beide Abbauwege im Parkinson-Modell induziert vorlagen. Wodurch man auf vermehrten mitochondrialen Schaden und verstärkte Bildung von Proteinaggregaten schließen konnte. Obwohl Phenothiazin in der Lage war die Einflüsse von Rotenon sowohl auf Mitophagie als auch auf Autophagie zu reduzieren, bestand ein Restschaden. Deswegen lagen die Mitophagie und die Autophagie immer noch zum Teil induziert vor. Beide Abbauwege führen ihre Substrate der Bindung von p62 und Ubiquitin zu, weswegen hier der restliche Schaden von Rotenon akkumuliert. Und obwohl der protektive Einfluss von PHT auf die Mitophagie als auch auf die Autophagie ersichtlich war, wirkte er sich scheinbar nicht auf die Proteine p62 und Ubiquitin aus.

#### **4.6.2 Das Proteasom wird im reinen Parkinson-Modell nicht reguliert**

Das Proteasom und die Autophagie sind zwei wesentliche Abbauwege der Proteinhomöostase und agieren hier in einem engen Zusammenspiel (siehe Abschnitt 1.4.1) (Lilienbaum, 2013; Morawe et al., 2012). Da das Proteasom ubiquitinierte Proteine abbaut, könnte die beobachtete Zunahme der Proteinspiegel von Ubiquitin unter der Rotenon-Behandlung auch im Zusammenhang mit der Funktion des Proteasoms stehen. Hierfür wurden das 20S-Proteasom und das Co-Chaperon BAG1, das Proteine für den proteasomalen Abbau kennzeichnet, analysiert.

Hierbei konnten keine wesentlichen Unterschiede unter der Behandlung mit Rotenon beobachtet werden (Abbildung 3-16). Dies weist darauf hin, dass das Proteasom in dem Parkinson-Modell von Rotenon nicht reguliert wird. Eine Beeinträchtigung im Proteasom im Zusammenhang mit der PD wurde unter verschiedenen experimentellen Bedingungen bereits beschrieben. Jedoch werden Teile dieser Versuche kontrovers diskutiert (Lim und Tan, 2013; McNaught und Jenner, 2001). Fakt ist, dass die Rolle des Proteasoms in der PD noch nicht ganz eindeutig geklärt ist.

Unter PHT schien das Proteasom jedoch beeinflusst zu sein. Die alleinige Behandlung mit PHT senkte die Spiegel von BAG1, was darauf hindeutet, dass die basale Proteinhomöostase verringert abläuft. Vermutlich da durch die Einwirkung vom Antioxidans weniger Proteine fehlgefaltet werden. Während die Rotenon-Behandlung keinen Einfluss auf die Proteinspiegel der proteasomalen Proteine hatte, führte die Behandlung in Kombination mit PHT zu einer Erhöhung in den Proteinspiegeln von BAG1. Die bisherigen Ergebnisse bei Betrachtung der mitochondrialen Homöostase und der Autophagie deuten darauf hin, dass durch die Vorbehandlung mit PHT der toxische Effekt von Rotenon abgemildert wird. Die Veränderung am Proteasom unter PHT und Rotenon könnten andeuten, dass PHT den toxischen Effekt von Rotenon abmildert, weshalb die Proteine der Zelle zwar noch fehlgefaltet werden, aber weniger aggregieren. Die fehlgefalteten Proteine könnten dann vermehrt im Proteasom abgebaut werden, wodurch die Regulation von BAG1 erklärt werden würde. Dies zeigt, wie stark kompensatorisch die Proteinhomöostase abläuft.

Es konnte gezeigt werden, dass im Parkinson-Modell das Proteasom nicht beeinflusst wird. Jedoch konnte durch die protektive Behandlung mit PHT kompensatorisch eine leichte Induktion im Proteasom im PD-Modell ermittelt werden.

#### **4.7 Die Rolle der Mitochondrien- und der Proteinhomöostase in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit**

In dieser Arbeit konnte mithilfe vom Komplex I-Inhibitor Rotenon ein Parkinson-Modell erzeugt werden, welches verdeutlicht, wie kausal sich oxidativer Stress in der Pathogenese der PD auswirkt. Es wurde deutlich, dass im Parkinson-Modell verstärkt die Fission von Mitochondrien eingeleitet wird, was nachfolgend zu einer erhöhten Mitophagie führt. Währenddessen kommt es kompensatorisch ebenfalls zur verstärkten Fusion des mitochondrialen Netzwerkes und in diesem Zusammenhang zu einer Induktion der mitochondrialen Biogenese. Daneben kommt es zur Induktion der Autophagie um dem verstärkten mitochondrialen Abbau gerecht zu werden und gleichzeitig um den unspezifischen Abbau von geschädigten Proteinen zu gewährleisten. Das zeigt wie all diese Komponenten abhängig voneinander agieren und wie sie in der Lage sind, sich im Parkinson-Modell zu regulieren. Dies dient dem Zweck eine gesunde Mitochondrien- und Proteinhomöostase zu gewährleisten. Diese Kompensationsleistung der Zelle ist bemerkenswert, jedoch ist sie nicht unerschöpflich. Es ist möglich, dass die Kompensationsleistung eine Weile von der Zelle aufrechterhalten werden kann, jedoch kommt es bei dauerhaftem Stress zur Fehleranfälligkeit im System. Die Tatsache, dass in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit

vermehrte Beeinträchtigungen in den Mitochondrien und deren Homöostase festgestellt wurden, sprechen dafür. Beispielsweise sind in der PD vermehrt Mutationen in der mitochondrialen DNA vorzufinden (Bender et al., 2006; Shokolenko et al., 2009). Hierdurch läuft die Synthese von mitochondrial kodierten Proteinen nicht mehr optimal ab, weshalb es zu Beeinträchtigungen in mitochondrialen Funktionen kommt (Banerjee et al., 2009; Bose und Beal, 2016). Dies führt zu Einschränkungen in der Atmungskette und in der ATP-Synthese. Hinzu kommen Schädigungen in anderen wichtigen mitochondrialen Prozessen, wie beispielsweise der Apoptose-Regulation oder der Calcium-Homöostase (Hajieva et al., 2018; Jiang et al., 2008; Rowley et al., 2016). Auch die Tatsache, dass es familiäre Formen der PD mit Mutationen in den Mitophagie-Genen *PINK1* und *Parkin* gibt, bestätigt die Vermutung, dass eine gestörte Mitophagie zum Ausbruch der Erkrankung beiträgt (Cookson, 2012; Morais et al., 2009). Aufgrund dessen und aufgrund der multifaktoriellen Ursachen dieser Erkrankung kommt es zu weiteren Schädigungen in der Zelle. Diese äußern sich beispielsweise durch die verstärkte Neuroinflammation und Proteinaggregation. Letztere äußert sich vor allem durch die intrazelluläre Ansammlung von  $\alpha$ -Synuclein (Braak et al., 2003; Imamura et al., 2003; Lee et al., 2009; Zhang et al., 2005). Durch die Akkumulation von zahlreichen Beeinträchtigungen in der Zelle bricht irgendwann das System zusammen und es kommt zum Zelltod (Tatton, 2000). Dieser betrifft in der PD vorwiegend die dopaminergen Neurone in der Substantia nigra *pars compacta*. Nach dem Absterben von ca. 50 % dieser Neurone manifestiert sich die Parkinson-Krankheit durch ihre typische Symptomatik (Fearnley und Lees, 1991).

In dieser Arbeit konnte ein besseres Verständnis über die Rolle der Mitochondrien in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit erlangt werden. Hierbei konnten die Vorgänge der mitochondrialen Homöostase und Dynamik im Modell der PD erschlossen werden. Weiterhin wurde deutlich, dass die Mitochondrien- und Proteinhomöostase in einer Abhängigkeit stehen, in der sich die einzelnen Komponenten gegenseitig beeinflussen können. Im Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit ist es ein relevantes System, das bis zu einem gewissen Grad der Schädigung, eine kompensatorische protektive Rolle spielt. Damit wird deutlich, dass die punktuelle Untersuchung der einzelnen Systeme der mitochondrialen Homöostase, wie beispielsweise nur der Fission oder nur der Fusion, der Erforschung der mitochondrialen Homöostase nicht gerecht wird. Hierbei ist es wichtig, das Zusammenspiel der Komponenten zu ermitteln, um eine eindeutige Aussage über die Regulation unter den jeweiligen Versuchsbedingungen zu ermöglichen.

## 4.8 Phenothiazin als präventive Therapiemöglichkeit in der Parkinson-Krankheit

In dieser Arbeit hat sich das Phenothiazin als neuroprotektiv herausgestellt, da es in der Lage war die toxischen Effekte von Rotenon in der humanen neuronalen Zelllinie SH-SY5Y und ebenfalls in der humanen Nierenzelllinie (HEK-Zellen) zu vermindern. Phenothiazin war in der Lage die mitochondriale Zerstörung im Parkinson-Modell zu verringern, wodurch die kompensatorische Regulation der mitochondrialen Homöostase abgeschwächt wurde.

Antioxidantien als Therapiemöglichkeiten der PD wurden bereits in zahlreichen Studien analysiert (siehe Abschnitt 1.1.5). Hierbei wurden Substanzen wie beispielsweise Vitamin E, Vitamin C, Coenzym Q10, Melatonin und Kreatin verwendet. Während viele Antioxidantien sich präklinisch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als protektiv erwiesen (Antolin et al., 2002; Ballaz et al., 2013; Jin et al., 2014; Lan und Jiang, 1997; Matthews et al., 1999), waren die klinischen Studien meist ernüchternd und zeigten nicht die erhoffte Protektion im Patienten (Etminan et al., 2005; Jin et al., 2013; Moosmann und Behl, 2002). Mögliche Ursachen wurden im Abschnitt 1.1.5 diskutiert. Trotzdem waren protektive Tendenzen mit Coenzym Q10 und Vitamin E zu verzeichnen (Shults et al., 2002; Zhang et al., 2002). Dies und die vielen präklinischen Studien, die eine antioxidative Protektion in der PD zeigten, bestätigen, dass sich die Forschung in diesem Gebiet lohnt. Jedoch ist es hierbei wichtig sich Substanzen zu widmen, die ein höheres protektives Potential aufweisen als die bisher Untersuchten.

Das Phenothiazin wäre hier ein vielversprechendes Antioxidans. Der präventive und neuroprotektive Einfluss im Zusammenhang mit der PD konnte präklinisch, wie bereits erwähnt, sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Analysen beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.4) (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010; Tapias et al., 2019). Die lipophile, niedermolekulare, chemische Struktur dieser Substanz, sollte einen guten Übergang der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen (Tadros und Wahab, 1962). In dieser Arbeit konnte weiterhin bestätigt werden, dass PHT seine neuroprotektive antioxidative Kapazität im bereits nanomolaren Bereich entfaltet, somit wäre eine Bioverfügbarkeit von PHT im ZNS möglich, wo es die Neurodegeneration verringern könnte. Die Tatsache, dass diese Substanz über die Dauer von mehreren Jahrzehnten im Menschen pharmakologisch eingesetzt wurde, bestätigt ihre Sicherheit. Damit stellt das Phenothiazin einen vielversprechenden Wirkstoff in der präventiven Behandlung der Parkinson-Krankheit dar.

## 4.9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass mitochondriale Schädigungen durch Veränderungen in der Mitochondrien- und Proteinhomöostase, die ein interdependentes System darstellen, kompensiert werden. Im Zusammenhang mit der PD werden häufig Mitochondrien untersucht, da sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung einnehmen. Jedoch erfolgt häufig eine Beschränkung auf eine statische Aufnahme, in der die Faktoren der mitochondrialen Homöostase nur vereinzelt und getrennt voneinander betrachtet werden (Chu et al., 2013; Peng et al., 2016). Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen jedoch die gegenseitige Abhängigkeit dieser Systeme, weshalb mitochondriale Untersuchungen weiter gefasst werden sollten. Dies würde einen wesentlicheren Einblick in das Geschehen der Mitochondrien im Zusammenhang mit der PD ermöglichen.

Die Entdeckung der zusammenhängenden Regulation zwischen den Proteinen Mitofusin 1 Isoform 3 (Mfn1 If3) und PINK1 ermöglichte erstmals die Beschreibung der Funktion von Mfn1 If3. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist zu vermuten, dass Mfn1 If3 ein Protein der Mitophagie darstellt. Hier interagiert es scheinbar mit dem Protein PINK1 um die Mitophagie zu vollziehen. Ferner sollte analysiert werden, auf welche Weise diese beiden Proteine genau interagieren. Darüber hinaus sollte das Protein Mfn1 If3 näher auf weitere Funktionen und Regulationen untersucht werden.

Die vielversprechende neuroprotektive Wirkung von Phenothiazin im Parkinson-Modell konnte sowohl in dieser Arbeit, als auch in anderen Analysen bestätigt werden (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010; Ohlow et al., 2017). Kürzliche Untersuchungen von Tapias et al. in Ratten, konnten ermitteln, dass das Phenothiazin im Parkinson-Modell neuroprotektiv wirkt und die Überlebensrate der Tiere verlängert (Tapias et al., 2019). Aufgrund des vielversprechenden Wirkungsprofils, sollten weitere Untersuchungen an Tieren folgen um eventuell klinische Untersuchungen ermöglichen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die Parkinson-Krankheit (PD – *Parkinson's disease*) stellt eine neurodegenerative Erkrankung dar, in deren Pathogenese der oxidative Stress eine kausale Rolle spielt. Die Mitochondrien sind hier entscheidend, da sie die Hauptquelle für zelluläre reaktive Sauerstoffspezies darstellen. Die Funktionalität der Mitochondrien wird durch die mitochondriale Homöostase, bestehend aus den Systemen der Biogenese, der Fission und Fusion sowie der Mitophagie, aufrechterhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mitochondriale Homöostase in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit und in diesem Zusammenhang die protektive Rolle des Antioxidans Phenothiazin analysiert. Der Komplex I-Inhibitor Rotenon wurde als Modell-Substanz für die PD verwendet. Die Untersuchungen ergaben eine verstärkte Schädigung der Mitochondrien unter dem oxidativen Einfluss von Rotenon, was zu einer Hochregulation der Proteine von Fission und Mitophagie führte. Demgegenüber kam es im zellulären Parkinson-Modell zu verstärkten kompensatorischen Regenerationsvorgängen im mitochondrialen Netzwerk. Dies wurde in der verstärkten Induktion von Proteinen der mitochondrialen Fusion und Biogenese deutlich. In diesem Zusammenhang wurden außerdem Proteine der Makroautophagie hochreguliert, was auf den erhöhten mitochondrialen Abbau und auf die verstärkte Proteinaggregation zurückzuführen wäre. Dies verdeutlicht, dass die einzelnen Systeme der mitochondrialen Homöostase in einer abgestimmten Abhängigkeit interagieren, um ein intaktes mitochondriales Netzwerk zu gewährleisten. Die starke Kompensationsleistung der mitochondrialen Homöostase kann in der Pathogenese der PD von der Zelle vermutlich nicht dauerhaft aufrechterhalten werden, weswegen es schließlich zur charakteristischen Neurodegeneration kommt.

Bei der Untersuchung der mitochondrialen Proteine PINK1 und Mitofusin 1 unter der Behandlung mit Rotenon wurde eine Regulation in den Proteinspiegeln von Mitofusin 1 Isoform 3 entdeckt. Analysen auf molekularbiologischer Ebene ergaben, dass die Proteine PINK1 und Mitofusin 1 Isoform 3 in der Lage waren sich gegenseitig zu regulieren. Vermutlich stellt Mitofusin 1 Isoform 3 ein Protein der Mitophagie dar, welches im Zusammenhang mit PINK1 agiert.

Die Therapie der PD erfolgt zurzeit rein symptomatisch, weswegen der präventive Einfluss des Antioxidans Phenothiazin in der Pathogenese dieser Erkrankung untersucht wurde. Durch die antioxidative Wirkung von Phenothiazin wurde die Induktion der mitochondrialen Homöostase und der Autophagie im zellulären PD-Modell verringert. Damit wurde die neuroprotektive Wirkung von Phenothiazin im PD-Modell deutlich. Diese äußerte sich bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich, womit die hohe Potenz von Phenothiazin belegt wird. Diese Tatsache und die niedermolekulare, lipophile chemische Struktur des Phenothiazins sollten eine zerebrale Bioverfügbarkeit im PD-Patienten ermöglichen. Damit stellt das Phenothiazin einen möglichen präventiven Wirkstoff in der Therapie der PD dar.

## 6 Summary

The Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder. Throughout its pathogenesis, the cellular oxidative stress maintains a causal role, where mitochondria are of crucial importance acting as the key source for cellular reactive oxygen species. In order to maintain function, mitochondria rely on mitochondrial homeostasis which includes the systems of biogenesis, fission/fusion and mitophagy.

This study explored the mitochondrial homeostasis in the pathogenesis of Parkinson's disease. Furthermore, it analyzed the protective role of the antioxidant phenothiazine in the present context. The complex I inhibitor rotenone has been used as the model substance for the PD. The findings revealed increased mitochondrial damage as a result of the oxidative effect of rotenone leading to an upregulation of the proteins of fission and mitophagy. By contrast, increased compensating regeneration processes could be observed throughout the mitochondrial network in the cellular model of PD. This became clear through an increased induction of proteins of mitochondrial fusion and biogenesis. Furthermore, an upregulation of proteins concerning macroautophagy occurred, presumably to keep up with the elevated rate of mitochondrial degradation and increased protein aggregation. This shows that the particular systems of the mitochondrial homeostasis interact in a harmonized mutually dependent manner in order to facilitate an intact mitochondrial network. The intensified compensation rate of the mitochondrial homeostasis in the pathogenesis of the PD could probably not be maintained permanently by the cell, thus causing the characteristic neurodegeneration over time.

Throughout the examination of the mitochondrial proteins PINK1 and mitofusin 1 under treatment of rotenone, a regulation in protein levels of mitofusin 1 isoform 3 has been identified. Molecular biological analysis unveiled that the proteins PINK1 and mitofusin 1 isoform 3 were able to regulate each other. It can be assumed that mitofusin 1 isoform 3 is a protein of the mitophagy process where it acts together with PINK1.

The present therapy of the PD is merely symptomatic. Therefore the preventive influence of the antioxidant phenothiazine has been studied in the pathogenesis of the PD. The induction of the mitochondrial homeostasis and autophagy in the cellular PD-model has been reduced due to the antioxidative effect of phenothiazine, highlighting its neuroprotective effect in the PD-model. The neuroprotection was already expressed in a nanomolar concentration range, which underlines the potency of phenothiazine. This fact and the low molecular, lipophilic chemical structure of phenothiazine should allow for a high cerebral bioavailability in PD patients. Therefore, phenothiazine represents a possible preventive active compound for the therapy of the Parkinson's disease.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abner, E. L., Schmitt, F. A., Mendiondo, M. S., Marcum, J. L., & Kryscio, R. J. (2011). Vitamin E and all-cause mortality: A meta-analysis. *Current Aging Science*, 4(2), 158–170.
- AceView genes database (2019). Homo sapiens complex locus MFN1, encoding mitofusin 1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&q=MFN1>, Stand: 06.06.2019.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F. E., Neupert, W., & Nussberger, S. (1999). The TOM core complex: The general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 147(5), 959–968.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S., & Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction*, 41(1), 183–197.
- Alexander, G. E. (2004). Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6(3), 259–280.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., ... Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., ... Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and Histopathology*, 12, 25–31.
- Antolín, I., Mayo, J. C., Sainz, R. M., del Brío Mde, L., Herrera, F., Martín, V., & Rodríguez, C. (2002). Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Progress in Brain Research*, 943(2), 163-73.
- Arnold, B., Cassady, S. J., Van Laar, V. S., & Berman, S. B. (2011). Integrating multiple aspects of mitochondrial dynamics in neurons: Age-related differences and dynamic changes in a chronic rotenone model. *Neurobiology of Disease*, 41(1), 189-200.
- Ashrafi, G., & Schwarz, T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 31–42.
- Ballaz, S., Morales, I., Rodríguez, M., & Obeso, J. A. (2013). Ascorbate prevents cell death from prolonged exposure to glutamate in an in vitro model of human dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 91(12), 1609-17.
- Banerjee, R., Starkov, A. A., Beal, M. F., & Thomas, B. (2009). Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(7), 651-663.

- Beal, M. F., Oakes, D., Shoulson, I., Henchcliffe, C., Galpern, W. R., Haas, R., ... Boyar, K. (2014). A randomized clinical trial of high-dosage coenzyme Q10 in early Parkinson disease: no evidence of benefit. *JAMA neurology*, 71(5), 543-52.
- Behl, C. (2016). Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(8), 672–688.
- Behl, C., & Ziegler, C., (2014). Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease. *Springer, Berlin*.
- Beilina, A., Van Der Brug, M., Ahmad, R., Kesavapany, S., Miller, D. W., Petsko, G. a, & Cookson, M. R. (2005). Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(16), 5703–5708.
- Benabid, A. L. (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(6), 696–706.
- Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., ... Turnbull, D. M. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 38(5), 515–517.
- Bereiter-Hahn, J., & Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research and Technique*, 27(3), 198–219.
- Berg, D., Niwar, M., Maass, S., Zimprich, A., Möller, J. C., Wuellner, U., ... Riess, O. (2005). Alpha-synuclein and Parkinson's disease: Implications from the screening of more than 1,900 patients. *Movement Disorders*, 20(9), 1191–1194.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., Mackenzie, G., Garcia-osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301-1306.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research*, 38(11 Pt 1), 3751–3757.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in Enzymology*, 452, 181-197.
- Boengler, K., Heusch, G., & Schulz, R. (2011). Nuclear-encoded mitochondrial proteins and their role in cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(7), 1286–1294.
- Boerger, M., Funke, S., Leha, A., Roser, A. E., Wuestemann, A. K., Maass, F., ... Lingor, P. (2019). Proteomic analysis of tear fluid reveals disease-specific patterns in patients with Parkinson's disease – A pilot study. *Parkinsonism & related disorders*, 06.03.2019, online publiziert, noch nicht gedruckt, doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.03.001. Stand: 06.06.2019.

- Bose, A., & Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *139*, 216–231.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 121–134.
- Brix, J., Dietmeier, K., & Pfanner, N. (1997). Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(33), 20730–20735.
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthat, V., ... Hunot, S. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(1), 182–192.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, *17*(8), 1022–1030.
- Camicioli, R., Moore, M. M., Kinney, A., Corbridge, E., Glassberg, K., & Kaye, J. A. (2003). Parkinson's Disease is Associated with Hippocampal Atrophy. *Movement Disorders*, *18*(7), 784–790.
- Cao, Y. L., Meng, S., Chen, Y., Feng, J. X., Gu, D. D., Yu, B., ... Gao, S. (2017). MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature*, *542*(7641), 372–376.
- Cereghetti, G. M., Costa, V., & Scorrano, L. (2010). Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin. *Cell Death and Differentiation*, *17*(11), 1785–1794.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *22*, 79–99.
- Chan, D. C. (2012). Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annual Review of Genetics*, *46*(1), 265–287.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, *59*(3), 527–605.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*, *160*(2), 189–200.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y. E., Chomyn, A., Prolla, T. A., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*, *141*(2), 280–9.

- Chen, H., Zhang, S. M., Schwarzschild, M. A., Hernán, M. A., & Ascherio, A. (2006). Survival of Parkinson's disease patients in a large prospective cohort of male health professionals. *Movement Disorders*, *21*(7), 1002–1007.
- Chen, K., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., ... Tang, J. (2004). Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nature Cell Biology*, *6*(9), 872–883.
- Chen, Y., Azad, M. B., & Gibson, S. B. (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death and Differentiation*, *16*(7), 1040–1052.
- Chen, Y., & Dorn, G. W. (2013). PINK1- Phosphorylated Mitofusin 2 is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science*, *340*(6131), 471–475.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2007). Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 23), 4155–4166.
- Christ, J. (2010). Untersuchung neuer hochwirksamer neuroprotektiver Antioxidantien in experimentellen Modellen der Parkinsonschen Krankheit. *Universitätsbibliothek Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Dissertation.*
- Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., ... Kagan, V. E. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nature Cell Biology*, *15*(10), 1197–1205.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(45), 15927–15932.
- Cleren, C., Yang, L., Lorenzo, B., Calingasan, N. Y., Schomer, A., Sireci, A., ... Beal, M. F. (2008). Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. *Journal of Neurochemistry*, *104*(6), 1613–1621.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., ... Scorrano, L. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, *155*(1), 160–171.
- Cookson, M. R. (2012). Parkinsonism due to mutations in PINK1, Parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(9), 1–11.
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (2000). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *Journal of Cell Science*, *113* Pt 24, 4441–4450.
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired Degradation of Mutant  $\alpha$ -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science*, *305*(5688), 1292–1295.
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, *39*, 889–909.

- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & Arca, D. D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 18 pages.
- Del Dotto, V., Fogazza, M., Carelli, V., Rugolo, M., & Zanna, C. (2018). Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1859(4), 263-269.
- Del Dotto, V., Mishra, P., Vidoni, S., Fogazza, M., Maresca, A., Caporali, L., ... Zanna, C. (2017). OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell reports*, 19(12), 2557-2571.
- Deng, H., Dodson, M. W., Huang, H., & Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14503–14508.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of  $\alpha$ -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson's disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089–9100.
- DGN - Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2016). Idiopathisches Parkinson-Syndrom. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, 1-77.
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 461–491.
- Di Monte D. A. (2003). The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurology*, 2(9), 531-8.
- Drew, R., & Miners, J. O. (1984). The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochemical Pharmacology*, 33(19), 2989-2994.
- Duncan, O., van der Merwe, M. J., Daley, D. O., & Whelan, J. (2013). The outer mitochondrial membrane in higher plants. *Trends in Plant Science*, 18(4), 207–217.
- Dunnett, S. B., & Björklund, A. (1999). Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature*, 399(6738 Suppl), A32–A39.
- Dzamko, N., Zhou, J., Huang, Y., & Halliday, G. M. (2014). Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(June), 57.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L., & McLean, P. J. (2011). Molecular Chaperones in Parkinson's Disease – Present and Future. *Journal of Parkinson's Disease*, 1(4), 299–320.
- Eskelinen, E. L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5–6), 495–502.

- Etminan, M., Gill, S. S., & Samii, A. (2005). Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet Neurology*, 4(6), 362-365.
- Eura, Y. (2003). Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *Journal of Biochemistry*, 134(3), 333-344.
- Fahn, S. (1992). A pilot trial of high-dose alpha-tocopherol and ascorbate in early Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 32, 128-32.
- Fearnley, J. M., & Lees, A. J. (1991). Aging and Parkinson's Disease: Substantia nigra regional selectivity, *Brain*, 114, 2283-2301.
- Ferrari, C. C., Pott Godoy, M. C., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A. M., & Pitossi, F. J. (2006). Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 $\beta$  in the substantia nigra. *Neurobiology of Disease*, 24(1), 183-193.
- Franchini, A. M., Hunt, D., Melendez, J. A., & Drake, J. R. (2013). Fc $\gamma$ R-driven release of IL-6 by macrophages requires NOX2-dependent production of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25098-25108.
- Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., ... Reichert, A. S. (2012). Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(12), 2297-2310.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., & Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *Journal of Cell Biology*, 152(4), 683-692.
- Fu, D., Lippincott-Schwartz, J., & Arias, I. M. (2013). Increased mitochondrial fusion and autophagy help isolated hepatocytes repolarize in collagen sandwich cultures. *Autophagy*, 9(12), 2154-2155.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U., & Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO Journal*, 28(7), 889-901.
- Gamerding, M., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Clement, A. M., & Behl, C. (2011). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Reports*, 12(2), 149-156.
- Gao, F., Chen, D., Si, J., Hu, Q., Qin, Z., Fang, M., & Wang, G. (2015). The mitochondrial protein BNIP3L is the substrate of PARK2 and mediates mitophagy in PINK1/PARK2 pathway. *Human Molecular Genetics*, 24(9), 2528-2538.
- García-quintans, N., Prieto, I., Sánchez-ramos, C., Luque, A., Arza, E., Olmos, Y., & Monsalve, M. (2016). Free Radical Biology and Medicine Regulation of endothelial dynamics by PGC-1  $\alpha$  relies on ROS control of VEGF-A signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 93, 41-51.

- Gegg, M. E., Cooper, J. M., Chau, K. Y., Rojo, M., Schapira, A. H. V., & Taanman, J. W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human Molecular Genetics*, *19*(24), 4861–4870.
- Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, *12*(2), 119–131.
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V. J., Chen, Q., Souza, M., Hurtig, H. I., ... Lee, V. M. (2000). Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective  $\alpha$ -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science*, *290*(5493), 985–990.
- Gomez-Lazaro, M., Bonekamp, N. A., Galindo, M. F., Jordán, J., & Schrader, M. (2008). 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*(11), 1960–1969.
- Gómez-Mendikute, A., & Cajaraville, M. P. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro*, *17*(5–6), 539–546.
- Gong, G., Song, M., Csordas, G., Kelly, D. P., Matkovich, S. J., & Dorn, G. W. (2015). Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science*, *350*(6265), 1-20.
- Graham, D. G. (1978) Oxidative Pathways for Catecholamines in the Genesis of Neuromelanin and Cytotoxic Quinones. *Molecular Pharmacology*, *14*(4), 633-643.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*, *36*(2977), 59–72.
- Granold, M., Moosmann, B., Staib-Lasarezik, I., Arendt, T., Del Rey, A., Engelhard, K., ... Hajieva, P. (2015). High membrane protein oxidation in the human cerebral cortex. *Redox Biology*, *4*, 200–207.
- Greene, A. W., Grenier, K., Aguilera, M. A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M. E., ... Fon, E. A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Reports*, *13*(4), 378–385.
- Grünewald, A., Voges, L., Rakovic, A., Kasten, M., Vandebona, H., Hemmelmann, C., ... Klein, C. (2010). Mutant parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PLoS ONE*, *5*(9), e12962.
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A., & Salter, J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS Letters*, *567*(1), 96–102.
- Hajieva, P., Baeken, M. W., & Moosman, B. (2018). The role of Plasma Membrane Calcium ATPases (PMCA) in neurodegenerative disorders. *Neuroscience letters*, *663*, 29-38.

- Hajjeva, P., Bayatti, N., Granold, M., Behl, C., & Moosmann, B. (2015). Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *Journal of Neurochemistry*, *133*(3), 352–367.
- Hajjeva, P., Mocko, J. B., Moosmann, B., & Behl, C. (2009). Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, *110*(1), 118–132.
- Hales, K. G., & Fuller, M. T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, *90*(1), 121–129.
- Hartl, U. F., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, *475*(1), 324–332.
- Hartley, A., Stone, J. M., Heron, C., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (1994). Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *63*(5), 1987–1990.
- Hawkes, C. H. (2008). The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: Does it exist and if so how long is it? *Movement Disorders*, *23*(13), 1799–1807.
- Hirsch, E., Graybiel, A. M., & Agid, Y. A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, *334*(6180), 345–348.
- Hughes, K. C., Gao, X., Kim, I. Y., Rimm, E. B., Wang, M., Weisskopf, M. G., ... Ascherio, A. (2016). Intake of antioxidant vitamins and risk of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *31*(12), 1909–1914.
- Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., Koyano, F., Kosako, H., Kimura, M., ... Matsuda, N. (2013). Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(30), 22019–22032.
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., & Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathologica*, *106*(6), 518–526.
- Inden, M., Kitamura, Y., Abe, M., Tamaki, A., Takata, K., & Taniguchi, T. (2011). Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *34*(1), 92–96.
- Ingerman, E., Perkins, E. M., Marino, M., Mears, J. a., McCaffery, J. M., Hinshaw, J. E., & Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *170*(7), 1021–1027.
- Ishihara, N., Eura, Y., & Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of Cell Science*, *117*(26), 6535–6546.
- Jiang, J., Huang, Z., Zhao, Q., Feng, W., Belikova, N. A., & Kagan, V. E. (2008). Interplay Between Bax, Reactive Oxygen Species Production And Cardiolipin Oxidation During Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *368*(1), 145–150.

- Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Anantharam, V., Kalyanaraman, B., & Kanthasamy, A. G. (2014). Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(8), 1282–1294.
- Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *Journal of Cell Biology*, 191(5), 933–942.
- Jing, K., & Lim, K. (2012). Why is autophagy important in human diseases? *Experimental & Molecular Medicine*, 44(2), 69–72.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 13), 2805–2812.
- Kamat, C. D., Gadai, S., Mhatre, M., Williamson, K. S., Pye, Q. N., & Hensley, K. (2008). Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *Journal of Alzheimers Disease*, 15(3), 473–93.
- Kar, U. P., Dey, H., & Rahaman, A. (2017). Regulation of dynamin family proteins by post-translational modifications. *Journal of biosciences*, 42(2), 333–344.
- Kashihara, K., Shinya, T., & Higaki, F. (2011). Neuromelanin magnetic resonance imaging of nigral volume loss in patients with Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18(8), 1093–1096.
- Kawajiri, S., Saiki, S., Sato, S., Sato, F., Hatano, T., Eguchi, H., & Hattori, N. (2010). PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Letters*, 584(6), 1073–1079.
- Khaminets, A., Behl, C., & Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 6–16.
- Khan, M. M., Ahmad, A., Ishrat, T., Khan, M. B., Hoda, M. N., Khuwaja, G., ... Islam, F. (2010). Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Research* 1328, 139–151.
- Kim, Y. A., Kim, M. Y., & Jung, Y. S. (2013). Glutathione Depletion by L-Buthionine-S,R-Sulfoximine Induces Apoptosis of Cardiomyocytes through Activation of PKC- $\delta$ . *Biomolecules and Therapeutics*, 21(5), 358–363.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., & Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Journal*, 18(14), 3981–3989.
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., ... Zughaier, S.M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 12(1), 1–222.

- Koppula, S., Kumar, H., More, S. V., Kim, B. W., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2012). Recent advances on the neuroprotective potential of antioxidants in experimental models of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(8), 10608–10629.
- Koshiba, T., Detmer, S. a, Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, *305*(5685), 858–862.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., ... Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, *510*(7503), 162–166.
- Kubli, D. A., & Gustafsson, Å. B. (2012). Mitochondria and mitophagy: The yin and yang of cell death control. *Circulation Research*, *111*(9), 1208–1221.
- Lan, J., & Jiang, D. H. (1997). Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice. *Journal of Neural Transmission*, *104*(4–5), 469–481.
- Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., & Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*, *482*(7384), 186–191.
- Lau, L. M. L. De, & Breteler, M. M. B. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, *5*(6), 525–535.
- Lazarou, M., Jin, S. M., Kane, L. A., & Youle, R. J. (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Developmental Cell*, *22*(2), 320–333.
- Lee, H. J., Suk, J. E., Patrick, C., Bae, E. J., Cho, J. H., Rho, S., ... Lee, S. J. (2010). Direct transfer of  $\alpha$ -synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 9262–9272.
- Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C., & Voeltz, G. K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature*, *540*(7631), 139–143.
- Lee, S. Y., Oh, J. S., Rho, J. H., Jeong, N. Y., Kwon, Y. H., Jeong, W. J., ... Yoo, Y. H. (2014). Retinal pigment epithelial cells undergoing mitotic catastrophe are vulnerable to autophagy inhibition. *Cell death & disease*, *5*(6), e1303.
- Lemasters, J. J. (2005). Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Research*, *8*(1), 3–5.
- Li, H. N., Zimmermann, M., Milledge, G. Z., Hou, X. L., Cheng, J., Wang, Z. H., & Li, P. A. (2017). Water-Soluble Coenzyme Q10 Reduces Rotenone-Induced Mitochondrial Fission. *Neurochemical research*, *42*(4), 1096–1103.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., & Robinson, J. P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(10), 8516–8525.

- Li, Y., Park, J. S., Deng, J. H., & Bai, Y. (2006). Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(5-6), 283–291.
- Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4(1), 1–26.
- Lim, K. L., & Tan, J. M. M. (2013). Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochemistry*, 22(8), S13.
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, 24(5), 659–667.
- Martinez, T. N., & Greenamyre, J. T. (2012). Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(9), 920–934.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., ... Cuervo, M. (2008). Dopamine-modified  $\alpha$ -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of Clinical Investigation* 118(2), 777-788.
- Mathews, C. E., & Leiter, E. H. (1999). Constitutive differences in antioxidant defense status distinguish alloxan-resistant and alloxan-susceptible mice. *Free Radical Biology and Medicine* 27(3-4), 449-455.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., ... Tanaka, K. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 211–221.
- Matsuda, W., Furuta, T., Nakamura, K. C., Hioki, H., Fujiyama, F., Arai, R., & Kaneko, T. (2009). Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *Journal of Neuroscience*, 29(2), 444–453.
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology*, 16(14), 551–560.
- McNaught, K. S. P., & Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 297, 191–194.
- Meimaridou, E., Gooljar, S. B., & Chapple, J. P. (2009). From hatching to dispatching: The multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(1), 1–9.
- Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W., & Nagley, P. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Research*, 31(11), e61.
- Mitchell, S., C. (2006). Phenothiazine: the parent molecule. *Current drug targets*, 7(9), 1181-9.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 107-32.

- Mo, J. J., Liu, L. Y., Peng, W.P., Rao, J., Liu, Z., & Cui, L. L. (2017). The effectiveness of creatine treatment for Parkinson's disease: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Neurology* 17, 105.
- Mocko, J. B., Kern, A., Moosmann, B., Behl, C., & Hajieva, P. (2010). Phenothiazines interfere with dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 40(1), 120–129.
- Mohamed Yusoff, A. A. M., Ahmad, F., Idris, Z., Jaafar, H., & Abdullah J. M. (2015). Understanding Mitochondrial DNA in Brain Tumorigenesis. *Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor (Chapter 1)*, 3-27.
- Mokranjac, D., & Neupert, W. (2010). The many faces of the mitochondrial TIM23 complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6–7), 1045–1054.
- Moosmann, B., & Behl, C. (2002). Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(10), 1407-35.
- Moosmann, B., Skutella, T., Beyer, K., & Behl, C. (2001). Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. *Biological Chemistry*, 382(11), 1601–1612.
- Morais, V. A., Haddad, D., Craessaerts, K., De Bock, P. J., Swerts, J., Vilain, S., & De Strooper, B. (2007). PINK1 Loss-of-function mutations affect Mitochondrial complex 1 activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. *Science*, 344(6180), 203-207.
- Morawe, T., Hiebel, C., Kern, A., & Behl, C. (2012). Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 46(1), 41–54.
- Mühlenbein, N., Hofmann, S., Rothbauer, U. & Bauer, M. F. (2004). Organization and function of the small Tim complexes acting along the import pathway of metabolite carriers into mammalian mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 279(14), 13540-6.
- Murphy, C. M., Rawer, H., & Smith, N. L. (1950). Mode of Action of Phenothiazine-Type Antioxidants. *Industrial and Engineering Chemistry*, 42(12), 2479–2489.
- Murphy, M. P., Krueger, M. J., Sablin, S. O., Ramsay, R. R., & Singer, T. P. (1995). Inhibition of complex I by hydrophobic analogues of N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and the use of an ion-selective electrode to measure their accumulation by mitochondria and electron-transport particles. *The Biochemical Journal*, 306(Pt 2), 359–365.
- Nakajima, A., Kataoka, K., Hong, M., Sakaguchi, M., & Huh, N. H. (2003). BRPK, a novel protein kinase showing increased expression in mouse cancer cell lines with higher metastatic potential. *Cancer Letters*, 201(2), 195–201.
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., ... Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biology*, 8(1).

- Negida, A., Menshawy, A., El Ashal, G., Elfouly, Y., Hani, Y., Hegazy, Y., ... Rashad, Y. (2016). Coenzyme Q10 for Patients with Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *CNS and Neurological Disorders Drug Targets*, 15(1), 45-53.
- Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P., & McBride, H. (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25060–25070.
- Nguyen, T. N., Padman, B. S., & Lazarou, M. (2016). Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in Cell Biology*, 26(10), 1–12.
- Oakley, A. E., Collingwood, J. F., Dobson, J., Love, G., Perrott, H. R., & Morris, C. M. (2007). Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology*, 68(21), 1820-1825.
- Ohlow, M. J., & Moosmann, B. (2011). Phenothiazine: The seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discovery Today*, 16(3-4), 119–131.
- Ohlow, M. J., Sohre, S., Granold, M., Schreckenberger, M., & Moosmann, B. (2017). Why Have Clinical Trials of Antioxidants to Prevent Neurodegeneration Failed? - A Cellular Investigation of Novel Phenothiazine-Type Antioxidants Reveals Competing Objectives for Pharmaceutical Neuroprotection. *Pharmaceutical Research*, 34(2), 378-393.
- Okatsu, K., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2015). Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of Cell Science* 128(5), 964-78.
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., ... Belenguer, P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters*, 523(1-3), 171–176.
- Ottmann, H., U. (1952). Phenothiazin-Vergiftung bei einer Madenwurmkur. *Fühner-Wieland's Sammlung von Vergiftungsfällen*, 14(4), 192-195.
- Outeiro, T. F., Putcha, P., Tetzlaff, J. E., Spoelgen, R., Koker, M., Hyman, B. T., & Mclean, P. J. (2008). Formation of Toxic Oligomeric  $\alpha$ -Synuclein Species in Living Cells. *PLoS ONE*, 3(4), e1867.
- Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., van der Brug, M., & Singleton, A. B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44(4), 595–600.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., ... Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24131–24145.
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 408–417.

- Park, Y.-Y., Lee, S., Karbowski, M., Neutzner, A., Youle, R. J., & Cho, H. (2010). Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 4), 619–626.
- Parkinson, J. (1817). An Essay on the Shaking Palsy. *London 1817*.
- Patten, D. a, Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R. J., Pilon-Larose, K., ... Slack, R. S. (2014). OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *The EMBO Journal*, 33(22), 2676-2691.
- Peng, K., Xiao, J., Yang, L., Ye, F., Cao, J., & Sai, Y. (2019). Mutual Antagonism of PINK1/Parkin and PGC-1 $\alpha$  Contributes to Maintenance of Mitochondrial Homeostasis in Rotenon-Induced Neurotoxicity. *Neurotoxicity research*, 35(2), 331-343.
- Peng, K., Yang, L., Wang, J., Ye, F., Dan, G., Zhao, Y., ... Cao, J. (2016). The Interaction of Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion Mediated by PGC-1 $\alpha$  Regulates Rotenone-Induced Dopaminergic Neurotoxicity. *Molecular Neurobiology*, 54(5), 3783-3797.
- Periquet, M., Fulga, T., Myllykangas, L., Schlossmacher, M. G., & Feany, M. B. (2007). Aggregated  $\alpha$ -Synuclein Mediates Dopaminergic Neurotoxicity In Vivo. *The Journal of Neuroscience* 27(12), 3338–3346.
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron*, 85(2), 257–273.
- Pissadaki, E. K., & Bolam, J. P. (2013). The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 7, 13.
- Poewe, W. (2006). The natural history of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 253 Suppl 7, VII2-6.
- Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., ... Tolosa, E. (2015). The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Movement Disorders*, 30(2), 229-237.
- Poole, A. C., Thomas, R. E., Andrews, L. a, McBride, H. M., Whitworth, A. J., & Pallanck, L. J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1638-1643.
- Poole, A. C., Thomas, R. E., Yu, S., Vincow, E. S., & Pallanck, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS ONE*, 5(4), e10054.
- Prigione, A., Piazza, F., Brighina, L., Begni, B., Galbusera, A., Difrancesco, J. C., ... Ferrarese, C. (2010). Alpha-synuclein nitration and autophagy response are induced in peripheral blood cells from patients with Parkinson disease. *Neuroscience Letters*, 477(1), 6-10.

- Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Donnes, P., & Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *Journal of Cell Science*, *128*(2), 207–217.
- Pyakurel, A., Savoia, C., Hess, D., & Scorrano, L. (2015). Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis. *Molecular Cell*, *58*(2), 244–254.
- Raha, S., McEachern, G. E., Myint, A. T., & Robinson, B. H. (2000). Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology & Medicine*, *29*(2), 170–180.
- Rakovic, A., Grünewald, A., Kottwitz, J., Brüggemann, N., Pramstaller, P. P., Lohmann, K., & Klein, C. (2011). Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS ONE*, *6*(3), e16746.
- Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., ... Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature Genetics*, *38*(10), 1184–1191.
- Ramonet, D., Perier, C., Recasens, A., Dehay, B., Bové, J., Costa, V., ... Vila, M. (2013). Optic atrophy 1 mediates mitochondria remodeling and dopaminergic neurodegeneration linked to complex I deficiency. *Cell Death and Differentiation*, *20*(1), 77–85.
- Raza Shaikh, S., & Brown, D. A. (2013). Models of plasma membrane organization can be applied to mitochondrial membranes to target human health and disease with polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *88*(1), 21–25.
- Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., & Brooks, D. (2005). Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*, *128*(6), 1314–1322.
- Rodriguez, J. A., Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Cascio, D., Reyes, F. E., Shi, D., ... Eisenberg, D. S. (2015). Structure of the toxic core of  $\alpha$ -synuclein from invisible crystals. *Nature*, *525*(7570), 486–90.
- Roghani, M., & Behzadi, G. (2001). Neuroprotective effect of vitamin E on the early model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. *Brain Research* *892*(1), 211–227.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., & Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 8), 1663–1674.
- Rowley, S., Liang, L., Fulton, R., Shimizu, T., Day, B., & Patel, M. (2016). Mitochondrial respiration deficits driven by reactive oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, *75*, 151–158.

- Sanders, L. H., & Greenamyre, J. T. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson's disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 111-120.
- Sarraf, S. A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M. E., Huttlin, E. L., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496(7445), 372-376.
- Sarkar, S., Raymick, J., & Imam, S. (2016). Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 904.
- Schapira, a H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 54(3), 823-827.
- Schubert, A. F., Gladkova, C., Pardon, E., Wagstaff J. L., Freund, S. M., Steyaert, J., ... Komander, D. (2017). Structure of PINK1 in complex with its substrate ubiquitin. *Nature*, 552(7683), 51-56.
- Sekine, S., & Youle, R. J. (2018). PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC biology*, 16(1), 29.
- Sharma, N., & Nehru, B. (2013). Beneficial Effect of Vitamin E in Rotenone Induced Model of PD: Behavioural, Neurochemical and Biochemical Study. *Experimental Neurobiology*, 22(3), 214-223.
- Shefa, U., Jeong, N. Y., Song, I. O., Chung, H. J., Kim, D., Jung, J., & Huh, Y. (2019). Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 14(5), 749-756.
- Sherer, T. B., Kim, J.-H., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. (2003). Subcutaneous Rotenone Exposure Causes Highly Selective Dopaminergic Degeneration and  $\alpha$ -Synuclein Aggregation. *Experimental Neurology*, 179(1), 9-16.
- Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G. L., & Alexeyev, M. F. (2009). Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 37(8), 2539-2548.
- Shults, C. W., Oakes, D., Kieburtz, K., Beal, M. F., Haas, R., Plumb, S., ... Lew, M. (2002). Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Archives of Neurology*, 59(10), 1541-1550.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1), 76-85.
- Sofic, E., Lange, K. W., Jellinger, K., & Riederer, P. (1992). Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 142(2), 128-130.

- Solesio, M. E., Prime, T. A., Logan, A., Murphy, M. P., del Mar Arroyo-Jimenez, M., Jordán, J., & Galindo, M. F. (2013). The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ reduces aspects of mitochondrial fission in the 6-OHDA cell model of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1832*(1), 174–182.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G., & Chan, D. C. (2009). Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Molecular Biology of the Cell* *20*, 3525–3532.
- Songarj, P., Luh, C., Staib-Laszczik, I., Engelhard, K., Moosmann, B., & Thal, S. C. (2015). The antioxidative, non-psychoactive tricyclic phenothiazine reduces brain damage after experimental traumatic brain injury in mice. *Neuroscience Letters* *584*, 253-258.
- Strange, H., Joseph, J., & Pellegrini, J. P. (1967). Improved Phenothiazine Antioxidants for Synthetic Lubricants. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, *6*(1), 33–35.
- Stürner, E., & Behl, C. (2017). The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, *10*, 177.
- Tadros, F. W., & Wahab, F. A. (1962). The site of action of phenothiazine S35 in the central nervous system. *The Journal of the Egyptian Medical Association*, *45*, 162-71.
- Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M., & Youle, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *Journal of Cell Biology*, *191*(7), 1367–1380.
- Tanaka, M., Kim, Y. M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., & Mouradian, M. M. (2004). Aggresomes Formed by  $\alpha$ -Synuclein and Synphilin-1 Are Cytoprotective. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(6), 4625–4631.
- Tanner, C. M., Kame, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., ... Langston, J. W. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental Health Perspectives*, *119*(6), 866–872.
- Tapias, V., McCoy, J., L., & Greenamyre, J., T. (2019). Phenothiazine normalizes the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, maintains mitochondrial integrity and protects the nigrostriatal dopamine system in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. *Redox biology*, *21.03.2019*, online publiziert, noch nicht gedruckt, doi: 10.1016/j.redox.2019.101164. Stand: 06.06.2019.
- Tatton, N. A. (2000). Increased Caspase 3 and Bax Immunoreactivity Accompany Nuclear GAPDH Translocation and Neuronal Apoptosis in Parkinson's Disease. *Experimental Neurology*, *43*, 29–43.
- Thomas, B., & Beal, M. F. (2007). Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, *16*(R2), 183-194.

- Tieu, K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a009316.
- Toulorge, D., Schapira, A. H. V., & Hajj, R. (2016). Molecular changes in the postmortem parkinsonian brain. *Journal of Neurochemistry*, 139, 27–58.
- Turrens, J. F., & Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 191(2), 421–427.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., ... Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO Journal*, 27(2), 433–446.
- Twig, G., & Shirihai, O. S. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), 1939–51.
- UniProt - the universal protein knowledgebase (2019). Entry: MFN1\_HUMAN, Protein: Mitofusin-1. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8IWA4>, Stand: 06.06.2019.
- UniProt - the universal protein knowledgebase (2019). Entry: PINK1\_HUMAN, Protein: Serine/threonine-protein kinase PINK1. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BXM7>, Stand: 06.06.2019.
- Uryu, K., Richter-Landsberg, C., Welch, W., Sun, E., Goldbaum, O., Norris, E. H., ... Trojanowski, J. Q. (2006). Convergence of heat shock protein 90 with ubiquitin in filamentous alpha-synuclein inclusions of alpha-synucleinopathies. *The American Journal of Pathology*, 168(3), 947–961.
- Vatassery, G. T. (1998). Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics 53 Suppl 1*, 25–27.
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease : Molecules implicated in the formation and degradation of  $\alpha$ -synuclein aggregates. *Neuropathology* 27, 494–506.
- Wallings, R., Manzoni, C., & Bandopadhyay, R. (2015). Cellular processes associated with LRRK2 function and dysfunction. *FEBS Journal*, 282(15), 2806–2826.
- Weber, C. A., & Ernst, M. E. (2006). Antioxidants, Supplements, and Parkinson's Disease. *Annals of Pharmacotherapy*, 40(5), 935–938.
- Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(10), 1833–1838.
- Wiedemann, N., Stiller, S. B., & Pfanner, N. (2013). Activation and Degradation of Mitofusins: Two Pathways Regulate Mitochondrial Fusion by Reversible Ubiquitylation. *Molecular Cell*, 49(3), 423–425.

- Wu, Y., Zhou, D., Xu, X., Zhao, X., Huang, P., Zhou, X., ... Zheng, S. (2016). Clinical significance of mitofusin-2 and its signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 179.
- Yamada, T., Hashida, K., Takarada-Iemata, M., Matsugo, S., & Hori, O. (2011).  $\alpha$ -Lipoic acid (LA) enantiomers protect SH-SY5Y cells against glutathione depletion. *Neurochemistry International*, 59(7), 1003–1009.
- Yamano, K., & Youle, R. J. (2013). PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy*, 9(11), 1758–1769.
- Yan, L., Qi, Y., Huang, X., Yu, C., Lan, L., Guo, X., ... Lou, Z. (2018). Structural basis for GTP hydrolysis and conformational change of MFN1 in mediating membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, 25(3), 233–243.
- Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M. F., McQuibban, A., Vogel, H., & Lu, B. (2008). Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 7070–7075.
- Yang, Z., & Klionsky, D. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 124–131.
- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*, 337(6098), 1062–1065.
- Yu, M. J., McCowan, J. R., Smalstig, E. B., Bennett, D. R., Roush, M. E., & Clemens, J. A. (1992). A phenothiazine derivative reduces rat brain damage after global or focal ischemia. *Stroke*, 23(9), 1287–1291.
- Zecca, L., Tampellini, D., Gatti, A., Crippa, R., Eisner, M., Sulzer, D., ... Gallorini, M. (2002). The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *Journal of neural transmission*, 109(5-6), 663–672.
- Zecca, L., Zucca, F. A., Albertini, A., Rizzio, E., & Fariello, R. G. (2006). A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 67(7 Suppl 2), 8–11.
- Zhang, S. M., Hernán, M. A., Chen, H., Spiegelman, D., Willett, W. C., & Ascherio, A. (2002). Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology* 59(8), 1161–1169.
- Zhang, W. W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., ... Zhang, J. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB Journal*, 19(6), 533–542.
- Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., ... Przedborski, S. (2008). The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 12022–12027.

Zhu, J.-H., Horbinski, C., Guo, F., Watkins, S., Uchiyama, Y., & Chu, C. T. (2007). Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *The American Journal of Pathology*, *170*(1), 75–86.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
AcPHT	Acetylphenothiazin
ATG	<i>autophagy-related proteins</i> , Autophagie-Proteine
ATP	Adenosintriphosphat
ATP13A2	<i>probable cation-transporting ATPase 13A2</i>
BafA1	Bafilomycin A1
BAG	<i>Bcl-2-associated athanogene</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CMA	<i>chaperone-mediated autophagy</i> , Chaperon-vermittelte Autophagie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX IV	Untereinheit vom Komplex IV der Atmungskette
CPRZ	Chlorpromazin
Da	Dalton
DA	Dopamin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
DJ-1	<i>protein deglycase DJ-1</i>
DLP-1	<i>dynammin like protein 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EOPD	<i>early onset Parkinson's disease</i> , frühzeitig eintretende Parkinson-Krankheit

EPMS	Extrapyramidalmotorisches System
et al.	<i>et alii/et aliae</i> , und andere
EtOH	Ethanol
FAD/FADH2	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/ reduzierte Form)
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FIS1	<i>mitochondrial fission 1 protein</i>
g	Gravitation
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
GP	Globus pallidus (GPe – <i>externus</i> ; GPi – <i>internus</i> )
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HA	<i>human influenza hemagglutinin</i>
HCl	Salzsäure
HEK-Zellen	<i>human embryonic kidney cells 293 A</i> , humane embryonale Nierenzellen 293 A
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HR 1/2	<i>heptad repeat 1/2</i> , Coiled-Coil Domäne 1/2
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
If1/3	Isoform 1/3
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IMM	<i>inner mitochondrial membrane</i> , innere Mitochondrienmembran
IMS	<i>intermembrane space</i> , Intermembranraum
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LAMP1	<i>lysosoma- associated membrane protein-1</i>
LAMP-2A	<i>lysosomal-associated membrane protein-2a</i>
LC3	<i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
M	Mol

Mff	<i>Mitochondrial fission factor</i>
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MiD 49/51	<i>Mitochondrial dynamics protein 49/51 kDa</i>
min	Minute
Miro	<i>Mitochondrial Rho GTPase 1</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i> , mitochondriale Zielsequenz
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadeninukleotid (oxidierte/ reduzierte Form)
NaOH	Natriumhydroxid
NBR1	<i>neighbour of BRCA1 gene 1</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	nonsense
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxid-Anion
OH <sup>-</sup>	Hydroxylanion
OH <sup>•</sup>	Hydroxylradikal
OMM	<i>outer mitochondrial membrane</i> , äußere Mitochondrienmembran
OPA1	<i>Optic atrophy 1</i>
p62/SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARL	<i>presenilin-associated rhomboid-like protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	<i>Parkinson's disease</i> , Parkinson-Krankheit
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd

PHT	Phenothiazin
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i> , Serin/Threonin-Protein Kinase 1
RFP	<i>red fluorescent protein</i> , Rot-fluoreszierendes Protein
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , RNA-induzierender Stilllegungs-Komplex
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
Rot	Rotenon
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SH-SY5Y	humane Neuroblastoma-Zelllinie
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , kurze interferierende RNA
SN	Substantia nigra ( <i>SNpc – pars compacta</i> ; <i>SNpr - pars reticulata</i> )
SNCA	Gen das $\alpha$ -Synuclein kodiert
STN	Nucleus subthalamicus
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris gepufferte Salzlösung
TBSt	TBS mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tim	<i>translocase of the inner membrane</i> , Translokase der inneren Membran
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tom	<i>translocase of the outer membrane</i> , Translokase der äußeren Membran
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
u. a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
VitE	Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol)
vs.	versus
WIPI1	<i>WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
$\mu$ g	Mikrogramm

$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Extrapiramidalmotorisches System .....	4
Abbildung 1-2: Neuropathologie in der Parkinson-Krankheit.....	6
Abbildung 1-3: Phenothiazin.....	12
Abbildung 1-4: Phenothiazin-Derivate .....	12
Abbildung 1-5: Mitochondriales Membranpotential unter der Behandlung mit Rotenon und Phenothiazin.....	13
Abbildung 1-6: Rotenon .....	14
Abbildung 1-7: Das Mitochondrium.....	16
Abbildung 1-8: Regulation der mitochondrialen Dynamik (Fission und Fusion) und der Mitophagie.....	20
Abbildung 1-9: Mitofusin 1 .....	21
Abbildung 1-10: PINK1-Import.....	23
Abbildung 1-11: Wege des Proteinabbaus .....	24
Abbildung 1-12: Makroautophagie.....	26
Abbildung 3-1: Die Proteinspiegel von PINK1 werden durch den Komplex I-Inhibitor Rotenon in Abhängigkeit von Behandlungszeit und -konzentration hochreguliert.....	47
Abbildung 3-2: Der Rotenon-vermittelte Anstieg der Proteinspiegel von PINK1 beruht auf einem oxidativen Effekt.....	49
Abbildung 3-3: Phenothiazin verringert den Rotenon-induzierten Anstieg der Proteinspiegel von PINK1.....	50
Abbildung 3-4: Das Mitophagie-Protein Parkin und dessen Substrat Mfn1 werden durch Rotenon und Phenothiazin moduliert.....	52
Abbildung 3-5: Überexpression von Mitofusin 1 bewirkt Hochregulation der Proteinspiegel von Mitofusin 1 Isoform 3 und von PINK1 .....	54
Abbildung 3-6: Herunterregulation der Isoformen von Mfn1 zeigt, dass PINK1 durch If3 beeinflusst wird.....	56
Abbildung 3-7: Regulation von PINK1 bewirkt analoge Regulation der Proteinspiegel von Mfn1 If3 .....	59

Abbildung 3-8: Vergleichssubstanzen.....	61
Abbildung 3-9: Die Wirkung von Phenothiazin ist antioxidativ.....	61
Abbildung 3-10: Rotenon bewirkt eine verstärkte Fission der Mitochondrien, während Phenothiazin diesen Effekt vermindert .....	63
Abbildung 3-11: Phenothiazin verringert die durch Rotenon induzierte mitochondriale Dynamik.....	65
Abbildung 3-12: Mitochondriale Proteine werden unter der Behandlung mit Rotenon verstärkt exprimiert.....	66
Abbildung 3-13: Rotenon beeinflusst die Proteinexpression von Ubiquitin und p62 .....	68
Abbildung 3-14: Rotenon erhöht den autophagischen Flux .....	70
Abbildung 3-15: Autophagiemarker werden durch Rotenon und Phenothiazin moduliert.....	71
Abbildung 3-16: Rotenon hat keinen Einfluss auf die Expression von Markern des Proteasoms	72

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Plasmide .....	30
Tabelle 2-2: siRNA .....	31
Tabelle 2-3: Primärantikörper .....	31
Tabelle 2-4: Sekundärantikörper .....	32
Tabelle 2-5: Marker und Kits.....	32
Tabelle 2-6: Chemikalien .....	32
Tabelle 2-7: Geräteverzeichnis.....	37

## 8.4 Lebenslauf

## 8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den

---

Tanja Kromm

## **8.6 Danksagung**