

**Untersuchung neuer hochwirksamer neuroprotektiver Antioxidantien  
in experimentellen Modellen der Parkinsonschen Krankheit**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Justyna Barbara Christ geb. Mocko

geb. am 29.04.1980 in Tychy (Polen)

Mainz, 2010





## INHALTSVERZEICHNIS

### 1. EINLEITUNG

1.1.	Parkinsonsche Krankheit	1
1.1.1.	Symptomatik der Parkinsonschen Krankheit	1
1.1.2.	Das Extrapiramidalmotorische System	1
1.1.3.	Neuropathologie der Parkinsonschen Krankheit	4
1.1.4.	Prävalenz und Klassifizierung	5
1.1.5.	Diagnose	5
1.1.6.	Therapieansätze	6
1.2.	Besondere Eigenschaften dopaminerger Neurone der <i>SNpc</i>	6
	Beschaffenheit dopaminerger Neurone	6
	Dopaminsynthese, Dopaminabbau und das Neuromelanin	7
	Glutathion und Eisen	8
	Mitochondriale Rolle	9
	Oxidativer Stress	10
1.3.	Oxidativer Stress	10
1.3.1.	Wie entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS)?	10
1.3.2.	Das antioxidative Schutzsystem der Zelle	12
	Antioxidative Moleküle	12
	Antioxidative Enzyme	13
1.3.3.	Schädigung zellulärer Moleküle	14
1.3.4.	Beseitigung oxidativ modifizierter Proteine	15
1.4.	Zelltod	16
1.5.	Funktion der Mitochondrien innerhalb der Zelle	17
	Mitochondriale Rolle in der progressiven Neurodegeneration	19
1.6.	Rolle der Mitochondrien in der Entwicklung der Parkinsonschen Krankheit	20
	Familiäre Formen	20
	Sporadische Formen	20
	Degenerationsprozess dopaminerger Neurone der <i>Substantia nigra</i>	22
1.7.	Antioxidantien zur neuroprotektiven Therapie der Parkinsonschen Krankheit	24
	Bedeutung einer potenten antioxidativen Wirkung und guter Blut-Hirn-Schrankengängigkeit	
1.8.	Modelle	26
1.8.1.	Untersuchte Substanzen	26
1.8.2.	Parkinson-Phänotyp induzierende Komplex I Inhibitoren	27



1.8.3.	Modellsysteme	28
1.8.3.1.	<i>In vitro</i> Modellsysteme	28
1.8.3.2.	<i>Caenorhabditis elegans</i> als Labormodell	28
	Das Nervensystem des <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
1.9.	Ziel der Arbeit	31
<b>2.</b>	<b>MATERIAL und METHODEN</b>	
2.1.	Modelle	33
2.2.	Chemikalien	33
2.3.	Geräte	34
2.4.	Puffer und Lösungen	35
2.5.	Antikörper	38
2.6.	Kultivierung und Behandlung der <i>in vitro</i> Kulturen	38
2.6.1.	Gewinnung und Haltung der Primärzellen aus dem ventralen Mesencephalon der Ratte	38
2.6.2.	Kultivierung der SH-SY5Y Zelllinie	39
2.6.3.	Kryokonservierung der SH-SY5Y Zelllinie	39
2.6.4.	Ermittlung der Lebendzellzahl	40
2.6.5.	Behandlung der <i>in vitro</i> Kulturen	40
2.7.	Kultivierung und Behandlung des <i>Caenorhabditis elegans</i>	40
2.7.1.	Kultivierung des <i>Caenorhabditis elegans</i>	41
2.7.2.	Kryokonservierung des <i>Caenorhabditis elegans</i>	41
2.7.3.	Synchronisierung des <i>Caenorhabditis elegans</i>	41
2.7.4.	Behandlung der <i>in vivo</i> Kulturen	42
2.7.5.	Analyse der <i>in vivo</i> Kulturen	42
2.7.5.1.	Protektionsanalyse	42
2.7.5.2.	Analyse dopaminerger Neurone und des Gesamtnervensystems	42
2.7.5.3.	Verhaltensuntersuchung	43
2.8.	Zytotoxizitätsanalysen	43
2.8.1.	MTT-Test	43
2.8.2.	Hoechst-Färbung	43
2.8.3.	Propidiumiodid-Färbung	44
2.9.	Immunhistochemie	44
2.10.	MitoTracker-Färbung	44
2.11.	JC-1-Färbung	45
2.12.	Färbung der Lysosomen	46
2.13.	Glutathion-Assay	46

2.14.	Westernblot Analyse	48
2.15.	Messung der Proteincarbonyle	49
2.16.	Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies	49
2.17.	Messung der mitochondrialen Schwellung	50
2.18.	Messung von Thiobarbitursäure reaktiven Lipidperoxidationsprodukte (TBARS Thiobarbituric acid-reactive substances)	51
2.19.	Molekularbiologische Arbeiten	52
2.19.1.	Konstruktion des P <sub>Cat-2</sub> :: <i>DsRed2</i> Vektors zur Expression in <i>Caenorhabditis elegans</i>	52
2.19.1.1.	Bakterienstämme	52
2.19.1.2.	Vektoren	52
2.19.1.3.	Primerpaare (PP)	53
2.19.1.4.	Enzyme für molekularbiologische Methoden	53
2.19.1.5.	Reaktionskomplettausstattung (Kits)	54
2.19.1.6.	Amplifikation des P <sub>Cat-2</sub> aus genomischer DNA des <i>Caenorhabditis elegans</i> und <i>DsRed2</i> aus dem <i>DsRed2</i> -N1-Vektor	54
2.19.1.7.	Auftrennung der PCR-Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese	55
2.19.1.8.	Gelextraktion	56
2.19.1.9.	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren	56
2.19.1.10.	Fusion-PCR	56
2.19.1.11.	TOPO-TA-Klonierung	57
2.19.1.11.1.	Anhängen des 3`-Adenin-Überhangs an das Fusion-PCR-Produkt	57
2.19.1.11.2.	Ligation des 3` Adenin-Überhangproduktes mit dem pCR®8/GW/TOPO®-Vektor	57
2.19.1.11.3.	Transformation des TOPO-TA-Klonierungsvektors in kompetente One shot®TOP10 <i>E. coli</i> und Kultivierung der transformierten Klone	57
2.19.1.12.	Plasmidpurifikation	58
2.19.1.13.	Evaluation der P <sub>Cat-2</sub> :: <i>DsRed2</i> -Sequenz in positiven Klonen	58
2.19.1.14.	Evaluation der erstellten P <sub>Cat-2</sub> :: <i>DsRed2</i> -Sequenz durch Sequenzierung	58
2.19.1.15.	LR-Reaktion	58
2.19.1.16.	Transformation kompetenter DH5α <i>E. coli</i> und Gewinn des Expressionsvektors	59
2.19.1.17.	Plasmidpurifikation (Midi-Präparation)	59
2.20.	Generierung transgener <i>Caenorhabditis elegans</i>	60
2.21.	Real-Time-quantitative-PCR	60

2.20.1.	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>Caenorhabditis elegans</i>	61
2.20.2.	Reverse Transkription	61
2.20.3.	Q-PCR	62
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	
3.1.	Zytoprotektion der klonalen SH-SY5Y Zelllinie mithilfe von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin	63
3.1.1.	Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen die SY-SY5Y Zelllinie vor MPP <sup>+</sup> -Toxizität	64
3.1.2.	Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen die SY-SY5Y Zelllinie vor Rotenon-Toxizität	67
3.1.3.	Einfluss der Toxine und der untersuchten Substanzen auf das Glutathiongleichgewicht der SH-SY5Y Zellen	70
3.1.4.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen SH-SY5Y Zellen vor oxidativen Modifikationen zellulärer Komponenten	75
3.1.5.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin zeigen eindeutige antioxidative Wirkung in direkten <i>in situ</i> Assays zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies	76
3.1.6.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin erhalten die Integrität der Mitochondrien bei einer Komplex I Inhibition in SH-SY5Y Zellen	78
3.1.7.	Einfluss der Toxine und Bisarylimine auf lysosomale Abbauprozesse und die mitochondriale Neusynthese in SH-SY5Y Zellen	83
3.2.	Zytoprotektion der primären Mittelhirnkulturen mithilfe von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin	86
3.2.1.	Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns vor MPP <sup>+</sup> - und Rotenon-Toxizität	87
3.2.2.	Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen dopaminerge Neurone des ventralen Mittelhirns vor MPP <sup>+</sup> - und Rotenon-Toxizität	91
3.2.3.	Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin detoxifizieren induzierten oxidativen Stress in Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns	93
3.2.4.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin stabilisieren das antioxidative System der Primärzellkultur	95
3.2.5.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin stabilisieren die Integrität der Mitochondrien bei einer Komplex I Inhibition in Primärzellkulturen	96

3.3.	<i>Caenorhabditis elegans</i> zur Untersuchung des protektiven Potentials von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin gegen Parkinson-Toxin induzierten Phänotyp <i>in vivo</i>	107
3.3.1.	Das Parkinson-Toxin induzierte L1-Larvenmodell	108
3.3.1.1.	Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin verhindern die MPP <sup>+</sup> -Effekte im L1-Larvenmodell	109
3.3.1.2.	Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin verhindern die Rotenon-Effekte im L1-Larvenmodell	113
3.3.2.	Etablierung einer transgenen <i>Caenorhabditis elegans</i> Linie zur Untersuchung des dopaminergen Systems nach Behandlung mit Parkinson-Toxinen	116
3.3.2.1.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin wirken neuroprotektiv im MPP <sup>+</sup> - und Rotenon-induzierten L1-Larvenmodell	117
3.3.2.2.	Etablierung eines adulten <i>Caenorhabditis elegans</i> Modells mit Toxin-induzierter spezifischer dopaminergener Neurodegeneration	121
3.3.2.3.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen dopaminerge Neurone des adulten Toxin-induzierten <i>Caenorhabditis elegans</i> Modells	124
3.3.3.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen MPP <sup>+</sup> - und Rotenon-behandelte adulte <i>Caenorhabditis elegans</i> vor einer reduzierten Beweglichkeit	126
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	129
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	
4.1.	Neuroprotektion <i>in vitro</i>	130
4.1.1.	Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin heben die Zytotoxizität in Parkinson-Modellen auf	130
4.1.2.	Mitochondrialer Phänotyp unter Komplex I Inhibition	135
	Das mitochondriale Membranpotential	135
	Mitochondriale Beweglichkeit	137
	Fusion und Fragmentierung der Mitochondrien	138
	Kompensatorische Biogenese der Mitochondrien	140
	Oxidativer Stress induziert autophagische Prozesse in Parkinson-Modellen	141
	Zusammenfassung der <i>in vitro</i> Ergebnisse	142
4.2.	Neuroprotektion der dopaminergen Neurone <i>in vivo</i>	143
4.2.1.	L1-Larven Parkinsonmodell	143
4.2.2.	Adultes <i>Caenorhabditis elegans</i> Parkinsonmodell	146
4.3.	Bisarylimine als effektive Antioxidantien zur Therapie der Parkinsonschen Krankheit	149
	Strukturelle Eigenschaften der Bisarylimine	151
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	154

<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	156
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	171

**LEBENS LAUF**

**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Parkinsonsche Krankheit

Die Parkinsonsche Krankheit (PD – Parkinson`s disease) zeichnet sich klinisch durch einen charakteristischen Bewegungstyp aus. Dieser Krankheitsphänotyp wird durch eine progressive Degeneration der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta (SNpc)* verursacht.

#### 1.1.1. Symptomatik der Parkinsonschen Krankheit

Die Charakteristika der PD wurden 1817 von James Parkinson in der Abhandlung „An Essay on the Shaking Palsy“ zusammengefasst. Wie prägnant beschrieben, zeichnet sich die Schüttellähmung (engl. shaking palsy, lat. *Paralysis agitans*) durch folgende Kardinalsymptome aus: Bradykinesia, beschreibt eine allgemeine Bewegungsarmut, wie z.B. der charakteristische kleinschrittige, schlurfende Gang, verzögerte Bewegungsinitiation und verminderte Mimik; Ruhetremor, bezeichnet das langsame Muskelzittern; Rigor, weist auf eine Muskelsteifheit hin, welche durch eine unwillkürliche Anspannung der quergestreiften Muskulatur hervorgerufen wird (gekrümmte Fehllhaltung des Körpers); posturale Instabilität, beschreibt die verminderte Aufrechterhaltung der Statur (Gang- und Standunsicherheit, verursacht durch verzögerte reflektorische Ausgleichsbewegungen). Weitere Begleitsymptome sind individueller Art und können im Verlauf der Krankheit entstehen oder sich verstärken. Hierbei sind zu nennen: psychische Veränderungen, wie Bradyphrenie (verlangsamte Denkabläufe und Antriebsverlust), Lewy-Körperchen-Demenz, niedergedrückte Stimmung bis zu Depressionen, Schlafstörungen, Müdigkeit, Störung der Aufmerksamkeit, sowie Sinnestäuschungen (oft medikamentös begründet), des Weiteren können sensorische Missempfindungen (insbesondere des olfaktorischen Sinnes) auftreten, Schmerzen in Gelenk und Muskel, sowie vegetative Störungen.

#### 1.1.2. Das Extrapyramidalmotorische System

Das Extrapyramidalmotorische System kontrolliert die Harmonie der Bewegungen und die Korrektur der Körperhaltung. Neben der Steuerung der Willkürmotorik, beeinflusst es Motivation, Emotion und Kognition. Die vom motorischen Kortex ausgehenden Informationen werden über die Basalganglien gefiltert und moduliert an den Hirnstamm zum Rückenmark und an den Thalamus geschickt, welcher seinerseits den Motorkortex moduliert. Die Basalganglien beschreiben den Regelkreislauf zwischen Striatum (*Putamen, Nucleus caudatus, Nucleus accumbens*), *Globus pallidus (GPe - Globus pallidus externus; GPi - Globus pallidus internus)*, *Substantia nigra (SNpc - Substantia nigra pars compacta; SNpr – Substantia nigra pars reticulata)* und subthalamischen Kerngebieten (siehe Abb. 1.1. und 1.2.).

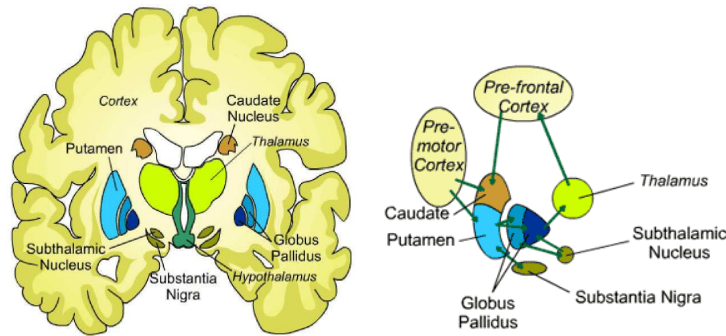


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Basalganglien. Entnommen aus [http://hopes.stanford.edu/basics/brainut/f\\_ab19bslgangp.gif&imgrefurl](http://hopes.stanford.edu/basics/brainut/f_ab19bslgangp.gif&imgrefurl).

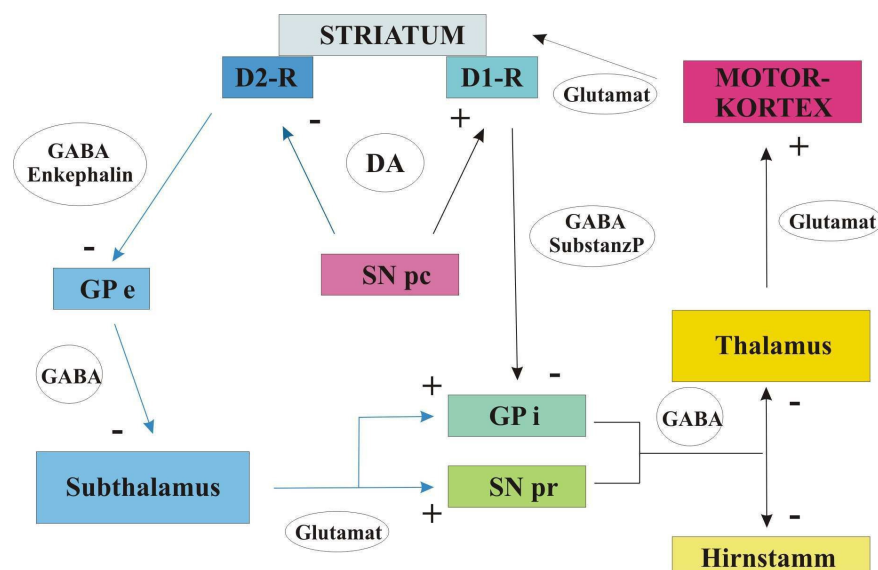


Abb. 1.2. Extrapyramidalmotorisches System. Modifiziert nach Lang und Lozano, 1998.

Das Striatum ist der Hauptrezipient der Informationen aus Motorkortex, Thalamus und Hirnstamm und wird des Weiteren über die *SNpc* moduliert. Der Motorkortex erregt das Striatum mittels glutamaterger Projektionen. Die GABAergen Efferenzen vom Striatum zum *GPi* und *SNpr* weisen überwiegend  $D_1$ -Rezeptoren auf, welche exzitatorisch erregt werden durch Dopamin der *SNpc* (interner Modulator der Basalganglien). Das hemmende GABAerge Signal des Striatums an den Ausgangsstrukturen der Basalganglien (*GPi* und *SNpr*; Hemmung der Hemmung) führt zur aktivierenden Wirkung auf die Thalamus/Motorkortex- und Hirnstamm/Rückenmark-Schleifen. Diese Regulationsschleife wird als direkter oder exzitatorischer Weg des Striatopallidums verstanden. Der indirekte oder inhibitorische Weg geht von GABAergen Efferenzen des Striatums zum *GP e* aus, welche durch Dopamin der *SNpc* über  $D_2$ -Rezeptoren inhibitorische Impulse erhalten. Im indirekten Regelkreislauf wird beim Dopaminsignal der *SNpc* der *GP e* nicht inhibiert, somit kann der *GP e* hemmend auf die subthalamischen Kerngebiete wirken und die Anregung der inhibitorischen GABAergen Ausgangssignale des *GPi* und der *SNpr* unterdrücken (siehe Abb. 1.2.). Fehlt das

Dopaminsignal der *SNpc*, wie bei Parkinson-Patienten (siehe Abb. 1.3.), wird der *GPe* gehemmt, somit bleiben die subthalamischen Kerne aktiv und wirken aktivierend auf *GPi* und *SNpr*. Kommt es zu einer Exzitation der Ausgangszentren der Basalganglien (*GPi* und *SNpr*), ist die direkte Hemmung aus dem Striatum aufgehoben und es kommt zu einer Suppression der kortikalen Motorsysteme (bei Parkinson-Patienten sichtbar als Akinesia, Rigidität und Tremor) und des Hirnstammes (bei Parkinson-Patienten treten Abnormalitäten der Haltung und Postur auf) (siehe Abb. 1.2. und 1.4.).

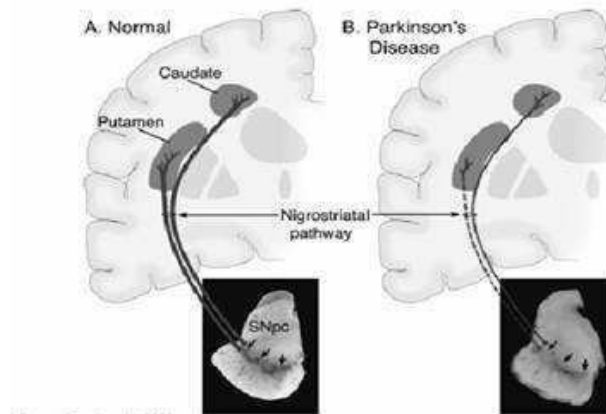


Abb. 1.3. Darstellung des Verlustes dopaminergener, Neuromelanin-haltiger Neurone in der *SNpc* und der verminderten dopaminergen Innervierung im Striatum. Verändert nach Dauer und Przedborski, 2003.

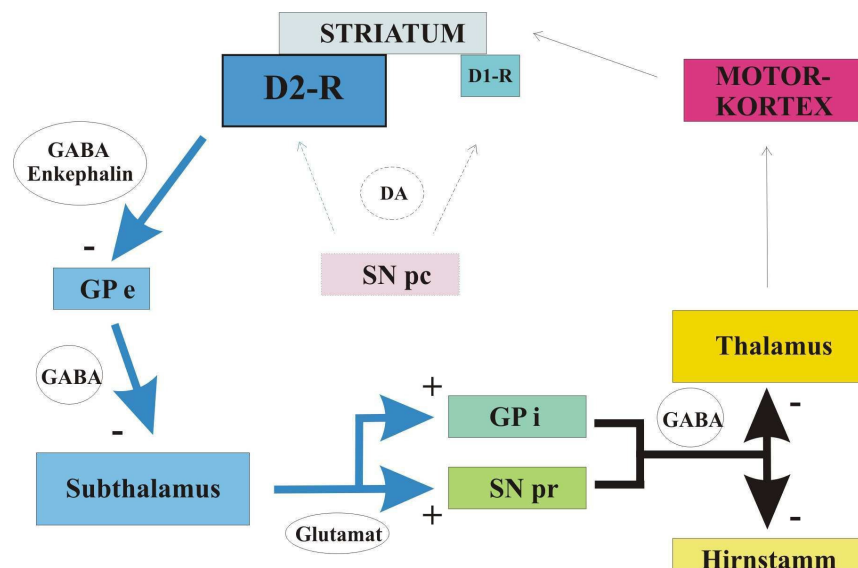


Abb. 1.4. Veränderung der Extrapyramidalmotorischen Schleife bei Parkinson-Patienten verursacht durch das Fehlen der dopaminergen Erregung des Striatums. Modifiziert nach Lang und Lozano, 1998.



### 1.1.3. Neuropathologie der Parkinsonschen Krankheit

Neuropathologisch ist die PD durch eine progressive Degeneration der dopaminergen, Neuromelanin-positiven Neurone in der *SNpc* gekennzeichnet (siehe Abb. 1.3. und 1.5.). Die Symptome treten erst bei einem 50 %igen Verlust nigraler dopaminergener Neurone und einer 80 %igen Dopamindepletion an striatalen Synapsen auf (Marsden, 1990; Fearnley und Lees, 1991). Der Dopaminmangel wird über die Dauer der präklinischen Phase ausgeglichen, vermutlich durch Hochregulation der Dopaminsynthese in verbliebenen Neuronen und Erhöhung der Empfindlichkeit der postsynaptischen striatalen Neurone für das Dopaminsignal (Zigmond, 1997). Die präklinische Phase oder Latenzzeit kann mehrere Jahrzehnte (Koller et al., 1991; anhand von *post mortem* Analysen) oder weniger als sieben Jahre (Morrish et al., 1998; anhand von PET (Positronen-Emissions-Tomographie)-Analysen) betragen.

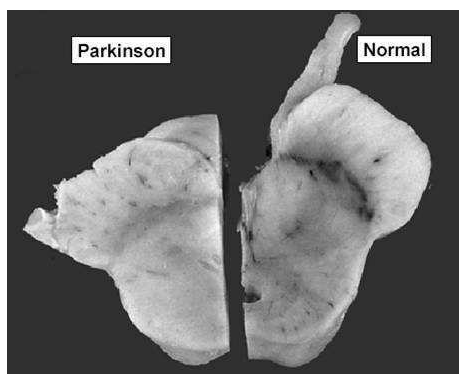


Abb. 1.5.  
Darstellung der *SN* mit den dopaminergen, Neuromelanin-positiven Neuronen (schwarz) bei Gesunden (rechts) und Verlust dieser Zellen bei Parkinson-Patienten (links). Entnommen aus einer Präsentation von Dauer und Przedborski, 2003 (Universität Basel).

Ein weiteres neuropathologisches Merkmal der PD ist die Ausbildung von Lewy-Körperchen (LB - engl. Lewy Bodies; Lewy, 1912; siehe Abb. 1.6.). Diese intrazellulären Einschlüsse findet man vermehrt in der *SNpc* und *Locus coeruleus*, aber auch in weiteren Hirnbereichen (Braak et al., 2004). LB stellen intraneuronale Einschlüsse dar und sind in ihrer Zusammensetzung protein- und membranhaltig. Die wichtigsten Komponenten dieser Aggregate sind  $\alpha$ -Synuclein (Spillantini et al., 1997), Synphilin-1 (Lee et al., 2004), Lipide sowie Teile des proteosomalen und lysosomalen Systems (Lennox et al., 1989, Engleender, 2008) und des Heat-Schock-Protein-Systems (Uryu et al., 2006).

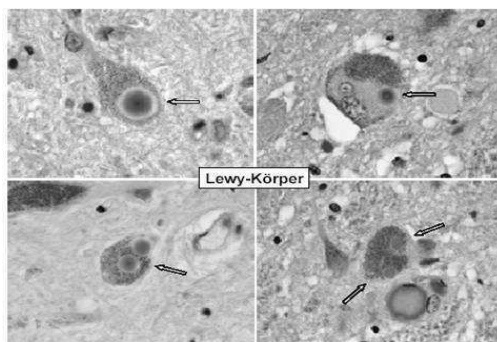


Abb. 1.6.  
Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Lewy-Körperchen; entnommen aus einer Präsentation von Dauer und Przedborski, 2003 (Universität Basel).

Die in Abschnitt 1.1.1. beschriebenen Begleitsymptome können eine Antwort auf die von Braak et al. (2004) beschriebenen Parkinson-Stadien (I bis VI) sein, welche anhand von LB-Ausbildungen in unterschiedlichen Hirnarealen der Parkinson-Patienten *post mortem* festgelegt wurden. Beim Fortschreiten der PD sind topographisch Komponenten des autonomen, limbischen und somatomotorischen Systems von LB-Einschlüssen betroffen. Im Stadium I bis II der prämotorischen Phase ist die *SNpc* nicht von LB-Einlagerungen betroffen, eine progressive Neurodegeneration mit LB-Ablagerungen in der *SNpc* tritt ab Stadium III auf.

#### **1.1.4. Prävalenz und Klassifizierung**

Morbus Parkinson stellt die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimerschen Krankheit dar. Die PD tritt in allen ethnischen Gruppen auf, die höchste Inzidenz ist jedoch bei Europäern zu verzeichnen mit einer leicht erhöhten Prävalenz bei Männern (Zhang und Román, 1993). PD manifestiert sich meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (mit Ausnahme der familiären Formen). Die Erkrankungsinzidenz steigt exponentiell zwischen dem 65. und 90. Lebensjahr an. Die Prävalenz der Gesamtbevölkerung liegt bei 0,3 % und erhöht sich auf 3 % bei 65-Jährigen (Moghal et al., 1994).

Das Parkinson-Syndrom wird in vier Formen klassifiziert in Hinblick auf den Entstehungsursprung. Der genetische Hintergrund in familiären Formen (5 bis 10 % aller Parkinson-Patienten) ist mit neun Genloci (*PARK1* bis 9) assoziiert. Die häufigsten Formen sind autosomal-rezessiv vererbt (*PARK2*, 6, 7 und 9). Bis auf *PARK8*, treten autosomal-dominante Formen (*PARK1*, 3, 4, 5 und 8) selten auf (siehe auch Abschnitt 1.6.). Die Mehrheit der Parkinson-Patienten entwickelt die Erkrankung ohne genetischen Hintergrund (sporadische oder idiopathische Formen, mind. 75 % der Parkinson-Patienten). Weniger häufig sind Parkinson-Symptome auf das symptomatische Syndrom (sekundäres Syndrom, z.B. vaskulär-, medikamentös- oder toxin-induziert) oder das atypische Parkinson-Syndrom (im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen entstehend) zurückzuführen.

#### **1.1.5. Diagnose**

Zur Diagnose der PD wird der sog. L-DOPA-Test angewandt. Hierbei wird das positive Ansprechen auf L-DOPA (Vorstufe des Dopamins; Kompensierung des dopaminergen Verlusts in der *SNpc*; siehe Abschnitt 1.2.) in einem standardisierten Test (Unified Parkinson`s Disease Rating Scale, UPDRS) untersucht, welcher Intelligenz (intellektuelle und gedankliche Beschwerden), Verhalten (Motivation, Initiative) und Stimmung (Depressionen), Aktivitäten des täglichen Lebens (Sprechen, Geschicklichkeit der Hände) und motorische Aspekte (Tremor, Rigidität, Bradykinesia, Mimik) anspricht. Zur Bildgebung der neurologischen Situation des Patienten kann eine computer- (CT) oder kernspintomographische (MRT) Untersuchung durchgeführt werden. Mithilfe einer SPECT (single

positron emission computed tomography) Analyse lässt sich das Ausmaß des Zellverlustes in der *SN* beurteilen.

### 1.1.6. Therapieansätze

Die Behandlung der Parkinson-Patienten erfolgt bislang meist symptomatisch. Hierbei werden durch Substitution des striatalen Dopamin-Defizits, welches durch die Degeneration der präsynaptischen Innervierung entsteht, die Symptome gelindert. Die Gabe von L-DOPA (L-Dihydroxyphenylalanin; gehirngängige Vorstufe des Dopamins), Dopaminrezeptor-Agonisten oder Inhibitoren des Dopaminmetabolismus ermöglicht, die dopaminerge Modulatorfunktion der Basalganglien zeitweise zu erhalten, mithilfe von NMDA-Antagonisten und Anticholinergika wird die Neurotransmitter-Balance der Basalganglien bei erniedrigtem Dopaminsignal ausgeglichen. Diese Therapieansätze zeigen nur Erfolg, solange die Degeneration der *SNpc* nicht völlig fortgeschritten ist und dopaminerge Neurone als Dopaminspeicher dienen. Beim Fortschreiten der Krankheit kommt es zu Wirkungsfluktuationen, dem sog. On-Off-Phänomen, sowie Bewegungsstörungen (Dyskinesien). On-Phasen bezeichnen eine gute Beweglichkeit, die von Off-Phasen, schlechter Beweglichkeit, und Dyskinesien, wie das plötzliche Erstarren, begleitet sind. In späten Stadien wird neben der irreversiblen ablativen neurochirurgischen Strategie, die Tiefenhirnstimulation angewandt, in welcher durch Implantation von Stimulationselektroden, überaktive Fehlimpulse des *Nucleus subthalamicus*, *Globus pallidus* oder vorderen Thalamus (siehe Abschnitt 1.1.2.) unterdrückt werden. Neuroprotektive und neurostabilisierende Therapieansätze sind von größter Bedeutung für die Erhaltung der Funktionalität des nigrostriatalen Fundaments der Bewegungsmodulation. Neuroprotektive Substanzen, welche auf antioxidativer Wirkung basieren, werden in dieser Arbeit untersucht und in Abschnitt 1.7. und 4.3. ausführlich erläutert.

## 1.2. Besondere Eigenschaften dopaminerger Neurone der *SNpc*

In Parkinson-Patienten kommt es zu einer selektiven Degeneration dopaminerger Neurone in der *SNpc*. Die Integrität dieser Neuronenpopulation wird altersassoziiert beeinträchtigt. Welche Eigenschaften der dopaminerger Neurone führen zur verstärkten Vulnerabilität dieser Zellen?

### Beschaffenheit dopaminerger Neurone

Braak et al. (2004) beschrieben anhand von *post mortem* Studien die neuronale Situation in Parkinson-Patienten. In dieser Abhandlung werden PD-Stadien anhand von LB-Ausbildungen festgelegt. Es konnte festgestellt werden, dass die Zellen, welche sich für die intrazelluläre Aggregatbildung anfällig zeigen, eine spezifische Morphologie aufweisen. Diese Neurone besitzen Axone, welche disproportional lang und dünn sind im Vergleich zur Größe des Somas (Braak et al., 2004). Nigrale

dopaminerge Neurone senden sehr lange Projektionen an das Striatum (Goldstein, 2003), in diesen Neuronen wird ein hoher Anteil (über 95 %) des Gesamtvolumens in axonalen Fortsätzen organisiert (Feng, 2006). Des Weiteren weisen für LB-Ablagerungen anfällige Neurone nicht myelinisierte oder leicht myelinisierte Axone auf. Myelinisierte Neurone erlauben einen schnellen Transport und verbrauchen weniger Energie für die Impulsweiterleitung (Nieuwenhuys, 1999).

### Dopaminsynthese, Dopaminabbau und das Neuromelanin

Ausgangspunkt der Dopaminsynthese ist die Aminosäure Tyrosin. Tyrosin wird aus dem Extrazellulärraum in die Nervenzelle aufgenommen oder intrazellulär mithilfe des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) aus der Aminosäure Phenylalanin gebildet (siehe Abb. 1.7.).

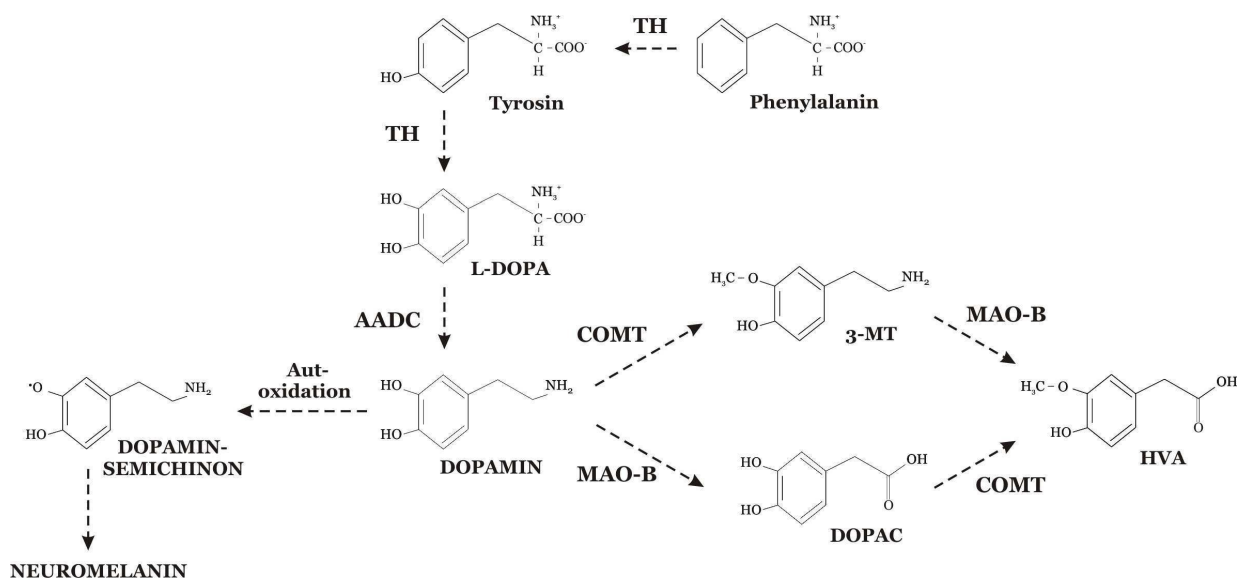
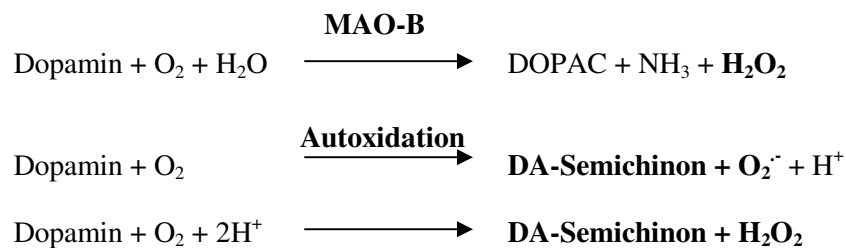


Abb. 1.7. Darstellung des Dopaminmetabolismus.

Tyrosin wird im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt mittels TH zu 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA) umgewandelt. Im nächsten Schritt wird mithilfe der aromatischen Aminosäure-Decarboxylase (AADC) L-DOPA zu Dopamin decarboxyliert (siehe Abb. 1.7.). Dopamin wird in synaptischen Vesikeln mithilfe des vesikulären Monoamintransporters 2 (VMAT 2) gespeichert. Nach der Erregung der nachfolgenden Postsynapse an striatalen  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptoren (siehe Abschnitt 1.1.2.) wird Dopamin v.a. in Nervenzellen oder in benachbarte Gliazellen mithilfe des Dopamintransporters (DAT) aufgenommen. Dopamin wird in Nervenzellen entweder in Vesikeln gespeichert oder zytosolisch metabolisiert. Monoaminoxidase-B (MAO-B) katalysiert die oxidative Desaminierung des Dopamins und die weitere Umwandlung zu 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd (DOPAC). Dieses Enzym ist in dopaminergen Zellen und Gliazellen präsent. Weiterer Abbau von DOPAC findet nur in Gliazellen statt, da dopaminerge Neurone das Enzym Katecholamin-O-Methyltransferase (COMT) nicht besitzen. In Gliazellen wird DOPAC zu Homovanillinsäure (HVA)

mittels COMT methyliert. COMT katalysiert auch direkt den Abbau von Dopamin zu 3-Methoxytyramin (3-MT), welches anschließend zu HVA abgebaut wird (siehe Abb. 1.7.).

Die Speicherung des Dopamins in Vesikeln ist von großer Wichtigkeit in Hinblick auf die Transmission des Signals bei Impulsweiterleitung als auch für den Schutz der Nervenzelle. Dopamin wird im Zytoplasma enzymatisch mithilfe der MAO-B (an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert) oder durch Autoxidation abgebaut (siehe Abb. 1.7.). Bei beiden Reaktionen kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).



Dopamin-Semichinon reagiert mit gleicher Spezies oder Cystein-Seitenketten von Proteinen (auch Glutathion) (Tse et al., 1976; Graham et al., 1978; Stockes et al., 1999) und bildet das biochemische Grundgerüst der Neuromelaninschichten. Diese komplexieren aliphatische Ketten von Lipiden und Peptide, chelatieren Metallionen wie Eisen, Kupfer, Zink, Magnesium, aber auch Schwermetalle aus der Umwelt (Zecca et al., 1994; Enochs et al., 1994) und akkumulieren Umwelttoxine wie 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) und Paraquat (D'Amato et al., 1986, Lindquist et al., 1988, Ostergren et al., 2004). Neuromelanin wird in gesunden Neuronen eine Schutzfunktion zugeschrieben, indem es die reaktiven Dopaminmetaboliten und andere reaktive und toxische Spezies sowie redoxaktive Eisenionen abfängt und in den autophagosomalen Vesikeln des Neuromelanins vor dem Zytosol verschließt (Zareba et al., 1995). Gelangt aber das Neuromelanin in den Extrazellulärraum (wenn Zellen sterben), wird eine massive mikrogliale Antwort ausgelöst, welche die umliegenden Zellen schädigt. Des Weiteren werden bei massiver Beladung der Zellen mit Neuromelanin Transportprozesse innerhalb der Zelle verhindert (Ducan and Goldstein, 2006). Ein Ausbruch des Neuromelanins aus autophagosomalen Vesikeln ins Zytosol, d.h. aller langjährig akkumulierter toxischer Spezies, könnte eine Determinante der Progression der PD darstellen (Zecca et al., 2006). Auch wurde eine proteosomale Inhibition durch das Neuromelanin beschrieben (Shamoto-Nagai et al., 2004).

### Glutathion und Eisen

Das Glutathion (GSH) ist eines der wichtigsten zelleigenen Antioxidantien der Zelle zur Detoxifizierung freier Radikale und Xenobiotika (siehe Abschnitt 1.3.2.). GSH tritt in millimolaren Konzentrationen im Gehirn auf (Cooper und Kristal, 1997). Im Vergleich zu anderen Hirnbereichen besitzt die SN erniedrigte Werte an GSH (Chen et al., 1989; Abbott et al., 1990; Kang et al., 1999).

Eines der primären biochemischen Merkmale der PD ist eine frühe Reduktion der GSH-Mengen in der *SNpc* (Riederer et al., 1989; Sofic et al., 1992). Man geht davon aus, dass nicht primär die erhöhte Detoxifizierungsfunktion des GSH zur Erniedrigung der GSH-Werte in der *SNpc* beiträgt, sondern eher Synthese und Abbau von GSH sich in Parkinson-Patienten früh verschieben (Sian et al., 1994a,b).

Hohe Eisenkonzentrationen sind charakteristisch für die *SNpc*. Bei Parkinson-Patienten ist die Eisenkonzentration in der *SNpc* stark erhöht im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen (Sofic et al., 1988; 1991). Freies Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) verstärkt oxidativen Stress durch die Reaktion mit Peroxiden in der sog. Fenton-Reaktion (siehe Abschnitt 1.3.2.(i).), und fördert die Entstehung der reaktivsten Sauerstoffspezies, des Hydroxyradikals ( $\text{HO}^{\cdot}$ ). Eine stringente Kontrolle des freien Eisenpools in der Zelle sorgt für eine optimale Verfügbarkeit des Eisens für biochemische Reaktionen, gleichzeitig werden aber die Mengen für verstärkte oxidative Reaktionen limitiert. Ferritin, der Hauptspeicher des Eisens, erhält das Eisen in einer nicht-reaktiven Form. In Parkinson-Patienten ist das Ferritin gesättigt mit Eisen (Griffiths et al., 1999). Dopaminmetaboliten (siehe oben) und Superoxid entziehen dem Ferritinpool das Eisen und machen es für Redoxreaktionen verfügbar (Double et al., 1998). Des Weiteren verstärkt Eisen die Autoxidationsreaktion des Dopamins, wobei wiederum vermehrt reaktive Peroxide entstehen (Ben-Shachar et al., 1995), und fördert gleichzeitig die Ablagerung des Dopamins im Neuromelanin (Sulzer et al., 2000). Wie oben beschrieben, dient das Neuromelanin als Chelator für Eisen, ist jedoch ein Überschuss an  $\text{Fe}^{3+}$  dem Neuromelanin angelagert, verhält sich das Neuromelanin wie ein Prooxidant und reduziert  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  und macht es hierdurch wieder verfügbar für das Zytosol ( $\text{Fe}^{2+}$  besitzt niedrige Affinität zu Neuromelanin; Ben-Shacher et al., 1991). Somit wird das Eisen wieder verfügbar für oxidative Reaktionen.

### **Mitochondriale Rolle**

In *post mortem* Studien an Parkinson-Patienten konnte ein Aktivitätsverlust des Komplex I innerhalb der dopaminergen Neurone der *SNpc* detektiert werden (Schapira et al., 1990; Hattori et al., 1991; Dawson und Dawson, 2003; Schapira, 2006; Keeney et al., 2006). Der Aktivitätsverlust dieses Atmungskomplexes ist mit erhöhten Carbonylierungen in katalytischen Domänen des Komplex I korreliert (Keeney et al., 2006). Zudem zeigen sich dopaminerge Neurone der *SNpc* verstärkt vulnerabel gegenüber einer gestörten Komplex I Aktivität (siehe Abschnitt 1.6. und 1.8.2.). Dies könnte auf die oben beschriebenen, erhöhten prooxidativen Bedingungen innerhalb dieser Neuronenpopulation zurückzuführen sein, die durch den Dopaminmetabolismus, erniedrigte Glutationwerte, das freie Eisen und die Existenz des Neuromelanins verursacht werden (Chinta und Andersen, 2008).

## Oxidativer Stress

Das erhöhte Auftreten oxidativer Modifikationen an zellulären Komponenten konnte an *post mortem* Untersuchungen innerhalb der nigralen Region von Parkinson-Patienten bestätigt werden (Sanchez-Ramos et al., 1994; Floor und Wetzel, 1998; Zhang et al., 1999; Kikuchi et al., 2002; Andersen, 2004; Keeney et al., 2006). Dopaminerge Zellen der *SNpc* besitzen besondere Beschaffenheiten, welche eine prooxidative Situation in diesen Zellen bei nicht ausreichenden antioxidativen Schutzmechanismen einführen. All die oben genannten Besonderheiten dopaminerger Neurone der *SNpc* werden altersassoziiert und besonders in Parkinson-Patienten verstärkt.

### 1.3. Oxidativer Stress

Seit Zellen von der oxidativen Atmung profitieren, werden sie durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) belastet. Parallel zur evolutionären Adaptierung an die sauerstoffreiche Atmosphäre durch die Aufnahme des oxidativ metabolisierenden „Mitochondriums“ haben eukaryotische Zellen antioxidative Schutzsysteme entwickelt, welche die Entstehung von oxidativem Stress zu verhindern versuchen. Oxidativer Stress äußert sich darin, dass das endogene antioxidative System der Zelle die anfallenden Radikale nicht ausreichend entgiften kann. Es kann in diesem Zusammenhang zwischen ROS-Produktion und -Beseitigung unterschieden werden, welche in Zusammenarbeit einen stationären Redoxzustand in Zellen beibehalten oder zur ROS-Emission beitragen, wodurch Zellkomponenten oxidativ beeinträchtigt werden. Im letztgenannten Redoxzustand kommt es zur Entstehung oxidativ modifizierter Proteine, Membranen und Nukleinsäuren, die wiederum vermehrt oxidativen Stress propagieren. Oxidativer Stress wird mit der allgemeinen Seneszenz und verschiedenen Pathologien, wie neurodegenerativen und nicht neurologischen Erkrankungen, in Verbindung gebracht (Lin und Beal, 2006; Nunomura et al., 2006).

#### 1.3.1. Wie entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS)?

In aeroben Organismen kommt es zur Bildung von ROS, dieser Begriff vereinigt sowohl entstehende Sauerstoff- als auch Stickstoffradikale. Die wichtigste oder primäre Quelle der ROS-Bildung stellen Mitochondrien dar. An der inneren Mitochondrienmembran werden in der energetischen ATP-Kopplung Elektronen über Redoxzentren transferiert, die potentiell einzelne Elektronen verlieren können (siehe Abb. 1.8.). Ausbrechende Elektronen, die etwa 1 bis 3 % des Elektronentransfers ausmachen (Boveris und Chance, 1973; siehe auch Andreyev et al., 2005), werden von  $O_2$  abgefangen. Ein Ein-Elektronen-Transfer auf  $O_2$  führt zur Bildung des Superoxid-Anions ( $O_2^{\cdot-}$ ), des Vorläufermoleküls der ROS. Komplex I (NADH Dehydrogenase) ist neben Ubichinon (Coenzym Q,

Q) und Cytochrom b des Komplex III (Ubichinon: Cytochrom c Reduktase) hierfür verantwortlich (zusammengefasst in Turrens, 2003).

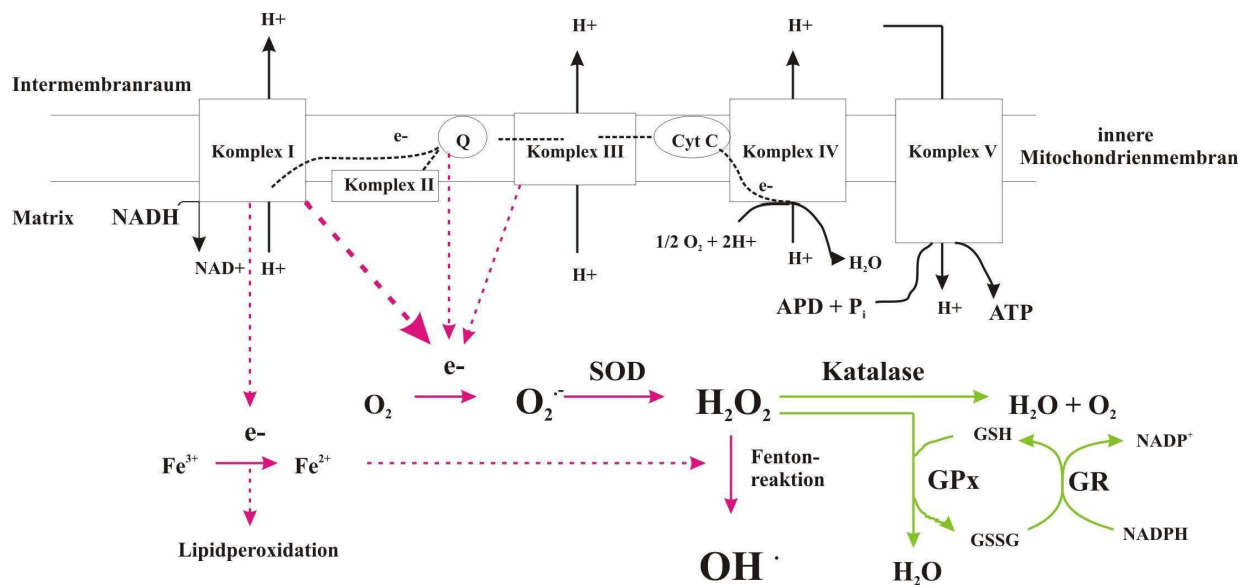
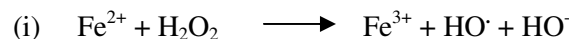
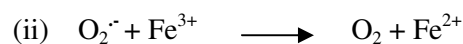


Abb. 1.8. Darstellung der Atmungskette der Mitochondrien, der Hauptbildungsquellen von ROS, sowie der Hauptdetoxifizierungsenzyme.

Das  $O_2^{\cdot-}$ -Radikal ist hoch reaktiv, v.a. an Eisen-Schwefel-Zentren der mitochondrialen Atmungskette. Da das Superoxid-Anion aufgrund seiner negativen Ladung Membranen nicht überschreitet, ist seine Reaktivität limitiert. Die Reduktion des  $O_2^{\cdot-}$ -Radikals führt zur Bildung des Wasserstoffperoxids ( $H_2O_2$ ). Diese Reaktion wird hauptsächlich von der Superoxiddismutase (SOD) katalysiert.  $H_2O_2$  ist begrenzt reaktiv, es diffundiert aber durch Membranen. Eisenionen ( $Fe^{2+}$ ) begünstigen die sog. Fentonreaktion (i), wobei das reaktivste Sauerstoffradikal, das Hydroxyradikal ( $HO^{\cdot}$ ), entsteht:



Das  $O_2^{\cdot-}$ -Radikal kann die Fentonreaktion (i) fördern, indem es die Reduktion des Eisenions  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$  (ii) begünstigt:



Neben Eisenionen können weitere Metallionen, v.a. Kupferionen, an diesen Reaktionen beteiligt sein.

Die Quelle der nicht-membrangekoppelten Elektronenemission des Komplex I kann in drei experimentelle Mechanismen unterschieden werden (Murphy, 2009). 1) Der reverse Elektronenfluss (RET), welcher energetisch an das Membranpotential gekoppelt ist, erlaubt Elektronen entgegen des Redoxgradienten zu „wandern“ (vom reduzierten  $CoQH_2$  zum  $NAD^+$  anstatt zum  $O_2$ ). Dieser Vorgang tritt auf bei einer Inhibition des Komplex III mit Antimycin A in Anwesenheit von Succinat,  $NAD^+$



und hohem Membranpotential. RET führt zur starken ROS-Produktion, welche 5 bis 20 % der Gesamtsauerstoffkonsumption beansprucht. 2) Der zweite experimentelle Mechanismus der vermehrten ROS-Produktion wird durch Rotenon und andere Komplex I Inhibitoren, wie MPP<sup>+</sup>, induziert. Für eine gesteigerte ROS-Produktion wird ein hoher Reduktionsgrad des Redoxträgers NADH benötigt, das Membranpotential reguliert diesen Prozess nicht (siehe auch Diskussion). 3) Der Mechanismus der vermehrten ROS-Bildung ohne Komplex I Inhibition wird unterstützt durch hohen Reduktionsgrad des NADH, und somit durch vermehrte Aktivität der NAD<sup>+</sup>-gelenkten Enzyme, und wird stimuliert durch ein hohes Membranpotential (Chance und Williams, 1956). Der Mechanismus der ROS-Generierung durch Komplex III, welcher CoQH<sub>2</sub> oxidiert und Cytochrom c als Elektronenakzeptor nutzt, wird durch das instabile Semichinon (Q<sup>•</sup>) vermittelt, welches im CoQ-Zyklus der CoQH<sub>2</sub>-Oxidation entsteht. Diese Reaktion wird durch Behandlung mit Antimycin A erhöht.

### 1.3.2. Das antioxidative Schutzsystem der Zelle

Das antioxidative Schutzsystem der Zelle kann in antioxidative Moleküle und antioxidative Enzyme unterteilt werden (Moosmann und Behl, 2002).

#### Antioxidative Moleküle

Zu den antioxidativen Molekülen der Zelle zählen endogene Stoffe, wie Glutathion, Harnsäure, Ubichinon (Coenzym Q), Liponsäure und Bilirubin, oder antioxidative Moleküle der Nahrung, wie Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherole und Tocotrienole, wie das  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Carotinoide und Flavonoide.

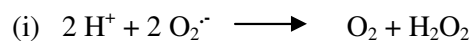
Glutathion ist das wichtigste antioxidative Molekül der Zelle. Es reagiert direkt mit freien Radikalen, wie O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NO<sup>•</sup> (Stickstoffoxid) und HO<sup>•</sup> (Winterbourn und Metodiewa, 1994; Clancy et al., 1994), oder fungiert als Elektronendonator in der Reduktion von Peroxiden, katalysiert durch die Glutathionperoxidase (GPx) (siehe Abb. 1.8.). Glutathion (GSH) stellt ein Tripeptid ( $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Glu) dar mit einer aktiven Thiolgruppe am Cystein. In oxidierten Form liegt es als Glutathiondisulfid (GSSG) vor oder bildet Disulfide mit Proteinen an Cystein-Seitenketten aus. Die Synthese von GSH erfolgt mithilfe des Enzyms  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthase ( $\gamma$ -GCS), welche ATP-abhängig zuerst das  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein bildet und nachfolgend ein Glycin hinzu anfügt. Regulation der GSH-Synthese durch  $\gamma$ -GCS erfolgt über einen Rückkopplungsmechanismus des GSH und Phosphorylierung. Das Recyclen von GSSG zu GSH wird vermittelt durch die Glutathion-Reduktase (GR), welche NADPH als Reduktionsmittel nutzt. Die Degradation von GSH erfolgt extrazellulär mithilfe der  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase. GSH tritt in millimolaren Konzentrationen im Gehirn auf (Cooper und Kristal, 1997),

Mitochondrien beinhalten etwa 10 bis 12 % des Gesamtglutathions der Zelle. Wegen des relativ kleinen Matrixvolumens, ist die mitochondriale GSH-Konzentration höher als im Zytoplasma (Wahlländer et al., 1979).

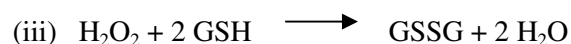
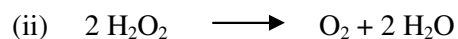
Vitamin C und Vitamin E sind die wichtigsten Antioxidantien der Nahrung. Vitamin C kann ein Elektron an Radikale abgeben unter Bildung des stabilen Ascorbylradikals. Vitamin C ist zytosolisch aktiv. Radikale, die Membranen angreifen, werden von Vitamin E abgefangen. Vitamin E lagert sich durch seinen lipophilen Charakter in Membranen ein und detoxifiziert Lipidperoxidationsprodukte und stellt somit ein sog. Kettenabbruch-Antioxidans dar. Vitamin C und Ubichinon regenerieren oxidiertes Vitamin E (Packer et al., 1979; Leung et al., 1981, Packer et al., 2001).

### Antioxidative Enzyme

Das anfallende Superoxid-Radikal der Atmungskette (siehe Abschnitt 1.3.1.) ist sehr reaktiv. Es wird mithilfe der Superoxiddismutase (SOD) entkräftet, indem zwei Superoxid-Radikale und zwei Protonen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid dismutieren (siehe (i) und Abb. 1.8.):



SOD tritt in drei Formen auf. Die Kupfer/Zink-abhängige Cu/Zn-SOD (SOD1) ist zytosolisch und im mitochondrialen Intermembranraum anzutreffen, wohingegen die Mangan-abhängige MnSOD (SOD2) hauptsächlich mitochondrial lokalisiert ist (Okado-Matsumoto und Fridovich, 2001). SOD3 stellt eine Cu/Zn-SOD dar, tritt aber extrazellulär auf (Marklund, 1982; Fattman et al., 2003). Das anfallende Wasserstoffperoxid kann mithilfe der Katalase (ii) oder der Glutathionperoxidase (iii) detoxifiziert werden (siehe Abb. 1.8.):



Für die Detoxifizierung des Wasserstoffperoxids ist hauptsächlich die Glutathionperoxidase (GPx) zuständig (Makino et al., 1994), Katalase besitzt einen hohen  $K_m$ -Wert für Wasserstoffperoxid und ist im Gehirn wenig aktiv (Marklund, 1982). Glutathionperoxidasen, welche Selenoenzyme darstellen und Glutathion als Reduktionsäquivalenten nutzen, treten in verschiedenen Formen auf und sind differentiell lokalisiert (Brigelius-Flohé, 1999). GPx1 ist in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert, wie auch in der mitochondrialen Matrix und im Intermembranraum. GPx1 stellt vielleicht das wichtigste enzymatische ROS-Detoxifizierungssystem dar, v.a. bei akutem oxidativen Stress. Oxidiertes Glutathion (GSSG) kann mithilfe der Glutathion-Reduktase (GR) regeneriert werden (iiii):



Des Weiteren bieten die Glutathion-S-Transferase, welche bei der Detoxifizierung von Xenobiotika und organischen Peroxiden beteiligt ist, durch Konjugation von GSH an Oxidationsprodukte, sowie Peroxiredoxine und Thioredoxin-abhängige Peroxireduktasen, welche oxidierte Proteine und Lipide regenerieren, einen wichtigen antioxidativen Schutz. Es sind auch Reparaturenzyme anzumerken, wie DNasen, RNasen, Proteasen und Lipasen, sowie das proteosomale und lysosomale Abbausystem der Zelle, welche einen sehr wichtigen Schutz vor oxidativ modifizierten Akkumulationen bieten (siehe Abschnitt 1.3.4. und Abb. 1.9.).

### 1.3.3. Schädigung zellulärer Moleküle

Überwiegt die ROS-Bildung gegenüber der ROS-Beseitigung, kommt es zur „Netto“ ROS-Produktion und hierdurch zu oxidativen Modifikationen zellulärer Komponenten (siehe Abb. 1.9.). Lipidperoxidation erfolgt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, welche stark angereichert in Membranen des Gehirns und der mitochondrialen Membran vorkommen. Peroxidation wird durch das Hydroxyradikal vermittelt. Hierbei entsteht eine Kettenreaktion der Radikalbildung. Dieser Vorgang propagiert die Ausbreitung der Radikale und kann durch molekularen Sauerstoff, Peroxyradikale ( $\text{HO}_2^\cdot$ ), sowie Metallionen, wie Eisen- und Kupferionen, unterstützt werden. Lipidperoxide können mithilfe von Metallionen zu Aldehyden und Ketonen entarten. Die Hauptprodukte des Lipidzerfalls und biochemische Marker des oxidativen Stresses sind Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal. Beide Aldehyde zeigen zytotoxische Eigenschaften, sie sind mutagen, greifen Proteine an und induzieren oxidative Bedingungen. Die Oxidation von Nukleinsäuren ist mutagen, hierbei können aromatische Basen, sowie das Zuckerrückgrad oxidiert werden, wobei es beim letzteren zu DNA-Strangbrüchen kommt. Das häufigste Produkt dieser Reaktion ist das 8-Hydroxyguanin, welches einen weiteren Marker des oxidativen Stresses darstellt. Proteinoxidation verursacht verschiedenartige Modifikationen der Aminosäurereste, z.B. können Cystein- und Methionin-Seitenketten zu Disulfiden und Sulfoxiden reagieren, Arginin und Lysin zu Aldehyden, aromatische Seitenketten können oxidiert oder nitriert werden und aliphatische Kohlenstoffatome können zu Alkoholen oxidiert werden. Lipidperoxidationsprodukte modifizieren Proteine und Reaktionen mit Zuckern und Aldehyden verursachen eine verstärkte Proteinglykosylierung. Proteincarbonyle, welche bei diesen Reaktionen entstehen, stellen einen wichtigen Marker der Proteinoxidation dar. All diese Modifikationen führen zur Beeinträchtigung zellulärer Prozesse und zu vermehrten Reparaturmechanismen (siehe Abb. 1.9.).

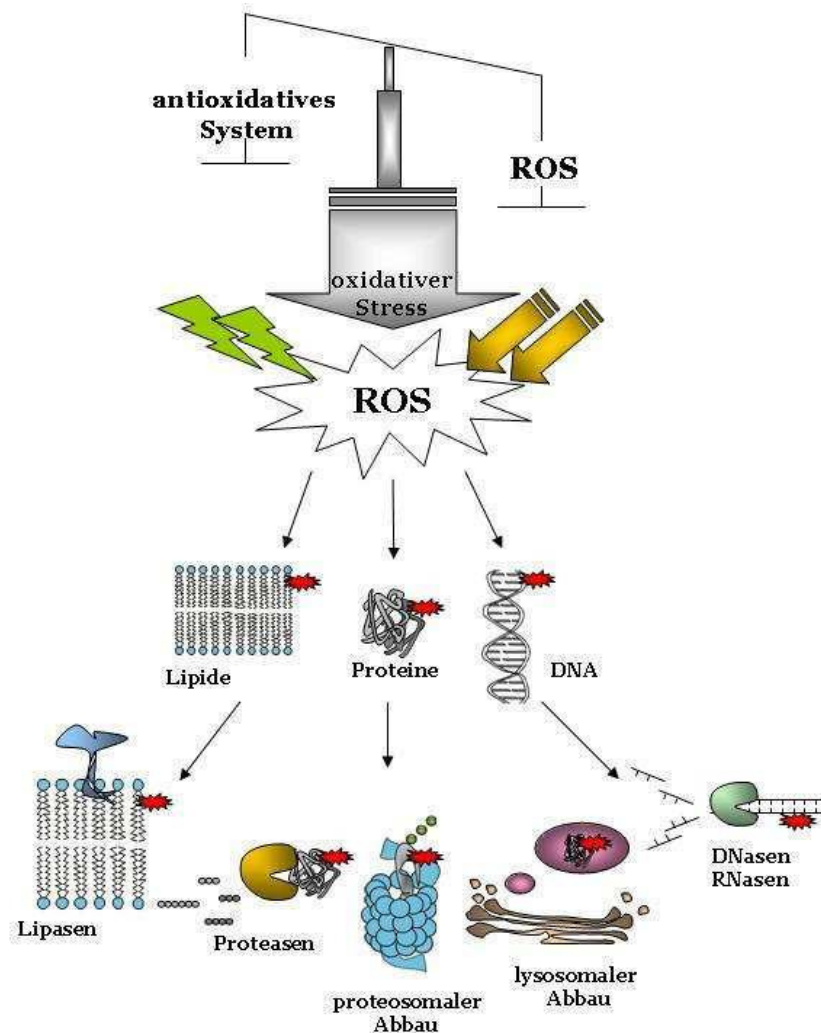


Abb. 1.9. Oxidative Schädigung zellulärer Komponenten. Überwiegt die ROS-Entstehung gegenüber dem antioxidativen Schutzsystem und den Degradationssystemen (Lipasen, Proteasen, proteosomales und lysosomales Abbausystem, DNasen, RNasen) der Zelle, kommt es zum oxidativen Stress und hiermit zur Akkumulation veränderter zellulärer Komponenten.

### 1.3.4. Beseitigung oxidativ modifizierter Proteine

Die Eliminierung modifizierter Proteine erfolgt mithilfe proteosomaler und lysosomaler Abbauprozesse (siehe Abb. 1.9.). Proteine, die für den proteosomalen Abbau bestimmt sind, werden mit Polyubiquitin-Ketten markiert. Die Erkennung und Markierung der Zielproteine erfolgt innerhalb einer Enzymkaskade, bestehend aus E1-, E2- und E3-Enzymen, wobei die Diversität der E3-Ligasen des Ubiquitin-Proteosomen-Systems, die Erfassung einer Vielzahl unterschiedlicher Zielproteine ermöglicht. Für die Aufnahme in das 26S-Proteosom müssen Proteine entfaltet werden. Stark oxidierte Proteine existieren in stabilen Aggregaten, welche sich durch kovalente Quervernetzung, Disulfidbrücken oder hydrophobe Interaktionen gegenüber Entfaltungen inert zeigen und stellen somit keine angemessenen Substrate für das Proteosom dar. Vernetzte Proteine werden mithilfe der Autophagie verdaut. Dieser Prozess vermittelt die Degradation von Proteinaggregaten und Organellen,

wie den Mitochondrien, innerhalb von Lysosomen. Makroautophagie erfolgt durch Einverleibung von Organellen oder langlebigen Proteinen innerhalb einer vesikulären Doppelmembran, die als Autophagosom bezeichnet wird. Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert im Zytoplasma mit Lysosomen, in welchen eine Degradation mithilfe saurerer lysosomaler Hydrolasen (Proteasen aus der Familie der Cathepsine) erfolgt. Mikroautophagie erfolgt durch eine direkte Einverleibung zytoplasmatischer Komponenten in Lysosomen. Eine weitere Form der Autophagie stellt die Chaperon-medierte Autophagie (CMA) dar. Diese Art des Verdauens erfolgt nur an Proteinen mit einer Konsensussequenz. Diese Abbau-determinierende Sequenz wird durch einen Chaperon-Komplex erkannt, worauf der Substrat-/Chaperon-Komplex an lysosomalen Rezeptoren erkannt, entfaltet und über die lysosomale Membran transloziert wird. Unvollständig verdaute Komponenten innerhalb der Lysosomen können sich im Alterungsprozess der Zelle zu polymerisierten Lipofuscin-ähnlichen Aggregaten entwickeln.

#### **1.4. Zelltod**

Ein erhöhter oxidativer Stress, Störungen proteosomaler oder lysosomaler Abbauwege, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials oder veränderte Signalkaskaden können den Zelltod einleiten.

Im Unterschied zur Nekrose, stellt die Apoptose (programmierte Zelltod) einen aktiven Eliminationsprozess der Zelle dar. Diese Art der zellulären Entkopplung erhält eine wichtige Funktion in der Entwicklung und Homöostase des Gesamtorganismus. Merkmale der energieaufwendigen Form des Zelltodes sind das Abrunden der Zelle, Kondensation und Spaltung des Chromatins, Bläschenbildung der Membran und Entstehung von apoptotischen Körperchen, welche von Makrophagen aufgenommen werden, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Im Gegensatz werden bei nekrotischer Zelleliminierung durch Zerfall von Zellorganellen und Schädigung der Zellmembran, Entzündungsreaktionen hervorgerufen, welche durch Makrophagenanlockung, durch Stoffe des freigesetzten Zytoplasmas der geplatzen Zellen, entstehen.

Signale für die Einleitung der Apoptose können intrinsischer oder extrinsischer Art sein. Der extrinsische Apoptoseweg spielt eine wichtige Rolle bei Immunantwort und Tumorabwehr. Die Einleitung dieser Apoptosekaskade erfordert eine Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptorfamilie, welches die Caspase 8 aktiviert, die durch Aktivierung der Effektorcaspase 3 und des Bid-Proteins in die Effektorphase des intrinsischen Weges eingreift. Der intrinsische (mitochondriale) Weg wird durch Stressoren eingeleitet, wie UV-Strahlung, zytotoxische Substanzen, freie Radikale, Calcium-Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder Wachstumsfaktor- und Serumentzug. Die Regulation erfolgt hier mithilfe der proapoptotischen (wie Bax, Bak, Bid) und antiapoptotischen Faktoren der Bcl<sub>2</sub>-Familie. Bax und Bak translozieren während

des Apoptoseprozesses vom Zytosol an das Mitochondrium und bilden in der mitochondrialen Membran durch Oligomerisierung Poren aus, wodurch eine Freisetzung von mitochondrialen Proteinen, wie dem Cytochrom C (Cyt c), ermöglicht wird. Zytosolisches Cyt c und Apaf-1 aktivieren Caspase 9 unter Ausbildung des Apoptosomenkomplexes aus den drei Komponenten. Hierauf erfolgt die Aktivierung der Effektorcaspase 3, welche die gesamte Kaskade der zellulären Eliminierung einleitet (Hengartner, 2000).

Das Absinken des mitochondrialen Membranpotentials stellt ein sehr frühes Ereignis in der mitochondrialen Zelltodkaskade dar (Green und Reed, 1998; Green und Kroemer, 2004). Dieses wird hervorgerufen durch Blockierung der mitochondrialen Atmungskette und hierauf einsetzender Öffnung der mitochondrialen Pore (MTP – engl. mitochondrial transition pore; Qian et al., 1997), welche als Konsequenz einer oxidativen Modifizierung an MTP-Einheiten erfolgen kann (Kowaltowski et al., 2001). Die MTP wird gebildet aus dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) der inneren Membran mit gekoppeltem Cyclophilin D, einem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC, Porin), welcher die äußere Membran umspannt, und dem peripheren Benzodiazepinrezeptor (Zamzami und Kroemer, 2001), und kann im offenen Zustand bis zu 1,5 kDa große Moleküle durchlassen. Öffnung der MTP führt zur Kollabierung des mitochondrialen Membranpotentials, zum ATP-Verlust und zur Freisetzung proapoptotischer Komponenten ins Zytosol. Eine leichte Senkung des mitochondrialen Potentials wird mit Apoptose assoziiert, eine drastische Senkung aber mit Nekrose (Martinou und Green, 2001).

### **1.5. Funktion der Mitochondrien innerhalb der Zelle**

Die symbiotische Beziehung der glykolytisch aktiven, eukaryotischen Zelle und des aufgenommenen „Mitochondriums“ hat sich zu einer Einheit entwickelt, in welcher eine koordinierte Interaktion, Verantwortung für die Vollständigkeit des zellulären Ausmaßes übernimmt. Mitochondrien sind Schlüsselkomponenten im Entwicklungs- und Alterungsprozess, in Signalprozessen, der Erhaltung der Calcium-Homöostase, Zellzyklusregulation, Radikalproduktion, Thermogenese und, wie oben beschrieben, in der Entscheidung und Einleitung der zellulären Eliminierung, sowohl im apoptotischen als auch im nekrotischen Zelltod.

Mitochondrien stellen Membran-umschlossene Organellen eukaryotischer Zellen dar mit 0,5 bis 10 µm Durchmesser und lassen sich in vier Kompartimente mit unterschiedlichen Bestandteilen und Funktionen unterscheiden. Die poröse äußere Membran umschließt das Organell, enthält wichtige Enzyme und Rezeptoren und ist durchlässig für kleine Moleküle und Ionen. Die stark gewundene, invaginierte Innenmembran beinhaltet die Komponenten der oxidativen Phosphorylierung und ist impermeabel für die meisten Moleküle und Ionen. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der

Intermembranraum mit spezialisierten Proteinen. Die Matrix, die von der inneren Membran umschlossen ist, enthält Enzyme verschiedener metabolischer Prozesse, wie des Zitratzyklus, der Fettsäureoxidation und des Harnsäurezyklus, und beinhaltet die mitochondriale DNA (mtDNA), Peptidasen und Chaperone. Der Zitratzyklus behält die Reduktionsäquivalenten  $\text{NADH}_2$  (an Komplex I) und  $\text{FADH}_2$  (an Komplex II) in einem reduzierten Status. Die Freigabe der Elektronen der Reduktionsäquivalenten in den Elektronentransport an der inneren Membran führt zur Reduktion des Ubichinons, welches über Komplex III Cyt c reduziert und das Cyt c an Komplex IV die Elektronen transferiert, wo sie molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduzieren (siehe Abb. 1.8.). Der Elektronenfluss ist an die Erstellung des Protonengradienten gekoppelt (Komplex I, III und IV). Der Protonengradient bildet das Membranpotential (innen negativ:  $\Delta\Psi_m$ : -150 bis -180 mV), den elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\text{pH}$ , innen basisch) und erlaubt Protonen über die ATP-Synthase nach innen zu translozieren mit paralleler Bildung des ATP (siehe Abb. 1.8.). Die mitochondriale zirkulär-doppelsträngige DNA (mtDNA) enthält 37 Gene (16569 Basenpaare). Diese kodieren für 13 strukturelle Proteine der oxidativen Phosphorylierung, 22 Transfer-RNAs, sowie eine 12S und 16S ribosomale RNA (Garesse und Vallejo, 2001). Etwa 900 Proteine der mitochondrialen Maschinerie werden von der nukleären DNA kodiert, diese Proteine werden in das Mitochondrium transportiert (Chan, 2006).

Mitochondrien, als Hauptakteure der zellulären Energiemaschinerie, nehmen in der Zelle eine mobile und den Anforderungen der Zelle hierarchisch unterstellte Rolle ein. Die Anzahl der Mitochondrien in Zellen kann stark variieren zwischen Organismen und Gewebetyp. In Neuronen finden sich hunderte bis tausende Mitochondrien. Mitochondrien teilen sich hauptsächlich als Antwort auf Energieansprüche der Zelle. Die Synthese neuer Mitochondrien erfolgt nahe dem Nukleus, in Neuronen im Soma. Den Anforderungen des Energieverbrauchs folgend, wandern Mitochondrien innerhalb der Zelle entlang von Zytoskelettkomponenten und zeigen eine dynamische Mobilität. Mitochondrien enthalten mehrere Kopien der mtDNA (2 bis 15 Kopien - Polyplasmie), welche nicht modifiziert sind oder multiple Varianten des mitochondrialen Codes darstellen können (Heteroplasmie). Des Weiteren können Mitochondrien durch häufige Fusion und Teilung komplexe Morphologien annehmen. Das „mitochondriale Retikulum“ vereinigt die Fusion mehrerer Mitochondrien (Chan, 2006). In diesem Prozess kommt es zu intermitochondrialen Kontakten mit möglichem Austausch genetischer Informationen und eine energetische Kopplung in dem vernetzten System kann zur effektiven Energieproduktion beitragen. Eine exzessive Teilung der Mitochondrien, welche als Fragmentierung beschrieben werden kann, begleitet die ersten Schritte der mitochondrial eingeleiteten Apoptose (Frank et al., 2001). Abbau geschädigter Mitochondrien erfolgt über Autophagie (Mitophagie; siehe Abschnitt 1.3.4.), geschädigte mitochondriale Proteine können auch endogen mithilfe intramitochondrialer Proteasen und Peptidasen eliminiert werden (Bota und Davies, 2001).

## **Mitochondriale Rolle in der progressiven Neurodegeneration**

Mitochondrien besitzen eine zentrale Rolle im Alterungsprozess und bei altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen (Lin und Beal, 2006; Trifunovic et al., 2004; Ruan et al., 2002; Hansel et al., 2002; Schriener et al., 2005). Das mitochondriale Genom (mtDNA) zeigt sich hoch vulnerabel gegenüber ROS. ROS entstehen hauptsächlich innerhalb des Elektronentransports an der inneren Mitochondrienmembran, somit in der Nähe der in der mitochondrialen Matrix lokalisierten mtDNA. Reparaturmechanismen der mtDNA sind nicht völlig effizient und des Weiteren weist die mtDNA keinen Schutz durch Histonanlagerungen auf. Die mtDNA innerhalb eines älteren Organismus zeigt, wie oben beschrieben, meist nicht einen vererbten, homogenen Code, sondern weist eine ansteigende Mutationsrate mit dem Alter auf (somatische Mutationen), die innerhalb einer Zelle zur Heteroplasmie (innerhalb einer Zelle sind mitochondriale Organellen heterogen) führt. Bestimmte mutierte Formen der mtDNA zeigen eine erhöhte replikative Rate gegenüber der Wildtyp-mtDNA. Dieses Phänomen führt zur klonalen Expansion, welche Mutationen innerhalb der Zelle propagiert (He et al., 2002; Chan, 2006). Rossignol et al. (2003) konnten beschreiben, dass erst ein kritischer Schwellenwert von über 60 % an mutierter mtDNA innerhalb einer Zelle erreicht werden muss, um atmungsdefiziente Mitochondrien der Zelle zu erlangen, die wiederum vermehrt mtDNA-Mutationen akkumulieren oder zur Entscheidung der zellulären Eliminierung beitragen. Für synaptische Mitochondrien konnte dargestellt werden, dass der Schwellenwert von 25 % an mutierter mtDNA ausreicht, um die Aktivität des Komplex I und die ATP-Generierung zu erniedrigen (Davey et al., 1997). Neben den oben beschriebenen somatischen Mutationen, ist die mtDNA auch durch genetische Polymorphismen gekennzeichnet. Polymorphismen innerhalb der mtDNA könnten vernachlässigbare Differenzen in kodierten Proteinen verursachen, die in minimalen Veränderungen der oxidativen Phosphorylierungsfunktion als auch der Radikalproduktion resultieren (Lin und Beal, 2006). So könnten leichte Veränderungen eine Prädisposition in Individuen ermöglichen, entweder zur verstärkten progressiven Akkumulation somatischer mtDNA Mutationen oder zur Verlangsamung dieser Prozesse. Die bekannten mtDNA Polymorphismen definieren mitochondriale, Kontinent-spezifische Genotypvariationen, die als Haplotypen bezeichnet werden. Bestimmte Haplotypen sind in bestimmten Bevölkerungen mit Langlebigkeit assoziiert (Tanaka et al., 1998; De Benedictis et al., 1999; Ross et al., 2001; Niemi et al., 2003; Santoro et al., 2006).

Mitochondriale Dysfunktion und Mutationen der mtDNA propagieren oxidativen Stress und fördern einen Teufelskreis der Radikalbildung (Kang et al., 2007). Progressiv akkumulierende oxidative Modifikationen zellulärer Komponenten beeinträchtigen die Funktionalität des Zellgefüges. Das Zentralnervensystem (ZNS) zeigt sich besonders vulnerabel für den oxidativen Angriff durch eine sehr hohe Rate des Sauerstoffverbrauchs, relativ geringen Anteil an antioxidativen Molekülen und Enzymen und die hohe Menge an mehrfach ungesättigten Lipiden (Lin und Beal, 2006; Nunomura et



al., 2006). In familiären Formen neurodegenerativer Erkrankungen treten Mutationen in spezifischen Genen auf, die in ihrer mutierten Form selektiv spezifische Neurone zur altersabhängigen, jedoch im Vergleich zu sporadischen Formen, frühzeitigen Degeneration führen. Der wichtigste Risikofaktor zur Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen, stellt, neben den familiären Formen, das Alter dar. Sporadische Formen (etwa 90 % ohne genetischen Hintergrund) könnten eine Kombination des genetischen Hintergrunds (Prävalenz), der Umwelt und des Lebensstils erfassen, der der Organismus ein Leben lang ausgesetzt ist.

## 1.6. Rolle der Mitochondrien in der Entwicklung der Parkinsonschen Krankheit

### Familiäre Formen

Familiäre Formen der PD ermöglichen es, molekulare Folgen der PD-assoziierten Mutationen zu untersuchen und hiermit einen Einblick in pathogene Mechanismen zu gewähren, welche die spezifische Anfälligkeit der dopaminergen Neurone der *SNpc* bei Parkinson-Patienten auszeichnen. Viele dieser Genprodukte übernehmen wichtige Funktionen innerhalb der Mitochondrien (zusammengefasst in Thomas und Beal, 2007) und verweisen auf eine kausale Beteiligung mitochondrialer Dysfunktion und des oxidativen Stresses in der PD-Pathogenese. *PINK1-* (*Pten-induced kinase 1*, *PARK6*), *Parkin-* (*PARK2*) und *DJ-1-* (*PARK7*) Mutationen sind in mitochondriale Dysfunktion eingebunden, auch *LRRK2-* (*leucin-rich repeat serin/threonin-kinase 2*, *PARK8*) und *α-Synuclein-* (*PARK1/4*) Mutationen beeinträchtigen die mitochondriale Integrität. PD-assoziierte Proteine sind in Signalkaskaden (*PINK1* und *LRRK2*), sowie in proteosomale und lysosomale Abbauprozesse (*Parkin*, *LRRK2*, *UCH-L1* (*Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1*, *PARK5*), *ATP13A2* (*PARK9*), auch indirekt *PINK1* und *α-Synuclein*) eingebunden, weisen Chaperonaktivitäten und Modulatorfunktionen in Translation (*DJ-1*) oder in der Stabilisierung von Lipiddoppelmembranen (*α-Synuclein*) auf. Ein sehr komplexer Einbezug der genetischen Formen in mitochondriale Funktionen zeigt, dass obwohl Mitochondrien nicht die primäre Quelle der PD darstellen müssen, es bei den meisten PD-induzierenden Mutationen zum erhöhten oxidativen Stress mit mitochondrialen Veränderungen kommt (siehe Abou-Sleiman et al., 2006; Biskup und Moore, 2006; Beal, 2007; Wood-Kaczmar et al., 2006; Thomas und Beal, 2007).

### Sporadische Formen

Neben den experimentellen Parkinson-Modellen, in welchen eine Komplex I Inhibition zur selektiven Degeneration dopaminergener Zellen der *SNpc* führt (siehe Abschnitt 1.8.2. und Diskussion), wurde eine mitochondriale Beteiligung in der PD-Pathogenese an *post mortem* Studien erkannt. Innerhalb der *SNpc* von sporadischen Parkinson-Patienten konnten Defekte des mitochondrialen Komplex I mit

einem Aktivitätsverlust von 25 bis 30 % identifiziert werden (Schapira et al., 1990; Hattori et al., 1991; Dawson und Dawson, 2003; Schapira, 2006). Defekte der Komplex I Aktivität zeigen sich begrenzt auf die *SN* (Schapira et al., 1990; Cooper et al., 1995). Parkinson-Patienten weisen in katalytischen Domänen des Komplex I erhöhte Werte an Carbonylierungen auf, die mit reduzierter Elektronentransferrate korrelieren und zur falschen Assemblierung und Dysfunktion dieses Komplexes führen können (Keeney et al., 2006). Des Weiteren könnte der Aktivitätsverlust des Komplex I eine Unterproduktion bestimmter Komplex I Untereinheiten reflektieren (sieben Untereinheiten des Komplex I sind mitochondrial kodiert) (Schapira, 2001; Beal, 2004). Auch im frontalen Kortex (Parker et al., 2008), in Blutplättchen (Schapira und Marsden, 1994; Krige et al., 1992; Haas et al., 1995) und Skelettmuskeln (Blin et al., 1994) konnten PD-spezifisch leichte Komplex I Defizite identifiziert werden.

Mitochondrien-freie Rezipientenzellen, die mtDNA aus Blutplättchen von Parkinson-Patienten enthalten, weisen reduzierte Komplex I Aktivitäten auf (Gu et al., 1998). Dieses Cybrid-PD-Modell verweist darauf, dass die mtDNA der Parkinson-Patienten der Ursprung einer defekten Komplex I Aktivität sein kann. Bender et al. (2006) und Kraysberg et al. (2006) konnten zeigen, dass im Vergleich zu jungen und älteren Kontrollpersonen spezifisch in Melanin-positiven Neuronen der *SNpc* im Alter stark erhöhte Werte an mtDNA-Deletionen auftreten und dass die Menge an mtDNA-Deletionen in Parkinson-Patienten verstärkt erhöht ist im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen. Hingegen zeigen andere Neuronenpopulationen in älteren Individuen vernachlässigbare Werte mutierter mtDNA (Corral-Debrinski et al., 1992; Soong et al., 1992). Eine konditionelle Ablation des *Tfam* Gens (mitochondrialer Transkriptionsfaktor A) in dopaminergen Neuronen der Maus führt zu respiratorischen Defekten dopaminergischer Zellen der *SNpc* und progressivem Parkinsonismus mit intrazellulären Einschlüssen (Ekstrand et al., 2007). Dieses Parkinson-Modell zeigt, dass die Störung des mitochondrialen Aufbaus, die selektive Degeneration dopaminergischer Zellen der *SNpc* verursacht, ohne dabei dopaminerge Neurone des angrenzenden ventralen Tegmentums zu beeinträchtigen, und eine kausale Rolle oder primäre Quelle der Parkinson-spezifischen Degeneration darstellen kann. In wildtypischen Mäusen ist die mitochondriale Masse in dopaminergen Neuronen der *SNpc* erniedrigt im Vergleich zu dopaminergen Neuronen des angrenzenden ventralen Tegmentums oder nicht-dopaminergen Zellen des Mittelhirns (Liang et al., 2007a). Wenn eine Erniedrigung der mitochondrialen Masse in dieser Neuronenpopulation auch beim Menschen auftritt, könnte dies die erhöhte Vulnerabilität dopaminergischer Zellen in der *SNpc* erklären.

Genetische mtDNA Varianten lassen einen Zusammenhang mit der PD-Inzidenz in Bevölkerungsgruppen erkennen. Haplotyp J und Haplotyp K reduzieren die PD-Inzidenz um etwa 50 % bei Europäern, andere Nukleotidpolymorphismen reduzieren das Risiko der Krankheitsentwicklung bei Frauen und bei älteren Individuen (van der Walt et al., 2003). Der Haplotyp Cluster

UKJT erniedrigt das PD-Risiko um 22 % (Pyle et al., 2005). Des Weiteren impliziert der JTIWX Cluster in der finnischen Bevölkerung ein erhöhtes PD-Risiko (Autere et al., 2004). Diese mtDNA-Komposition ist assoziiert mit einer erhöhten Rate an nicht-synonymen Substitutionen innerhalb eines mtDNA Gens, welches für Komponenten des Komplex I kodiert (Autere et al., 2004). Ein weiterer Polymorphismus wurde in der italienischen Bevölkerung als protektiv gegenüber der PD-Entwicklung entdeckt (Ghezzi et al., 2005), zeigte aber in der spanischen Bevölkerung keine Indizien auf einen protektiven Haplotyp (Huerta et al., 2005). Diese bevölkerungsabhängigen Befunde weisen darauf hin, dass eine mitochondriale und nukleäre Komposition, wie auch mögliche Umwelteinflüsse, die Inzidenz der sporadischen PD beeinflussen können. Wichtig anzumerken ist, dass Haplotypen, die in Parkinson-Patienten unterrepräsentiert sind, sich gleichzeitig in gesunden „Hundertjährigen“ überrepräsentiert zeigen (Tanaka, 2002).

### **Degenerationsprozess dopaminergener Neurone der *Substantia nigra***

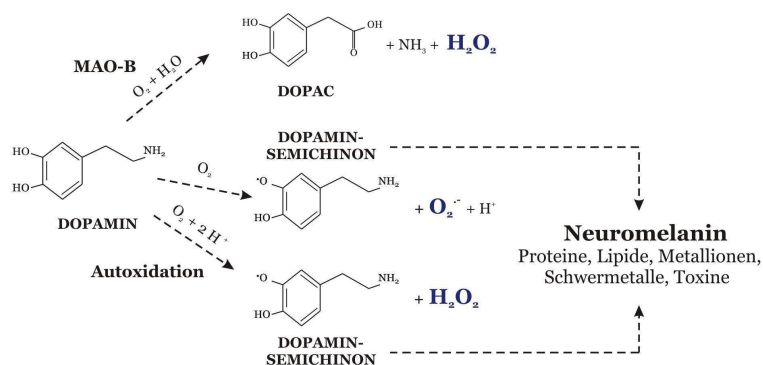
Ein typisches dopaminerges Neuron der *SNpc*, welches Dopamin metabolisiert, hohe Mengen an Neuromelanin und Eisen, sowie erniedrigte Glutathion-Mengen und mitochondriale Defekte aufweist, befindet in einem stark prooxidativen Status (siehe Abb. 1.10.).

Mit dem Alter wird jeder der genannten Faktoren immer stärker ins Ungleichgewicht fallen und oxidative Bedingungen einführen. Wie oben beschrieben, entwickelt sich die PD in der Mehrzahl der Individuen erst ab einem Alter von 65 Jahren. Obwohl dopaminerge Zellen gegen die gegebenen Anforderungen gewappnet sind, kommt es mit der Zeit zu einem verstärkten Redoxungleichgewicht. Wenn diese Bedingungen ein bestimmtes Ausmaß erreicht haben, kommt es zur Entstehung eines Teufelskreises, in welchem durch oxidative Bedingungen alle zellulären Komponenten beeinträchtigt werden, wie auch Mitochondrien in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, die hierdurch wiederum vermehrt ROS entlassen (siehe Abb. 1.10.). Modifizierte Proteine verlieren ihre Funktion, modifizierte Lipide verändern die Funktion der Membranproteine. Mit der Zeit können progressiv modifizierte Mitochondrien entstehen mit Membranpotentialverlust (ATP-Depletion und verringerte Pufferkapazität von Ionen und Calcium). Es kommt zu gesteigerten proteosomalen und lysosomalen Abbauprozessen, welche energieabhängig arbeiten. Die Aggregation modifizierter Proteine wird eingeleitet, mutierte Mitochondrien und Aggregate werden z.T. eliminiert, wodurch vergrößerte Autophagosomen entstehen. Aggregate, autophagosomale Strukturen und veränderte Phosphorylierungssignalwege reduzieren oder verhindern den Transport von Proteinen, Vesikeln und Mitochondrien entlang der langen Axone. Hierdurch können an der Synapse nicht genügend Mitochondrien auftreten, wodurch sich die massiven Ionentransporte über die Membran bei Signaltransduktion verlangsamen (ATP-Mangel) und Calcium nicht ausreichend endoplasmatisch und mitochondrial akkumuliert werden kann. Dies könnte zu einer Desintegration der Kommunikation

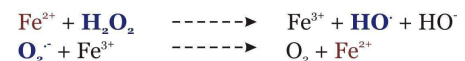
zwischen interagierenden Zellen und zwischen Soma und Axonterminus führen und eine retrograde Degeneration der Neurone auslösen (siehe auch Diskussion). All diese Prozesse verlaufen langsam, aber progressiv, und können in Individuen die Degeneration dieser spezifischen Neuronenpopulation einleiten.

### Beschaffenheit dopaminerger Neurone der *SNpc*

#### I. DOPAMINMETABOLISMUS und NEUROMELANIN



#### II. ERHÖHTE EISENWERTE



#### III. ERNIEDRIGTE GLUTATIONWERTE

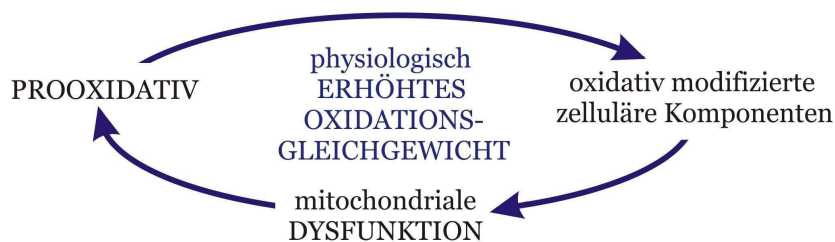


Abb. 1.10. Eigenschaften dopaminerger Neurone der *SNpc* wirken sich prooxidativ auf Zellen aus. Oxidative Modifikationen zellulärer Komponenten verursachen mitochondriale Defekte, welche die Entstehung eines Teufelskreises der ROS-Bildung induzieren.

Mithilfe der oben angeführten Befunde wurde versucht darzustellen, dass dopaminerge Neurone der *SNpc* durch oxidative Verschiebungen und mitochondriale Defekte einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind und dass oxidativer Stress in der Degeneration dieser besonderen Neuronenpopulation einen sehr wichtigen Faktor darstellt. Aus diesem Grund könnte eine Therapie in antioxidativer Form in Parkinson-Patienten eine Neuroprotektion ermöglichen und die nigrale Integrität in der Bewegungsmodulation erhalten.

## 1.7. Antioxidantien zur neuroprotektiven Therapie der Parkinsonschen Krankheit

### Bedeutung einer potenten antioxidativen Wirkung und guter Blut-Hirn-Schrankengängigkeit

Zur Prävention progressiver Neurodegeneration in altersabhängigen Krankheiten sind antioxidative Substanzen als protektive Therapeutika sehr vielversprechend, v.a. auch als Protektionsstrategie der vulnerablen dopaminergen Neurone. In präklinischen Studien konnten protektive Effekte mithilfe verschiedenster antioxidativer Strukturen etabliert werden (siehe Abschnitt 4.3.). In klinischen Studien erzielten die potentiell protektiven Substanzen in neurodegenerativen Erkrankungen keine bis geringfügige neuroprotektive Effekte (Moosmann und Behl, 2002; Weber und Ernst, 2006). Alzheimer-Patienten oder Patienten mit mikrovaskulärer Hirnverletzung zeigen nach Behandlung mit antioxidativen Substanzen keine Verringerung oxidativer Stressmarker (Sonnen et al., 2009). Die einzige Struktur, welche auf einer antioxidativen Wirkung basiert und sich neuroprotektiv in frühen PD-Stadien und anderen neurodegenerativen Erkrankungen zeigt, ist das Ubichinon (Coenzym Q; Shults et al., 2002; Cooper et al., 2008). In Pilotstudien konnte für die PD als auch für die Alzheimersche Krankheit eine Kombination aus  $\alpha$ -Tocopherol und Ascorbinsäure als leicht protektiv eingestuft werden (Fahn, 1992; Zandi et al., 2004). Hiermit wurde in klinischen Studien bestätigt, dass eine antioxidative Therapie das Fortschreiten der Degenerationsprozesse aufhalten kann.

Das Fehlen der antioxidativen Wirkung der meisten Substanzen in Patienten könnte auf eine nicht ausreichende Entgiftungskraft der untersuchten Strukturen *in vivo* zurückzuführen sein. Protektive Konzentrationen der meisten antioxidativen Strukturen liegen in hohen mikro- bis sogar millimolaren Bereichen in Zellkulturuntersuchungen (siehe auch Abschnitt 4.3.). In Toxin-induzierten zellulären SH-SY5Y-Modellen werden 200  $\mu$ M Melatonin (Chen et al., 2005b), 300  $\mu$ M Talipexol und Pramipexol (Kitamura et al., 1998), 2,5 mM N-Acetylcystein, 5 mM TEMPO sowie 10  $\mu$ M Dihydroliponsäure (Seaton et al., 1997) als neuroprotektiv beschrieben. Hingegen zeigen 500  $\mu$ M Trolox (wasserlösliches Vitamin E), Ascorbinsäure oder Phenyl-tert-Butylnitron (PBN) keine protektive Wirkung im Toxin-induzierten Zellkulturmodell (Lee et al., 2000). Im Toxin-induzierten Parkinson-Modell des Nematoden *C. elegans* erweisen sich Ascorbinsäure und Liponsäure ab 500  $\mu$ M als protektiv, Carnitin, Kreatin und Ubichinon zeigen bis 500  $\mu$ M keine protektiven Eigenschaften (Braungart et al., 2004). Diese Studien verweisen auf eine hohe Pharmako-Dosis-Aktivitätsbeziehung der meisten antioxidativen Strukturen. Übertragen auf einen Organismus, kann eine hohe Konzentration an Pharmaka, Nebeneffekte hervorrufen und sich auf den Organismus negativ auswirken. Ein weiteres Kriterium der Neuroprotektion, ist die Aufnahme der Substanzen in das ZNS. Die Blut-Hirn-Schranke kann als Barriere dienen und die Bioverfügbarkeit der Pharmaka an Stellen des Einsatzes sehr stark absenken.  $\alpha$ -Tocopherol und Ubichinon werden trotz massiver

Supplementierung nicht signifikant im Gehirn angereichert (Vatassery et al., 1998; Dallner und Sindeler, 2000).

Für eine protektive Therapie *in vivo* müssen effektive, biochemisch potente, antioxidative Strukturen, welche eine gute Blut-Hirn-Schrankengängigkeit aufweisen, gefunden werden (Gilgun-Sherki et al., 2001; Moosmann und Behl, 2002). Bisarylimine (siehe Abb. 1.11.), welche in dieser Arbeit als potente Antioxidantien in Parkinson-Modellen beschrieben werden, wurden bereits als sehr effiziente ROS-Detoxifizierungsstrukturen identifiziert (Moosmann et al., 2001; Hajieva et al., 2009). In *in vitro* Kulturen wirken Bisarylimine in nanomolaren Konzentrationen gegenüber direkten ROS-induzierenden Toxinen (effektive Konzentrationen liegen etwa zwei bis vier Potenzen niedriger im Vergleich zu vielen antioxidativen Strukturen). Bisarylimine stellen kleine Moleküle dar mit lipophilem Charakter, diese Eigenschaften sollten die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen (siehe auch Abschnitt 4.3.). Effiziente Antioxidantien, welche eine hohe Detoxifizierungsrate oxidativer Zustände bei niedrigen Konzentrationen ermöglichen und eine gute Blut-Hirn-Schrankengängigkeit aufweisen, sollten ihre neuroprotektive Wirkung im ZNS entfalten.

## 1.8. Untersuchte Substanzen und experimentelle Modellsysteme

### 1.8.1. Untersuchte Substanzen

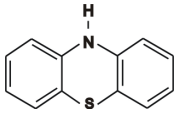
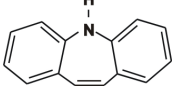
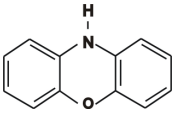
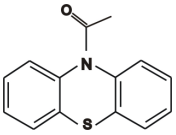
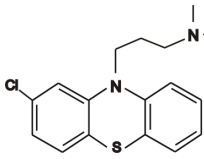
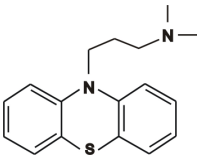
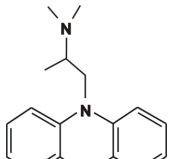
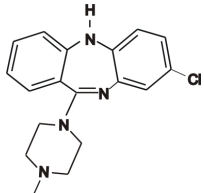
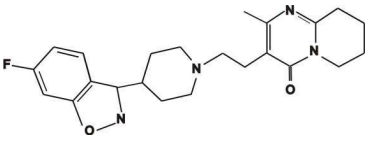
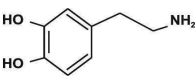
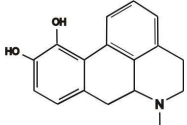
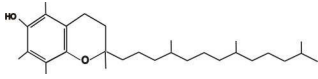
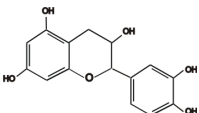
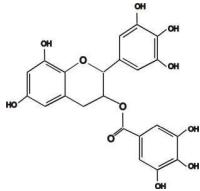
<p><b>Bisarylimine</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Phenothiazin (PHT)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Iminostilben (ISB)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Phenoxazin (PHO)</p> </div> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>N-Acetyl- phenothiazin (AcPHT)</p> </div>	
<p><b>typische Neuroleptika</b>  Dopaminrezeptor-Antagonisten</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Chlorpromazin (CPRZ)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>Promazin (PRZ)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>Promethazin (PMZ)</p> </div>
<p><b>atypische Neuroleptika</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p>Clozapin (CLOZ)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>Risperidon (RISP)</p> </div>	
<p><b>Dopaminrezeptor-Agonisten</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p>Dopamin (DA)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>Apomorphin (Apo)</p> </div>	
<p><b>bekannte Antioxidantien</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p>Vitamin E (Vit E)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p><math>\beta</math>-Catechin (Cat)</p> </div>	<div style="text-align: center;">  <p>Epigallocatechingallat (EGCG)</p> </div>

Abb. 1.11. Darstellung der untersuchten Substanzen.

Bisarylimine (Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin) werden in dieser Arbeit als neuroprotektive Substanzen untersucht. Zur Darstellung des antioxidativen und nicht-rezeptorvermittelten Wirkungsmechanismus der Bisarylimine und zur Untersuchung ihres antioxidativen Potentials, werden parallel nicht-antioxidativ wirkende N-substituierte Strukturanaloga des Phenothiazins (N-Acetylphenothiazin, Chlorpromazin, Promazin, Promethazin), Dopaminrezeptor-Antagonisten

(Chlorpromazin, Promazin, Promethazin, Clozapin, Risperidon), Dopaminrezeptor-Agonisten (Dopamin, Apomorphin) und bekannte Antioxidantien (Vitamin E,  $\beta$ -Catechin, Epigallocatechingallat) auf ihr neuroprotektives Potential hin untersucht (siehe Abb. 1.11.).

### 1.8.2. Parkinson-Phänotyp induzierende Komplex I Inhibitoren

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) wurde als PD-induzierendes Neurotoxin durch einen unglücklichen Zufall in den 80er Jahren entdeckt. Durch Eigenapplikation unsachgemäß hergestellten, synthetischen Heroins, mit einem gewissen Anteil an MPTP, entwickelten junge Drogensüchtige Parkinson-Symptome (Langston et al., 1983). Diese Entdeckung ebnete den Weg der experimentellen Parkinson-Modelle (Beal, 2001). MPTP kann durch seinen lipophilen Charakter die Blut-Hirn-Schranke passieren, wird in Astrozyten aufgenommen und dort mithilfe der MAO-B zum 1-Methyl-4-Phenyl-1,2-Dihydroxypyridiniumion (MPDP<sup>+</sup>; Chiba et al., 1984; Markey et al., 1984) metabolisiert, welches spontan oxidiert wird zum eigentlichen toxischen Agens, dem 1-Methyl-4-Phenyl-pyridiniumion (MPP<sup>+</sup>). MPP<sup>+</sup> wird nach der glialen Freisetzung selektiv in dopaminerge Neurone mittels Dopamintransporter (DAT) aufgenommen (Chiba et al., 1985; Javitch et al., 1985). Intrazellulär kann MPP<sup>+</sup> in Mitochondrien akkumulieren (Singer et al., 1987) oder in Vesikeln mittels VMAT-2 gespeichert werden (Liu et al., 1992). Inhibition des mitochondrialen Komplex I durch MPP<sup>+</sup> (Dauer und Przedborski, 2003) führt zur ATP-Depletion und zum verstärkten Ausbruch von Elektronen aus der inneren Mitochondrienmembran, welches zur verstärkten ROS-Bildung führt (siehe Abschnitt 1.3.1. und 4.1.2.). Diese Primäreffekte auf die mitochondriale Funktion lösen eine Reihe von oxidativen Kaskaden aus, die in Abschnitt 1.3. beschrieben werden. MPTP-Applikation führt in Affen und Mäusen (Gerlach und Riederer, 1996), aber auch in *C. elegans* (Braungart et al., 2004; siehe Abschnitt 1.8.3.), zur selektiven Degeneration dopaminerger Neurone. In Primaten spiegelt die MPTP-induzierte neurologische Veränderung die Symptomatik der Parkinson-Patienten sehr gut wieder. Unter den Nagetieren zeigt der Mäusestamm C57black/6 genügend Sensibilität gegenüber MPTP, um als PD-Modell genutzt zu werden, mit Ausnahme der PD-typischen Lewy-Körperchen Bildung.

Rotenon wird aus der Wurzel eines in Borneo heimischen Schmetterlingsblütlers gewonnen. Als Insektizid eingesetzt, konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass eine langjährige Rotenon-Exposition mit einer erhöhten PD-Inzidenz assoziiert wird (Seidler et al., 1996) und somit Rotenon als eines der Umweltgifte (Paraquat (MPTP-Strukturanalogon), Organophosphate, Rotenon, und andere Umwelttoxine) identifiziert werden, die in Zusammenhang mit verstärktem Auftreten der PD gebracht werden (Tanner, 2003; Taylor et al., 2006; Dick et al., 2007; Elbaz und Tranchant, 2007). Rotenon stellt einen selektiven und sehr effizienten Komplex I Inhibitor dar. In Tiermodellen führt Rotenon zur progressiven Degeneration der nigralen Neurone mit Lewy-Körperchen Bildung. Nicht



alle Tierindividuen sprechen auf das Toxin an und die Applikation erfolgt aufgrund der stark hydrophoben Struktur intravenös oder über osmotische Pumpen (Betarbet et al., 2000). Da Rotenon in alle Zellen diffundiert, seine Wirkung jedoch zu einer selektiven Degeneration dopaminerger Neurone führt, deutet darauf hin, dass dopaminerge Zellen der *SNpc* eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber einer Komplex I Inhibition und deren Folgen zeigen (Sherer et al., 2003; Betarbet et al., 2000).

### 1.8.3. Modellsysteme

#### 1.8.3.1. *In vitro* Modellsysteme

Die humane Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y stellt eine Sublinie der Neuroepitheliomazelllinie SK-N-SH dar, welche einer Knochenmarksbiopsie eines vier jährigen Mädchens mit metastatischem Neuroblastoma entstammt (Biedler et al., 1978). SH-SY5Y Zellen wachsen adhärent und besitzen Charakteristika dopaminerger, cholinерger, glutamaterger und adrenerger Neurone (Biedler et al., 1978). Aufgrund der dopaminergen Eigenschaften, wie etwa der Tyrosinhydroxylase Aktivität, kann die SH-SY5Y Zelllinie als *in vitro* Modell der PD genutzt werden (u.a. Saeton et al., 1997).

Die Kultur der primären Neurone des ventralen Mittelhirns von Sprague-Dawley Ratten stellt eine neuronale Mischkultur dar, welche etwa 3 bis 5 % dopaminerge Neurone enthält (Moon et al., 2005). Nach Differenzierung der Primärzellen, nehmen die Neurone interneuronale und neurogliale Kontakte auf. Das neurogliale Netzwerk kommt einer *in vivo* Situation sehr nahe.

#### 1.8.3.2. *Caenorhabditis elegans* als Labormodell

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ist ein etwa 1 mm großer durchsichtiger Fadenwurm (Nematode). Es ist ein im Boden lebender Organismus, welcher sich von Bakterien und organischem Material ernährt. *C. elegans* kann in zwei Geschlechtern auftreten, nämlich als Hermaphrodit oder Männchen. Unter normalen Lebensbedingungen vermehrt sich der Wurm als Hermaphrodit durch Selbstbefruchtung und entlässt etwa 300 befruchtete Eier. Unter lebensbedrohlichen Bedingungen (UV-Licht, Wärme, Futterarmut, Überfüllung) treten Männchen auf, die im Gegensatz zum Hermaphrodit (zwei X Chromosomen) über nur ein X Chromosom verfügen. Bei einer Befruchtung durch männliche Individuen, bei der es zum Austausch der genetischen Information kommt, steigt die Anzahl der Nachkommen auf etwa Tausend. Die Lebensdauer des Wurms beträgt bei 20 °C etwa drei Wochen, die reproduktive Phase wird nach drei Tagen erreicht. Niedrigere Temperaturen (im Labor 15 °C) verlängern die Lebensspanne, bei höheren Temperaturen (im Labor 25 °C) verkürzt sie sich. Während seiner Entwicklung durchschreitet der Wurm vier Larvalstadien, L1 bis L4, welche von einem Größenwachstum und Häutungen begleitet sind. Zwischen dem L4 und jung adulten Stadium

entwickeln sich die Reproduktionsorgane, welche ab dem jung adulten Stadium als Vulva, sowie eiertragende Eileiter sichtbar werden. Unter schlechten Bedingungen oder Armut an Nahrungsquellen kann sich ein im L1/L2-Stadium befindlicher Wurm zur Dauerlarve entwickeln, welches als Entwicklungsarrest bezeichnet wird. Dauerlarven weisen einen sehr geringen Metabolismus auf und können lange Zeit in diesem Stadium unter schlechten Lebensbedingungen ausharren, bis Nahrungsquellen wieder wahrgenommen werden können. Der in Bristol vom Boden entnommene *C. elegans* Wurmstamm, wurde „N2“ bezeichnet und ist als Wildstamm klassifiziert (Briggs, 1946). Als Labororganismus ist *C. elegans* sehr einfach zu halten. Die Reproduktionsphasen mit vielen Nachkommen verlaufen sehr schnell, aufgrund der Selbstbefruchtung können Genmanipulationen über Populationen unverändert vererbt werden und die vollständige Aufklärung des Genoms und vieler molekularer Mechanismen, welche über die Vielfalt der Spezien konserviert bleiben, erleichtern das Verständnis noch unaufgeklärter Signalwege und erlauben Analogien zu höheren Organismen. Die Durchsichtigkeit des Wurms und Genmanipulationsstrategien ermöglichen *in vivo* einzelne Zellpopulationen, Organellen oder Proteine mit fluoreszenten Markern im Fluoreszenzmikroskop zu diskriminieren und zu analysieren. *C. elegans* stellt ein geeignetes experimentelles Modell für verschiedene Krankheiten dar.

### Das Nervensystem des *Caenorhabditis elegans*

Das Strickleiternnervensystem des *C. elegans* besteht aus 302 Neuronen, die im pharyngealen Nervenring zum Ganglienkomplex zusammenlaufen, und ventral und dorsal eine Chorda-Struktur ausbilden (siehe Abb. 3.3.7.). Neurone können unterteilt werden in sensorische Neurone, Motorneurone und Interneurone. Zur Signaltransduktion werden Dopamin, Acetylcholin, Glutamat, Serotonin und Neuropeptide genutzt. Hermaphroditen besitzen acht dopaminerge, bilateral organisierte Neurone, sechs Neurone befinden sich in der Kopfregion, mit vier cephalischen Neuronen (CEP) und zwei anterioren Deidriten (ADE), sowie zwei posterior liegenden Deidriten (PDE) (White et al., 1986; siehe Abb. 1.12. und 3.3.7.). Des Weiteren weisen Männchen zusätzlich R5A, R7A und R9A Neurone in der Schwanzregion auf, die bei der Kopulation eine Rolle spielen (Liu und Sternberg, 1995).

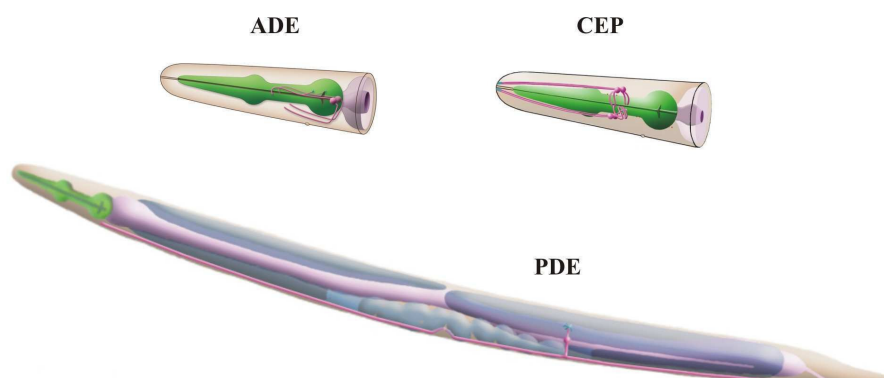


Abb. 1.12. Darstellung dopaminergen Neurone des *C. elegans*; entnommen aus <http://www.wormatlas.org>.

Dopaminerge Neurone enden in sensorischen Organen der Cuticula. Anhand von Ablationsstudien konnte gezeigt werden, dass die acht dopaminergen Neurone zur mechanischen Sensierung von Nahrungsquellen genutzt werden. Bei großem Nahrungsangebot verlangsamt der Wurm seine Bewegung, bei Ablation der dopaminergen Zellen fehlt dieses Verhalten (sog. „basal slowing response“; Sawin et al., 2000). Dopaminerge Neurone sind für ein weiteres Verhalten verantwortlich. Wird eine Nahrungsquelle verbraucht, werden gut gefütterte Würmer in der Nähe nach Nahrungsquellen suchen. Hierfür werden Würmer in sehr schnellen Wendungen die nahe Umgebung nach Nahrungsquellen durchsuchen, bevor sie sich in weitere Regionen begeben. Dieses Verhalten fehlt beim fehlenden Dopaminsignal (sog. „area restricted searching“; Hills et al., 2004). Das dopaminerge System des Wurmes spielt auch eine Rolle im Lernprozess. Hierbei wurde von Sanyal et al. (2004) beschrieben, dass in Wildtypen eine Berührung zur Flucht des Tieres führt, nach mehrfacher Wiederholung, wird sich der Wurm an diese externe Störung gewöhnen. Würmer mit fehlendem Dopaminsignal oder einem mutierten DOP-1 Rezeptor ( $D_1$ -Rezeptor Homolog in *C. elegans*) gewöhnen sich viel schneller an äußere Gefahren. *C. elegans* besitzt vier Dopaminrezeptoren (DOP-1 bis DOP-4), die Homologe der  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptortypen darstellen. Der  $D_2$ -Rezeptortyp DOP-3 vermittelt das „basal slowing response“ Verhalten, wobei der  $D_1$ -Rezeptortyp DOP-1 in antagonistischer Weise dieses Verhalten kontrolliert (Chase et al., 2004). DOP-1 und DOP-3 Rezeptoren sind in Motorneuronen der ventralen Chorda ko-exprimiert und modulieren die Bewegungsrate. Motorneurone der ventralen Chorda sind nicht postsynaptisch an dopaminerge Neurone gekoppelt, die Signaltransduktion des Dopamins erfolgt bei *C. elegans* extrasynaptisch.

In *C. elegans* wurden sowohl pharmakologische als auch genetische Parkinson-Modelle etabliert (Schmidt et al., 2007). Toxin-induzierte Parkinson-Modelle in *C. elegans* sind für 6-Hydroxydopamin (Nass et al., 2002; Cao et al., 2005), sowie MPP<sup>+</sup> und Rotenon (Braungart et al., 2004) bekannt. Diese *in vivo* Modellsysteme rekapitulieren die erhöhte Sensibilität dopaminergener Neurone und eignen sich zur Evaluierung antisymptomatischer und protektiver Therapeutika (Braungart et al., 2004; Schmidt et al., 2007).

## 1.9. Ziel der Arbeit

Da nach dem aktuellen Wissensstand oxidativer Stress eine kausale Rolle in der PD-Pathogenese einnimmt und in präklinischen Studien eine antioxidativ-basierte Neuroprotektion der vulnerablen dopaminergen Neuronenpopulation erreicht werden kann, erweist sich eine neuroprotektive Therapie, welche auf antioxidativer Wirkung basiert, als sehr vielversprechend. In klinischen Studien konnte verdeutlicht werden, dass eine antioxidativ vermittelte Neuroprotektion bestimmte strukturelle Eigenschaften der potentiellen Neuroprotektanten einbezieht. Diese grundlegenden Faktoren erfassen eine niedrige Pharmako-Dosis-Aktivitätsbeziehung der antioxidativ wirkenden Strukturen, sowie eine gute Blut-Hirn-Schrankengängigkeit der Neuropharmaka. Strukturelle Eigenschaften der Bisarylimine verweisen auf eine hohe antioxidative Potenz in niedrigen Konzentrationen und auf eine gute Gehirngängigkeit dieser kleinen, lipophilen Antioxidantien. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der Bisarylimine zu trizyklischen Neuroleptika, könnten Bisarylimine zu klinisch anerkannten Neuroprotektanten etabliert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, drei Bisarylimin-basierte Strukturen, Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin, auf ihr neuroprotektives Potential in Modellsystemen der PD hin zu untersuchen. Die *in vitro* und *in vivo* Modellsysteme basieren auf der Wirkung der Komplex I Inhibitoren, MPP<sup>+</sup> und Rotenon. Beide Komplex I Inhibitoren etablieren *in vitro* und *in vivo* pathophysiologische Charakteristika der PD. Für die *in vitro* Untersuchungen werden neben einer humanen, dopaminergen Neuroblastomazelllinie, primäre Kulturen des ventralen Mittelhirns von Rattenembryonen eingesetzt. In beiden Zellkulturmodellen erfolgt die Charakterisierung des neuroprotektiven Potentials der Bisarylimine an pathophysiologischen Merkmalen der PD. Anhand von Zellüberlebensuntersuchungen werden protektive Konzentrationen der untersuchten Substanzen bestimmt und diese zur Analyse der neuroprotektiven Wirksamkeit der Bisarylimine gegenüber verschiedenen Etappen der Komplex I Toxizität verwendet. Diese Untersuchungen beinhalten die Analyse der mitochondrialen Integrität und der endogenen antioxidativen Kapazität, sowie lysosomale Abbauprozesse. Des Weiteren wird in *in situ* Untersuchungen die antioxidative Potenz der Bisarylimine analysiert. Der antioxidative Wirkungsmechanismus der Bisarylimine wird durch den Einsatz von neuroleptisch-wirkenden N-substituierten Strukturanaloga des Phenothiazins bestätigt.

Für *in vivo* Untersuchungen wird *C. elegans* herangezogen. *C. elegans* stellt einen etablierten Modellorganismus der PD dar (Braungart et al., 2004; Schmidt et al., 2007). Zur Etablierung des *C. elegans* Parkinson-Modells wird der Nematode genetisch manipuliert zur dopaminerg-spezifischen *DsRed2*-Expression und pan-neuronaler *CFP*-Expression. In diesem Modellsystem kann die dopaminerge Neuronenpopulation *in vivo* vom Gesamtnervensystem diskriminiert werden. Die

Etablierung des *C. elegans* Parkinson-Modells im larvalen und adulten Stadium umfasst den Einsatz der beiden Komplex I Inhibitoren und die Charakterisierung der Integrität des dopaminergen Systems bei Toxingabe und die Neuroprotektion mithilfe der Bisarylimine. Des Weiteren werden mithilfe des Toxin-induzierten larval-arretierten Phänotyps protektive Konzentrationen der untersuchten Substanzen *in vivo* bestimmt. Parallel kann in den genannten Untersuchungen und Verhaltensanalysen durch den Einsatz von Neuroleptika, Dopaminrezeptor-Agonisten sowie bekannten Kontroll-Antioxidantien die antioxidativ-vermittelte Neuroprotektion der Bisarylimine klar charakterisiert und die Modulationsfähigkeit des dopaminerg-vermittelten Verhaltens mithilfe der untersuchten Substanzen *in vivo* analysiert werden.

## 2. MATERIAL und METHODEN

### 2.1. Modelle

Modell	Bezugsquelle	Charakteristika
SH-SY5Y Zelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas (USA)	humane Neuroblastomazelllinie mit dopaminergem Charakter
primäre Mittelhirnzellen	entnommen aus dem ventralen Mittelhirn von E17-Embryonen des Sprague-Dawley Rattenstammes	neurogliales Netzwerk, Anreicherung dopaminergere Neurone der <i>Substantia nigra</i>
N2-Bristol Wildstamm	<i>Caenorhabditis</i> Genetic Center, Minnesota (USA)	<i>C. elegans</i> Wildstamm-Variante
transgene Wurmlinie	N2-Variante ko-transfiziert mit $P_{Cat-2}::DsRed2$ im pRL1899-Vektor und $P_{Sng-1}::CFP$ im pVH10.10-Vektor	dopaminerge <i>DsRed2</i> -Expression und pan-neuronale <i>CFP</i> -Expression

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente entsprechen den Richtlinien für Tierversuche nach der Maßgabe der Europäischen Union (Direktive 86/609/EEC). Es liegt eine Genehmigung für die Tierexperimente vor.

### 2.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, sind von den Firmen Sigma-Aldrich (Schnellendorf), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle Medien und Puffer für Zellkulturarbeiten sind von Gibco (Invitrogen, Karlsruhe). Die in dieser Arbeit verwendeten Toxine, 1-Methyl-4-phenylpyridin (MPP<sup>+</sup>), Rotenon und Buthionin-Sulfoximin (BSO), sowie die zu untersuchenden Substanzen (Phenothiazin (PHT), Iminostilben (ISB), Phenoxazin (PHO), Vitamin E (VitE),  $\beta$ -Catechin (Cat), Epigallocatechingallat (EGCG), N-Acetylphenothiazin (AcPHT), Chlorpromazin (CPRZ), Promazin (PRZ), Clozapin (CLOZ), Risperidon (RISP), Promethazin (PMZ), sowie Apomorphin (Apo) und Dopamin (DA)) sind sachgemäß verwendet und entsorgt worden und stammen von Sigma-Aldrich im höchst angebotenen Reinheitsgrad.

### 2.3. Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Absaugpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Aufsatzkamera SPOT RE-SE™	Diagnostic Instruments, Sterling Heights (MI, USA)
Brutschrank, Queue®	Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden
Brutschrank	Kühn & Bayer Laboreinrichtungen, Nidderau
CO2-Inkubator CB 210	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektrophoresegerät PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenz-Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Fluoreszenz-Stereomikroskop MZ10F	Leica Camera AG, Solms
FujiFilm Intelligent Dark Box	FujiFilm, Düsseldorf
Geldokumentationssystem	Intas®UV-Systeme, Göttingen
Gelbild-Drucker P91D	Mitsubishi, Tokyo (Japan)
Heizblockmagnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubatorschüttler Certomat®HK	Sartorius AG, Göttingen
Invers-Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Invers-Mikroskop CKX41	Olympus, Hamburg
Netzgerät	Biometra, Göttingen
pH Meter CG 825	SI Analytics GmbH (SCHOTT AG), Mainz
Photometer Multiscan RC	Thermo Lab Systems, Franklin (MA, USA)
Potter-Elvehjem Apparatur Typ 853202	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Schallgerät, Ultrasonic Cell Disruptor	KONTES, Vineland (NJ, USA)
Schüttler	INFORS GmbH, Einsbach
Schüttler Denley MaxiMix	Denley instruments Ltd., Colchester (UK)
Sicherheitswerkbank	Slee, Mainz
Sicherheitswerkbank MH-100	Telstar Life Science solutions, Frankfurt
Sicherheitswerkbank SterilGARD® III Advance°	Labotect Labor-Technik GmbH, Göttingen
Stereomikroskop	Olympus, Hamburg
Stereomikroskop Leica DM IRB	Leica Camera AG, Solms
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Thermocycler T-Gradient 96T1	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

TransferMan NK2 + Femtojet	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman Coulter, Fullerton (CA, USA)
UV-Lampe NU-4KL	Benda, Wiesloch
UV/Vis Spectrophotometer DU® 800	Beckman Coulter, Fullerton (CA, USA)
UV-Tisch	Renner GmbH, Dannstadt
UV-Transilluminator	Intas®UV-Systeme, Göttingen
Varioklav	H + P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim
VICTOR3™ V Multilabel Counter 1420 mit Wallac Software	PerkinElmer LAS GmbH, Jügesheim
Vortexer K MS 1 Minishaker	IKA®Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage TE153S	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge EBA12	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Fresco 17	Heraeus Holding GmbH, Hanau

## 2.4. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen sind mit bidestilliertem Wasser (bidest.-H<sub>2</sub>O) hergestellt und autoklaviert.

<b>Puffer</b>		
<b>allgemeine Puffer</b>		
1x PBS	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in bidest.-H <sub>2</sub> O, pH 7.4 mit HCl.	137 mM 2,7 mM 10 mM 1,8 mM
1x TBS	NaCl KCl Tris-Base in bidest.-H <sub>2</sub> O, pH 7.4 mit HCl.	137 mM 2,7 mM 25 mM
<b>Bakterien-Nährmedien</b>		
LB-Medium <i>Luria Broth</i>	Trypton Hefeextrakt NaCl in bidest.-H <sub>2</sub> O, pH 7.0 mit NaOH.	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 0,5 % (w/v)
LB-Agarplatten	LB-Medium + 1,5 % Bacto-Agar autoklavieren, auf etwa 65 °C abkühlen, Antibiotika hinzugeben (Endkonzentration 100 µg/ml), in 10 cm Schalen gießen.	
<i>E. coli</i> Suspension	Bacto-Trypton	1,2 % (w/v)
TB-Medium	Hefe-Extrakt	2,4 % (w/v)
<i>Terrific Broth</i>	Glycerin	0,2 % (v/v)



<p>2 x 450 ml TB in 1 L Glaskolben autoklavieren, abkühlen und pro Glaskolben 50 ml K-Puffer und 200 mg/ml Streptomycin hinzugeben. Die Lösung beimpfen mit 5 ml einer sich in der exponentiellen Phase befindlichen HB-101 <i>E. coli</i> Kultur (<math>10^9</math> Zellen/ml). Die Bakterien-suspension bei 37 °C und 210 rpm 16 h hochziehen, bei 9000 rpm und 4 °C für 10 min sedimentieren. Das Bakteriensediment im kleinen Volumen des Überstandes resuspendieren, in ein 50 ml Röhrchen überführen und mit M9-Puffer auf etwa <math>10^9</math> Bakterien/ml (<math>OD_{600nm}</math> von 1 ~ <math>10^9</math>/ml) auffüllen.</p>		
<b>Nematoden-Medien, -Puffer und -Lösungen</b>		
NGM-Platten	NaCl	0,3 % (w/v)
	Bacto-Pepton	0,25 % (w/v)
	Bacto-Agar	1,6 % (w/v)
Lösung autoklavieren, auf etwa 65 °C abkühlen und bereichern mit:		
	PPB pH 6.0	25 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	MgSO <sub>4</sub>	1 mM
	Uracil	200 µg/ml
	Cholesterol	500 mg/ml
	Streptomycin	100 mg/ml
NGM-Agarmedium in 60 mm Schalen gießen (11,5 ml), nach Abkühlen die Platten mit 350 µl einer sich in der exponentiellen Phase befindlichen <i>E. coli</i> -Übernachtskultur des Stammes HB-101 beimpfen und 2 bis 3 Tage bei RT inkubieren. Die Platten werden bei 4 °C gelagert.		
1 M PPB	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,72 M
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,28 M
	pH 6.0 mit 10 N KOH.	
M9-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 % (w/v)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 % (w/v)
	NaCl	0,05 % (w/v)
	NH <sub>4</sub> Cl	0,1 % (w/v)
S-Basal-Medium	NaCl	0,58 % (w/v)
	PPB pH 6.0	50 mM
vor Gebrauch bereichern mit:		
	Cholesterol	0,0005 % (w/v)
	MgSO <sub>4</sub>	3 mM
	CaCl <sub>2</sub>	3 mM
	Spurenelemente-Lösung	1x
	Kaliumcitrat pH 6.0	1x
	<i>E. coli</i> HB-101 Suspension ( $10^9$ /ml) 1/100x	
K-Puffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 M
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72 M
100x Kaliumcitrat	Zitronensäure Monohydrat	21,02 % (w/v)
	pH 6.0 mit KOH-Plättchen.	

100x Spurenelemente-Lösung	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,069 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> EDTA	0,186 % (w/v)
	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,0196 % (w/v)
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,0288 % (w/v)
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,0024 % (w/v)
2x Wurm-Einfriermedium	NaCl	100 mM
	PPB	50 mM
	Glycerin	30 %
	MgSO <sub>4</sub>	0,3 mM
Hypochlorit-Lösung	NaHypochlorit	0,625 %
	KOH	250 mM
<b>Westernblot-Puffer</b>		
4x Sammelpuffer	Tris-Base	0,6 M
	SDS in bidest.-H <sub>2</sub> O auf pH 6.8 mit HCl.	0,4 % (w/v)
4x Trennpuffer	Tris-Base	1,5 M
	SDS in bidest.-H <sub>2</sub> O auf pH 8.8 mit HCl.	0,4 % (w/v)
1x Laufpuffer	Tris-Base	2,5 mM
	Glycin	25 mM
	SDS	0,01 % (w/v)
1x Transferpuffer	Tris-Base	2,5 mM
	Glycin	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)
4x Probenpuffer	Tris-HCl pH 6.8	200 mM
	Glycerin	40 % (v/v)
	SDS	4 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	20 % (v/v)
PonceauS-Lösung	PonceauS	0,1 % (w/v)
	Trichloressigsäure	3 % (w/v)
<b>Agarosegel-Puffer</b>		
50x TAE-Puffer	Tris-Base	2 M
	Natriumacetat x 3 H <sub>2</sub> O	1 M
	EDTA	50mM
<b>Eindeckmedium</b>		
Eindeckmedium	Polyvinylalkohol	10 % (w/v)
	PBS	70 % (v/v)
	bei 60 °C unter Rühren auflösen	
	Glycerin	30 % (v/v)
	p-Phenylendiamin	0,1 % (w/v)
	unter Rühren auf pH 8.0 mit NaOH, die Lagerung erfolgt bei -80 °C unter Lichtausschluss.	

## 2.5. Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
<b>Primärantikörper für Immunhistochemie</b>			
MAP2	Maus	1:100	Sigma-Aldrich, Schellendorf
<b>Primärantikörper für Immunoblots</b>			
Aktin	Kaninchen	1:500	Sigma-Aldrich, Schellendorf
Katalase	Kaninchen	1:1000	Ab-cam, Cambridge (UK)
DNP	Kaninchen	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Drp1	Maus	1:1000	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
GPx1	Kaninchen	1:1000	Ab-cam, Cambridge (UK)
MAP2	Kaninchen	1:500	Millipore (Chemicon), Schwalbach
MnSOD	Kaninchen	1:1000	Upstate (Millipore GmbH), Schalbach
OPA1	Maus	1:1000	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
SOD (72B1)	Maus	1:1000	Ab-cam, Cambridge (UK)
TH	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich, Schellendorf
<b>Sekundärantikörper für Immunhistochemie</b>			
Cy <sup>3</sup> - anti-Maus	Ziege	1:300	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)
<b>Sekundärantikörper für Immunoblots</b>			
anti- Maus-HRP	Esel	1:10000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)
anti- Kaninchen-HRP	Esel	1:10000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket (UK)

## 2.6. Kultivierung und Behandlung der *in vitro* Kulturen

### 2.6.1. Gewinnung und Haltung der Primärzellen aus dem ventralen Mesencephalon der Ratte

Das ventrale Mittelhirn von Sprague-Dawley Ratten am Embryonaltag 17 (E17) wird für die Gewinnung der Primärzellkulturen verwendet. Nach Anästhesierung der trächtigen Ratte mit Forene (Wirkstoff: Isofluran; Abbott AG, Baar (Schweiz)) wird diese mittels Guillotine enthauptet und Embryonen werden entnommen. Nach Dekaptierung der Embryonen werden die Köpfe in eiskalter 1x Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freier Phosphat gepufferter Saline (dPBS) gesammelt und entnommene Gehirne erneut in eiskaltem dPBS gespült. Die Region des ventralen Mittelhirns wird unter einem Stereomikroskop gewonnen und für die Zeit der Präparation auf Eis in 1x Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freier Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) gehalten. Zur Dissoziation der Zellen des entnommenen Gewebes wird eine 20minütige Trypsinierung in 0,1 %-igem Trypsin und 0,02 % Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bei RT vorgenommen. Das trypsinierte Gewebe wird in 10 ml HBSS mit 10 % inaktivem fötalen Kälberserum (FCS, bei 60 °C für 30 min inaktiviert; PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)) aufgenommen, worauf die Zellen durch Auf- und

Abpipettieren in einer Sterilpipette dissoziiert vorliegen. Das Zellgemisch wird durch eine sterile Gase mit 50 µm Porenweite (Nybolt Gase; Eckardt, Waldkirch) filtriert und in weiteren 10 ml HBSS mit 10 % inaktivem FCS aufgenommen. Die Zellsuspension wird bei RT und 1200 rpm für 4 min zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 10 ml Neurobasal-Medium, welches mit 1 mM Glutamax, 1x Supplement B-27 und 0,1 U Gentamycin bereichert ist, aufgenommen. Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wird eine Quantifizierung mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Kammer vorgenommen (siehe Abschnitt 2.6.4.). Die Zellen des ventralen Mittelhirns werden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro 24er Loch-Kulturplatte auf sterilen Deckgläschen (12 mm (VWR International GmbH, Darmstadt), zur Sterilisierung und Entfettung bei 180 °C für 2 h gebacken) für immunhistochemische Untersuchungen ausgesät, für weitere Analysen werden die Zellen in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  pro Kulturplatte verwendet. Die Beschichtung der Kulturplatten erfolgt mit 0,1 mg/ml Polyornithin (Molekulargröße: 100 bis 200 kDa) in steriler 1x Phosphat gepufferten Saline (PBS) für mind. 30 min bei Schüttelbewegung und RT. Kurz vor dem Aussähen der Zellen werden die beschichteten Kulturplatten einmal mit sterilem PBS gespült. Die Verdünnung der Zellsuspension erfolgt in Neurobasal-Medium, welches mit 1 mM Glutamax, 1x Supplement B-27 minus Antioxidantien und 0,1 U Gentamycin supplementiert ist (Neurobasal-Kulturmedium). Die Primärkulturen werden sich in sieben Tagen bei hoher Luftfeuchtigkeit, 5 %-igen Kohlenstoffdioxid-Gehalt und 37 °C (Brutschrankbedingungen) zu einem differenzierten neuroglialen Netzwerk entwickeln.

### **2.6.2. Kultivierung der SH-SY5Y Zelllinie**

SH-SY5Y Zellen werden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit 4,5 % Glucose, 1 mM Pyruvat, 10 % inaktivem FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin (DMEM-Kulturmedium) kultiviert. Zur Kultivierung werden die Zellen auf 10 cm Kulturplatten zwei Mal wöchentlich bei 70 %iger Konfluenz passagiert. Die Zellen werden mit 0,1 %igem Trypsin und 0,02 % EDTA in dPBS für 5 min bei 37 °C trypsiniert und mechanisch durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wird bei RT und 1200 rpm für 4 min zentrifugiert und in DMEM-Kulturmedium aufgenommen. Die Lebendzellzahl wird mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Kammer bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.4.). Für Experimente werden die Zellen in 96er, 12er, 24er und 6er Loch-Kulturplatten in einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Kulturplatte ausgesät.

### **2.6.3. Kryokonservierung der SH-SY5Y Zelllinie**

Zur Erhaltung der SH-SY5Y Zelllinie werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zellen einer zu 70 % konfluenten Platte werden trypsiniert (siehe Abschnitt 2.6.2.). Nach der Zentrifugation werden die Zellen in 1 ml Einfriermedium, welches 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 50 % inaktives

FCS und 40 % DMEM-Kulturmedium enthält, aufgenommen und in ein Kryogefäß (Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden) überführt. Der Einfriervorgang erfolgt in einer Kryobox (Nalgene Cryo 1°C freezing container, Nalgene Labware, Dänemark) mit Isopropyl-Alkohol bei -80 °C, welches eine kontrollierte Senkung der Temperatur um -1 °C pro min erlaubt. Nach zwei Tagen Lagerung bei -80 °C werden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff transferiert. Beim Auftauprozess werden Zellen gleich nach dem Auftauen in warmes DMEM-Kulturmedium überführt und bei RT und 1200 rpm für 4 min zentrifugiert. Die Zellen eines Kryogefäßes werden in DMEM-Kulturmedium aufgenommen und in einer 10 cm Kulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium durch frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt und die Zellen werden am darauf folgenden Tag passagiert.

#### 2.6.4. Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl werden tote von lebenden Zellen mittels 1:1 Färbung mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) in der Neubauer-Kammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) unterschieden. Der Farbstoff Trypanblau diffundiert in tote Zellen und lässt diese durch eine Blaufärbung von lebenden Zellen unterscheiden. Die Anzahl der intakten Zellen pro Milliliter Zellsuspension wird mit der dargestellten Formel errechnet (berücksichtigt den Verdünnungsfaktor (f), die durchschnittliche Zellanzahl pro Kleinquadrat (0,1 µl Volumen) und die Umrechnung auf das Volumen von 1 ml ( $\times 10^4$ ):

$$\text{Zellanzahl pro ml Zellsuspension} = (\text{Zellanzahl pro Großquadrat} / 4) * f * 10^4$$

#### 2.6.5. Behandlung der *in vitro* Kulturen

Nach einer Ruhephase von einem Tag (SH-SY5Y Zellen) bzw. einer Differenzierungszeit von sieben Tagen (Primärzellkultur) werden die Zellen 2 h vor Toxingabe mit den zu untersuchenden Substanzen (PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ) behandelt. Aufgrund der Löslichkeit der Substanzen in Ethanol (EtOH), werden Toxin- und unbehandelte Zellen in Anwesenheit von 1 % (96er Loch-Kulturplatten) oder 0,1 % EtOH (Vehikel) inkubiert. Die eingesetzten Toxinkonzentrationen betragen 200 µM MPP<sup>+</sup>, 150 nM Rotenon oder 200 µM bzw. 400 µM BSO. Analysen erfolgen zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe Abschnitt 3.1. und 3.2.).

#### 2.7. Kultivierung und Behandlung des *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) Wildstamm-Variante Bristol (N2) und transgene Würmer mit N2-Hintergrund werden in dieser Arbeit verwendet (siehe Abschnitt 1.8.3.). Die Erstellung der transgenen Wurmlinie wird in Abschnitt 2.19. und 2.20. behandelt.

### **2.7.1. Kultivierung des *Caenorhabditis elegans***

Die Kultivierung der Würmer erfolgt bei 20 °C auf 60 mm NGM (Nematode Growthmedium)-Platten (Brenner, 1974; siehe Abschnitt 2.4.), die mit der Nahrungsquelle *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm HB-101 (*Caenorhabditis* Genetic Center, Minnesota (USA)) beimpft sind. Der Stamm HB-101 ist Uracil auxotroph und Streptomycin resistent. Für die Haltung und Anzucht der Würmer werden NGM-Platten mit jeweils einem Wurm oder durch die „chunk-out“ Methode jeden dritten Tag beimpft. Der N2-Bristolstamm und der transgene Stamm weisen eine Generationszeit von etwa drei Tagen auf.

### **2.7.2. Kryokonservierung des *Caenorhabditis elegans***

Für eine Stammkonservierung werden L1-Larven in einem kleinen Volumen M9-Puffer (siehe Abschnitt 2.4.) von NGM-Platten gespült, mit gleichem Volumen 2x Wurm-Einfriermedium (siehe Abschnitt 2.4.) versetzt und in Kryogefäße aufgenommen, welche bei -80 °C vertikal eingefroren und gelagert werden. Zur Rekonstitution der eingefrorenen Würmer werden diese auf NGM-Platten überführt.

### **2.7.3. Synchronisierung des *Caenorhabditis elegans***

Zur Erstellung einer homogenen Population werden Würmer im L1- und jung adulten Stadium synchronisiert. Hierfür werden adulte eiertragende Würmer mit M9-Puffer von NGM-Platten gespült und in ein 15 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Rickenhausen) überführt. Die Würmer werden bei 9000 rpm für 45 sec sedimentiert und in alkalische Hypochlorit-Lösung (siehe Abschnitt 2.4.) aufgenommen. Nach sofortiger Zentrifugation (9000 rpm für 30 sec) wird der Überstand abgenommen und die Würmer werden wiederum in alkalischer Hypochlorit-Lösung resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Rickenhausen) überführt. Das Aufbrechen der adulten Würmer erfolgt mithilfe von 23G-Nadeln (Dispomed Witt oHG, Gelnhausen). Die Würmer werden hierfür in einer Kanüle drei bis vier Mal aufgezogen. Das Aufbrechen erfolgt so lange bis 90 % der adulten Würmer aufgeschlossen sind, dies kann im Sichtglas unter einem Stereomikroskop geprüft werden. Hierauf wird die Wurm suspension in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Das Wurmsediment wird zwei Mal mit M9-Puffer gegespült mit den Zwischenschritten der Zentrifugation (je 9000 rpm für 1 min). Anschließend werden die gereinigten Eier in 10 ml M9-Puffer aufgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und können 16 h bei 20 °C und 70 rpm (sauerstoffreiche Kultivierung durch Bewegung) inkubiert werden. In dieser Zeit schlüpfen die L1-Larven, welche als Ausgangsorganismen für L1-Larven Experimente dienen. Für Experimente mit adulten Würmern werden frisch geschlüpfte Larven auf NGM-Platten bis zum Erreichen des adulten Stadiums bei 20 °C für etwa drei Tage kultiviert.

#### 2.7.4. Behandlung der *in vivo* Kulturen

Als Ausgangsorganismus für *in vivo* Analysen dienen synchronisierte L1-Larven oder jung adulte Nematoden des N2- bzw. transgenen Stammes in Flüssigkultur. Hierfür werden pro Plattenloch einer 48er Loch-Kulturplatte (Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden) etwa 40 L1-Larven bzw. adulte Nematoden in 0,5 ml S-Basal-Medium (siehe Abschnitt 2.4.) verteilt und bei 20 °C und 180 rpm kultiviert. L1-Larven bzw. adulte Würmer (N2- und transgener Stamm) werden mit 1,5 µM MPP<sup>+</sup> oder 1,5 µM Rotenon bzw. 2 mM MPP<sup>+</sup> oder 1,5 µM Rotenon in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (PHT, ISB, PHO, VitE, Cat, EGCG, AcPHT, CPRZ, PRZ, CLOZ, RISP, PMZ, Apo, DA) für die angegebene Zeit behandelt (siehe Abschnitt 3.3.). Toxin- und unbehandelte Würmer werden in Anwesenheit von 0,1 % EtOH (Vehikel) inkubiert.

#### 2.7.5. Analyse der *in vivo* Kulturen

##### 2.7.5.1. Protektionsanalyse

Für die Auswertung der Protektionsanalysen werden behandelte N2-Würmer nach drei Tagen Behandlung im Phasenkontrastkanal bei 50x und 100x Vergrößerung photographiert und in Hinblick auf ihren Entwicklungsfortschritt beurteilt (L1-/L2-Larven bis jung adultes Stadium).

##### 2.7.5.2. Analyse dopaminerger Neurone und des Gesamtnervensystems

Transgene L1- bzw. adulte Würmer werden nach der angegebenen Zeit (siehe Abschnitt 3.3.) auf Agarosekissen überführt und mit etwa 20 µl Tetramisol (0,1 g/ml; Sigma-Aldrich) betäubt. Zur Vorbereitung der Agarosekissen werden etwa 200 µl heiße, 3 %ige Agarose in H<sub>2</sub>O auf einen Objektträger (Hartenstein, Würzburg) getropft und mit einem weiteren Objektträger bedeckt. Nach dem Transfer werden die Nematoden auf den Agarosekissen mit weiteren 20 µl Tetramisol und einem Deckgläschen (VWR International GmbH) bedeckt. Die Dokumentation des dopaminergen Systems erfolgt mithilfe der DsRed2- (Variante des rot fluoreszierenden Proteins des *Discosoma sp.*)-Fluoreszenz (siehe Abschnitt 1.8.3.) im 535/610 nm Exzitations-/Emissionskanal, die des pan-neuronalen CFP- (cyan fluoreszierendes Protein)-Signals im 490/510 nm Kanal, die Morphologie des Wurmes wird im DIC- (Differenzialinterferenzkontrast)-Kanal bei 200x Vergrößerung photographiert. Für die Auswertung wird die DsRed2-Fluoreszenzintensität im Kopfbereich (dopaminerge ADE und CEP Neurone) mithilfe der MetaVeu-Software (Universal Imaging PerkinElmer Life and Analytical Sciences) analysiert.

### **2.7.5.3. Verhaltensuntersuchung**

Zur Untersuchung des Dopamin-vermittelten Verhaltens in Würmern werden Verhaltensmuster in adulten N2-Würmern nach fünf Behandlungstagen analysiert. Die Beweglichkeit der Würmer wird im sog. Thrashing Test (Miller et al., 1996; Thomas und Lockery, 1999) untersucht. Hierfür werden Würmer auf ein Sichtglas in einem Tropfen M9-Puffer überführt und nach einer einminütigen Gewöhnungszeit wird die Beweglichkeit der Würmer unter Berücksichtigung der Ausschläge der Schängelbewegung innerhalb von 30 sec quantifiziert.

## **2.8. Zytotoxizitätsanalysen**

### **2.8.1. MTT-Test**

Die Quantifizierung des Zellüberlebens wird mithilfe der metabolischen Aktivität der Zelle bestimmt. Hierfür wird der MTT-Test angewandt, bei welchem das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich) in metabolisierenden Zellen zum blau-violetten wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Entstehende Formazan-Kristalle werden photometrisch quantifiziert.

Die Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen bzw. Primärzellkulturen auf 96er Loch-Kulturplatten (mit 0,1 ml DMEM-Medium bzw. Neurobasal-Medium pro Plattenloch) werden zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe Abschnitt 3.1. und 3.2.) dem MTT-Test unterzogen. Hierfür werden 0,5 mg/ml MTT den Zellen für 4 h zugegeben, Formazan-Kristalle mit 0,1 ml (1:1) Solubilisierungslösung (40 % Dimethylformamid (DMF), 20 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in bidest.-H<sub>2</sub>O, pH ~ 4.0) für 24 h solubilisiert und bei 560 nm photometrisch gemessen.

### **2.8.2. Hoechst-Färbung**

Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) ist ein fluoreszenter Farbstoff, welcher selektiv in der kleinen Furche der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bindet. Der Farbstoff wird zur Darstellung der DNA-Fragmentierung und -Kondensation verwendet.

Zu angegebenen Zeitpunkten der Behandlung der SH-SY5Y Zellen auf 96er Loch-Kulturplatten (siehe Abschnitt 3.1.) werden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei RT fixiert. Hierauf folgen drei Waschschrte mit PBS und die Färbung der Zellen mit 1 µg/ml Hoechst 33258 in PBST (PBS versetzt mit 0,2 % Triton X-100) für 20 min bei RT. Ungebundener Farbstoff wird durch drei



Waschschritte mit PBS aus den Zellen herausgespült. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgen im 360/460 nm Exzitations-/Emissionskanal bei 200x Vergrößerung.

### **2.8.3. Propidiumiodid-Färbung**

Propidiumiodid (PI; Sigma-Aldrich) interkaliert in Nukleinsäuren, überquert jedoch nur die Zellmembranen toter Zellen. Hiermit stellt die PI-Färbung einen guten Indikator für die Zellmembranintegrität dar.

Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie auf 96er Loch-Kulturplatten werden zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe Abschnitt 3.1.) mit 1 µg/ml PI in DMEM-Kulturmedium für 10 min gefärbt, zweifach mit phenolfreiem DMEM-Kulturmedium (phenolfreies DMEM-Medium, supplementiert mit 4,5 % Glucose, 1mM Pyruvat, 10 % inaktivem FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) gespült und bei 200x Vergrößerung im Phasenkontrastkanal zur morphologischen Darstellung der Zellen und im 535/610 nm Exzitations-/Emissionsfilter zur Darstellung der PI-positiven Zellen photographiert.

## **2.9. Immunhistochemie**

Zu angegebenen Zeitpunkten der Behandlung (siehe Abschnitt 3.2.) werden Primärzellkulturen (kultiviert auf 24er Loch-Kulturplatten mit Deckgläschen) mit -80 °C kaltem Methanol für 20 min bei -20 °C fixiert. Hierauf folgen drei Waschschritte mit PBS und die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Abschnitt 2.5.) in PBST und 10 % inaktivem FCS für 2 h bei RT. Es werden drei Waschschritte mit PBS vorgenommen. Der Cy<sup>3</sup>-gekoppelte Sekundärantikörper wird in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreifachem Spülen mit PBS werden die Zellkerne mit 1 µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in PBST für 20 min bei RT gefärbt und überschüssiger Farbstoff mit PBS herausgespült. Die auf Deckgläschen lokalisierten, gefärbten Zellen werden auf Objektträger mit Eindeckmedium (siehe Abschnitt 2.4.) transferiert und mit Lack versiegelt. Fluoreszenzaufnahmen erfolgen bei 200x Vergrößerung mithilfe folgender Exzitations-/Emissionsfilterpaare: 535/610 nm Filter für die Cy<sup>3</sup>-Darstellung und 360/460 nm Filter für die DAPI-Detektion.

## **2.10. MitoTracker-Färbung**

MitoTracker sind lipophile, kationische, fluoreszente Stoffe, die selektiv in Mitochondrien angereichert werden. Die selektive Anreicherung des Farbstoffes in intakten Mitochondrien wird durch das mitochondriale Membranpotential vermittelt. Eine thiolreaktive Chloromethylgruppe am

MitoTracker ermöglicht die kovalente Bindung an freie Sulfhydrylgruppen. Diese Eigenschaft ermöglicht eine Fixierung der Farbstoffverteilung in Zellen.

Für die Detektion des mitochondrialen Membranpotentials werden behandelte SH-SY5Y Zellen (kultiviert auf 24er Loch-Kulturplatten mit Deckgläschen) zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe Abschnitt 3.1.6.) mit 100 nM MitoTracker Red CMX-Ros (MitoTracker Red; Invitrogen) in DMEM-Kulturmedium 3 h unter Brutschrankbedingungen gefärbt, mit -80 °C kaltem Methanol für 20 min bei -20 °C fixiert und nach dreifachem Spülen mit PBS, einer 20minütigen DAPI-Färbung (1 µg/ml in PBST) bei RT unterzogen. Zur Entfernung des ungebundenen Farbstoffes werden drei Waschschrte mit PBS vorgenommen, die Deckgläschen auf Objektträger mit Eindeckmedium platziert und mit Lack versiegelt.

Zur Darstellung der mitochondrialen Neubildung wird das Kulturmedium der Primärzellkulturen (ausgesät auf 24er Loch-Kulturplatten mit Deckgläschen) gesammelt (konditioniertes Medium; Aufbewahrung unter Brutschrankbedingungen für die Dauer der MitoTracker-Färbung) und die Zellen werden für 3 h mit 100 nM MitoTracker Red im aufgewärmten Neurobasal-Färbemedium (Neurobasal-Medium ergänzt mit 1x Supplement B-27 minus Antioxidantien und 0,1 U Gentamycin) gefärbt. Hierauf wird das Färbemedium durch das konditionierte Medium ersetzt und die Kulturen werden nach einer Erholungsphase von 16 h behandelt. SH-SY5Y Zellen werden mit 100 nM MitoTracker Red in DMEM-Kulturmedium 3 h gefärbt, das Färbemedium durch frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt und nach einer Erholungsphase von 16 h behandelt. Nach der angegebenen Zeit (siehe Abschnitt 3.1.7. und 3.2.5.) werden die Kulturen, wie oben beschrieben, für 3 h mit 100 nM MitoTracker Green FM (MitoTracker Green; Invitrogen) gefärbt und, wie oben angegeben fixiert, mit DAPI gefärbt und mit Eindeckmedium und Lack versiegelt. Die Fluoreszenzaufnahmen werden bei 400x Vergrößerung mithilfe folgender Exzitations-/Emissionsfilterpaare vorgenommen: Detektion des MitoTracker Red erfolgt im 535/610 nm Filter, MitoTracker Green-Darstellung im 490/510 nm Filter und DAPI wird mit dem 360/460 nm Filterpaar detektiert.

## **2.11. JC-1-Färbung**

JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid, Sigma-Aldrich) ist ein lipophiler, kationischer, fluoreszenter Farbstoff, welcher selektiv in Mitochondrien mithilfe des mitochondrialen Membranpotentials angereichert wird. JC-1 besitzt die Eigenschaft, reversibel bei hohem Membranpotential in seiner Emission von einem energieärmeren in einen energetisch höheren Zustand zu gelangen. JC-1 bildet spontan bei hohem Membranpotential in gesunden Mitochondrien Komplexe aus, die als J-Aggregate bezeichnet werden und bei Anregung intensiv rot fluoreszieren. In

Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential bleibt der Farbstoff in seiner monomeren Form, welche bei Anregung grünes Licht emittiert.

Für Fluoreszenzaufnahmen erfolgt die JC-1-Färbung der Primärzellkulturen (kultiviert auf 24er Loch-Kulturplatten) nach der angegebenen Behandlungsdauer (siehe Abschnitt 3.2.5.) mit 2,5  $\mu\text{M}$  JC-1 in Neurobasal-Färbemedium für 30 min unter Brutschrankbedingungen. Aufnahmen erfolgen bei 400x Vergrößerung im 490/510 nm Exzitations-/Emissionsfilter zur Darstellung mitochondrial akkumulierter monomere JC-1 Moleküle und im 535/610 nm Filter zur Detektion der J-Aggregate.

### **2.12. Färbung der Lysosomen**

Für die Darstellung der Lysosomen wird der fluoreszente Farbstoff LysoTracker genutzt, welcher durch seinen basischen Charakter selektiv in sauren Organellen (Lysosomen) angereichert wird.

Behandelte SH-SY5Y Zellen (kultiviert auf 24er Loch-Kulturplatten mit Deckgläschen) werden nach der angegebenen Zeit (siehe Abschnitt 3.1.7.) mit 200 nM LysoTracker Red DND-99 (LysoTracker Red) in phenolfreiem DMEM-Kulturmedium für 1 h unter Brutschrankbedingungen gefärbt und die Fluoreszenzaufnahmen erfolgen im 490/510 nm Exzitations-/Emissionsfilter bei 400x Vergrößerung. Für die parallele Analyse von Mitochondrien und Lysosomen werden SH-SY5Y Zellen bzw. Primärzellkulturen (kultiviert auf 24er Loch-Kulturplatten mit Deckgläschen) mit MitoTracker Green gefärbt (siehe Abschnitt 3.10.) und nach Behandlung (siehe Abschnitt 3.1.7. und 3.2.4.) mit LysoTracker Red inkubiert und bei 400x Vergrößerung die Fluoreszenz des LysoTracker Red und des MitoTracker Green (535/610 nm Filter) detektiert.

### **2.13. Glutathion-Assay**

Glutathion stellt eines der wichtigsten Komponenten des antioxidativen Systems der Zelle dar (siehe Abschnitt 1.3.2.) und ist in mikro- bis millimolaren Konzentrationen in Zellen vorhanden. Im Glutathion-Assay (leicht modifiziert nach Griffith, 1980) wird eine enzymatische Recycling-Methode des Glutathions angewandt, welche es ermöglicht, die Glutathionkonzentration anhand eines amplifizierbaren Detektionssystems zu quantifizieren. Die Sulfhydrylgruppe des Glutathions reagiert hierbei mit dem Farbstoff 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB; Ellman's Reagens) unter Bildung zweier Produkte, der gelblichen 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB), welche photometrisch bei 405 nm detektiert werden kann, und dem Disulfidprodukt der Reduktionsreaktion GSTNB. GSTNB wird mithilfe der Glutathionreduktase (GR) zu GSH reduziert und das Detektionssignal, TNB, wird freigesetzt. Durch Einsatz des Glutathion-Recyclingenzym (GR) und einem Überschuss an DTNB und NADPH als Reduktionsmittel kommt es zur Amplifizierung des TNB-Signals (siehe Abb. 2.1.).

Die TNB-Bildung verläuft direkt proportional zur Recyclingreaktion, welche wiederum direkt proportional zur Glutathionkonzentration der Probe ist. Des Weiteren kann im Glutathion-Assay der Redoxstatus der Zelle untersucht werden, da in diesem Assay die reduzierte (GSH) und oxidierte (GSSG) Form des Glutathions unterschieden werden kann. Hierfür wird vor der Farbstoffumsetzung das reduzierte GSH der Probe durch 2-Vinylpyridin abgeschirmt, so dass nur das oxidierte GSSG für die Reaktion zur Verfügung steht, welches mittels GR in die GSH-Form reduziert werden kann. Mithilfe einer Kalibrationskurve mit oxidiertem GSSG kann die Konzentration sowohl der reduzierten als auch oxidierten Form des Glutathions in den Proben bestimmt werden.

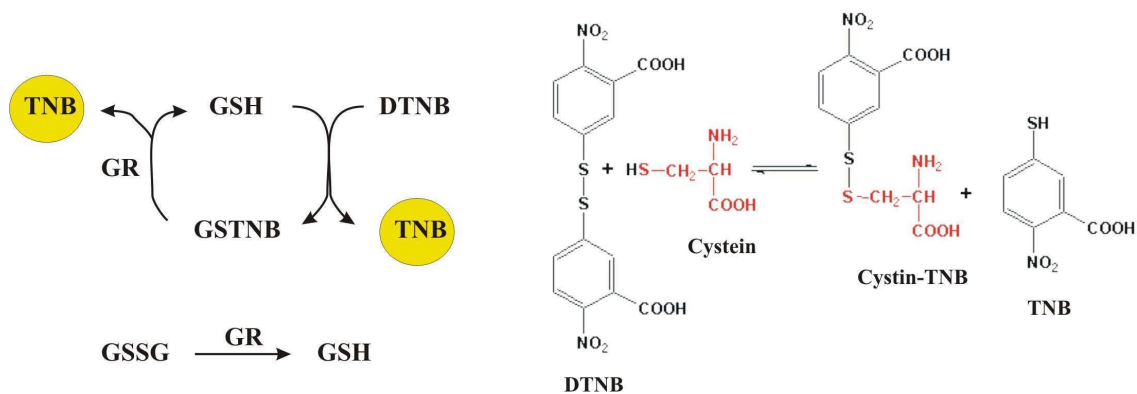


Abb. 2.1. Links: Recycling-Reaktion des Glutathion-Assays zur Amplifizierung des TNB-Signals; Rechts: Darstellung der Reaktion des GSH mit dem Farbstoff DTNB (verändert nach <http://www.biosite.dk/leksikon/images/ellman.gif>).

Behandelte SH-SY5Y Zellen auf 24er Loch-Kulturplatten werden nach der angegebenen Zeit (siehe Abschnitt 3.1.3.) mit eiskaltem PBS gespült, in 100 µl eiskaltem MES-Puffer (50mM 2-(N-morpholino-)ethansulfonsäure, pH 6,0, 1 mM EDTA; 4 h stabil bei RT) aufgenommen und mithilfe eines Spatels gesammelt. Nach einer 30x Sonifizierung mit 40 Hz wird das Zelllysat für 15 min bei 10000 x g und 4 °C sedimentiert. Für die Proteinbestimmung mithilfe des BCA-Assays (siehe Abschnitt 2.14.) werden 5 µl des Überstandes entnommen und die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt zur nachträglichen Normierung der Glutathionwerte. Der Rest des Überstandes (95 µl) wird mit gleichem Volumen einer 8 mM Metaphosphorsäure (MPA, Sigma-Aldrich) versetzt, gut gevortext und für 5 min bei RT deproteiniert. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 2000 x g und RT kann der Überstand bei -20 °C gelagert werden. Kurz vor der photometrischen Messung des Glutathiongehaltes werden 50 µl der deproteinierten Proben auf einen pH von 5,5 eingestellt durch Zugabe von 2,5 µl einer 4 M Triethanolamin-Lösung (TEAM; 531 µl TEAM + 469 µl H<sub>2</sub>O; 4 h stabil bei RT). Für eine gute Verteilung des TEAM sollte die Probe gleich nach Zugabe gut gevortext werden. Zur Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes (GSH + GSSG) werden 20 µl der deproteinierten Proben in eine 96er Loch-Platte überführt und mit 80 µl Arbeitslösung, welche 3 mM NADPH (Sigma-Aldrich) und 6 mM DTNB (Sigma-Aldrich) in Stamm-Puffer (125 mM Natriumphosphat, 3,3 mM EDTA, pH 7,5) enthält, versetzt. Parallel wird eine Standardreihe mit oxidiertem GSSG (Sigma-

Aldrich) unter gleichen Bedingungen angesetzt. Es folgt eine Erwärmung der Proben bei 30 °C für 10 min, die Zugabe des Enzyms GR (50 Unit / ml; Sigma-Aldrich) und die photometrische Messung bei 405 nm (Mehrfachmessungen erfolgen nach Enzymzugabe bis zur Sättigung der Reaktion). Der Gesamtglutathiongehalt der Proben wird mithilfe der Kalibrationskurve des GSSG (2 x GSH) bestimmt und auf die zytosolische Proteinmenge normiert. Um die Menge an oxidiertem Glutathion (GSSG) zu messen, wird das reduzierte GSH in den Proben mithilfe des 2-Vinylpyridins (Sigma-Aldrich) derivatisiert. Hierfür wird der Rest der deproteinierten und auf pH 5.5 eingestellten Proben mit 0,3 µl 1 M 2-Vinylpyridin-Lösung (108 µl 2-Vinylpyridin + 892 µl EtOH) versetzt, gut gevortext und für 60 min bei RT inkubiert. Parallel wird die Standardreihe unter gleichen Bedingungen bei RT inkubiert (2-Vinylpyridin quencht das TNB-Signal). Nach der Derivatisierung werden 20 µl der Proben wie oben beschrieben behandelt und mithilfe der Kalibrationskurve auf die zytosolische Proteinmenge normiert.

#### **2.14. Westernblot Analyse**

Primärkulturen bzw. SH-SY5Y Zellen auf 12er Loch-Kulturplatten werden nach der angegebenen Behandlungsdauer (siehe Abschnitt 3.1. und 3.2.) in eiskaltem PBS gespült und auf Eis in 100 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 67 mM Saccharose, 0,67 % SDS, 1x Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)) aufgenommen. Die Zellen werden von den Kulturplatten mit einem Spatel gelöst, die Lysate in 1 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 40 Hz 30x sonifiziert. 5 µl der Probe werden in eine 96er Loch-Platte gegeben und mit 45 µl bidest.-H<sub>2</sub>O und 200 µl BCA-Lösung (BCA™ ProteinAssay, Thermo Scientific; 50x Lösung A zu 1x Lösung B) versetzt und zusammen mit einer parallel erstellten BSA (Rinderserumalbumin)-Eichreihe, wird die Platte bei 60 °C für 20 min inkubiert und die Proteinkonzentration mithilfe der Absorptionsmessung bei 560 nm im Photometer (Multiscan RC) quantifiziert (BCA-Proteinbestimmung). Die Proben werden bei -20 °C gelagert oder in äquivalenten Mengen (10 bis 20 µg Protein) neben einem Proteinstandardmarker (peqGold, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) mithilfe der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese) auf 12 %ige Polyacrylamidgele (Auftrennungsbereich 10 bis 70 kDa) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Bio-Rad; Sammelgel 80 Volt; Trenngel 160 Volt). Hierfür werden die Proben mit 1x Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.4.) versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Der Transfer der separierten Proteine erfolgt in einem Semidry-Blot (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad) bei 30 Volt über Nacht. Die geblottete Membran wird mit PonceauS-Lösung (siehe Abschnitt 2.4.) gefärbt. Zusätzlich zur Detektion aller Proteine, hilft die in der PonceauS-Lösung enthaltene Essigsäure, Proteine an der Membran zu fixieren. Der Blot wird mit bidest.-H<sub>2</sub>O gespült. Zur Sättigung unspezifischer Bindungspartner für die Immundetektion wird die Membran für 30 min bei RT mit 5 % Magermilchpulver (AppliChem GmbH, Darmstadt) in 1x Tris-gepufferter Saline (TBS, siehe Abschnitt 2.4.) mit 0,1 % Tween20 (TBST) inkubiert, mit darauf folgender

Primärantikörper-Inkubation in TBST (siehe Tab. 2.5.) bei 4 °C über Nacht. Polyklonale Primärantikörper werden in der Zeit der Antikörper-Inkubation mit 3 % Magermilch versetzt. Es folgen drei Waschschrte mit TBST, eine einstündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in TBST, sowie wiederholtes Spülen in TBST. Immunreaktive Proteinbanden werden mit Luminol (Immobilon™, Millipore, Schwalbach) entwickelt und eingescanned (Fuji Las-3000 Dark Box). Die Intensität der erhaltenen Banden wird mit der Aida Image Analysis Software (Raytest, Staubenhardt) quantifiziert. Die Bilder werden mit Adobe Photoshop CS2 bearbeitet.

### 2.15. Messung der Proteincarbonyle

Oxidativ modifizierte Proteine können als Marker des oxidativen Stresses genutzt werden. Carbonyle, wie Aldehyde und Ketone, können mithilfe der Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) detektiert werden (Levine et al., 1990, siehe Abb. 2.2.).

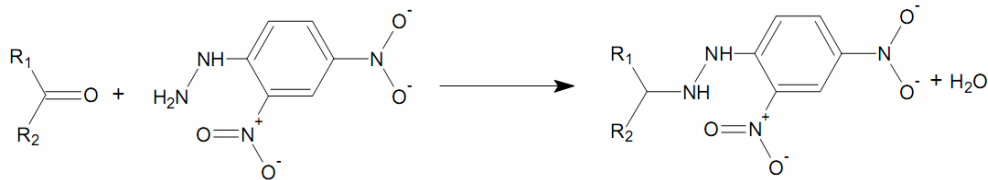


Abb. 2.2. Derivatisierung von Carbonylen mit dem Reagenz 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Hanna, 1966); R1 und R2 stellen Aminosäurereste dar.

Behandelte SH-SY5Y Zellen auf 6er Loch-Kulturplatten werden nach der angegebenen Zeit (siehe Abschnitt 3.1.4.) mit eiskaltem PBS gespült und mithilfe eines Spatels in Lysispuffer (siehe Abschnitt 2.14.) gesammelt. Es folgt eine 30x Sonifizierung mit 40 Hz und die Derivatisierung mit DNPH (0,1 mg/ml in 2 M HCl) für 20 min bei RT. Hierauf wird die Reaktion mit der Neutralisierungslösung (3 M Tris-Base mit 30 % Glycerin) versetzt und auf Eis gekühlt. Die Proben werden im SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (siehe Abschnitt 2.14.). Nach einer 30minütigen Blockierung mit 5 % Magermilch in TBST, wird die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem anti-DNP Antikörper (siehe Abschnitt 2.5.) inkubiert. Nach dreifachem Spülen in TBST wird der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper 1 h bei RT inkubiert, detektiert und quantifiziert (siehe Abschnitt 2.14.).

### 2.16. Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

Der Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erfolgt mit dem Farbstoff Dihydrodichlorofluoreszein (H<sub>2</sub>DCF). Dihydrodichlorofluoreszeindiacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) wird in Zellen aufgenommen und in H<sub>2</sub>DCF gespalten. H<sub>2</sub>DCF reagiert mit ROS zum fluoreszierenden Farbstoff Dichlorfluoreszein (DCF).

SH-SY5Y Zellen, kultiviert auf 6er Loch-Kulturplatten, werden unter oxidativen Bedingungen in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT für 5 h inkubiert. Die Luftsauerstoff induzierte ROS-Freisetzung wird durch eine sauerstoffreiche Kultivierung mit leicht zellbedeckendem Mediumvolumen erreicht. Die Zellen werden trypsinisiert (siehe Abschnitt 2.6.2.) und mittels Zentrifugation bei 200 x g für 4 min sedimentiert. Das Zellsediment wird in phenolfreiem DMEM-Kulturmedium gespült und in PBS mit 1 g/l D-Glucose (PBS/Glucose) resuspendiert. Die Zellen werden mit einer 2 µM H<sub>2</sub>DCF-DA-Lösung für 15 min bei 37 °C inkubiert, zwei Mal mit PBS/Glucose gespült und das Fluoreszenzsignal wird im Photometer (Multilabel Counter 1420) im 485/535 nm Exzitations-/Emissionsfilter gemessen.

### 2.17. Messung der mitochondrialen Schwellung

Eine Fe<sup>2+</sup>/Ascorbat induzierte Peroxidation führt in isolierten Mitochondrien zum Verlust der Cristacea-Struktur und einer Schwellung der Mitochondrien. Die mitochondriale Schwellung führt zur Abnahme der Trübung einer Mitochondriensuspension bei 520 nm (Hunter et al., 1963).

Die Leber einer erwachsenen Sprague-Dawley Ratte wird entnommen nach Anästhesierung mit Forene und Perfusion mit eiskaltem PBS. Die Leber wird in kleine Stücke zerschnitten und in eiskaltem Homogenisierungspuffer (300 mM Saccharose, 5 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM Ethylenglycoltetraacetat (EGTA), 0,1 % fettsäurefreies BSA, pH 7.4) auf Eis aufgenommen. Um Blutreste zu entfernen, wird das Gewebe im Homogenisierungspuffer mehrfach gespült, in 2 ml frischen Homogenisierungspuffer pro Gramm Gewebe überführt und mithilfe der Potter-Elvehjem Apparatur bei 700 rpm für 1 bis 2 min homogenisiert, filtriert, bei 4 °C und 1000 x g für 10 min zentrifugiert und der erhaltene Überstand wird anschließend bei 4 °C und 8000 x g für 10 min sedimentiert. Das Mitochondriensediment wird vorsichtig in 1 Volumen Homogenisierungspuffer ohne EGTA resuspendiert. Mitochondrien werden auf Eis gelagert und innerhalb von 5 h nach Präparation für Experimente verwendet. Die Mitochondrien des Neokortex eines adulten Rattengehirns werden wie oben angegeben präpariert. Nach der Entfernung der Hirnhaut und sichtbarer weißer Masse werden neokortikale Hirnhälften, wie oben beschrieben, homogenisiert und zwei Mal bei 4 °C und 2000 x g für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wird bei 4 °C und 12000 x g für 8 min sedimentiert. Das Mitochondriensediment wird in EGTA-freien Homogenisierungspuffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Isolierte Mitochondrien werden zwei Mal in Inkubationspuffer (125 mM KCl, 20 mM Tris, pH 7.4) gespült mit den Zwischenschritten der Zentrifugation (8000 x g für 3 min bei 4 °C). Die Proteinkonzentration wird mithilfe der BCA-Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 2.14.) ermittelt und die Proben werden auf eine Konzentration von 0,25 mg/ml in Inkubationspuffer gebracht. Die gereinigte Mitochondriensuspension wird mit 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT oder 1 % EtOH (Vehikel) behandelt, mit 10 µM Fe<sup>2+</sup> / 200 µM

Ascorbat-Lösung versetzt und zugleich im Photometer (Multilabel Counter 1420) bei 520 nm und 20 °C analysiert. Die durch ROS induzierte Schwellung der isolierten Mitochondrien führt zu einer Abnahme der Trübung bei 520 nm und erlaubt eine Aussage über die antioxidative Wirkung von Substanzen zu treffen.

#### **2.18. Messung von Thiobarbitursäure reaktiven Lipidperoxidationsprodukte (TBARS Thiobarbituric acid-reactive substances)**

Lipidperoxidationen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren induzieren die Entstehung von Aldehydverbindungen, wie des Malondialdehyds (MDA), des Hauptproduktes der Lipidperoxidation. Reaktion der Thiobarbitursäure (TBA) mit reaktiven Aldehyden führt zur Bildung eines fluorometrisch detektierbaren Komplexes.

Mitochondrien der Rattenleber werden, wie in Abschnitt 2.17. beschrieben, gewonnen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des BCA-Assays (siehe Abschnitt 2.14.) wird die aufgereinigte Mitochondriensuspension auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml Protein in Inkubationspuffer (siehe Abschnitt 2.17.) gebracht. Die Mitochondriensuspension wird mit 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT oder 1 % EtOH (Vehikel) behandelt und mit einer 10 µM Fe<sup>2+</sup> / 200 µM Ascorbat-Lösung versetzt zur Induktion der Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidationsreaktion wird nach 10 min abgestoppt durch Zugabe von 2,5 Volumen einer 5 %igen Trichloressigsäure in 1 M Essigsäure. Nach einer Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min werden die Proben mit 0,1 % TBA versetzt und bei 95 °C für 30 min derivatisiert. Die Fluoreszenz des MDA-TBA-Komplexes wird im Photometer (Multilabel Counter 1420) im 531/572 nm Exzitations-/Emissionsfilter gemessen.



## 2.19. Molekularbiologische Arbeiten

### 2.19.1. Konstruktion des $P_{Cat-2}::DsRed2$ -Vektors zur Expression in *Caenorhabditis elegans*

Um eine dopaminerg-spezifische Expression des *dsRed2*-Gens zu erreichen, wird im pRL1899-Vektor (zur Verfügung gestellt von Rueyling Lin, UTSW Medical Center, Dallas (USA)) die *dsRed2*-Sequenz (aus p*DsRed2*-N1-Vektor (Clontech)) unter den Tyrosinhydroxylase (TH)-Promotor ( $P_{Cat-2}$ ) gestellt. Die zu klonierende  $P_{cat-2}$ -Sequenz wurde unter [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org) ermittelt. Das B0432.5b-Cosmid (Lints und Emmons, 1999) dient als Matrize zur Generierung der Primer. Es wurde ein  $P_{Cat-2}$ -Amplifikat aus der genomischen DNA des *C. elegans* erstellt mit einer Extension der Promotorregion in Exon1 um 267 bp des *cat-2*-Genes. Eine Extension der Promotorsequenz in Exon1 des *cat2*-Genes sollte nach Lints und Emmons (1999) eine Stabilisation des Expressionsstatus erlauben. Die *dsRed2*-Sequenz wurde vom p*DsRed2*-N1-Vektor heraus amplifiziert, mit Ermittlung der Sequenz unter <http://www.clontech.com>. Das Fusionsprodukt  $P_{Cat-2}::DsRed2$  wurde in den pRL1899-Vektor hineinkloniert.

#### 2.19.1.1. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Bezugsquelle	Funktion
<i>E.coli</i> -Stamm One shot <sup>®</sup> Top10	TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)	Transformation des TOPO-TA Kolonierungsvektors
<i>E. coli</i> -Stamm Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$ chemically competent	Invitrogen, Karlsruhe	Transformation des Expressions- vektors

#### 2.19.1.2. Vektoren

Vektor	Bezugsquelle	Funktion
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup>	TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)	Eingangsvektor zur Klonierung der $P_{Cat-2}::DsRed2$ -Sequenz
pRL1899	Rueyling Lin, UTSW Medical Center, Dallas (USA)	Ziel- oder Expressionsvektor zur Klonierung der $P_{Cat-2}::DsRed2$ - Sequenz
$P_{Sng-1}::CFP$ - pVH10.10	K. Hüsken und R. Leube, Universität Mainz	<i>CFP</i> -Expression unter dem <i>Synaptogyrin-1</i> -Promotor

### 2.19.1.3. Primerpaare (PP)

<b>Primerpaare zur Erstellung der P<sub>Cat-2</sub>::DsRed2 Sequenz</b>	
<b>1) P<sub>Cat-2</sub> (Genom) vorwärts</b>	5` - GAT CTC CAA TAA CCC GGA AA - 3`
<b>P<sub>Cat-2</sub> (Genom) rückwärts</b>	5` - CAG CTC TGC CGA GTG AAT TA - 3`
<b>2) P<sub>Cat-2</sub> (pRL1899) vorwärts</b>	5` - ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG - 3`
<b>P<sub>Cat-2</sub> (pRL1899) rückwärts</b>	5` - CAG CTC TGC CGA GTG AAT TA - 3`
<b>3) DsRed2 vorwärts</b>	5` - AGT TAA TTC ACT CGG CAG AGC TGA TGG CCT CCT CCG AGA ACG - 3`
<b>DsRed2 rückwärts</b>	5` - CTC TAC AAA TGT GGT ATG GCT GAT - 3`
<b>4) P<sub>Cat-2</sub>:: DsRed2 vorwärts</b>	5` - CTG CAG GGA TCT CCA ATA AC - 3`
<b>P<sub>Cat-2</sub>:: DsRed2 rückwärts</b>	5` - CTG ATT ATG ATC TAG AGT CGC - 3`
<b>Primerpaare der Q-PCR</b>	
<b>cat-2 vorwärts</b>	5` - CCA ACG CTT TCC AAT TTT GT - 3`
<b>cat-2 rückwärts</b>	5` - TAG GAG CAC GTC GTG TGA AG - 3`
<b>gpd-1 vorwärts</b>	5` - AAA GGA CAC GGT TCA AGT GG - 3`
<b>gpd-1 rückwärts</b>	5` - CCG TGG GTC GAG TCA TAC TT - 3`
<b>rpl-21 vorwärts</b>	5` - CCA GTC CCA GCT TTG AAG AG - 3`
<b>rpl-21 rückwärts</b>	5` - ACA ATC TCG AAA CGG AGT GG - 3`

**Tab. 2.3.** Primerpaare zur Erstellung der P<sub>Cat-2</sub>::DsRed2 Sequenz und für die Q-PCR.

Zur Wahl der Oligonukleotide werden die Programme Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) und OligoFactory (<http://164.15.232.115/oligofactory/index.jsp>) genutzt, mit der Abgleichung der Sequenzen in der Clone Manager Suite Software. Primer werden von der Firma MWG-Biotech AG bezogen. Lyophilisierte Proben werden nach Empfehlung des Herstellers auf eine Endkonzentration von 100 µmol/µl mit bidest.-H<sub>2</sub>O gebracht und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Gebrauchslösung beträgt 10 pmol/µl.

### 2.19.1.4. Enzyme für molekularbiologische Methoden

<b>Enzym</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo (Finnland)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

**2.19.1.5. Reaktionskomplettausstattung (Kits)**

Kit	Bezugsquelle
Absolutely RNA Nanoprep Kit	Stratagene, La Jolla, CA (USA)
Absolute SYBR Green Q-PCR Mix	Thermo Scientific, Dreieich
Gateway®LR Clonase™II Enzym Mixes	Invitrogen, Karlsruhe
GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kits	Sigma-Aldrich, Schellendorf
NucleoSpin®Plasmid Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
Omniscript Reverse Transkriptase	Qiagen, Hilden
PCR clean-up Gel Extraktion NucleoSpin® Extrakt II-Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo (Finnland)
TOPO-TA Cloning® Kits	Invitrogen, Karlsruhe

**2.19.1.6. Amplifikation des  $P_{Cat-2}$  aus genomischer DNA des *Caenorhabditis elegans* und *DsRed2* aus dem *DsRed2*-N1-Vektor**

Zur Amplifizierung von Klonierungsprodukten mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) wird die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase genutzt. Mit der Phusion Polymerase können lange Amplifikate gewonnen werden und die Ablese-Fehlerquote sinkt auf  $4,4 \cdot 10^{-7}$  im Phusion HF Puffer (50x weniger als DNA Polymerase des *Thermus aquaticus*). Mit diesen Eigenschaften wird dieses Enzym zur Polymerase der Wahl bei Klonierungen. Die Phusion Polymerase synthetisiert Amplifikationsprodukte mit stumpfen Enden.

Zur Amplifikation der  $P_{Cat-2}$ -Sequenz aus der genomischen DNA des *C. elegans* (zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Kern, Universität Mainz) wird das Primerpaar 1 (PP 1; Tab. 2.3.; Abschnitt 2.19.1.3.) genutzt. Da die  $P_{Cat-2}$ -Sequenz in den pRL1899-Vektor mit nachgeschaltetem grün fluoreszierenden Protein (GFP) hineinkloniert wurde (Überlappung des Exzitations-/Emissionsspektrums des dopaminergen GFP Signals mit dem pan-neuronalen cyan fluoreszierenden Protein (CFP)-Signal), wird die  $P_{Cat-2}$ -Sequenz aus dem pRL1899-Vektor heraus amplifiziert mit dem PP 2 (siehe Tab. 2.3.). Die *dsRed-2*-Sequenz wird aus dem p*DsRed2*-N1-Vektor amplifiziert mit dem PP 3 (siehe Tab. 2.3.). Die Primersequenz des PP 3 besitzt eine 5'-Extension um eine Basenabfolge der 3'-Sequenz des  $P_{Cat-2}$ -PCR-Produktes, welche es ermöglicht, im Schritt der Fusion-PCR (siehe Abschnitt 2.19.1.10.), das Fusionsprodukt  $P_{Cat-2}::DsRed2$  zu erhalten.

**PCR-Reaktion**

Folgende Komponenten werden auf Eis zusammengestellt:

genomische DNA, pRL1899 bzw. DsRed2-N1	1 $\mu$ l (100 ng)
Primerpaar 1, 2 bzw. 3	je 1 $\mu$ l (10 pmol/ $\mu$ l)
5x HF Puffer	10 $\mu$ l (Endkonzentration 1x)
10 mM dNTPs	1 $\mu$ l (Endkonzentration je 200 $\mu$ M)
Phusion Polymerase	0,5 $\mu$ l (0,02 U/ $\mu$ l)
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad. 50 $\mu$ l

Die PCR wird unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

PCR Programm			
Denaturierung		30 sec 98 °C	
Amplifikation	Denaturierung	10 sec 98 °C	X <sub>3</sub> x Zyklen
	Anlagerung	35 sec X <sub>1</sub> °C	
	Elongation	X <sub>2</sub> min 72 °C	
Endelongation		5 min 72 °C	

Die Anlagerungstemperatur (X<sub>1</sub>) der Primer an homologe DNA-Sequenzen beträgt für PP 1 (P<sub>Cat-2</sub> aus genomischer DNA) 55 °C, für PP 2 58 °C (P<sub>Cat-2</sub> aus pRL1899) und für PP 3 60 °C (DsRed2 aus pDsRed2-N1). Die Elongationsreaktion erfolgt in der Amplifikationsphase für PP 1 in 2 min, für PP 2 in 1 min und in 35 sec für PP 3 (X<sub>2</sub>). Die Amplifikationsreaktion beträgt 28 Zyklen für PP 1 und für PP 2 und PP 3 25 Zyklen (X<sub>3</sub>).

#### 2.19.1.7. Auftrennung der PCR-Produkte mithilfe der Gelelektrophorese

Nukleinsäuren sind durch negativ geladene Phosphatgruppen am Zuckerphosphatrückgrad negativ geladen. Diese Eigenschaft der Nukleinsäuren erlaubt eine elektrophoretische Auftrennung nach der Molekulargröße, die der Länge der Basenpaare entspricht.

Das Amplifikationsprodukt wird mit 1x Gelladepuffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) im 1%igen Agarosegel (in 1x TAE-Puffer (siehe Abschnitt 2.4.) mit 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid (EtBr; Nukleinsäure-interkalierender Fluorophor) im elektrischen Feld bei 80 Volt zusammen mit einem Standardmarker (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) in Richtung Anode aufgetrennt. Die entsprechenden Banden der Amplifikationsprodukte werden im Gel mithilfe einer energiearmen Transilluminatorlampe (220 Watt; zur Vermeidung von Mutationsinduktionen) identifiziert, aus dem Gel herausgeschnitten, in 1 ml Reaktionsgefäße überführt und im weiteren Schritt mithilfe der Gelextraktion aus dem Gel eluiert.

### 2.19.1.8. Gelextraktion

Die in den Schritten 2.19.1.6. und 2.19.1.7. gewonnenen Amplifikationsprodukte werden mithilfe des PCR clean-up Gel Extraktion NucleoSpin® Extrakt II-Kits aus dem Gel eluiert. Die Präparationsschritte werden strikt nach dem vorgegebenen Protokoll des Kits eingehalten und die gewonnenen PCR-Produkte liegen in 17,5 µl NE-Puffer des Kits vor.

### 2.19.1.9. Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren

Bei der photometrischen Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren werden die Lichtenergie-absorbierenden Eigenschaften von aromatischen Strukturen ausgenutzt. Aromatische Basen der Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm Wellenlänge, wohingegen aromatisch Aminosäurereste (Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin) ihr Extinktionsmaximum bei 280 nm Wellenlänge zeigen. Da eine lineare Beziehung zwischen Extinktionsmaximum bei 260 nm ( $E_{260}$ ) und der Konzentration von Nukleinsäuren besteht, kann mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes auf die Konzentration der Nukleinsäure (angegeben in µg/µl) geschlossen werden (mit  $k$  als Konstante, welche die Konzentration an Nukleinsäure beschreibt, die bei einer Schichtdicke von 1 cm, einer OD von 1 entspricht; für doppelsträngige DNA nimmt der  $k$ -Wert 50 µg/µl an, einsträngige Ribonukleinsäure (RNA) den Wert 40 µg/µl; (f) berücksichtigt die Verdünnung):

$$c = E_{260} * f * k$$

Die Reinheit der Nukleinsäuren wird durch den Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  ausgedrückt und sollte bei 1,8 liegen. Kontaminationen mit Proteinen senken den Wert.

### 2.19.1.10. Fusion-PCR

Die aufgereinigten PCR-Produkte ( $P_{Cat-2}$  und  $DsRed2$ ) werden mithilfe der Fusion-PCR (nach Hobert, 2002) zum  $P_{Cat-2}::DsRed2$ -Fusionsprodukt mit PP 4 (siehe Tab. 2.3.) synthetisiert. Hierfür werden die Komponenten wie in Abschnitt 2.19.1.6. zusammengestellt. Als Matrize dienen die Produkte  $P_{Cat-2}$  (amplifiziert mit PP 2) und  $DsRed2$  (amplifiziert mit PP 3) in einer Konzentration von 10 ng. Die Anlagerungstemperatur ( $X_1$ ) beträgt 58 °C, die Synthese ( $X_2$ ) erfolgt in 35 sec und die Amplifikationsphase beläuft sich auf 27 Zyklen ( $X_3$ ). Das Fusionsprodukt wird gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.19.1.8.) und aus dem Gel eluiert (2.19.1.9.).

### 2.19.1.11. TOPO-TA-Klonierung

Die TOPO-TA Klonierung stellt eine effiziente Methode zur Klonierung von PCR-Produkten dar (Shuman, 1994). Hierbei werden im ersten Schritt mithilfe der Taq Polymerase einzelne Desoxyadenosinmonophosphate an das 3'-Ende der PCR-Produkte angefügt. Der linearisierte Eingangsvektor pCR®8/GW/TOPO®-Vektor des TOPO-TA Cloning® Kits besitzt an seinem 5'-Ende einzelne Desoxythymidinreste, die kovalent mit einer DNA-Topoisomerase verknüpft sind. Es kommt zu einer effizienten Ligation der PCR-Produkte mit dem pCR®8/GW/TOPO®-Vektor im zweiten Schritt der Klonierungsreaktion.

#### 2.19.1.11.1. Anhängen des 3'-Adenin-Überhangs an das Fusion-PCR-Produkt

Für die Generierung des 3'-Adenin-Überhangs an das Fusion-PCR-Produkt werden folgende Komponenten auf Eis zusammengestellt und für 30 min bei 70 °C inkubiert:

- 7 µl aufgereinigtes Fusionsprodukt ( $P_{Cat-2}::DsRed2$ -Sequenz)
- 1 µl Taq-Puffer
- 1 µl dATP (2mM)
- 1 µl Taq Polymerase (0,5 U/µl)

#### 2.19.1.11.2. Ligation des 3' Adenin-Überhangproduktes mit dem pCR®8/GW/TOPO®-Vektor

Für die Klonierung der  $P_{Cat-2}::DsRed2$ -Sequenz wird das 3'-Adenin-Überhang-PCR-Fusionsprodukt mit dem linearisierten pCR®8/GW/TOPO®-Vektor ligiert. Für die TOPO-TA-Klonierungsreaktion werden folgende Komponenten auf Eis zusammengestellt und für 5 min bei RT inkubiert:

- 4 µl 3'-Adenin-Überhang-PCR-Fusionsprodukt
- 1 µl Salzlösung (des TOPO-TA Cloning® Kits)
- 1 µl pCR®8/GW/TOPO®-Vektor

#### 2.19.1.11.3. Transformation des TOPO-TA-Klonierungsvektors in kompetente One shot®TOP10 *E. coli* und Kultivierung der transformierten Klone

Zu den auf Eis aufgetauten 500 µl One shot®TOP10 kompetenten *E. coli* werden 2 µl des in Abschnitt 2.19.1.11. erstellten Vektors hinzu addiert, leicht gemischt und auf Eis 30 min inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec. Nach einer 2minütigen Kühlung auf Eis, werden 250 µl S.O.C.- (Super Optimal broth with Catabolite repression)-Medium (Invitrogen) hinzugegeben. Der Transformationsansatz wird 1 h bei 37 °C und 210 rpm geschüttelt und anschließend auf *Luria Broth*

(LB)-Agarplatten (siehe Abschnitt 2.4.) mit 1x Spektinomycin (200 ng/ml) zur Selektion der transformierten Klone ausplattiert. Die Selektion erfolgt über Nacht bei 37 °C. Es werden Klone von der Übernachtskultur gepickt und zur Anreicherung werden 3,6 ml LB-Medium mit 1x Spektinomycin mit Einzelkolonien beimpft und über Nacht bei 37 °C und 210 rpm kultiviert bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 (photometerische Evaluation bei 600 nm).

#### **2.19.1.12. Plasmidpurifikation**

Die Plasmidaufreinigung erfolgt mit dem NucleoSpin®Plasmid Kit. Hierfür werden die in Abschnitt 2.19.1.11.3. gewonnenen Übernachtskulturen in einem 1 ml Reaktionsgefäß sedimentiert bei 11000 x g für 30 sec und die nachfolgenden Präparationsschritte werden strikt nach dem vorgegebenen Protokoll des Kits eingehalten. Das aufgereinigte Plasmid liegt in 50 µl AE-Puffer des Kits vor.

#### **2.19.1.13. Evaluation der P<sub>Cat-2</sub>::*DsRed2*-Sequenz in positiven Klonen**

Zur Evaluierung der klonierten Sequenz wird diese einer Restriktionsanalyse unterzogen. Restriktionsendonukleasen erkennen kurze palindromische Sequenzen und schneiden diese in beiden Strängen der DNA. Durch die Existenz einer charakteristischen Multiple Cloning Site im verwendeten Vektor, können durch Wahl der Restriktionsenzyme charakteristische DNA-Fragmente entstehen mit definierter Größe. Die fragmentierte Vektor-DNA wird gelelektrophoretisch (2.19.1.7.) auf die entstandenen Fragmente hin untersucht. Der Restriktionsverdau wird nach dem vorgegebenen Protokoll der Restriktionsenzyme angesetzt, für 2 h bei 37 °C inkubiert und im 1 %igen Agarosegel (2.19.1.7.) evaluiert.

#### **2.19.1.14. Evaluation der erstellten P<sub>Cat-2</sub>::*DsRed2*-Sequenz durch Sequenzierung**

Das in Abschnitt 2.19.1.13. positiv bewertete Plasmid wird von GENterprice GENOMICS (Mainz) sequenziert. Die sequenzierten Konstrukte werden auf Sequenzhomologien hin geprüft mithilfe des Basic Local Alignment Search Tools (NCBI/Blast, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Ergebnis der P<sub>Cat-2</sub>-Sequenz: 480836.2 (Akzession); *C. elegans* Cosmid B0432, komplette Sequenz mit 88 % Homologie. Für *DsRed2*-Sequenz eine Homologie zu 97 % mit *DsRed2*-beinhaltenden Vektoren.

#### **2.19.1.15. LR-Reaktion**

Die Subklonierung der P<sub>Cat-2</sub>::*DsRed2*-Sequenz aus dem pCR®8/GW/TOPO®-Vektor in den eukaryotischen Expressionsvektor pRL1899 erfolgt mithilfe des Gateway®LR Clonase™II Enzym

Mixes. Das Gateway®-System stellt eine Klonierungsmethode dar, welche die Strategie der ortsspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda nutzt. Hierbei können effizient DNA-Sequenzen innerhalb multipler Vektoren bewegt werden. Für die LR-Reaktion braucht es einen Eingangsvektor (pCR®8/GW/TOPO®-Vektor), welcher das zu bewegende Gen ( $P_{Cat-2}::DsRed2$ -Sequenz) mit attL-Stellen flankiert, der Zielvektor oder Expressionsvektor (pRL1899) hingegen besitzt attR-Stellen, die ein Gen, welches das Wachstum in *E. coli* inhibiert, flankieren. Der Gateway®LR Clonase™II Enzym Mix erlaubt eine Rekombination der zwischen den att-Stellen befindlichen Sequenz.

Für die LR-Reaktion werden folgende Komponenten auf Eis zusammengestellt und 1 h bei 25 °C inkubiert:

150 ng	$P_{Cat-2}::DsRed2$ - pCR®8/GW/TOPO®-Vektor
150 ng	pRL1899-Vektor
2 µl	LR-Clonase Enzym Mix
ad. 8 µl	TE-Puffer

Um die Reaktion abubrechen, erfolgt anschließend ein ProteinaseK-Verdau bei 37 °C für 10 min.

#### **2.19.1.16. Transformation kompetenter DH5α *E. coli* und Gewinnung des Expressionsvektors**

Die Transformation der chemisch kompetenten DH5α-*E. coli* erfolgt wie in Abschnitt 2.19.1.11.3. beschrieben. Die Selektion der transformierten Klone erfolgt hier mit 1x Ampicillin (100 ng/ml) auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Einzelkolonien werden gepickt und für Übernachtskulturen in LB-Medium mit 1 x Ampicillin beimpft.

Die Gewinnung des Expressionsplasmids ( $P_{Cat-2}::DsRed2$ -pRL1899) erfolgt mithilfe des Nucleo-Spin® Plasmid Kits (siehe Abschnitt 2.19.1.12.). Es folgt eine Restriktionsanalyse und Sequenzierung (2.19.1.13. und 2.19.1.14.) des erhaltenen Vektors. Zur Gewinnung ausreichender Mengen des  $P_{Cat-2}::DsRed2$ -pRL1899-Plasmids werden 100 ml LB-Medium mit 1x Ampicillin und 200 µl transformierten DH5α-*E. coli* angeimpft. Das Plasmid wird mithilfe der Midi-Präparation erhalten.

#### **2.19.1.17. Plasmidpurifikation (Midi-Präparation)**

Die Midi-Plasmidaufreinigung erfolgt mithilfe des GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kits. Die Midi-Präparation ermöglicht, bis zu 350 µg Plasmid-DNA aufzureinigen. Die Präparationsschritte werden strikt nach dem vorgegebenen Protokoll des Kits eingehalten. Anschließend werden zwei weitere



Zentrifugationsschritte bei 3000 x g für 10 min vorgenommen, um die Menge an EtOH zu reduzieren. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wird in 1 ml TE-Puffer des Kits aufgenommen.

## 2.20. Generierung transgener *Caenorhabditis elegans*

Zur Generierung transgener Würmer werden Plasmid-Konstrukte in die Vulva von jung adulten Hermaphroditen injiziert. Da *C. elegans* unter gegebenen Bedingungen als Hermaphrodit sich selbst reproduziert, sind die Nachkommen genetisch identisch.

Der erhaltene dopaminerge Reportervektor  $P_{Cat-2}::DsRed2$  ( $P_{Cat-2}::DsRed2$ -pRL1899) wird mit einem pan-neuronalen Reportervektor  $P_{Sng-1}::CFP$  (zur Verfügung gestellt von K. Hüsken und R. Leube, Universität Mainz) in den N2-Bristolstamm ko-injiziert in einer Konzentration von 60 ng je Vektor pro Wurm mithilfe eines inversen Stereomikroskops und des TransferMan NK2 + Femtojet (durchgeführt von Dr. A. Kern, Universität Mainz). Die Ko-Injektion resultiert in transgenen Nachkommen mit extrachromosomal exprimierenden Vektoren. Die Selektion positiv transfizierter Nachkommen erfolgt am Fluoreszenzmikroskop (Ko-Detektion von pan-neuronalem CFP-Signal und dopaminergem DsRed2-Signal).

Für die genomische Integration der DNA-Sequenzen und somit für eine stabile Expression in transgenen Würmern werden leuchtende Würmer im jung adulten Stadium auf NGM-Agarplatten ohne Bakterien transferiert und mit UV-Licht bestrahlt bei 270 nm und einer Energie von etwa 300 J/m<sup>2</sup>. Die Würmer werden auf NGM-Agarplatten vereinzelt und es folgt die Selektion der Nachkommen. Bei einer fast 100 %igen transgenen Nachkommenschaft über drei Generationen wird die Wurmlinie einen integrierten transgenen Hintergrund aufweisen (stabile Wurmlinie). Zwei unabhängige stabile Wurmlinien werden mit Wildstamm-Männchen drei Mal gekreuzt zur Bereinigung möglicher Mutationen, welche aufgrund der Bestrahlung entstanden sein könnten. Hierfür wird nach jeder Auskreuzung nach stabil exprimierenden Individuen selektiert. Induktion männlicher Individuen in einer Hermaphroditen-Population erfolgt durch eine Erhöhung der Temperatur auf 30 °C für 6 h. Hierfür werden L4-Larven für die angegebene Zeit bei 30 °C auf NGM-Platten inkubiert. Die Selektion von Männchen erfolgt nach phänotypischen Merkmalen der Schwanzregion.

## 2.21. Real-Time-quantitative-PCR

Zur Analyse des Expressionsniveaus zu untersuchender Gene wird die Real-Time-quantitative-PCR (Q-PCR) angewandt. Hierfür wird die Gesamt-RNA des zu untersuchenden Gewebes isoliert, worauf bei der nachfolgenden reversen Transkriptionsreaktion (RT-Reaktion) durch Verwendung von Oligo-(15x Desoxythymidin - dT<sub>15</sub>)-Primern, die ausschließliche Synthese der zellulären messenger RNA

(mRNA) in *complementary* DNA (cDNA) mithilfe der Reversen Transkriptase realisiert wird. Die Q-PCR ermöglicht durch den Einsatz DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe (SYBR Green I), die Menge an synthetisierten PCR-Produkten in jedem PCR-Zyklus zu quantifizieren durch Detektion der Fluoreszenzsignalintensität. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase. Der  $C_T$ -Wert (engl. Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus) beschreibt den Zyklus, in welchem sich die entstehende Fluoreszenzintensität signifikant von der Hintergrundfluoreszenzintensität abhebt. Der  $C_T$ -Wert ist somit direkt proportional zur vorhandenen Ausgangskonzentration der zu analysierenden mRNA. Mithilfe paralleler Quantifizierung von Referenz-Genen, die der Klasse der Haushaltsgene angehören und konstante Expressionsregulationen aufweisen, kann die relative Expressionsmenge des untersuchten Gens im analysierten Gewebe determiniert werden.

### **2.21.1. Isolierung der Gesamt-RNA aus *Caenorhabditis elegans***

Die Isolierung der Total-RNA aus adulten *C. elegans* Behandlungsgruppen erfolgt zu angegebenen Zeitpunkten (siehe Abschnitt 3.3.2.2.) mithilfe des Absolutely RNA Nanoprep Kits. Mit dieser Methode kann RNA aus geringem Gewebematerial in einem kleinen Volumen erhalten werden. Es werden etwa 15 Würmer pro Behandlungsgruppe in 10  $\mu$ l RNase-freiem Wasser in einem 1 ml Reaktionsgefäß auf Eis aufgenommen und bei -80 °C schockgefroren. Für die RNA-Isolierung werden die Präparationsschritte strikt nach dem vorgegebenen Protokoll des Kits eingehalten. Die aufgereinigte RNA liegt in 12,5  $\mu$ l Elutionspuffer des Kits vor. Die Konzentration und Reinheit der aufgereinigten RNA wird photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.19.1.9.).

### **2.21.2. Reverse Transkription**

Die AMV Reverse Transkriptase (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase) katalysiert die Umschreibung der RNA in cDNA-Form. Durch Verwendung von Oligo-(dT<sub>15</sub>)-Primern, die an den Poly-Adenin-Schwanz der mRNA binden, wird die alleinige Umschreibung der mRNA aus der Gesamt-RNA realisiert. Die AMV Reverse Transkriptase verfügt über eine RNase H-Aktivität, die parallel die gelesene RNA abbaut.

Die reverse Transkription erfolgt mit dem Omniscript RT Kit. Hierfür werden für die nachfolgende Q-PCR die Komponenten nach Vorgabe des Kit-Protokolls auf Eis zusammengesetzt für den Mastermix bzw. Mastermix ohne Reverse Transkriptase als Negativkontrolle. Die in Abschnitt 2.21.1. erhaltene RNA der Behandlungsgruppen wird auf äquivalente RNA-Konzentration in einem Volumen von 10  $\mu$ l in RNase-freiem H<sub>2</sub>O normiert. Die RNA wird bei 65 °C für 5 min denaturiert, der Mastermix bzw. der Mastermix für die Negativkontrolle hinzuaddiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

**2.21.3. Q-PCR**

Die in Abschnitt 2.21.2. erhaltene *cDNA* der Behandlungsgruppen dient als Matrize für die Q-PCR. Es werden die Komponenten des ABsolute SYBR Green Q-PCR Mixes nach Vorgabe des Kit-Protokolls auf Eis zusammengestellt, mit je 5 pmol des Primerpaares (siehe Tab. 2.3.) pro Ansatz (Mastermix), zur Quantifizierung der Tyrosinhydroxylase (TH)-mRNA Spiegel in Behandlungsgruppen und parallel der konstitutiv exprimierten Referenz-Amplifikate der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*gpd-1*; Enzym der Glykolyse) und des ribosomalen Proteins L21 (*rpl-21*; ribosomales Protein der 60S-Untereinheit). Auf einer 96er Loch-Q-PCR-Platte werden je 1 µl *cDNA* bzw. 1 µl *cDNA*-Vorlage der Negativkontrolle oder 1 µl bidest.-H<sub>2</sub>O für den Leerwert vorgelegt, mit dem Mastermixes überschichtet, mit Parafilm versiegelt und die Q-PCR erfolgt mit folgendem Programm im iCycler iQ™:

<b>Q-PCR Programm</b>		
Aktivierung		15 min 95 °C
Amplifikation	Denaturierung	20 sec 95 °C
	Anlagerung	20 sec 60 °C
	Elongation	30 sec 72 °C
		35 Zyklen
Enddenaturierung		1 min 95 °C
Abkühlung		1 min 55 °C
Schmelzkurve		8 sec 55 °C 0,5 °C Anstieg
		88 Zyklen

### 3. ERGEBNISSE

Diese Arbeit umfasst die Analyse des neuroprotektiven Potentials der antioxidativen Strukturen Phenothiazin (PHT), Iminostilben (ISB) und Phenoxazin (PHO) in Toxin-induzierten Parkinson-Modellen. Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns (Abschnitt 3.2.) stellen, neben der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y (Abschnitt 3.1.), das untersuchte *in vitro* Modell dar. *C. elegans* dient in dieser Arbeit als *in vivo* Modell (Abschnitt 3.3.). Die Einführung Parkinson-spezifischer Toxine, MPP<sup>+</sup> und Rotenon, etabliert eine selektive dopaminerge Neurodegeneration innerhalb der oben genannten experimentellen Systeme und ermöglicht das Ausmaß neurodegenerativer Charakteristika der Parkinsonschen Krankheit (PD) auf molekularer Ebene zu untersuchen.

#### 3.1. Zytoprotektion der klonalen SH-SY5Y Zelllinie mithilfe von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin

Zur Untersuchung der antioxidativen Wirksamkeit von PHT, ISB und PHO wird die klonale SH-SY5Y Zelllinie herangezogen. Wie in Abschnitt 1.8.3.1. beschrieben, erweist sich dieser Zellklon als ein etabliertes *in vitro* Untersuchungsobjekt der Parkinson-Forschung. MPP<sup>+</sup> und Rotenon rekapitulieren die in Abschnitt 1.8.2. beschriebenen Parkinson-phänotypischen Veränderungen der mitochondrialen Funktion. Zur Darstellung der effektiven Detoxifizierung eines induzierten Redoxungleichgewichts in Zellen wird das Toxin Buthionin-Sulfoximin (BSO) verwendet. Die Untersuchung der Auswirkungen verwendeter Toxine und protektiver Eigenschaften der analysierten Substanzen bei Ko-Inkubationen mit Toxinen umfasst das Spektrum der Zellvitalität (MTT-Test, Hoechst- und PI-Färbung), des zelleigenen antioxidativen Systems (Glutathion-Analyse), des zellulären Redoxgleichgewichts (Detektion von Carbonylen), sowie mitochondriale Aspekte (mitochondriales Membranpotential, mitochondriale Morphologie und Neubildung) und lysosomale Abbauprozesse. Des Weiteren werden direkte *in situ* Assays zur Darstellung der antioxidativen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen vorgenommen. Den zu analysierenden Substanzen, PHT, ISB und PHO (Bisarylimine mit freier Iminogruppe), werden in den Untersuchungen nicht-antioxidative N-substituierte Strukturanaloga, AcPHT, CPRZ und PRZ, gegenübergestellt zur Darstellung des antioxidativen Protektionsmechanismus (siehe Abb. 1.11.).

### **3.1.1. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen die SH-SY5Y Zelllinie vor MPP<sup>+</sup>-Toxizität**

Akute Behandlung der SH-SY5Y Zellen mit MPP<sup>+</sup> (200 µM) führt innerhalb von 60 h zur nukleären Kondensation und Fragmentierung (siehe Abb. 3.1.1.A. mittlere Spalte) in etwa 70 % der Zellen, dargestellt mithilfe der Hoechst 33258 Färbung (siehe Abb. 3.1.1.A. und 3.1.2. (graue Balken)), sowie zu einer signifikanten Erhöhung der Plasmamembranpermeabilität (in etwa 40 bis 50 % der Zellen), analysiert mithilfe der PI-Aufnahme in Zellen (siehe Abb. 3.1.1.B. und 3.1.2. (schwarze Balken)). Der Verlust der Kern- und Plasmamembranintegrität implizieren den terminalen Verlust der Zellintegrität in MPP<sup>+</sup>-Behandlungen. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und 50 nM an Bisaryliminen ermöglichen in 70 bis 80 % der Zellen, die Kernintegrität zu bewahren, die Plasmamembran bleibt bei diesen Inkubationen impermeabel für den PI-Farbstoff. Die Effekte des MPP<sup>+</sup> werden durch 50 nM an Bisaryliminen fast vollständig verhindert, Zellen bleiben unter diesen Inkubationsbedingungen stabil (siehe Abb. 3.1.1. bis 3.1.3.). N-substituierte Strukturanaloga des Phenothiazins, AcPHT, CPRZ und PRZ, zeigen keine protektive Wirkung gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität (siehe Abb. 3.1.1. bis 3.1.3.).

MPP<sup>+</sup> führt in SH-SY5Y Zellen zur veränderten Zellmorphologie und übt einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation aus. Diese Effekte werden durch die untersuchten Substanzen nicht beeinflusst. Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO in Abwesenheit des MPP<sup>+</sup> zeigen keine negativen Effekte auf die Integrität des Zellkerns oder der Plasmamembran, auch morphologisch weisen diese Inkubationen keine Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf (siehe Abb. 3.1.2.). In diesen Behandlungsgruppen konnte kein verstärktes Proliferationsverhalten der Zellen beobachtet werden (bestätigt mit MTT-Test; nicht gezeigt).

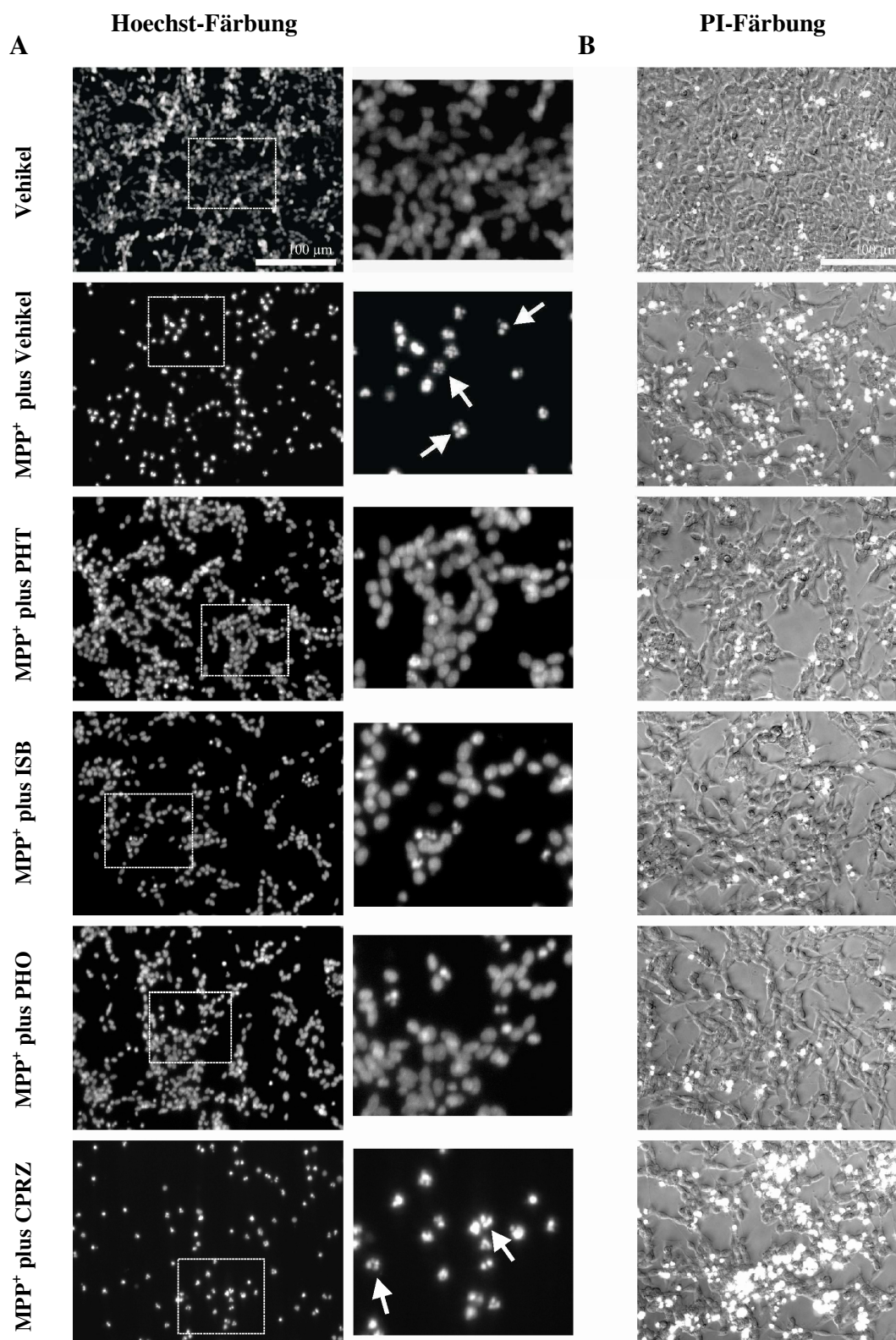
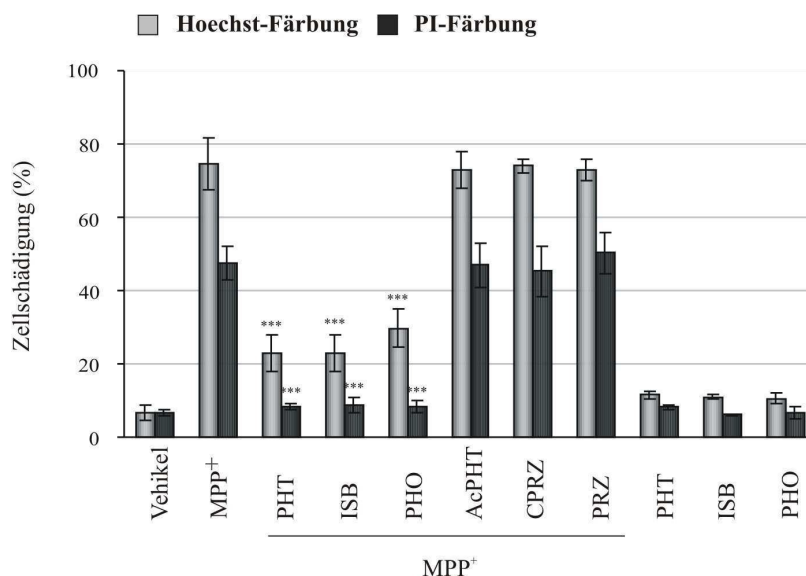


Abb. 3.1.1. Mikroskopische Aufnahmen der Hoechst- (A) und PI-Färbung (B) der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie.

SH-SY5Y Zellen wurden für 60 h mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ.

A) Darstellung repräsentativer Bilder der Hoechst-Färbung mit einer Vergrößerung der in der linken Spalte angegebenen Bereiche (mittleren Spalte). Pfeile weisen auf fragmentierte Zellkerne hin. B) Darstellung der Phasenkontrastaufnahmen mit leuchtendem PI-Signal. Aufnahmen erfolgten bei 200x Vergrößerung, der Maßstab definiert 100  $\mu$ m.

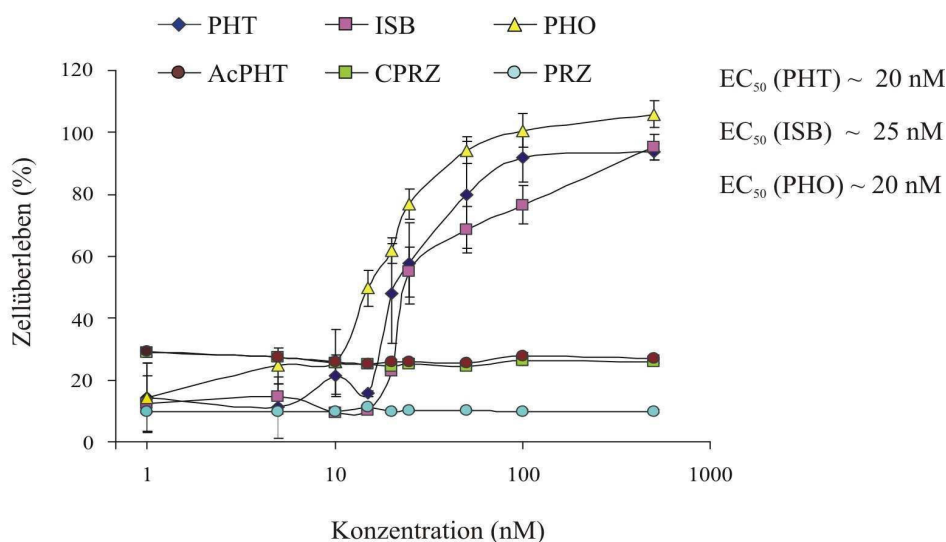


**Abb. 3.1.2. Auswertung der Hoechst- und PI-Färbung der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 60 h mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ. In der Hoechst- (graue Balken) und PI-Färbung (schwarze Balken) wurden sterbende Zellen (Zellschädigung) als stark leuchtende Kerne definiert und auf die Gesamtzellzahl der unbehandelten Zellen prozentuell normiert.

Die alleinige MPP<sup>+</sup>-Behandlung führt in 70 bzw. 50 % der Zellen zum positiven Hoechst- bzw. PI-Signal, Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT, ISB oder PHO ermöglichen eine signifikante Protektion (\*\*\*) gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und AcPHT, CPRZ oder PRZ zeigen keinen Unterschied im Zellüberleben im Vergleich zur alleinigen MPP<sup>+</sup>-Behandlung. Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO in Abwesenheit des MPP<sup>+</sup> weisen keine Toxizität auf. Die Auswertung beinhaltet drei separate Experimente mit der Auszählung von jeweils vier Gesichtsfeldern in Triplikat.

Die Analyse des Zellüberlebens mithilfe des MTT-Tests bestätigt die protektive Wirkung der Bisarylimine gegenüber MPP<sup>+</sup>-Toxizität. Nach 72 h MPP<sup>+</sup>-Behandlung kommt es zum Zellverlust in über 90 % der Zellen (siehe Abb. 3.1.3.). Bisarylimine mit freier Iminogruppe zeigen einen deutlichen Schutz gegenüber der Toxinwirkung bei Konzentrationen in niedrigen nanomolaren Bereichen. Ab 100 nM ist ein fast 100 %iges Zellüberleben zu detektieren mit halbmaximaler effektiver Konzentration (EC<sub>50</sub>-Werte) bei 20 nM für PHT und PHO und bei 25 nM für ISB. N-substituierte Substanzen zeigen keinen Schutz gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität (siehe Abb. 3.1.3.).



**Abb. 3.1.3.** Darstellung des MTT-Tests in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie mit Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Substanzen.

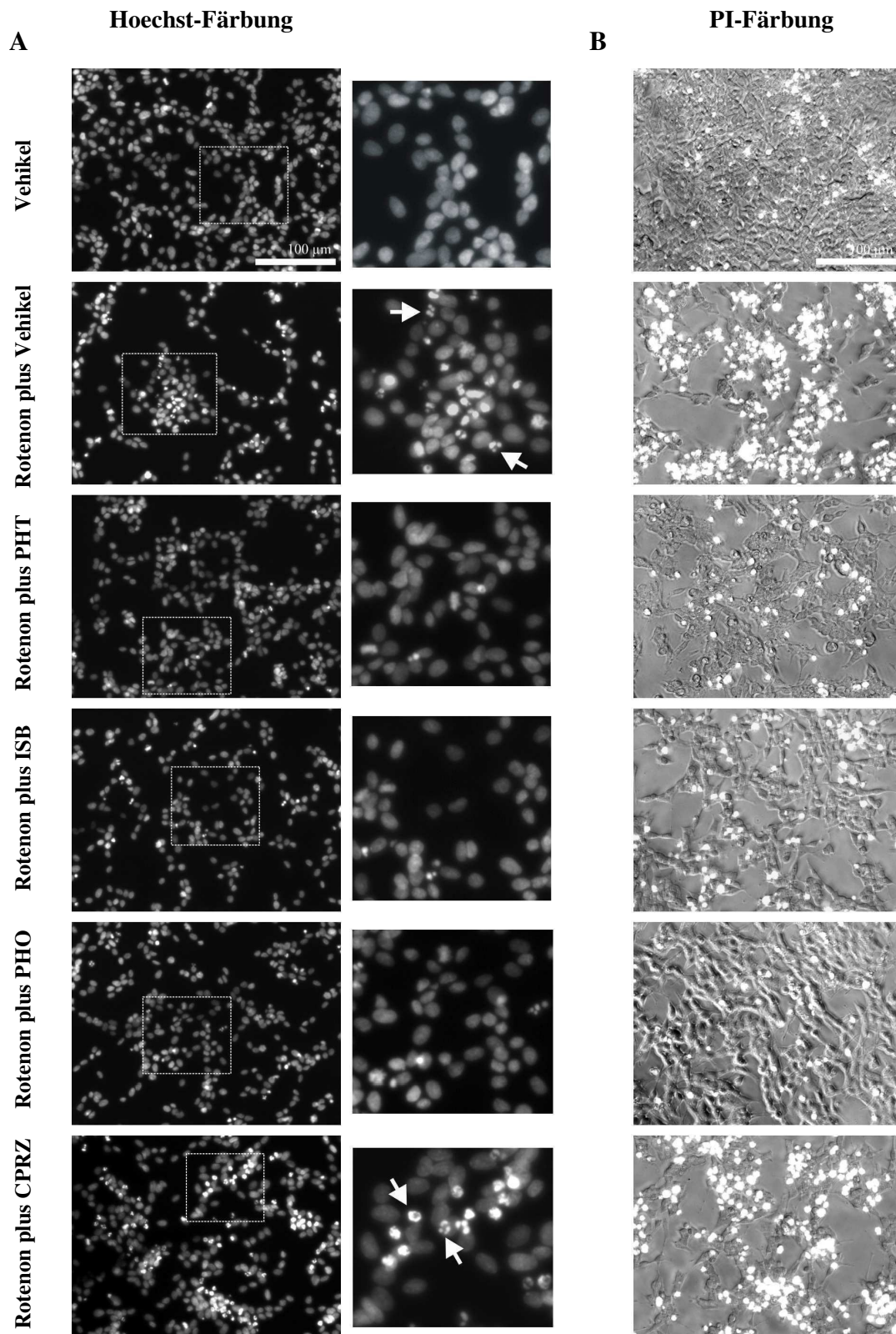
Zur Evaluierung des Zellüberlebens wurden SH-SY5Y Zellen mit 200 μM MPP<sup>+</sup> behandelt in Anwesenheit von PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ in einer Konzentration von 5 bis 500 nM und nach 72 h dem MTT-Test unterzogen. Die Auswertung beinhaltet drei unabhängige Experimente in Triplikat.

### 3.1.2. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen die SH-SY5Y Zelllinie vor Rotenon-Toxizität

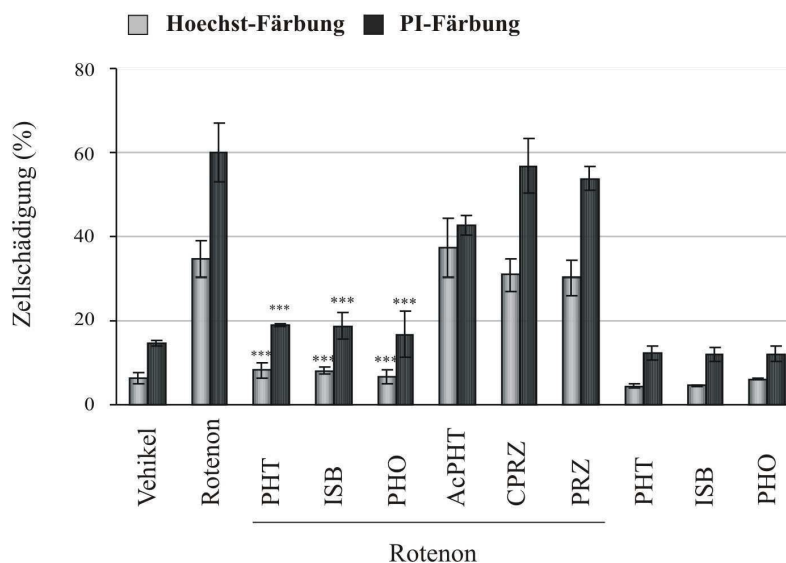
Nach Erfassung der neuroprotektiven Eigenschaften der Bisarylimine im MPP<sup>+</sup>-induzierten Modell der SH-SY5Y Zelllinie, wurden protektive Eigenschaften der Bisarylimine gegenüber Rotenon-Toxizität untersucht. Rotenon, als Komplex I Inhibitor und gut charakterisiertes Toxin der Parkinson-Modelle (siehe Abschnitt 1.8.2.), wurde in einer Konzentration von 150 nM in der SH-SY5Y Zelllinie eingesetzt zur Untersuchung der Integrität des Zellkerns und der Plasmamembran, sowie des Zellüberlebens.

Behandlung der SH-SY5Y Zellen mit akuter Konzentration an Rotenon (150 nM) führt innerhalb von 60 h zur nukleären Kondensation und Fragmentierung (siehe Abb. 3.1.4.A. mittlere Spalte) in etwa 35 % der Zellen, dargestellt mithilfe der Hoechst 33258 Färbung (siehe Abb. 3.1.4.A. und 3.1.5. (graue Balken)), sowie zu einer signifikanten Erhöhung der Plasmamembranpermeabilität (in etwa 60 % der Zellen), analysiert mithilfe der zellulären PI-Aufnahme (siehe Abb. 3.1.4.B. und 3.1.5. (schwarze Balken)). Wie bei MPP<sup>+</sup>, kommt es in Rotenon-Behandlungen zur Desintegration der zellulären Stabilität auf Niveau des Zellkerns und der Membran, welche sowohl die für die Apoptose charakteristische Fragmentierung des Chromatins, als auch die nekrotische Destabilisierung der Membran beinhaltet (siehe Abb. 3.14. A und B). Die Effekte des Rotenons auf die zelluläre Integrität werden mithilfe von 50 nM PHT, ISB und PHO fast vollständig verhindert (siehe Abb. 3.1.4. bis 3.1.6.), es kann sowohl eine Stabilisierung der Kernintegrität auf Niveau der unbehandelten Zellen, als auch ein signifikanter Schutz der Membranintegrität erreicht werden.





**Abb. 3.1.4.** Mikroskopische Aufnahmen der Hoechst- (A) und PI-Färbung (B) der Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie. SH-SY5Y Zellen wurden für 60 h mit 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ. A) Darstellung repräsentativer Bilder der Hoechst-Färbung mit einer Vergrößerung der in der linken Spalte angegebenen Bereiche (mittleren Spalte). Pfeile weisen auf fragmentierte Zellkerne hin. B) Darstellung der Phasenkontrastaufnahmen mit leuchtendem PI-Signal. Aufnahmen erfolgten bei 200x Vergrößerung, der Maßstab bezeichnet 100 µm.

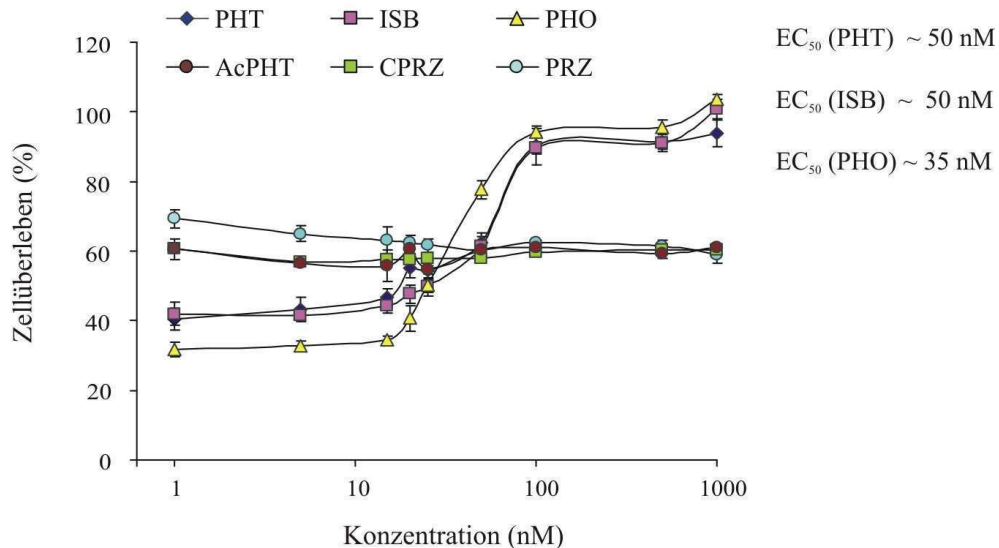


**Abb. 3.1.5. Auswertung der Hoechst- und PI-Färbung der Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 60 h mit 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ. In der Hoechst- (graue Balken) und PI-Färbung (schwarze Balken) wurden sterbende Zellen (Zellschädigung) als stark leuchtende Kerne definiert und auf die Gesamtzellzahl der unbehandelten Zellen prozentuell normiert.

Die alleinige Rotenon-Behandlung führt in 35 bzw. 60 % der Zellen zum positiven Hoechst- bzw. PI-Signal, Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT, ISB oder PHO ermöglichen eine signifikante Protektion ( $***p \leq 0,001$ ) gegenüber der Rotenon-Toxizität. Ko-Inkubationen mit Rotenon und AcPHT, CPRZ oder PRZ zeigen keinen Unterschied im Zellüberleben im Vergleich zur alleinigen Rotenon-Behandlung. Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO in Abwesenheit des Rotenons weisen keine Toxizität auf. Die Auswertung beinhaltet drei separate Experimente mit der Auszählung von jeweils vier Gesichtsfeldern in Triplikat.

Protektive Konzentrationen der Bisarylimine gegenüber Rotenon-induzierter Toxizität werden mithilfe des MTT-Tests ermittelt. Nach 72 h Rotenon-Behandlung kommt es in SH-SY5Y Zellen zu einem 40 bis 50 %igen Zellverlust (siehe Abb. 3.1.6.). Ab einer Konzentration von 100 nM reduzieren PHT, ISB und PHO den zytotoxischen Effekt des Rotenons auf das Niveau der unbehandelten Zellen. N-substituierte Strukturen zeigen keinen positiven Effekt auf das Zellüberleben bei Ko-Inkubation mit Rotenon. Die halbmaximale protektive Konzentration gegenüber der Rotenon-Toxizität liegt im MTT-Test für PHO bei 35 nM und bei etwa 50 nM für PHT und ISB (siehe Abb. 3.1.6.).



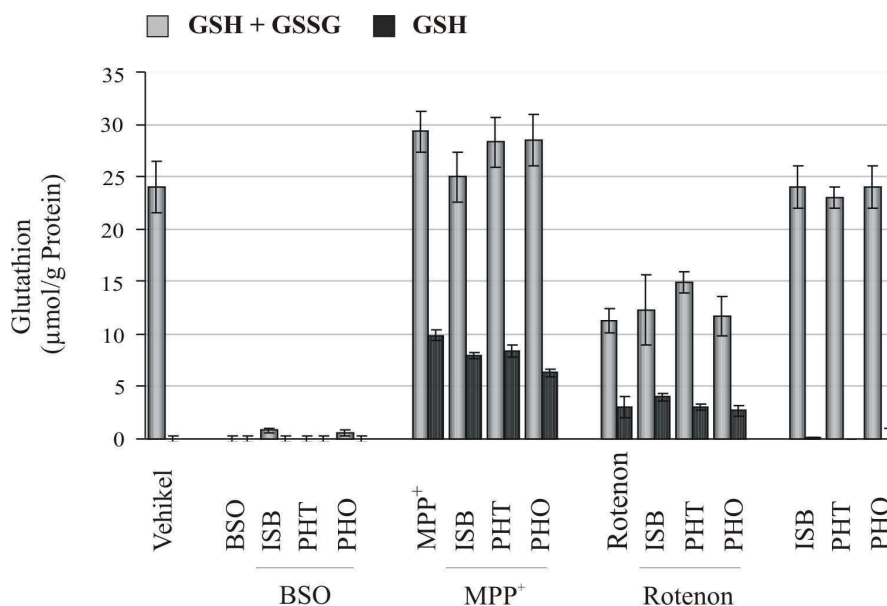
**Abb. 3.1.6. Darstellung des MTT-Tests in Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie mit Ermittlung der  $EC_{50}$ -Werte der untersuchten Substanzen.**

Zur Evaluierung des Zellüberlebens wurden SH-SY5Y Zellen mit 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ in einer Konzentration von 5 bis 1000 nM und nach 72 h dem MTT-Test unterzogen. Die Auswertung beinhaltet drei unabhängige Experimente in Triplikat.

### 3.1.3. Einfluss der Toxine und der untersuchten Substanzen auf das Glutathiongleichgewicht der SH-SY5Y Zellen

Glutathiondepletion und Verschiebungen seines Redoxzustandes sind an der Progression der PD beteiligt (siehe Abschnitt 1.2.; Jenner, 1993; Bharath et al., 2002). Zur Untersuchung des zelleigenen antioxidativen Abwehrsystems in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen wird das wichtigste zelleigene Antioxidans, Glutathion (siehe Abschnitt 1.3.2), auf seine Verfügbarkeit und seinen Redoxstatus hin untersucht. Als Kontrolle für die Glutathion-Messung wird Buthionin-Sulfoximin (BSO) als Toxin verwendet. BSO ist ein irreversibler Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthase ( $\gamma$ -GCS) (Griffith und Meister, 1979), bewirkt somit innerhalb zellulärer Systeme eine Herabsetzung des zelleigenen antioxidativen Schutzsystems durch Depletion des Glutathions (siehe Abschnitt 1.3.2.).

Die Evaluierung des Glutathionstatus in SH-SY5Y Zellen beinhaltet Behandlungsgruppen mit 200  $\mu$ M BSO, 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB oder PHO für 24, 48 und 72 h. Da zu den angegebenen Zeitpunkten vergleichbare Ergebnisse für das Glutathion gewonnen wurden, die untersuchten Toxine jedoch nach 48 h deutliche Effekte auf Zellen ausüben ohne detektierbare Anzeichen der finalen Zellschädigung (Zellkern- und Plasmamembranintegrität) zu zeigen, wird in Abbildung 3.1.7. der Glutathionstatus beispielhaft nach 48 h für die Behandlungsgruppen zusammengefasst.



**Abb. 3.1.7. Evaluierung des Glutathionstatus der SH-SY5Y Zelllinie bei Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB und PHO.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 48 h mit 200 µM BSO, 200 µM MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB oder PHO oder gesondert mit 50 nM PHT, ISB oder PHO in Abwesenheit der Toxine inkubiert und dem Glutathion-Assay unterzogen. Der Gesamtglutathionspiegel (GSH + GSSG), angegeben in Mikromol pro Gramm Protein, ist in grauen Balken illustriert, die oxidierte GSSG-Form hingegen in schwarzen Balken.

Alle BSO-Behandlungsgruppen erfahren eine massive Depletion des Glutathions. MPP<sup>+</sup> führt zu einer Induktion der oxidierten GSSG-Form und einem leichten Anstieg der Glutathionspiegel. Ko-Inkubationen mit Bisarylaminen zeigen einen ähnlichen Glutathionstatus. Rotenon-Behandlungsgruppen weisen eine Depletion des Glutathions und eine Zunahme der oxidierten GSSG-Form auf. Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO in Abwesenheit der Toxine zeigen keine Effekte auf den Glutathionstatus der Zellen. Der Redoxstatus des Glutathions zeigt sich in diesen Behandlungsgruppen wie in unbehandelten Zellen zur reduzierten GSH-Form hin verschoben. Die Auswertung beinhaltet drei unabhängige Experimente in Triplikate.

Unbehandelte Zellen zeigen im Verlauf der Inkubation keine großen Veränderungen im Glutathionspiegel (Mikromol pro Gramm Protein), in diesen Zellen liegt das Glutathion hauptsächlich in der reduzierten Form vor. Der Glutathionspiegel verbleibt konstant in Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO in Abwesenheit der Toxine, der Redoxstatus des Glutathions wird im reduzierten Zustand gehalten. Das Toxin BSO stellt einen Inhibitor der Glutathionsynthese dar. Innerhalb von 24 h ist eine vollständige Depletion des Glutathions in SH-SY5Y Zellen bei 200 µM BSO-Behandlung zu verzeichnen (nicht gezeigt). Diese Werte erfahren keine Veränderung in der zeitlichen Inkubation (siehe Abb. 3.1.7.; dargestellt für 48 h Behandlung). Ko-Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO zeigen keinen Einfluss auf die BSO-induzierte Glutathiondepletion. Nach 24 und 48 h MPP<sup>+</sup>-Behandlung ist ein Anstieg der zellulären Glutathionkonzentration in SH-SY5Y Zellen zu detektieren. Eine positive Wirkung auf zelluläre Glutathionwerte erfolgt zum Teil auch in Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT oder PHO (siehe Abb. 3.1.7.). In MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen verschiebt sich der Redoxstatus des Glutathions. In diesen Behandlungen liegen etwa 30 % des Gesamtglutathions in oxidiertem Zustand.

(GSSG) vor. Mit 50 nM an Bisaryliminen wird der Redoxzustand des Glutathions im Vergleich zur alleinigen Toxingabe nicht verändert. Rotenon führt zu einer signifikanten Depletion des Glutathions, die zelluläre Menge an Glutathion wird durch Ko-Inkubation mit den untersuchten Substanzen nicht signifikant verändert. Etwa 30 % des vorhandenen Glutathions der Zelle liegen auch nach Rotenon-Behandlungen in oxidiertem Status vor. Ko-Inkubationen mit Rotenon und 50 nM PHT, ISB oder PHO zeigen keine großen Unterschiede zur alleinigen Toxinbehandlung (siehe Abb. 3.1.7.). Alle Toxine tragen zur Erniedrigung der reduktiven Kapazität des Glutathions bei, entweder durch vollständige Glutathiondepletion, wie nach BSO-Behandlungen, oder durch Verschiebung des Redoxgleichgewichts des Glutathions zum oxidierten Status hin. Bisarylimine zeigen bei Ko-Inkubationen mit den drei Toxinen keine Effekte auf den Glutathionstatus der Zelle, die antioxidative Wirkung dieser Strukturen basiert nicht auf dem Redoxstatus des Glutathions.

Zur Analyse der Annahme, dass Bisarylimine das Zellüberleben bei kompletter Depletion des Glutathions ermöglichen können und somit gegenüber einer Dysregulation des Redoxgleichgewichts bei oxidativem Stress, Resistenz verschaffen, wurde das Zellüberleben in Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen und BSO als Toxin untersucht.

Zur Darstellung der effektiven Detoxifizierung eines induzierten oxidativen Ungleichgewichts mithilfe der Bisarylimine, wurden SH-SY5Y Zellen mit 200  $\mu$ M BSO und 50 nM an Bisaryliminen und N-substituierten Bisaryliminstrukturen behandelt. Innerhalb von 60 h kommt es in BSO behandelten SH-SY5Y Zellen zur Kondensation des Chromatins in 90 % der Zellen, dargestellt mithilfe der Hoechst 33258 Färbung (siehe Abb. 3.1.8.A. und 3.1.9. (graue Balken)) und in ähnlicher Anzahl an Zellen wird eine Permeabilität der Plasmamembran detektiert, analysiert mithilfe der PI-Färbung (siehe Abb. 3.1.8.B. und 3.1.9. (schwarze Balken)). 50 nM PHT, ISB oder PHO zeigen einen 90 %igen Schutz gegenüber der BSO-Toxizität, wohingegen nicht-antioxidative Strukturanaloga keine positive Wirkung auf das Zellüberleben haben (siehe Abb. 3.1.8. und 3.1.9.). Protektive Konzentrationen der Bisarylimine gegenüber BSO-induzierter Toxizität werden mithilfe des MTT-Tests ermittelt. Nach 72 h BSO-Behandlung kommt es in SH-SY5Y Zellen zu einem 90 %igen Zellverlust. PHT, ISB und PHO stellen das durch BSO gestörte Redoxgleichgewicht der Zellen wieder her und erlauben ab 50 nM ein Zellüberleben bis zu 90 % (siehe Abb. 3.1.10.). Der  $EC_{50}$ -Wert, welcher das Ausmaß der protektiven Wirksamkeit beschreibt, liegt bei 20 nM für PHT und PHO und bei 30 nM für ISB. Nicht-antioxidative Strukturanaloga zeigen keine protektiven Effekte.

Bisarylimine stabilisieren die Zellintegrität bei einer Komplex I Inhibition oder Glutathiondepletion ab nanomolaren Konzentrationen vollständig, protektive Effekte sind auf die freie Iminogruppe zurückzuführen. In den nachfolgenden Untersuchungen wird die antioxidative Wirkungsweise der Bisarylimine aufgezeigt und Effekte der Toxine auf zellulärer Ebene analysiert.



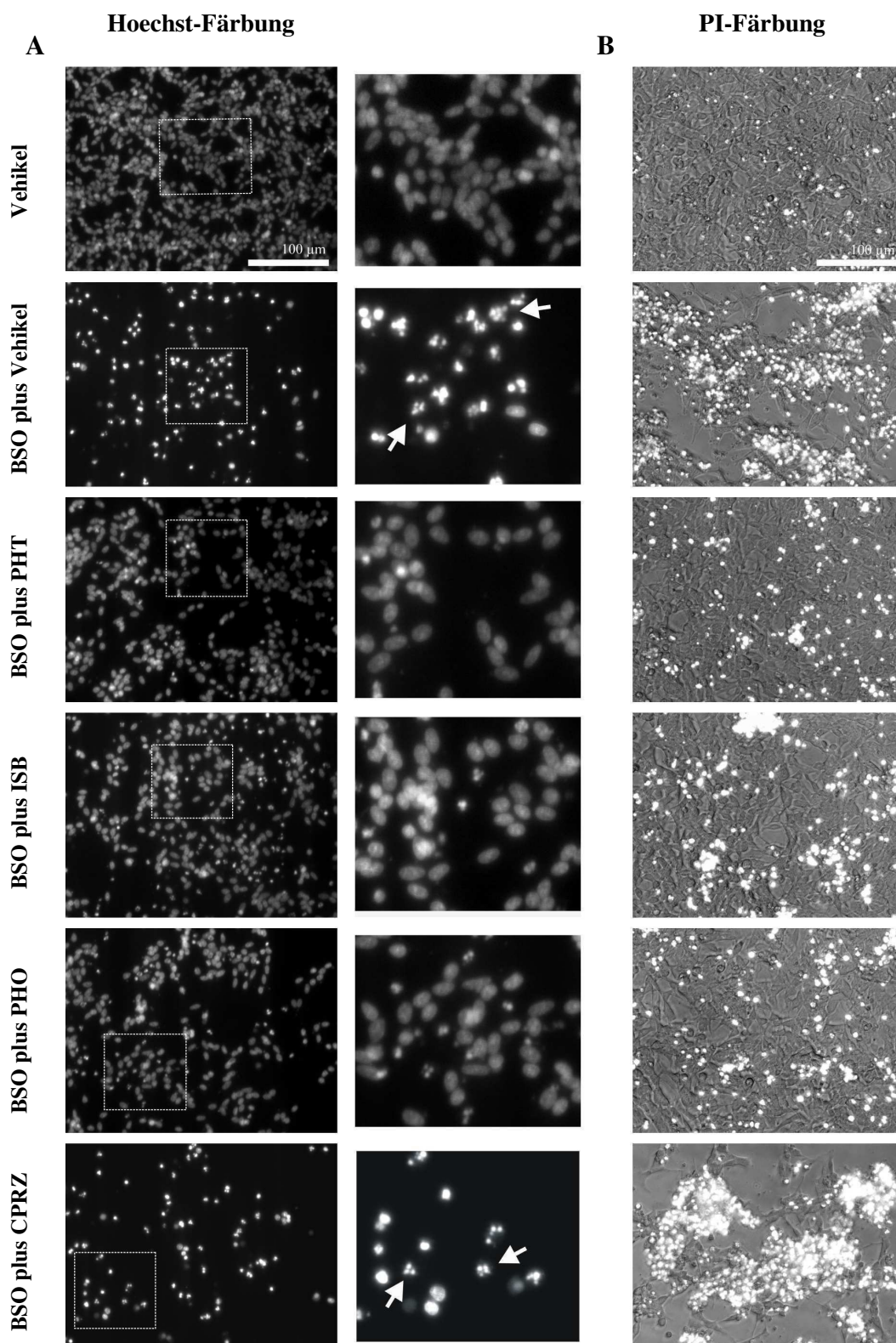
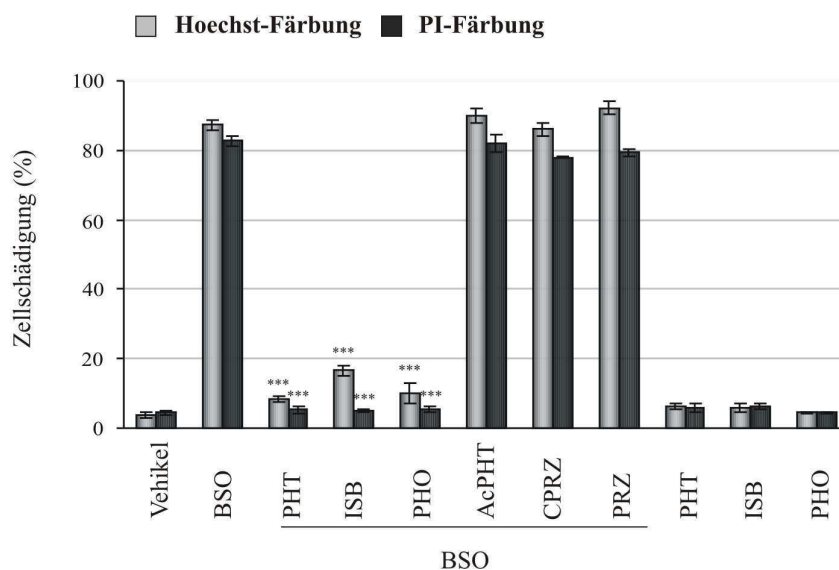


Abb. 3.1.8.

**Mikroskopische Aufnahmen der Hoechst- (A) und PI-Färbung (B) der BSO-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 60 h mit 200 μM BSO behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ.

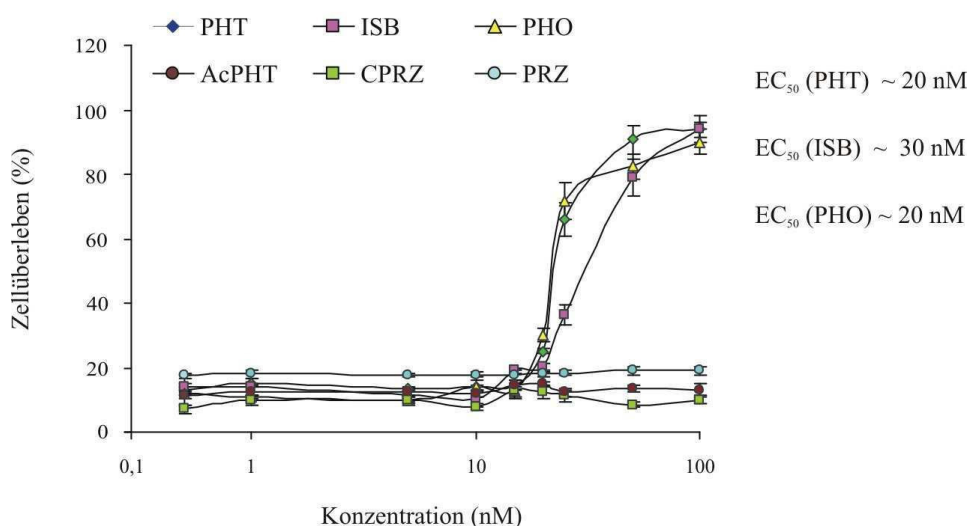
A) Darstellung repräsentativer Bilder der Hoechst-Färbung mit einer Vergrößerung der in der linken Spalte angegebenen Bereiche (mittleren Spalte). Pfeile weisen auf fragmentierte Zellkerne hin. B) Darstellung der Phasenkontrastaufnahmen mit leuchtendem PI-Signal. Aufnahmen erfolgten bei 200x Vergrößerung, der Maßstab beträgt 100 μm.



**Abb. 3.1.9. Auswertung der Hoechst- und PI-Färbung der BSO-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 60 h mit 200  $\mu$ M BSO behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ. In der Hoechst- (graue Balken) und PI-Färbung (schwarze Balken) wurden sterbende Zellen (Zellschädigung) als stark leuchtende Kerne definiert und auf die Gesamtzellzahl prozentuell normiert.

Die alleinige BSO-Behandlung führt in 80 % der Zellen zum positiven Hoechst- und PI-Signal, Ko-Inkubationen mit BSO und PHT, ISB oder PHO ermöglichen eine signifikante Protektion ( $***p \leq 0,001$ ) gegenüber der BSO-Toxizität. Ko-Inkubationen mit BSO und AcPHT, CPRZ oder PRZ zeigen keine erhöhte Überlebensrate im Vergleich zur BSO-Behandlung. Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO in Abwesenheit des BSO weisen keine Toxizität auf. Die Auswertung beinhaltet drei separate Experimente mit der Auszählung von jeweils vier Gesichtsfeldern in Triplikat.

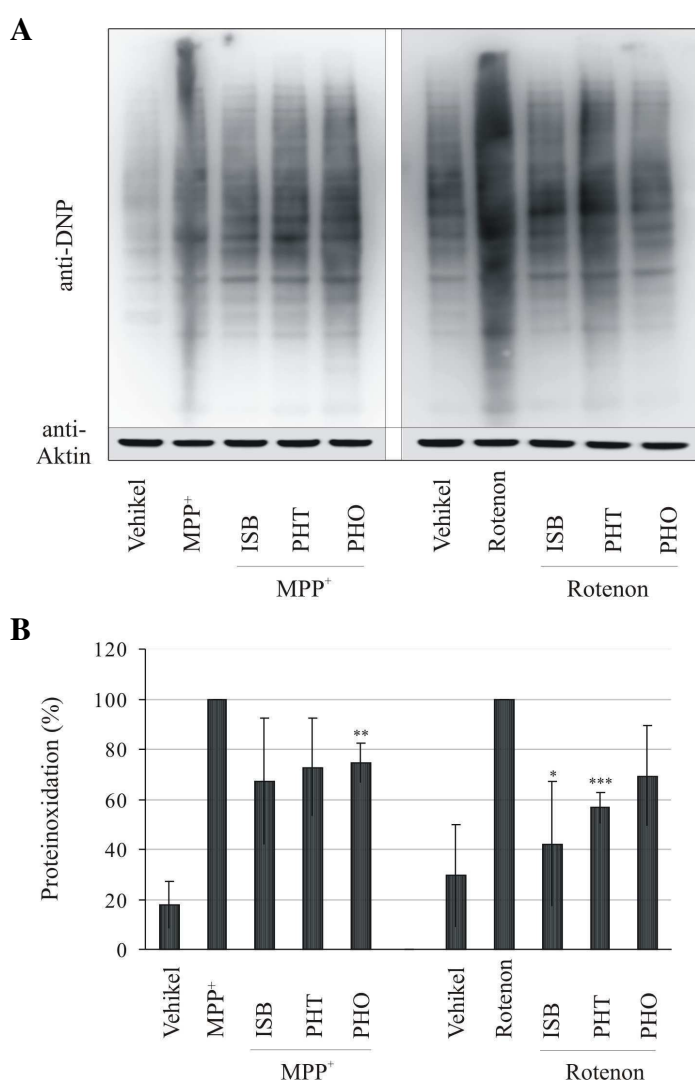


**Abb. 3.1.10. Darstellung des MTT-Tests in BSO-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie mit Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Substanzen.**

Zur Evaluierung des Zellüberlebens wurden SH-SY5Y Zellen mit 200  $\mu$ M BSO behandelt in Anwesenheit von PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ in einer Konzentration von 1 bis 100 nM. Die Auswertung beinhaltet fünf separate Experimente in Triplikat.

### 3.1.4. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen SH-SY5Y Zellen vor oxidativen Modifikationen zellulärer Komponenten

Zytoprotektive Eigenschaften der Bisarylimine wurden in vorangegangenen Abschnitten untersucht. Zur Analyse der prooxidativen Wirkung der beiden Komplex I Inhibitoren und der antioxidativen Eigenschaften der Bisarylimine wurde der zelluläre Redoxstatus zu einem späten Stadium der Toxinwirkung (60 h) anhand oxidativ modifizierter Proteine untersucht. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können bei einer uneffizienten Detoxifizierungsantwort der Zelle oxidative Modifikationen an zellulären Komponenten einführen (siehe Abschnitt 1.3.3.). Eine prominente Form der Proteinoxidation stellen Carbonyle dar (Berlett und Stadtman, 1997).



**Abb. 3.1.11.**

**Darstellung der Proteincarbonyle in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zelllinie nach 60 h.**

SH-SY5Y Zellen wurden mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB oder PHO für 60 h behandelt. Lysierte Zellen wurden im Immunoblot auf DNP-Immunoaktivität hin untersucht. A) Darstellung eines repräsentativen anti-DNP-Blots. B) Evaluierung des DNP-Signals in den Behandlungsgruppen.

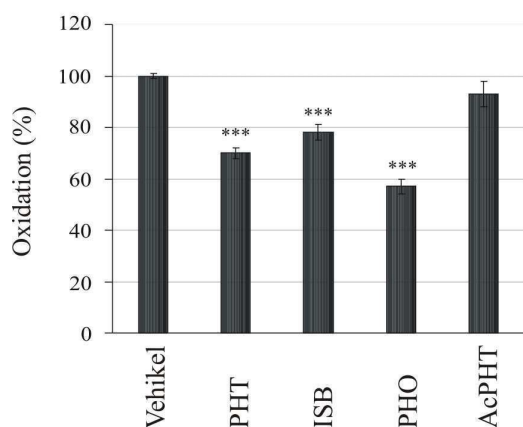
Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> bzw. Rotenon und 50 nM PHT, ISB oder PHO zeigen eine verringerte Menge an oxidativ modifizierten Proteinen, welche für die Ko-Inkubation MPP<sup>+</sup> und PHO (\*\* $p \leq 0,01$ ), Rotenon und ISB (\* $p \leq 0,05$ ) sowie Rotenon und PHT (\*\*\*) signifikant im Vergleich zur Toxinbehandlung verringert ist. Die Auswertung erfolgte mit der Aida Software und vereint drei unabhängige Experimente.

Zur Darstellung der antioxidativen Wirkung der Bisarylimine wurden SH-SY5Y Zellen nach 60 h Inkubation mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 150 nM Rotenon auf oxidativ eingeführte Carbonylverbindungen hin untersucht. Carbonylspezies wurden mithilfe des Dinitrophenyl-Antikörpers (anti-DNP) auf Immunoblot-Ebene detektiert. Behandlung mit MPP<sup>+</sup> und Rotenon erhöht deutlich die



Carbonylbildung in Zellen (siehe Abb. 3.1.11.) und zeigt, dass beide Komplex I Inhibitoren prooxidativ in Zellen wirken. Bis nach 60 h Toxinwirkung ermöglicht eine Einzelgabe an 50 nM an PHT, ISB oder PHO eine Teils signifikante Stabilisierung des Redoxstatus innerhalb der Zellen. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Mehrzahl der Toxin-behandelten Zellen in einem Stadium der Zelleliminierung oder des Integritätsverlustes (siehe Abb. 3.1.2. und 3.1.5.)

Zur direkten Analyse der antioxidativen Wirksamkeit der Bisarylimine bei einer schnellen Induktion der ROS-Bildung, wurden SH-SY5Y Zellen unter Luftsauerstoff-induzierter ROS-Freisetzung für 5 h inkubiert in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT. Die spontane ROS-Bildung wurde mithilfe des DCFA-Farbstoffes identifiziert, welcher durch Reaktion mit ROS fluoresziert. 50 nM PHT, ISB und PHO ermöglichen eine signifikante Depletion der induzierten Oxidationsreaktionen (siehe Abb. 3.1.12.). Die Inkubation mit dem nicht-antioxidativen Strukturanalogen, AcPHT, zeigt keine erniedrigte ROS-Bildungsrate.



**Abb. 3.1.12.**

**Darstellung der ROS-Detoxifizierung mithilfe von 50 nM PHT, ISB und PHO im DCFA-Assay.**

Zur direkten ROS-Quantifizierung wurden SH-SY5Y Zellen unter oxidativen Bedingungen in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT inkubiert und nach 5 h dem DCFA-Test unterzogen. Die durch ROS induzierte Farbstoffumsetzung wurde im 485/535 nm Exzitations-/Emissionsfilter detektiert und auf die alleinige Vehikel-Behandlung prozentuell normiert.

Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO ermöglichen eine signifikante Depletion der Oxidationsreaktionen (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Die Auswertung vereinigt drei unabhängige Experimente.

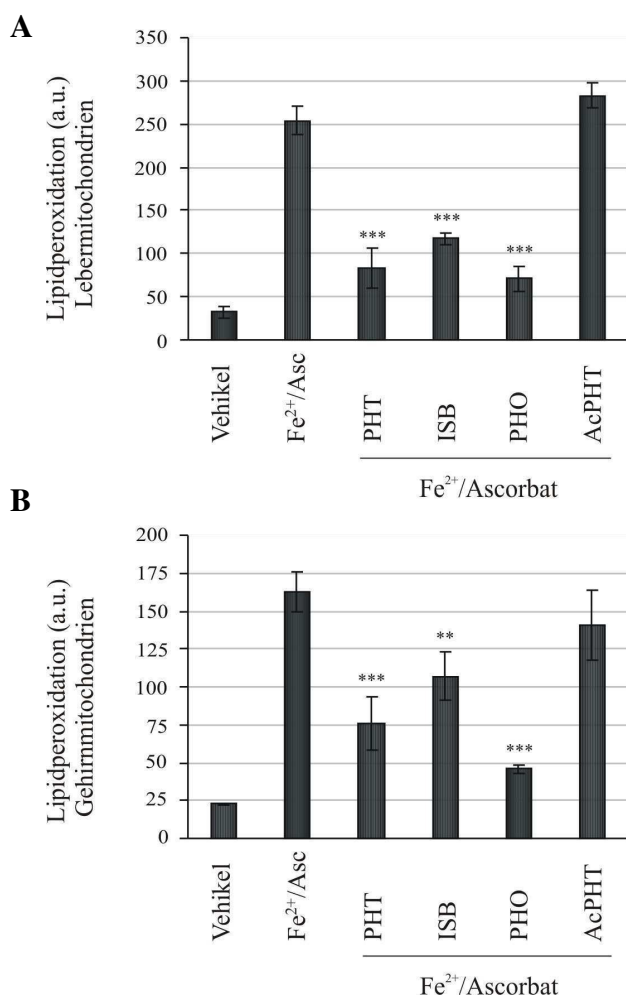
### 3.1.5. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin zeigen eindeutige antioxidative Wirkung in direkten *in situ* Assays zur Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

Lipide stellen ein sehr wichtiges Angriffsziel der Oxidationsreaktionen bei einer Zunahme des oxidativen Stresses dar. Um die antioxidative Effektivität von 50 nM PHT, ISB und PHO zu untersuchen, wird eine  $Fe^{2+}$ /Ascorbat-induzierte Lipidperoxidation in Anwesenheit der untersuchten Substanzen in zwei direkten *in situ* Assays evaluiert.

Im ersten Assay werden isolierte Mitochondrien der Leber (siehe Abb. 3.1.13.A.) bzw. des Gehirns (siehe Abb. 3.1.13.B.) in einer oxidativen Umgebung, vermittelt durch  $Fe^{2+}$ /Ascorbat-induzierte Peroxidationsreaktionen, für 10 min inkubiert in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT. Als Bezugskontrolle werden Mitochondrien ohne  $Fe^{2+}$ /Ascorbat parallel inkubiert. Ein

prominentes Produkt der Lipidperoxidation stellt das Malondialdehyd (MDA) dar. Die Reaktion des entstehenden MDA mit dem zugeführten Farbstoff Thiobarbitursäure (TBA) führt zur Bildung eines fluorimetrisch detektierbaren Komplexes. Das Ausmaß der Peroxidationsreaktionen wird in den Behandlungsgruppen als Fluoreszenzintensität des entstehenden MDA-TBA-Komplexes (TBARS-Signal) dargestellt (siehe Abb. 3.1.13. A und B).

Eine 10minütige  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat-Behandlung führt zu einer starken Zunahme des TBARS-Signals in Leber- (siehe Abb. 3.1.13.A.) und Gehirnzellmitochondrien (siehe Abb. 3.1.13.B.). 50 nM PHT, ISB und PHO können bis zu 2/3 der Peroxidationsreaktionen abfangen, 50 nM AcPHT zeigt keine ROS-Detoxifizierungsaktivität.



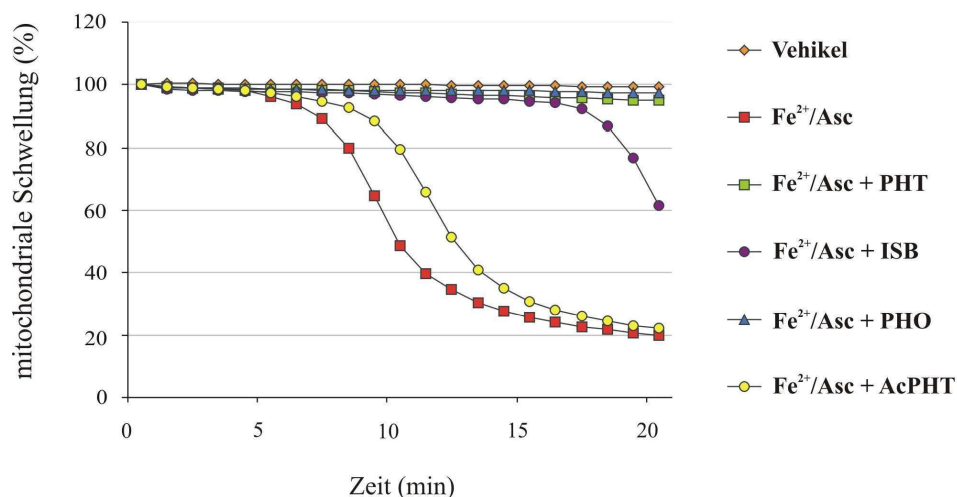
**Abb. 3.1.13.** Darstellung der Peroxidationsdetoxifizierungskapazität von PHT, ISB und PHO in Leber- und Gehirmitochondrien ermittelt mithilfe des TBARS-Assays.

Isolierte Leber- (A) bzw. Gehirmitochondrien (B) wurden mit  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT inkubiert und die induzierte Peroxidationsreaktion nach 10 min abgestoppt. Als Bezugskontrolle wurden Zellen ohne Zuführung des  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat-Peroxidationsinduktors inkubiert. Nach 20minütiger Derivatisierung mit TBA wurde die Intensität des entstehenden MDA-TBA-Komplexes im 531/572 nm Exzitations-/Emissionsfilter quantifiziert. A) Darstellung der TBARS in Lebermitochondrien; B) Darstellung der TBARS in Gehirmitochondrien.

50 nM PHT, ISB und PHO detoxifizieren signifikant die induzierten Peroxidationsreaktionen der mitochondrialen Lipide (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  oder \*\*)  $p \leq 0,01$ , AcPHT zeigt keinen protektiven Einfluss auf die Entstehung von Peroxidationsprodukten. Die Auswertung vereinigt drei unabhängige Experimente. a.u. – arbitrary units (willkürliche Skalierung);  $\text{Fe}^{2+}/\text{Asc}$  –  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat.

Des Weiteren wird die  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat-induzierte Peroxidation in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT durch Detektierung der mitochondrialen Schwellung evaluiert. Lipidperoxidationen an mitochondrialer Membran führen zum Anschwellen der Mitochondrien und hierdurch zum Verlust der Trübung der Mitochondriensuspension bei 520 nm. In Abbildung 3.1.14. wird der Verlust der Trübung der Lebermitochondriensuspensionen in den Behandlungsgruppen dargestellt.

Nach 10 min der alleinigen  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat-Inkubation kommt es zu einem signifikanten Verlust der Trübung der Mitochondriensuspension und somit einer starken Peroxidation der mitochondrialen Lipide. 50 nM PHT, ISB und PHO detoxifizieren in der angegebenen Zeit fast vollständig die stark oxidativen Bedingungen, welche durch  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat induziert werden, und verhindern eine mitochondriale Desintegration (siehe Abb. 3.1.14.). 50 nM AcPHT weist keinen antioxidativen Effekt auf (siehe Abb. 3.1.14.).



**Abb. 3.1.14. Darstellung der Peroxidationsdetoxifizierungskapazität von PHT, ISB und PHO in Lebermitochondrien ermittelt mithilfe der Quantifizierung der mitochondrialen Schwellung.**

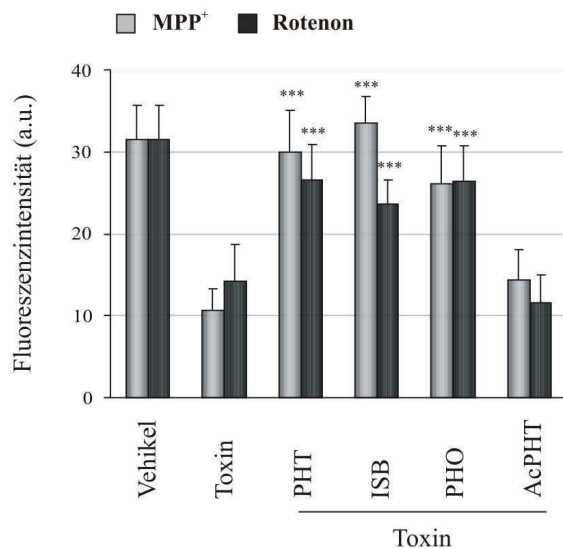
Isolierte Lebermitochondrien wurden mit  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT inkubiert, als Bezugskontrolle wurden Mitochondrien ohne Zuführung des  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat-Peroxidationsinduktors inkubiert und photometrisch bei 520 nm für 20 min untersucht.

Die  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat-Behandlung führt innerhalb von 10 min zu einem starken Verlust der Trübung der Mitochondriensuspension. Behandlung mit 50 nM PHT, ISB oder PHO hemmt diesen Prozess, die AcPHT-Behandlung weist vergleichbar schnell propagierende Peroxidationsreaktionen auf, wie die alleinige  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbat-Behandlung. Die Auswertung vereinigt drei unabhängige Experimente.  $\text{Fe}^{2+}/\text{Asc} - \text{Fe}^{2+}/\text{Ascorbat}$ .

### 3.1.6. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin erhalten die Integrität der Mitochondrien bei einer Komplex I Inhibition in SH-SY5Y Zellen

Das primäre Angriffsziel der beiden Komplex I Inhibitoren,  $\text{MPP}^+$  und Rotenon, stellen Mitochondrien dar. Eine Komplex I Inhibition führt zur energetischen Depletion, vermehrter ROS-Generierung und einer Absenkung des mitochondrialen Potentials (siehe Abschnitt 1.3.1. und 4.1.2.). Wie oben dargestellt, wird mithilfe der Bisarylimine die Zellintegrität bei akuter Toxinbehandlung durch Stabilisierung der oxidativen Resistenz beibehalten. Zur Untersuchung der protektiven Wirkung der Bisarylimine wird die Integrität der Mitochondrien in  $\text{MPP}^+$ - und Rotenon-Behandlungsgruppen nach 24 und 48 h analysiert. Diese Analyse kann verdeutlichen, ob Bisarylimine am Ursprung der Parkinson-Toxinwirkung eingreifen und zur Stabilisierung mitochondrialer Integrität gegenüber einer Komplex I Inhibition und vermehrter ROS-Emission beitragen.

Die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials in SH-SY5Y Zellen nach 24 und 48 h in MPP<sup>+</sup> (200  $\mu$ M)- und Rotenon (150 nM)-Behandlungsgruppen erfolgt mithilfe der MitoTracker Färbung. MitoTracker werden in gesunden Mitochondrien durch ein hohes Membranpotential verstärkt akkumulieren, im Vergleich zu Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential (erniedrigte Intensität).



**Abb. 3.1.15.**

**Evaluierung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe der Quantifizierung der MitoTracker-Fluoreszenzintensität in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen nach 24 h.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 24 h mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> (graue Balken) oder 150 nM Rotenon (schwarze Balken) behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT. Nach der Färbung mit MitoTracker Red wurden die Zellen mit konstanter Belichtungszeit im 535/610 nm Exzitations-/Emissionsfilter bei 400x Vergrößerung aufgenommen und die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen mit der MetaVue Software bestimmt.

In Toxin-behandelten Zellen oder Ko-Inkubationen mit Toxinen und AcPHT kommt es zu einer starken Abnahme des mitochondrial akkumulierten MitoTracker Red. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO zeigen eine signifikante Erhöhung des MitoTracker Red-Signals (\*\*\*) im Vergleich zu Toxin-behandelten Zellen. Die Auswertung berücksichtigt fünf repräsentative Zellen in drei unabhängigen Experimenten. a.u. – arbitrary units (willkürliche Skalierung).

Innerhalb von 24 h erfolgt eine drastische Absenkung des mitochondrialen Membranpotentials in Toxin-behandelten Zellen (auf etwa die Hälfte bis zu einem Drittel des Membranpotentials der unbehandelten Zellen; siehe Abb. 3.1.15. und 3.1.16.) und eine weitere leichte Abnahme des Membranpotentials kann nach 48 h Toxinbehandlung detektiert werden (siehe Abb. 3.1.17. und 3.1.18.). Des Weiteren ist die Morphologie der Toxin-behandelten Mitochondrien nach 24 und 48 h verändert (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.). Die Mitochondrien erscheinen fragmentiert, angeschwollen oder bilden rundliche MitoTracker positive Aggregate aus, v.a. bei Behandlung mit Rotenon (siehe Abb. 3.1.17. und 3.1.18.). Bisarylimine mit freier Iminogruppe ermöglichen eine Stabilisierung des mitochondrialen Potentials bei einer Komplex I Inhibition, mit einer signifikanten Potentialerhöhung gegenüber der alleinigen Toxinbehandlung nach 24 und 48 h (etwa 80 % des Signals unbehandelter Zellen; siehe Abb. 3.1.15. bis 3.1.18.). Auch die mitochondriale Morphologie erscheint verändert sowohl zu unbehandelten als auch zu Toxin-behandelten Zellen. Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen und Toxinen induzieren eine Fusion der Mitochondrien (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.). Das N-substituierte AcPHT weist keine Potential-stabilisierenden Effekte auf und Mitochondrien erscheinen in diesen Ko-Inkubationen fragmentiert, angeschwollen und teilweise auch in größeren Strukturen aggregiert (siehe Abb. 3.1.16.).

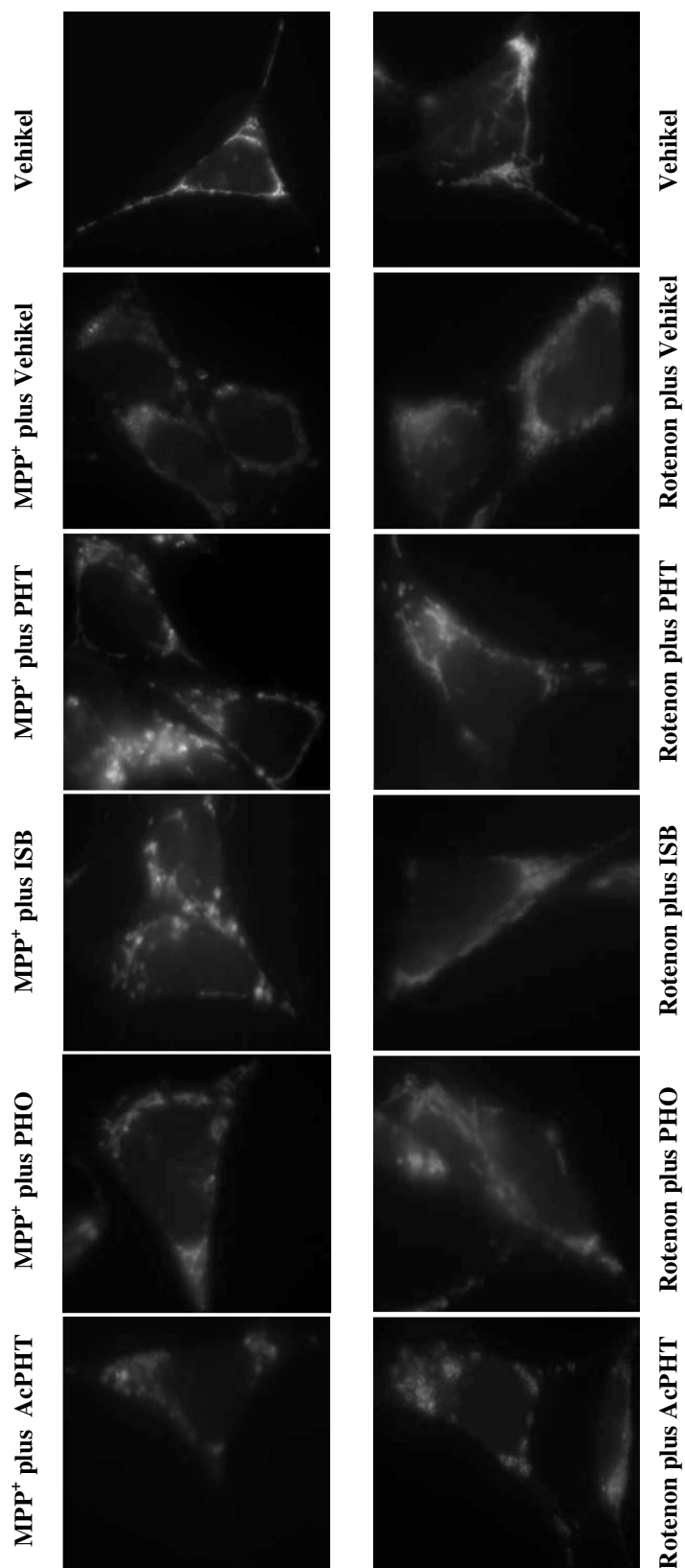
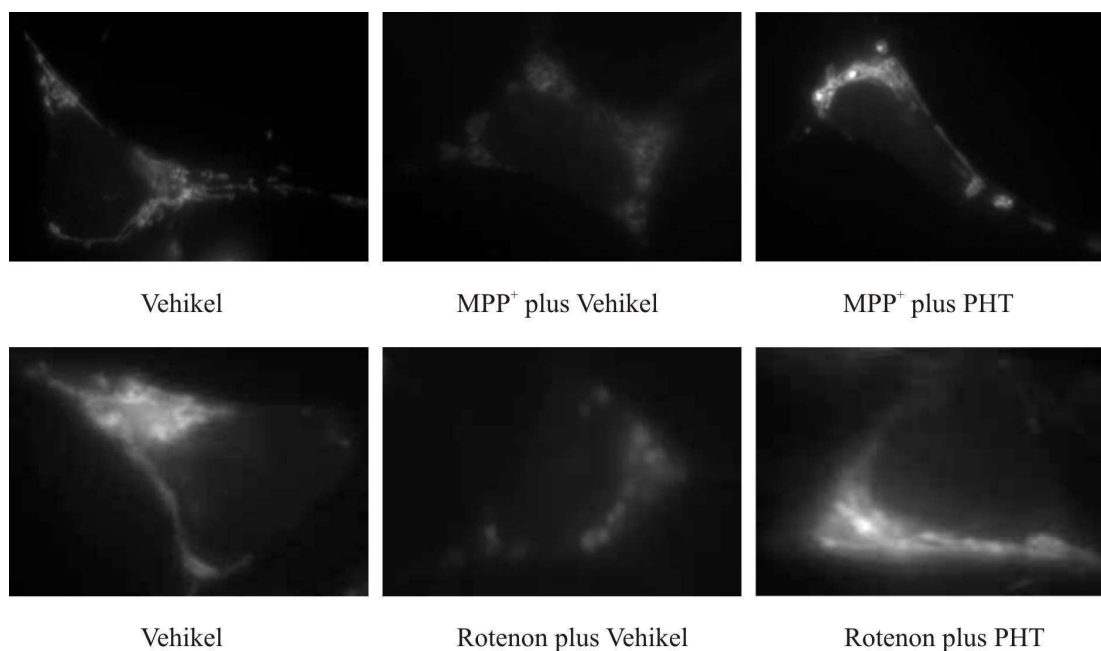


Abb. 3.1.16.

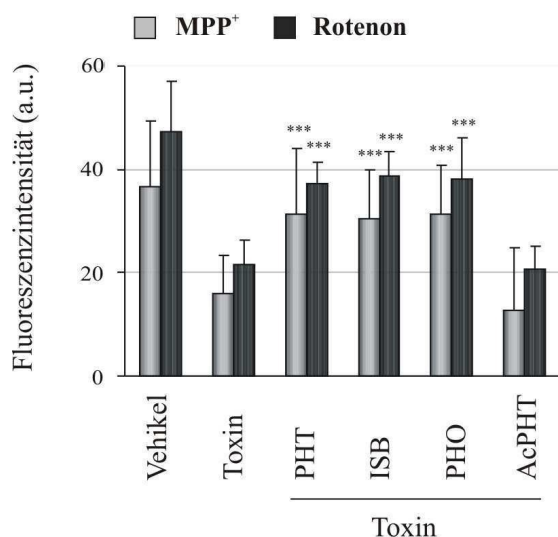
**Darstellung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe des MitoTracker Red in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen nach 24 h.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 24 h mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT. Gezeigt sind Ausschnitte aus Aufnahmen mit 400x Vergrößerung. Die Belichtungszeit ist in allen Aufnahmen identisch.



**Abb. 3.1.17.** Darstellung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe des MitoTracker Red in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen nach 48 h.

SH-SY5Y Zellen wurden für 48 h mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte aus Aufnahmen bei 400x Vergrößerung. Repräsentativ für Inkubationen mit Toxinen und Bisarylaminen sind Inkubationen mit Toxinen und PHT dargestellt. Die Belichtungszeit ist in den Behandlungsgruppen identisch.



**Abb. 3.1.18.**

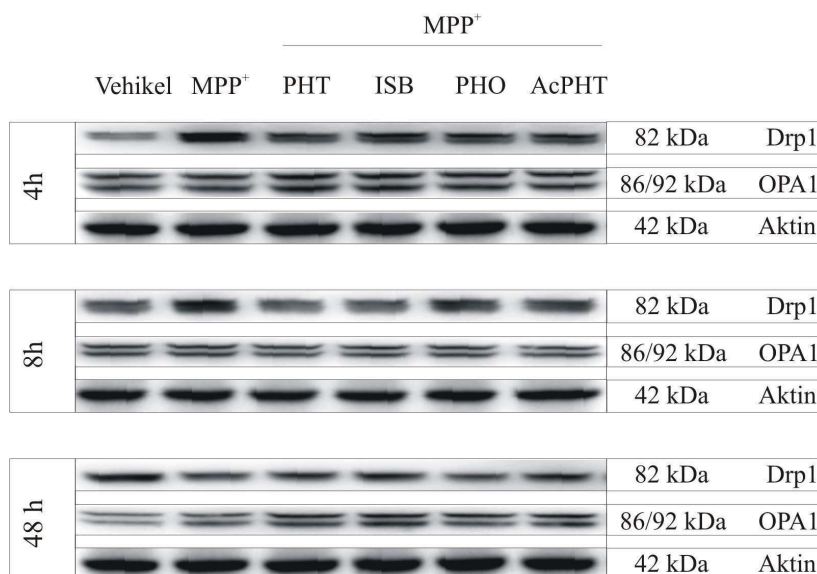
**Evaluierung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe der MitoTracker-Fluoreszenzintensität in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen nach 48 h.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 48 h mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT. Nach Färbung mit MitoTracker Red wurden die Zellen mit konstanter Belichtungszeit im 535/610 nm Exzitations-/Emissionsfilter bei 400x Vergrößerung aufgenommen und die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen mit der MetaVue Software bestimmt.

In Toxin-behandelten Zellen oder Ko-Inkubationen mit Toxinen und AcPHT kommt es zu einer starken Abnahme des mitochondrial akkumulierten MitoTracker Red. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO zeigen eine signifikante Erhöhung des MitoTracker Red-Signals (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Die Auswertung berücksichtigt zehn repräsentative Zellen in drei unabhängigen Experimenten. a.u. – arbitrary units (willkürliche Skalierung).

Als Antwort auf die Komplex I Inhibition wird das Membranpotential der Mitochondrien stark herabgesenkt und es erfolgt eine morphologische Umstrukturierung des mitochondrialen Netzwerkes. Um Effekte der Toxine auf mitochondriale Regulationsmechanismen zu untersuchen, wurden nach kurzer (4 und 8 h) und längerer (dargestellt für 48 h) Toxineinwirkung mitochondriale Fusions- und Fragmentierungsprozesse auf Proteinebene untersucht. Drp1 (dynamin-related protein 1) ist für die

Fragmentierung der Mitochondrien zuständig, OPA1 (optic atrophy 1) spielt eine Rolle in mitochondrialen Fusionsprozessen (siehe Abschnitt 4.1.2.).



**Abb. 3.1.19. Darstellung der Drp1 und OPA1 Proteinspiegel im Verlauf der Toxinbehandlung in SH-SY5Y Zellen.**

Mithilfe der Immunanalyse wurden Drp1- und OPA1- Proteinspiegel der mitochondrialen Teilungs-/Fusionsmaschinerie in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen nach 4, 8 und 48 h untersucht. SH-SY5Y Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB oder PHO. Das Drp1-Signal wird bei 82 kDa detektiert, OPA1 besitzt eine 86 und eine 92 kDa schwere Bande, Aktin dient als Ladekontrolle (42 kDa).

Nach 4 und 8 h Toxin-Inkubation kommt es zur Hochregulation des Drp1-Signals. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT, ISB oder PHO zeigen nur leicht erhöhte Werte an Drp1 nach 4 und 8 h, hingegen kommt es zur leichten Erhöhung des OPA1-Proteins nach 4 h Ko-Inkubation mit MPP<sup>+</sup> und PHT, ISB und PHO. Nach 48 h sind die Proteinspiegel des Drp1 in allen Toxinbehandlungen erniedrigt, OPA1 zeigt sich in Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT, ISB oder PHO erhöht.

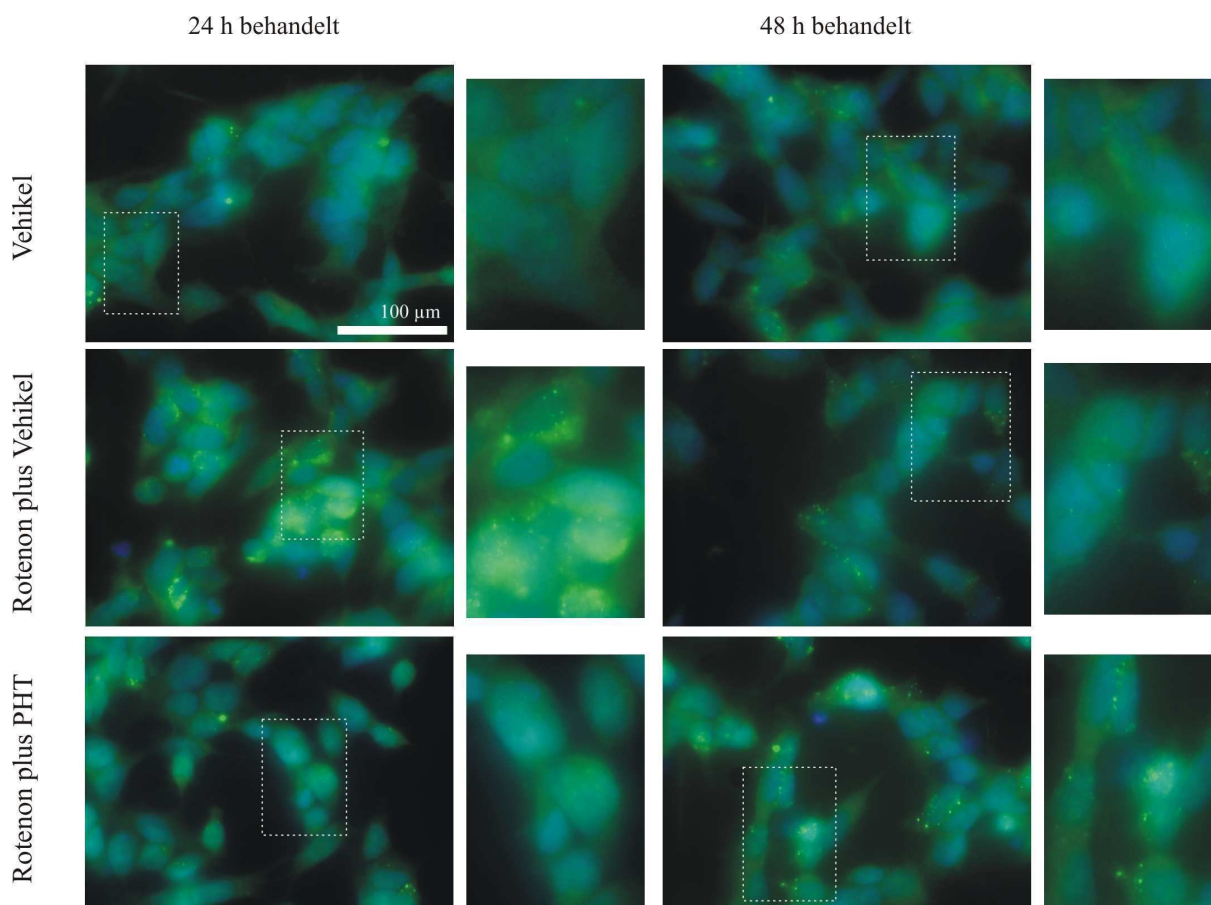
Nach 4 bis 8 h kommt es zu einer Hochregulation des Drp1-Proteins in Toxin-behandelten SH-SY5Y Zellen (dargestellt für 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>; Abb. 3.1.19.). Proteinspiegel des OPA1 zeigen sich durch die Toxingabe nicht stark beeinflusst, nur eine leichte Abnahme des OPA1 ist nach 4 h festzustellen. Ko-Inkubation mit Toxinen und Bisaryliminen zeigen nach 4 h nur eine leichte Hochregulation der Drp1-Proteinspiegel, nach 8 h Behandlung wird das Drp1-Protein auf Niveau der unbehandelten Zellen heruntergesenkt (siehe Abb. 3.1.19.). Parallel mit dem leichten Anstieg der Drp1-Proteinmenge bei Ko-Inkubation mit Bisaryliminen, wird nach 4 h das OPA1-Protein im Vergleich zu unbehandelten und Toxin-behandelten Zellen hochreguliert (siehe Abb. 3.1.19.), nach 8 h sinkt parallel zum Drp1-Signal auch das OPA1-Protein auf das Kontrollniveau. So kann dargestellt werden, dass die Fusions-/Fragmentierungsmaschinerie der Mitochondrien in den frühen Phasen der Toxineinwirkung starken Regulationsprozessen unterliegt und dass die Ko-Inkubation mit Bisaryliminen die Toxin-induzierten Prozesse umkehrt.



Die Proteinspiegel der beiden Fusions-/Fragmentierungsregulatoren wurden nach 24 und 48 h Behandlung (dargestellt für 48 h Behandlung; siehe Abb. 3.1.19.) parallel zur mitochondrialen Morphologie (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.) untersucht. Nach längerer Toxinbehandlung kommt es zur Abnahme des Drp1-Signals und einer leichten Zunahme des OPA1-Proteins. Morphologisch erscheinen Mitochondrien in diesen Behandlungsgruppen stark fragmentiert und oft zu größeren, runden Aggregaten zusammengelagert. Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen ermöglichen eine Zunahme des OPA1-Signals im Vergleich zu unbehandelten Zellen und eine leichte Abnahme der Drp1-Proteinspiegel (siehe Abb. 3.1.19.). In diesen Behandlungen erscheinen Mitochondrien eher fusioniert (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.).

### 3.1.7. Einfluss der Toxine und Bisarylimine auf lysosomale Abbauprozesse und die mitochondriale Neusynthese in SH-SY5Y Zellen

Die gewonnenen Daten zeigen eine Zunahme oxidativ modifizierter Proteine mit paralleler Abnahme der mitochondrialen Funktion in Toxin-behandelten SH-SY5Y Zellen. Stark modifizierte Proteine und dysfunktionelle Mitochondrien werden über den lysosomalen Abbaupfad eliminiert. Dysfunktionelle Mitochondrien und erhöhte Abbauprozesse können als Signal für die mitochondriale Neubildung zur Kompensierung des abnehmenden energetischen Status der Zellen dienen.



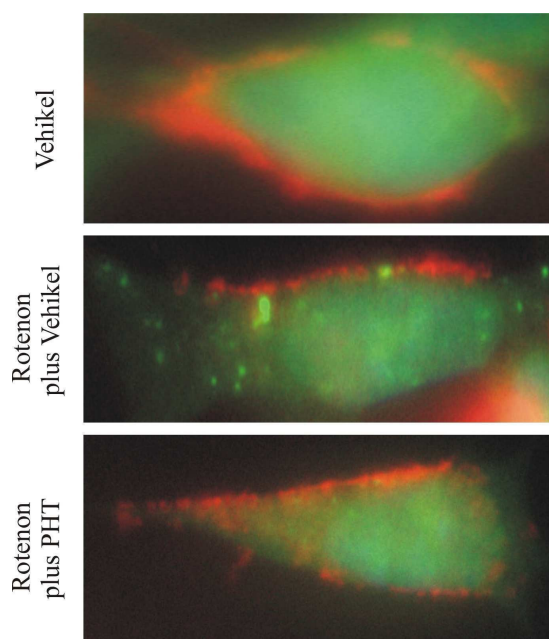


**Abb. 3.1.20. Darstellung der Lysosomen mithilfe des LysoTrackers in Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen nach 24 und 48 h Inkubation.**

SH-SY5Y Zellen wurden für 24 und 48 h mit 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB oder PHO. Gezeigt wird die LysoTracker-Färbung (grün) überlappt mit dem DAPI-Signal (blau) in Aufnahmen mit konstanter Belichtungszeit und 200x Vergrößerung, der Maßstab entspricht 100 µm, rechts sind die angegebenen Bereiche vergrößert dargestellt.

Nach 24 h Rotenon-Behandlung kommt es zu einer starken Induktion lysosomaler Prozesse. Ko-Inkubation mit Rotenon und PHT, ISB oder PHO zeigen eine nur leicht vermehrte Lysosomenanzahl zu unbehandelten Zellen (dargestellt für Rotenon plus PHT). Nach 48 h Rotenon-Behandlung sinkt die Lysosomenanzahl in den meisten Zellen stark ab, in etwa 30 % der Zellen sind große Lysosomenstrukturen zu erkennen. Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT, ISB oder PHO zeigen im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach 48 h eine Induktion lysosomaler Prozesse mit großen lysosomalen Strukturen.

Zur Untersuchung der lysosomalen Vorgänge in SH-SY5Y Zellen nach Toxinbehandlung wurden lysosomale Strukturen mithilfe des LysoTrackers in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen nach 24 und 48 h untersucht (repräsentativ dargestellt für die Rotenon-Behandlung und die Ko-Inkubation mit Rotenon und PHT; siehe Abb. 3.1.20.). LysoTracker werden selektiv in sauren Organellen, wie den Lysosomen, angereichert. Nach 24 h Toxinbehandlung kommt es zu einer drastischen Induktion lysosomaler Abbauprozesse (siehe Abb. 3.1.20.). Die Verteilung der lysosomalen Strukturen erreicht die größte Dichte am Zellrand, oft erscheinen Lysosomen mit größerem Volumen. Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen zeigen hingegen ähnliche lysosomale Charakteristika wie unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.1.20.), mit einer leicht erhöhten Lysosomenanzahl. Lysosomen erscheinen sehr klein oder nehmen ein größeres Volumen an. Nach 48 h Toxinbehandlung kommt es zu einer Reduktion der Lysosomenanzahl im Vergleich zu 24 h Toxinbehandlung. Etwa 60 bis 70 % der Zellen weisen schwach leuchtende und sehr kleine lysosomale Strukturen auf. In etwa 30 % der Zellen sind groß erscheinende Lysosomen zu erkennen, welche sich am Rand der Zellen organisieren. Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen zeigen hingegen eine lysosomale Induktion nach 48 h. Es erscheinen lysosomale Strukturen mit meist größerem Volumen, die am Rand der Zellen organisiert sind.

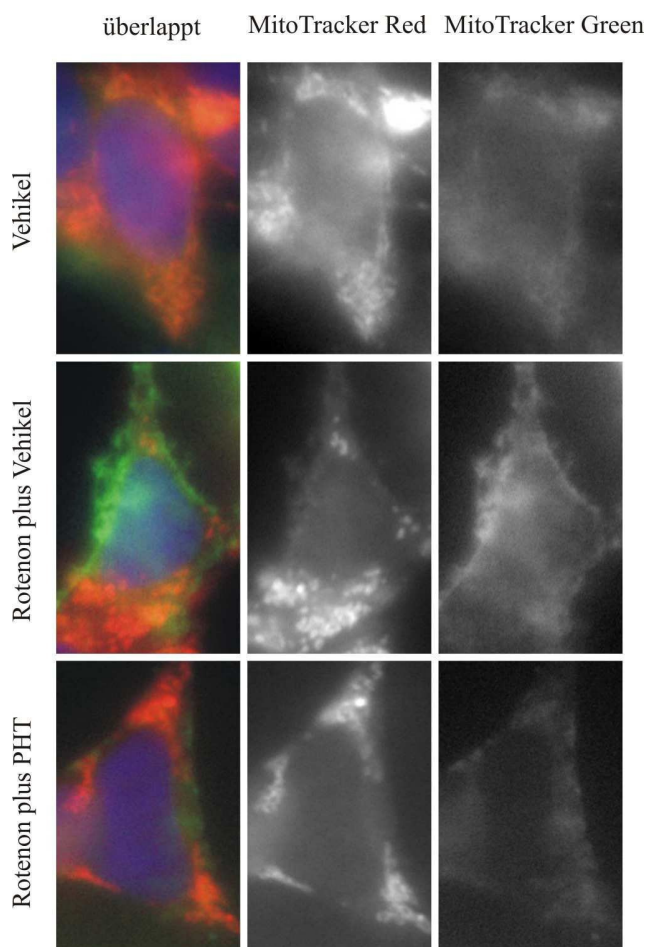


**Abb. 3.1.21. Darstellung der Lysosomen und Mitochondrien mithilfe des Lyso- und MitoTrackers in Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen nach 36 h Inkubation.**

Zur Darstellung des lysosomalen Abbaus und der vor Toxingabe gefärbten Mitochondrien (rot) wurden SH-SY5Y Zellen nach 36 h Behandlung mit LysoTracker (grün) gefärbt. SH-SY5Y Zellen wurden für 36 h mit 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB oder PHO. Die Belichtungszeit ist in allen Aufnahmen konstant gehalten. Gezeigt sind Ausschnitte aus Aufnahmen mit 400x Vergrößerung.

Darstellung des mitochondrialen Verlustes im Randbereich der Zelle nach Toxinbehandlung mit paralleler erhöhter Detektion lysosomaler Strukturen. Ko-Inkubationen mit Toxinen weisen zu diesem Zeitpunkt wenige lysosomale Strukturen und konstante Anzahl an Mitochondrien auf.

Parallel zu erhöhten lysosomalen Abbauprozessen lässt sich in Toxin-behandelten Zellen eine Abnahme der vor Toxingabe vorhandenen Mitochondrien detektieren (MitoTracker-Färbung vor Toxingabe). Die Anzahl der vor Toxingabe gefärbten Mitochondrien (rot) sinkt nach 36 h in Toxinbehandlungen, parallel kommt es zur Induktion lysosomaler Strukturen (LysoTracker, grün) (repräsentativ dargestellt für Rotenon-Behandlung; siehe Abb. 3.1.21.). Innerhalb der Lysosomen-positiven Bereiche (grün) der Zelle kommt es zur Reduktion des MitoTracker-Signals (siehe Abb. 3.1.21.). Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen zeigen im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine leicht reduzierte, aber konstante Anzahl der vor der Behandlung gefärbten Mitochondrien. Zu diesem Zeitpunkt ist das Ausmaß der lysosomalen Antwort in diesen Behandlungsgruppen nicht weit fortgeschritten.



**Abb. 3.1.22.**  
**Darstellung der mitochondrialen Neubildung in Rotenon-Behandlungsgruppen der SH-SY5Y Zellen nach 36 h Inkubation.**

Zur Darstellung neu gebildeter Mitochondrien wurden SH-SY5Y Zellen vor Toxingabe mit MitoTracker Red (rot) und nach 36 h Toxinbehandlung mit MitoTracker Green (grün) gefärbt. SH-SY5Y Zellen wurden für 36 h mit 150 nM Rotenon behandelt in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB oder PHO. Die Belichtungszeit ist in allen Aufnahmen konstant gehalten. Gezeigt sind Ausschnitte aus Aufnahmen mit 400x Vergrößerung.

In Toxinbehandlungen kommt es zu einem starken Anstieg neu gebildeter Mitochondrien (grün) mit parallelem Verlust alter Mitochondrien in Randgebieten der Zelle. Ko-Inkubation mit Toxin und PHT zeigt eine leichte Induktion der mitochondrialen Neubildung. Die Anzahl alter Mitochondrien nimmt leicht zu unbehandelten Zellen ab, die Verteilung der Mitochondrien bleibt in den Ko-Inkubationen vergleichbar mit unbehandelten Zellen.

Als Antwort auf den erniedrigten energetischen Status der Zelle, den Potentialverlust der mitochondrialen Membran, sowie die Zunahme lysosomaler Abbauprozesse, kann es zu einer kompensatorischen mitochondrialen Neubildung kommen. Um diesen Prozess in den Behandlungsgruppen zu untersuchen, wurden SH-SY5Y Zellen vor Toxingabe mit MitoTracker Red gefärbt, um Mitochondrien darzustellen, die vor der Toxingabe existierten (alte Mitochondrien, rot), nach einer Toxinbehandlung für 36 h wurden neu synthetisierte Mitochondrien mithilfe des MitoTracker Green

(neue Mitochondrien, grün) dargestellt (siehe Abb. 3.1.22.). Die Anzahl alter Mitochondrien wird nach Toxingabe reduziert und die Verteilung der stark fragmentierten Mitochondrien im Vergleich zu unbehandelten Zellen verändert. Alte Mitochondrien versammeln sich an einem Zellpol und verschwinden in Randgebieten. In den Randgebieten erscheinen neu entstandene Mitochondrien. Die mitochondriale Neubildung wird in Toxinbehandlungen induziert (repräsentativ dargestellt für Rotenon-Behandlung; siehe Abb. 3.1.22.). Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen, repräsentativ dargestellt für die Ko-Inkubation mit Rotenon und PHT, zeigen eine leichte Abnahme der Anzahl alter Mitochondrien, die Verteilung alter Mitochondrien bleibt jedoch ähnlich der Verteilung in unbehandelten Zellen. Die Anzahl an neu entstandenen Mitochondrien nimmt leicht zu (siehe Abb. 3.1.22.).

Es konnte gezeigt werden, dass Bisarylimine (PHT, ISB und PHO) in nanomolaren Konzentrationen im Parkinson-Toxin-induzierten Neuroblastoma-Modell zytoprotektiv wirken. Protektive Eigenschaften dieser Strukturen sind auf ihre sehr effektive antioxidative Kraft zurückzuführen, da Strukturanaloga, welche an der Iminogruppe substituiert sind (AcPHT, CPRZ und PRZ, siehe Abb. 1.11.) keine Zytoprotektion vermitteln. Bisarylimine erhalten die Integrität der Mitochondrien bei einer Komplex I Inhibition mit paralleler Stärkung der antioxidativen Abwehr, wie bei einer kompletten Glutathiondepletion gezeigt werden konnte. Direkte *in vitro* und *in situ* Assays konnten die antioxidative Kapazität dieser Substanzen aufzeigen. Nun werden Bisarylimine in der gemischten neuronalen Kultur des ventralen Mittelhirns auf ihr neuroprotektives Potential hin untersucht.

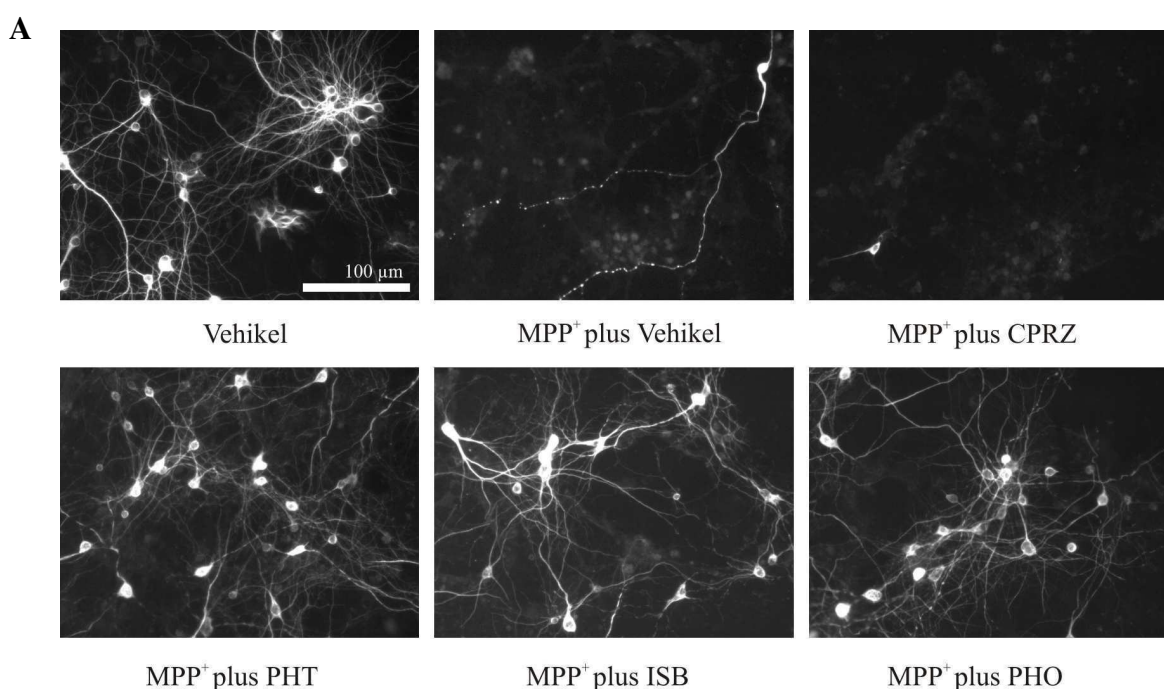
### **3.2. Zytoprotektion der primären Mittelhirnkulturen mithilfe von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin**

Mithilfe der Analyse der Wirksamkeit von PHT, ISB und PHO gegenüber Parkinson-Toxinen in einem neuroglialen Netzwerk, werden die Untersuchungen näher an die *in vivo* Situation herangeführt. Die Verwendung von Zellen des ventralen Mittelhirns erlaubt die selektive Vulnerabilität dopaminerger Zellen der *SNpc* gegenüber Parkinson-Toxinen und oxidativem Stress zu analysieren. In diesem Modellsystem werden Bisarylimine auf ihr neuroprotektives Potential hin untersucht bei akuter Komplex I Inhibition durch die Parkinson-Toxine, MPP<sup>+</sup> und Rotenon, sowie bei einer Destabilisierung des antioxidativen Schutzsystems durch Glutathiondepletion. Die Evaluierung des Zellüberlebens der Gesamtkultur erfolgt mithilfe des MTT-Tests, das neuronale Zellüberleben wird mithilfe histochemischer Färbungen untersucht. Des Weiteren wird die Selektivität der Parkinson-Toxine gegenüber dopaminergen Zellen analysiert. Die Regulation des antioxidativen Schutzsystems wird in der Primärzellkultur auf der Ebene der antioxidativen Enzyme untersucht. Des Weiteren werden lysosomale Abbauprozesse und die Reaktion der Mitochondrien auf die zugeführten Toxine,

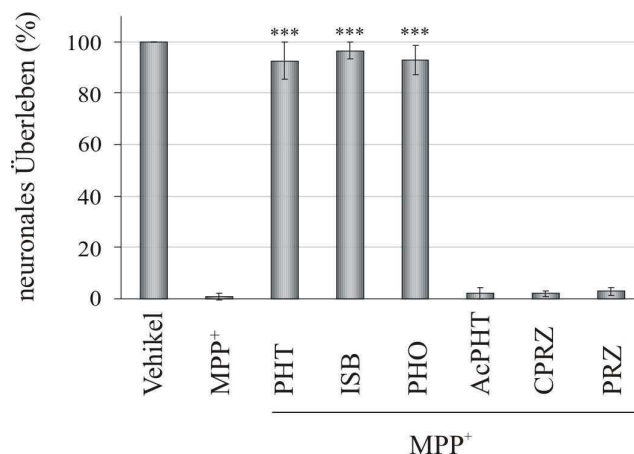
mit Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials, der mitochondrialen Morphologie und Verteilung, sowie der mitochondrialen Neubildung, analysiert.

### 3.2.1. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns vor MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Toxizität

Das neuroprotektive Potential der Bisarylimine wird in differenzierten Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns untersucht. Akute Konzentrationen an MPP<sup>+</sup> (200  $\mu$ M) und Rotenon (150 nM) führen innerhalb von 72 h zu einem massiven neuronalen Sterben, dargestellt mithilfe der immunhistochemischen Analyse des Neuronen-spezifischen Markers MAP2 (microtubule associated protein 2) (siehe Abb. 3.2.1. A und B und 3.2.2. A und B). Neurone zeigen eindeutige Anzeichen der primären Eliminierung der Fortsätze, welches auf einen „dying back“ Mechanismus des zellulären Sterbens hinweist und zuerst die Entkopplung der Axone vom Zellkörperleben einschließt (sichtbar an der Fragmentierung der Axone; Abb. 3.2.1.A., 3.2.2.A. oberen Reihe, mittleres Bild; 3.2.3., mittleres Bild). Bisarylimine mit freier Iminogruppe ermöglichen in einer Konzentration von 50 nM eine umfassende Protektion neuronaler Strukturen gegenüber MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Toxizität. Die große Mehrheit der Neurone (90 % für MPP<sup>+</sup>- und fast 100 % für Rotenon-Behandlungsgruppen; siehe Abb. 3.2.1.B. und 3.2.2.B.) behält ihre Integrität bei, sowohl in der Zellkörperregion als auch in den Fortsätzen sind keine Auffälligkeiten der zellulären Schädigung zu erkennen. N-substituierte Bisaryliminstrukturen (AcPHT, CPRZ und PRZ) zeigen keine neuroprotektiven Effekte gegenüber MPP<sup>+</sup>- oder Rotenon-Toxizität.



B

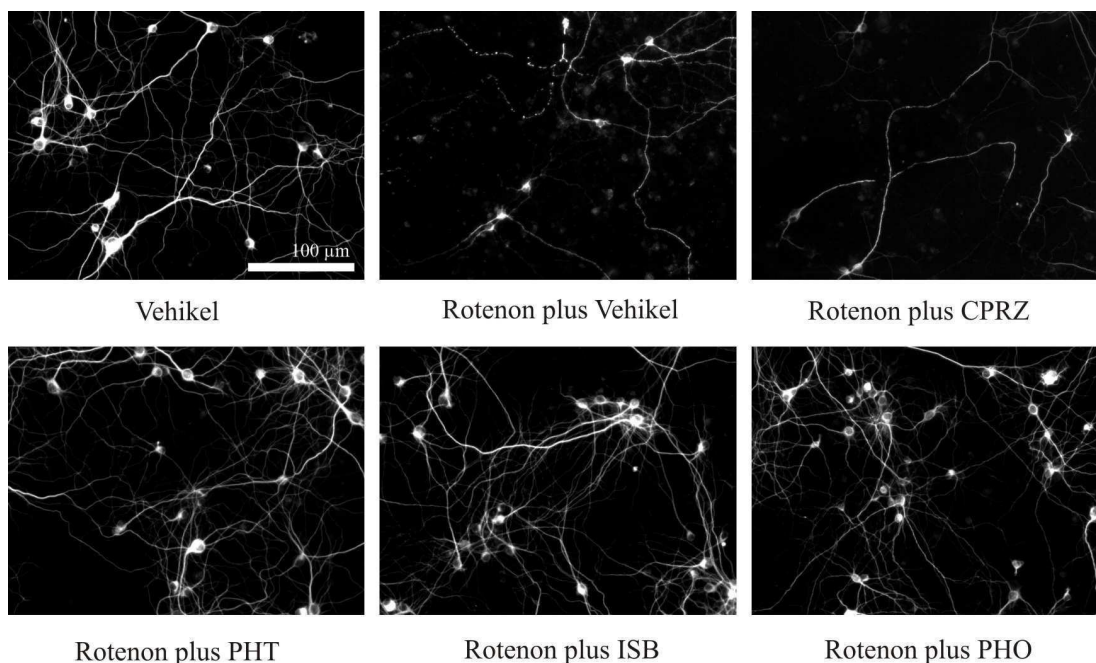


**Abb. 3.2.1. Darstellung des neuronalen Zellüberlebens in Primärzellkulturen der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen.**

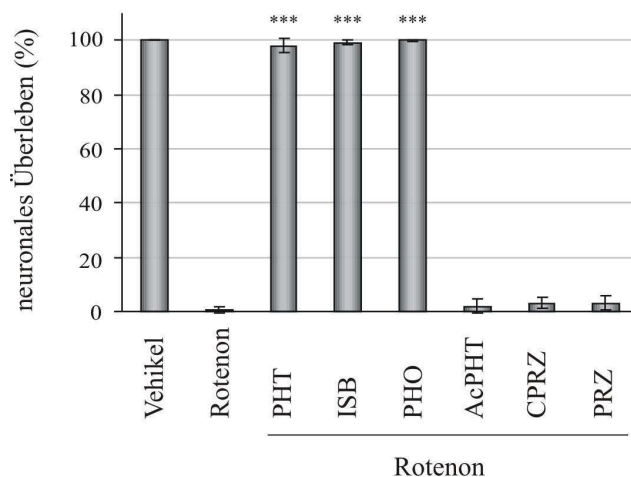
Mithilfe der histochemischen MAP2 (microtubule associated protein 2)-Färbung der Primärzellkulturen kann die neuronale Situation in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen evaluiert werden. Differenzierte Primärzellkulturen wurden mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ für 72 h behandelt und einer MAP2- und DAPI-Färbung unterzogen. A) Darstellung repräsentativer Bilder der MAP2-Färbung. Die Aufnahmen sind mit 200x Vergrößerung erstellt, der Maßstab definiert 100  $\mu$ m. B) Auswertung der MAP2-Färbung in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen. Neurone mit unfragmentierten Axonen wurden als gesunde Zellen eingestuft und Neurone mit fragmentierten oder zerstörten Axonen als sterbende Zellen definiert und auf die Kernzahl (DAPI-Färbung) normiert.

MPP<sup>+</sup>-Behandlung und Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und AcPHT, CPRZ oder PRZ führen zu einem massiven Verlust neuronaler Zellen. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT, ISB oder PHO zeigen einen signifikanten Schutz gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). Die Auswertung vereint drei unabhängige Experimente mit jeweils fünf evaluierten Gesichtsfeldern in Triplikat.

A



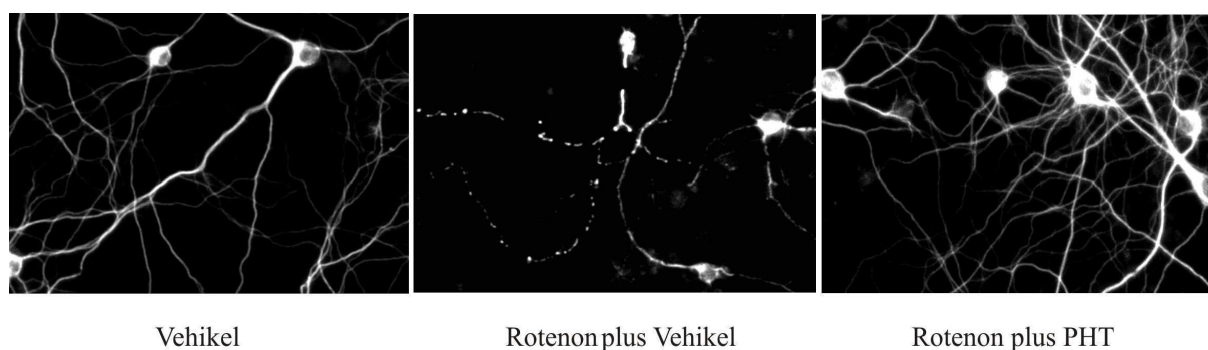


**B**

**Abb. 3.2.2. Darstellung der neuronalen Zellen in der Primärzellkultur der Rotenon-Behandlungsgruppen.**

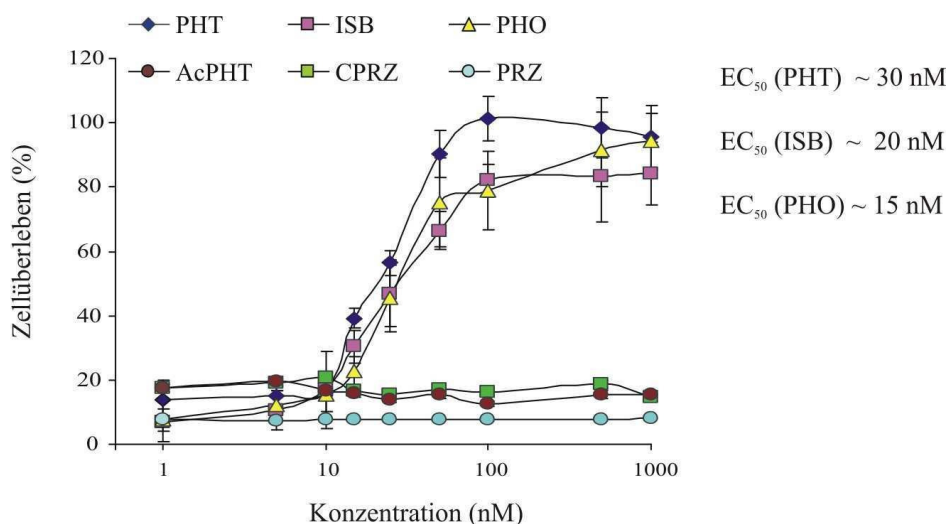
Mithilfe der histochemischen MAP2-Färbung der Primärzellkulturen kann die neuronale Situation in Rotenon-Behandlungsgruppen evaluiert werden. Differenzierte Primärzellkulturen wurden mit 150 nM Rotenon in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ für 72 h behandelt und einer MAP2- und DAPI-Färbung unterzogen. A) Darstellung repräsentativer Bilder der MAP2-Färbung. Die Aufnahmen sind mit 200x Vergrößerung erstellt, der Maßstab definiert 100  $\mu\text{m}$ . B) Auswertung der MAP2-Färbung in Rotenon-Behandlungsgruppen. Neurone mit unfragmentierten Axonen wurden als gesunde Zellen eingestuft und Neurone mit fragmentierten oder zerstörten Axonen als sterbende Zellen definiert und auf die Kernanzahl (DAPI-Färbung) normiert.

Rotenon-Behandlung und Ko-Inkubationen mit Rotenon und AcPHT, CPRZ oder PRZ führen zu einem massiven Verlust neuronaler Zellen. Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT, ISB oder PHO zeigen einen signifikanten Schutz gegenüber der Rotenon-Toxizität (\*\* $p \leq 0,001$ ). Die Auswertung vereint drei unabhängige Experimente mit jeweils fünf evaluierten Gesichtsfeldern in Triplikat.



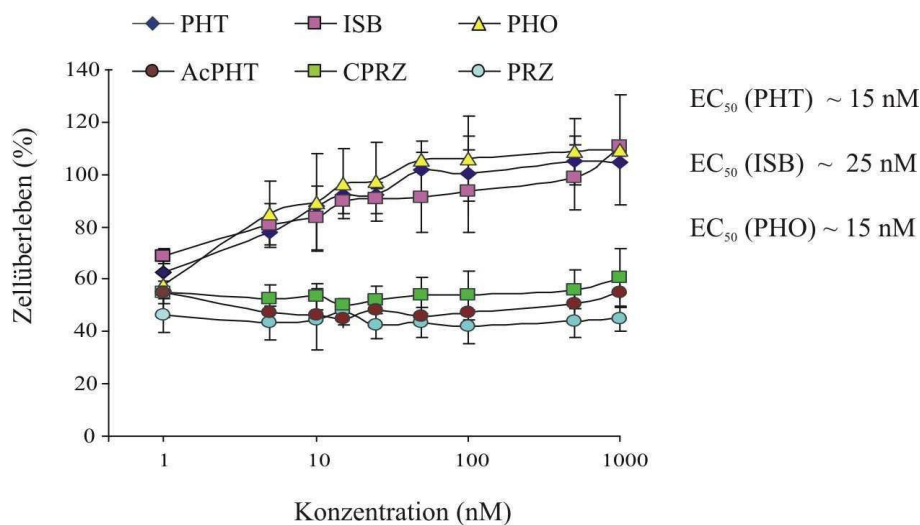
**Abb. 3.2.3. Darstellung der axonalen Fragmentierung.**

Dargestellte Bilder sind Vergrößerungen der in Abb. 3.2.2. illustrierten Aufnahmen. Rotenon-Behandlung führt nach 72 h zur massiven Fragmentierung der neuronalen Fortsätze (mittleres Bild). Bei Ko-Inkubation mit Rotenon und 50 nM an Bisarylaminen bleibt das neuronale Netzwerk intakt.



**Abb. 3.2.4. Darstellung des MTT-Tests in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen der Primärzellen mit Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Substanzen.**

Zur Evaluierung des Zellüberlebens wurden differenzierte Primärzellkulturen mit 200 µM MPP<sup>+</sup> für 96 h behandelt in Anwesenheit von PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ in einer Konzentration von 5 bis 1000 nM. Die Auswertung beinhaltet drei separate Experimente in Triplikat.



**Abb. 3.2.5. Darstellung des MTT-Tests in Rotenon-Behandlungsgruppen der Primärzellkulturen mit Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Substanzen.**

Zur Evaluierung des Zellüberlebens wurden differenzierte Primärzellkulturen mit 150 nM Rotenon für 96 h behandelt in Anwesenheit von PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ in einer Konzentration von 5 bis 1000 nM. Die Auswertung beinhaltet drei separate Experimente in Triplikat.

Die protektiven Konzentrationsbereiche der Bisarylimine gegenüber der akuten Toxizität des MPP<sup>+</sup> (200 µM) und Rotenons (150 nM) wurden zu einem späteren Zeitpunkt mithilfe des MTT-Tests evaluiert. MPP<sup>+</sup> führt nach 96 h zur Eliminierung aller zellulären Strukturen (siehe Abb. 3.2.4.). Bisarylimine zeigen eine stabile Protektion gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität ab 50 bis 100 nM und erhalten bis zu 70 und 90 % der Zellen. Die halbmaximalen effektiven Konzentrationen belaufen sich im MTT-Test auf 30 nM für PHT, 20 nM für ISB und 15 nM für PHO (siehe Abb. 3.2.4.). Nach 96 h

Rotenon-Behandlung kommt es zu einem 40 bis 50 %igen zellulären Verlust (siehe Abb. 3.2.5.). Vorangegangene Analysen haben gezeigt, dass die gesamte neuronale Population nach 72 h Rotenon-Behandlung eliminiert wird (siehe Abb. 3.2.2.). So kann vermutet werden, dass das Überlebenssignal im MTT-Test auf gliale Strukturen zurückzuführen ist. Die Protektion der Zellen gegenüber Rotenon-Toxizität mithilfe antioxidativer Bisarylimine ist bei 50 und 100 nM besonders deutlich. Die  $EC_{50}$ -Werte erreichen im MTT-Test 15 nM für PHT und PHO und 25 nM für ISB. Nicht-antioxidative Strukturanaloga zeigen keine zytoprotektive Wirkung gegenüber der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Toxizität.

### **3.2.2. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen dopaminerge Neurone des ventralen Mittelhirns vor MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Toxizität**

Da im vorangegangenen Abschnitt eine sehr deutliche Protektion mithilfe der Bisarylimine in nanomolaren Konzentrationen auf neuronaler Ebene gezeigt werden konnte, soll nun die protektive Effizienz der Bisarylimine, dopaminerge Zellen der differenzierten Primärzellkultur des ventralen Mittelhirns vor MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Toxizität zu schützen, angesprochen werden. Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns stellen Mischkulturen verschiedener neuronaler Populationen dar und beinhalten bei der Ratte etwa 3 bis 5 % dopaminerge Neurone, welche sich besonders vulnerabel gegenüber den beiden Parkinson-Toxinen *in vitro* und *in vivo* zeigen (Moon et al., 2005; siehe Einleitung).

Basierend auf mikroskopischen Beobachtungen konnte eine kleine Population an Neuronen in der Mischkultur des Mittelhirns identifiziert werden, die zu einem früheren Zeitpunkt, im Vergleich zur Mehrheit der Neurone, Zeichen der Zytotoxizität aufwies. Die Analyse einer selektiven Beeinträchtigung dopaminerger Neurone in frühen Stadien der akuten Toxinbehandlung umfasste die Detektion der Proteinspiegel der Tyrosinhydroxylase (TH, Enzym der Dopaminsynthese und Markerprotein dopaminerger Zellen; siehe Abschnitt 1.2.). Der Verlust der TH-Expression stellt einen spezifischen Marker des dopaminergen Integritätsverlustes dar (Moon et al., 2005). Akute Konzentrationen an MPP<sup>+</sup> (200  $\mu$ M) oder Rotenon (150 nM) führen innerhalb von 24 h zu einer signifikanten Abnahme des TH-Proteinsignals in Primärzellkulturen bei unverändertem pan-neuronalen MAP2c-Proteinsignal (siehe Abb. 3.2.6. A und B). Antioxidative Bisarylimine ermöglichen in nanomolaren Konzentrationen die dopaminerge Integrität in Toxin-Behandlungen zu erhalten (siehe Abb. 3.2.6. A und B), das N-substituierte AcPHT weist keine Stabilisierung dopaminerger Zellen auf. Hiermit wird verdeutlicht, dass Bisarylimine eine Stabilisierung der hoch vulnerablen dopaminergen Zellen vermitteln.



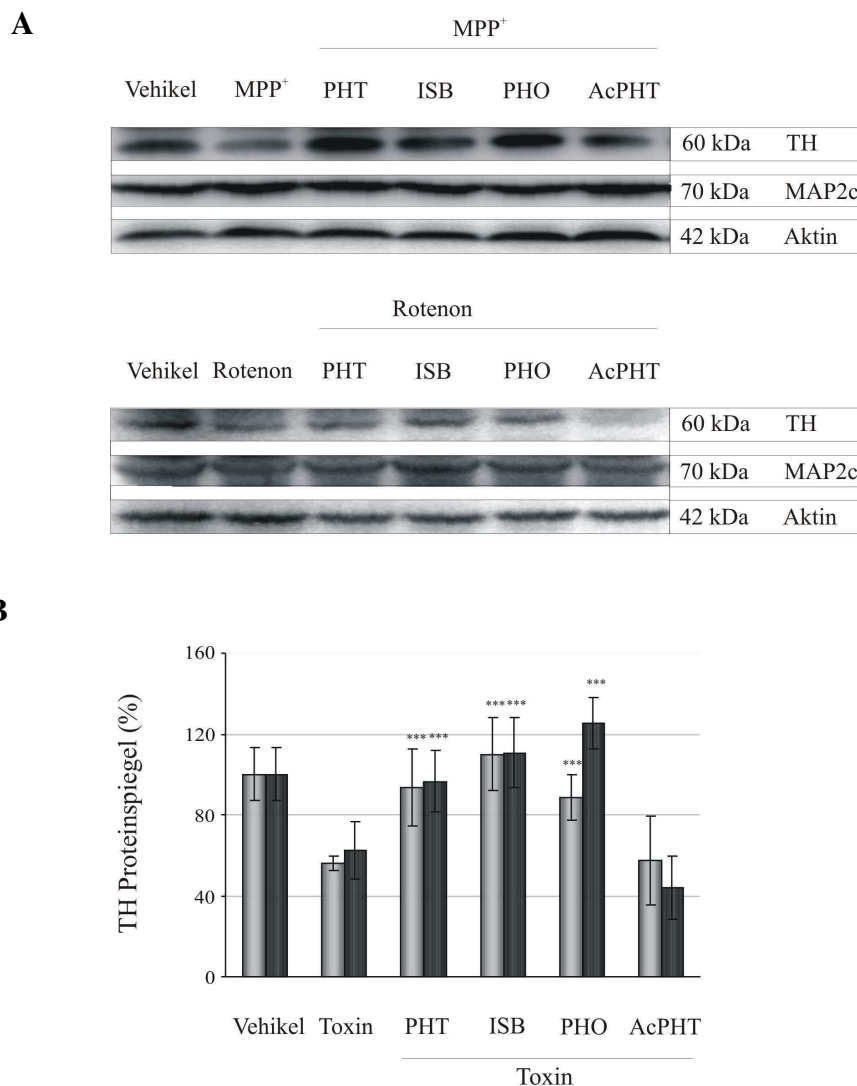


Abb. 3.2.6.

**Darstellung selektiver Vulnerabilität dopaminerger Neurone gegenüber MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungen und Protektion der dopaminerger Neurone mithilfe von 50 nM PHT, ISB und PHO.**

Mithilfe einer Immunanalyse wurden TH- (Tyrosinhydroxylase) Proteinspiegel in Primärzellkulturen bei MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlung detektiert zur Darstellung des Anteils überlebender dopaminerger Zellen. TH-Proteinspiegel werden mit dem MAP2c-Proteinspiegel verglichen zur Verzeichnung der Neuronenzahl in den Behandlungsgruppen. Parallel dient das Aktin-Signal als Ladekontrolle. Differenzierte Primärzellkulturen wurden mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT für 24 h behandelt und der Immunanalyse unterzogen. Das TH-Signal wird bei 60 kDa detektiert, MAP2c bei 70 kDa und Aktin bei 42 kDa. A) Darstellung repräsentativer Immunsignale der untersuchten Proteine. B) Quantifizierung der Immunoblot-Signale erfolgte mit der Aida Software. TH-Proteinsignale wurden auf Aktin-Proteinsignale normiert und auf die Kontrollbehandlung prozentuell bezogen.

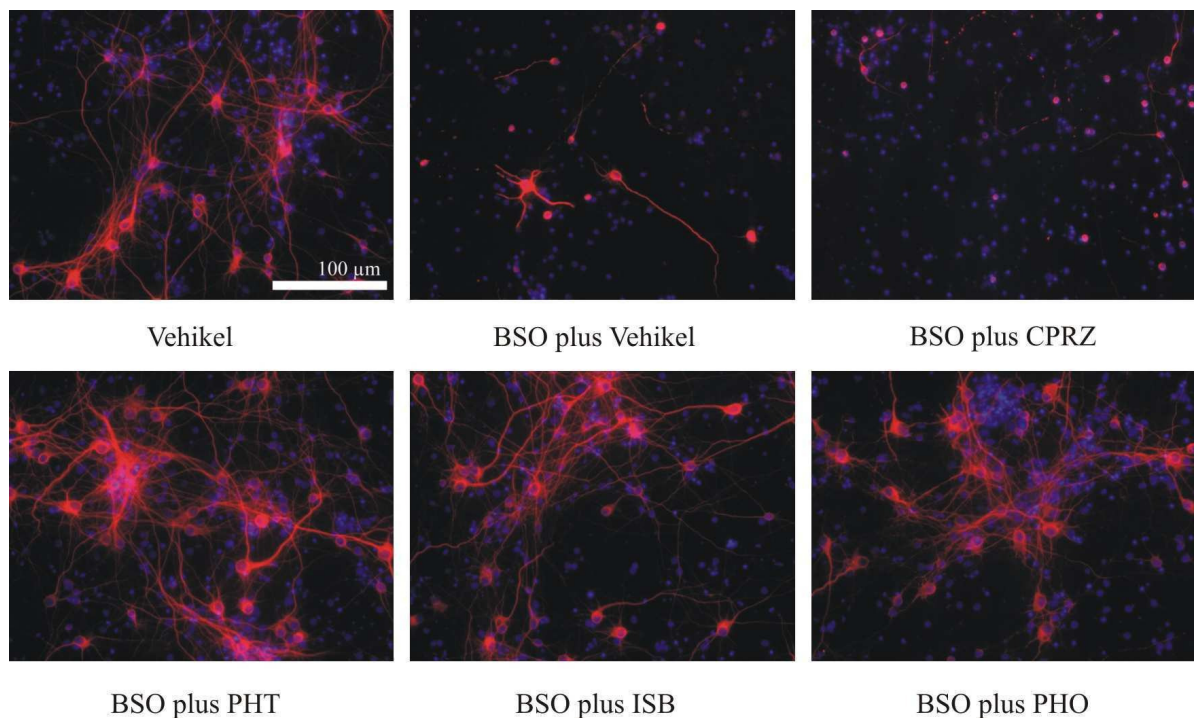
Toxinbehandlungen oder Ko-Inkubationen mit Toxinen und AcPHT führen zu einem selektiven Verlust des TH-Signals bei konstantem MAP2c-Signal. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO erhalten das TH-Signal in signifikanten Bereichen (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Die Auswertung vereinigt drei unabhängige Experimente.

### 3.2.3. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen vor oxidativen Stress in Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns

Zur Darstellung der effektiven Detoxifizierung eines induzierten oxidativen Ungleichgewichts mithilfe der Bisarylimine in Primärzellkulturen, wird das zelluläre antioxidative System durch die Depletion des Glutathions gestört (siehe Abschnitt 3.1.3.).

Glutathiondepletion, induziert durch 400  $\mu\text{M}$  BSO, führt innerhalb von 72 h zu einem massiven neuronalen Zelltod (evaluiert mithilfe der MAP2-Färbung; siehe Abb. 3.2.7. A und B). 50 nM PHT, ISB und PHO schützen das neuronale Netzwerk vollständig vor der Glutathiondepletion (siehe Abb. 3.2.7. A und B und 3.2.8.), 50 nM AcPHT, CPRZ oder PRZ vermitteln keine Protektion gegenüber der Glutathiondepletion. Nanomolare Konzentrationen an Bisaryliminen weisen nach 96 h BSO-Behandlung eine Stabilisierung der Integrität in 80 bis 90 % der Zellen auf und entfalten ihre halbmaximale Protektionskraft bei 20 nM für PHT, 25 nM für ISB und bei 35 nM für PHO (siehe Abb. 3.2.8.). N-substituierte Strukturanaloga zeigen in hohen Konzentrationen protektive Eigenschaften (siehe Abb. 3.2.8., etwa 1000fach höher als PHT, ISB oder PHO).

**A**



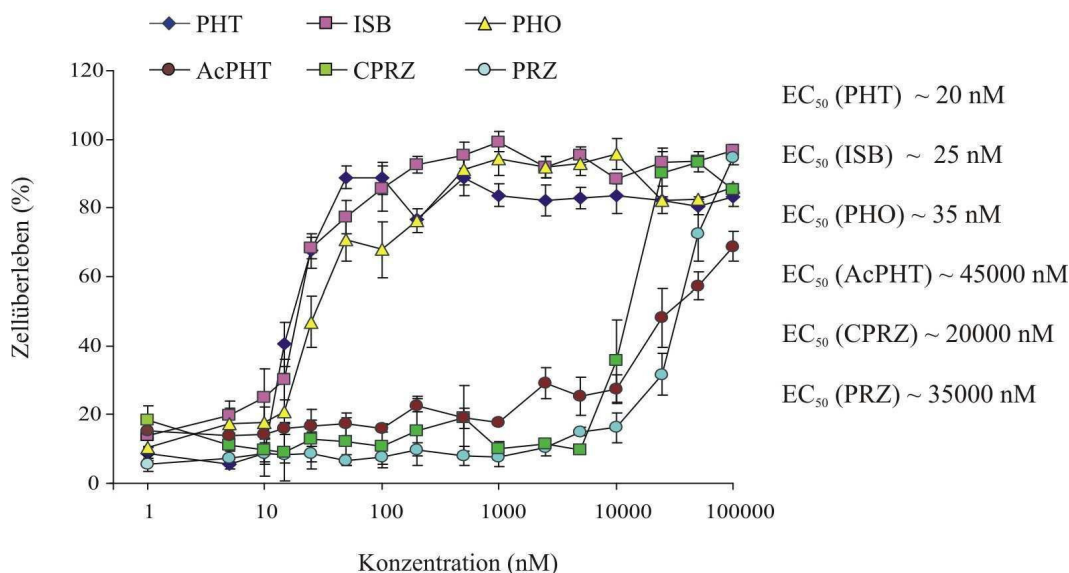
B



**Abb. 3.2.7. Darstellung der neuronalen Morphologie in BSO-Behandlungsgruppen der Primärzellkultur.**

Mithilfe der histochemischen MAP2-Färbung der Primärzellkultur kann die neuronale Situation in BSO-Behandlungsgruppen evaluiert werden. Differenzierte Primärzellkulturen wurden mit 400  $\mu\text{M}$  BSO in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ für 72 h behandelt und einer MAP2- und DAPI-Färbung unterzogen. A) Darstellung repräsentativer Bilder der MAP2-Färbung überlappt mit DAPI zur Ermittlung der Gesamtzellzahl. Die Aufnahmen sind mit 200x Vergrößerung erstellt, der Maßstab definiert 100  $\mu\text{m}$ . B) Auswertung der MAP2-Färbung in BSO-Behandlungsgruppen. Hierfür wurden Neurone mit unfragmentierten Axonen als gesunde Zellen eingestuft und Neurone mit fragmentierten oder zerstörten Axonen als sterbende Zellen definiert und prozentuell auf die Kernanzahl normiert.

BSO-Behandlung und Ko-Inkubationen mit BSO und AcPHT, CPRZ oder PRZ führen zu einem massiven Verlust neuronaler Zellen. Ko-Inkubationen mit BSO und PHT, ISB oder PHO zeigen einen signifikanten Schutz gegenüber der BSO-Toxizität (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ . Die Auswertung vereint drei unabhängige Experimente mit jeweils fünf evaluierten Gesichtsfeldern in Triplikat.



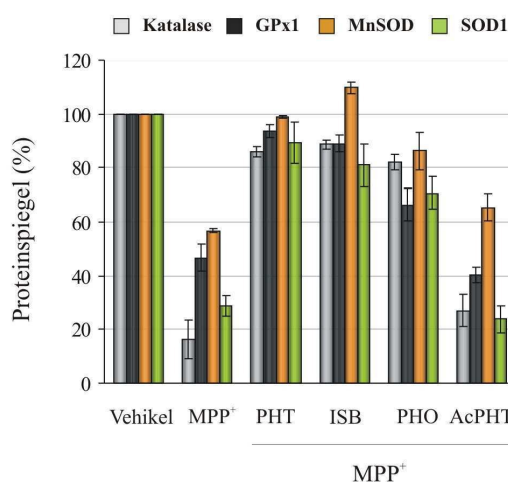
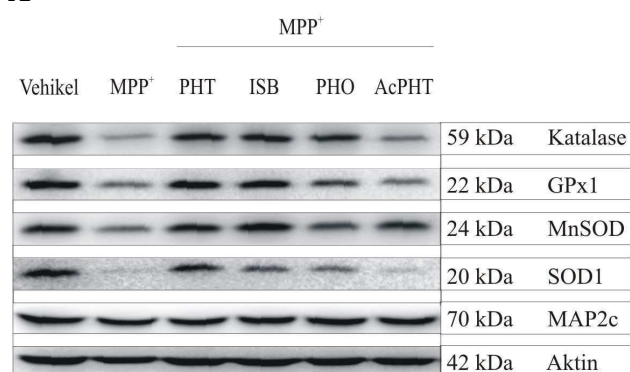
**Abb. 3.2.8. Darstellung des MTT-Tests in BSO-Behandlungsgruppen der Primärzellkulturen mit Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Substanzen.**

Zur Evaluierung des Zellüberlebens wurden BSO-Behandlungsgruppen dem MTT-Test unterzogen. Hierfür wurden differenzierte Primärzellkulturen für 96 h mit 400  $\mu\text{M}$  BSO behandelt in Anwesenheit von PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ oder PRZ in einer Konzentration von 5 nM bis 100  $\mu\text{M}$ . Die Auswertung beinhaltet drei unabhängige Experimente in Triplikat.

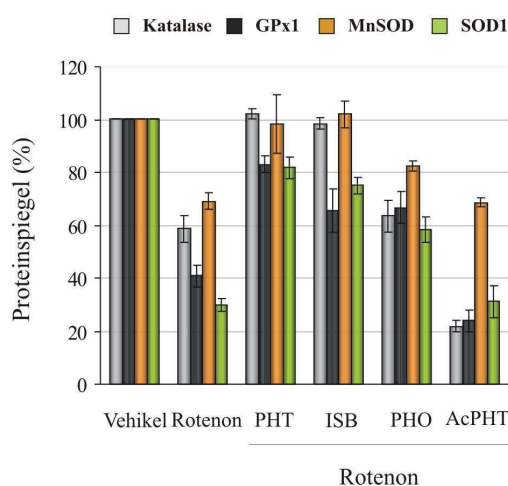
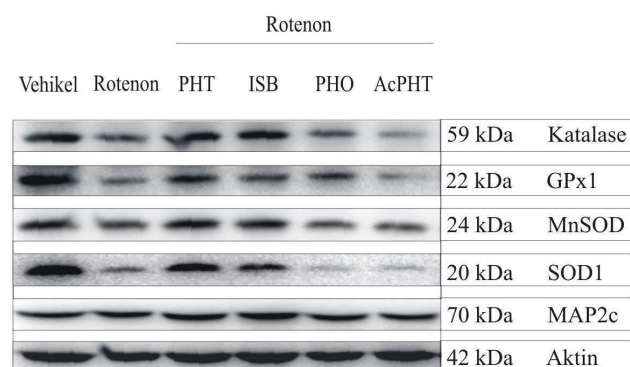
### 3.2.4. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin stabilisieren das antioxidative System der Primärzellkultur

Da Bisarylimine bei Depletion eines der wichtigsten antioxidativen Moleküle der Zelle, die Integrität der Primärzellkulturen aufrechterhalten und das neuronale Netzwerk vor der Wirkung der Parkinson-Toxine schützen, wurde das enzymatische antioxidative System in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen analysiert. Zur Untersuchung der Auswirkungen der beiden Toxine und Bisarylimine auf die ROS-Detoxifizierungsmaschinerie, wurden Proteinspiegel der Katalase, Glutathion-Peroxidase 1 (GPx1), mitochondrialer SOD (MnSOD, mit Mangan als Zentralatom) und zytosolischer SOD (SOD1, mit Kupfer-Zink als Zentralatome) innerhalb von 36 h akuter Toxinbehandlung in Primärzellkulturen analysiert.

**A**



**B**



**Abb. 3.2.9. Darstellung des antioxidativen zellulären Schutzsystems in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen und in Ko-Inkubationen mit 50 nM PHT, ISB, PHO und AcPHT.**

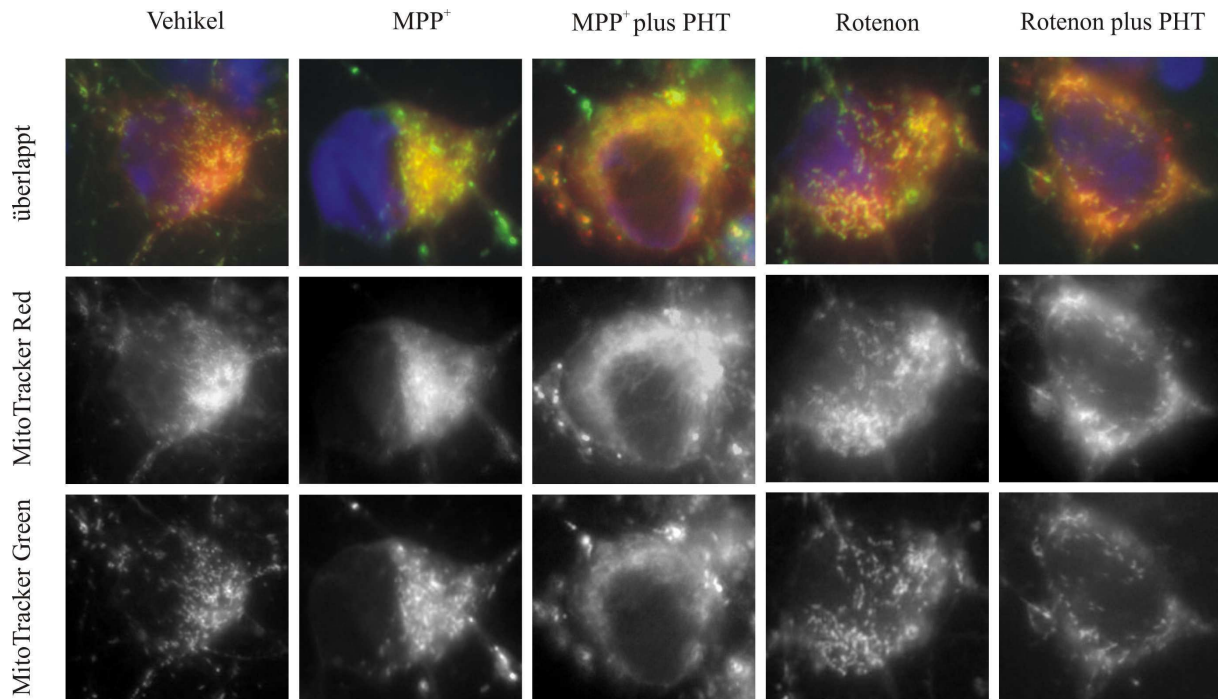
Mithilfe einer Immunanalyse wurden Proteinspiegel der zellulären antioxidativen Enzyme, Katalase, GPx1, MnSOD und SOD1 in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen untersucht. Differenzierte Primärzell-kulturen wurden mit 200 µM MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon in Anwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT für 36 h behandelt und einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Das Katalase-Signal wird bei 59 kDa detektiert, GPx1 bei 22 kDa, MnSOD bei 24 kDa, SOD1 bei 20 kDa, MAP2c bei 70 kDa und Aktin bei 42 kDa. Darstellung repräsentativer Immunsignale der untersuchten Proteine mit der Quantifizierung der Immunbanden mithilfe der Aida Software für MPP<sup>+</sup>- (A) und Rotenon- (B) Behandlungsgruppen. Proteinsignale der antioxidativen Enzyme wurden auf Aktin-Proteinsignale normiert und auf die Kontrollbehandlung prozentuell bezogen.

Toxinbehandlung führt zu einer drastischen Absenkung antioxidativer Enzyme. Es ist eine deutliche Stabilisierung antioxidativer Enzyme bei Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO zu detektieren. In Ko-Inkubationen mit Toxinen und AcPHT sind Katalase, GPx1 und SOD1 reduziert, MnSOD-Proteinspiegel weisen hingegen erhöhte Werte verglichen mit der alleinigen Toxinbehandlung. Die Auswertung beinhaltet zwei unabhängige Experimente.

Innerhalb der ersten 12 h kommt es in allen MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen zu einer Erhöhung der antioxidativen Enzymspiegel (nicht gezeigt). Nach 36 h akuter Toxinbehandlung kann ein Verlust der antioxidativen Enzyme bei stabilem MAP2c-Signal in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungen detektiert werden (siehe Abb. 3.2.9. A und B). Dies verdeutlicht, dass nach kurzer Erhöhung der antioxidativen Abwehrmechanismen des neuroglialen Netzwerkes, eine längere akute Toxinwirkung das antioxidative System der Zellen völlig destabilisiert. Ko-Inkubationen mit Toxinen und 50 nM an Bisaryliminen erhalten das antioxidative System der Primärzellkulturen zu einem gewissen Ausmaß auf dem Niveau der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.2.9. A und B). 50nM AcPHT scheint die MnSOD positiv zu beeinflussen, sowohl bei MPP<sup>+</sup>- als auch bei Rotenon-Ko-Inkubationen, hingegen bleiben Proteinspiegel von Katalase, GPx1 und SOD1 auf dem Niveau der alleinigen Toxinbehandlung (siehe Abb. 3.2.9. A und B).

**3.2.5. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin stabilisieren die Integrität der Mitochondrien bei einer Komplex I Inhibition in Primärzellkulturen**

MPP<sup>+</sup> und Rotenon stellen beide Komplex I Inhibitoren dar. Zur Beschreibung der Wirkungsweise der verwendeten Parkinson-Toxine wird das mitochondriale Verhalten in Primärzellkulturen angeschaut. Hierbei wird das Augenmerk auf die mitochondriale Neubildung und Abbau, die Morphologie, das Membranpotential, sowie die Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Toxin-behandelten Zellen und in Ko-Inkubationen mit Toxinen und Phenothiazin gerichtet.



**Abb. 3.2.10. Darstellung der mitochondrialen Neubildung und mitochondrialer Morphologie nach 6 h in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen.**

Zur Darstellung der mitochondrialen Neubildung und der mitochondrialen Morphologie wurden differenzierte, mit MitoTracker Red gefärbte Primärzellkulturen mit 200  $\mu$ M bzw. 150 nM Rotenon in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert. Nach 6 h Behandlung wurden die Zellen mit MitoTracker Green gefärbt und bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Dargestellte Bilder zeigen Vergrößerungen repräsentativer Zellen in den Behandlungsgruppen.

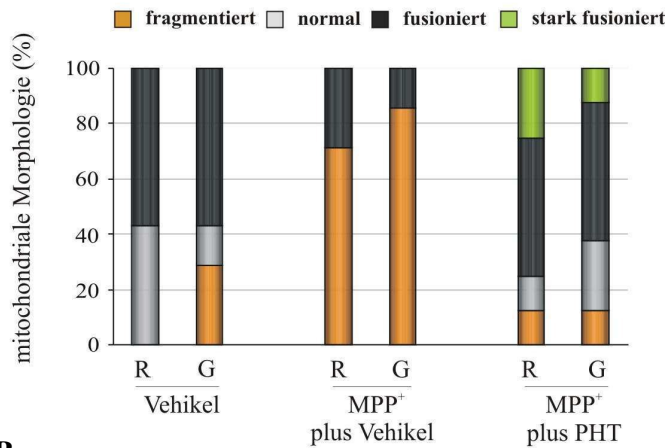
Im Vergleich zu Kontrollzellen zeigen MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelte Zellen eine Induktion der grün gefärbten Mitochondrien (erhöhte Entstehung neuer Mitochondrien) und eine abgekugelte Morphologie (fragmentierte Mitochondrien). Hingegen weisen Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT keine Induktion der mitochondrialen Neubildung auf und zeigen eine verstärkte Fusion des mitochondrialen Netzwerkes. Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT weisen relativ zu unbehandelten Zellen keine erhöhte Anzahl an grün gefärbten Mitochondrien auf, die Mehrheit der Mitochondrien besitzt eine normale bis abgerundete Morphologie.

Auf morphologischer Ebene zeigen Mitochondrien in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen starke Unterschiede zu Mitochondrien unbehandelter Primärzellen. Innerhalb von 6 h der akuten MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlung erfolgt eine Zunahme der mitochondrialen Fragmentierungsprozesse, dargestellt in neuronalen Zellkörpern mithilfe der MitoTracker-Färbung (siehe Abb. 3.2.10. und 3.2.11. A und B). Nach 12 und 24 h MPP<sup>+</sup>- oder Rotenon-Behandlung weisen Mitochondrien einen stark fragmentierten Phänotyp auf (siehe Abb. 3.2.12. bis 3.2.14.), wohingegen MitoTracker-positive Strukturen in späteren Stadien der Toxininkubation als Aggregate vorliegen (dargestellt für MPP<sup>+</sup>-Behandlung nach 48 h in Abb. 3.2.15.). Wie in Abschnitt 3.1.6. beschrieben, spielt Drp1 eine Rolle in der mitochondrialen Fragmentierung, OPA1 hingegen reguliert die mitochondriale Fusion (siehe auch Abschnitt 4.1.2.). Innerhalb der ersten 12 h kommt es zu einer Erhöhung des Drp1-Proteinsignals in allen MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen, v.a. in alleinigen Toxininkubationen. Proteinspiegel des OPA1 werden v.a. in Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen erhöht (nicht gezeigt). Nach 24 h ist Drp1 in Toxinbehandlungen und Ko-Inkubationen mit dem N-substituierten AcPHT hochreguliert, OPA1-

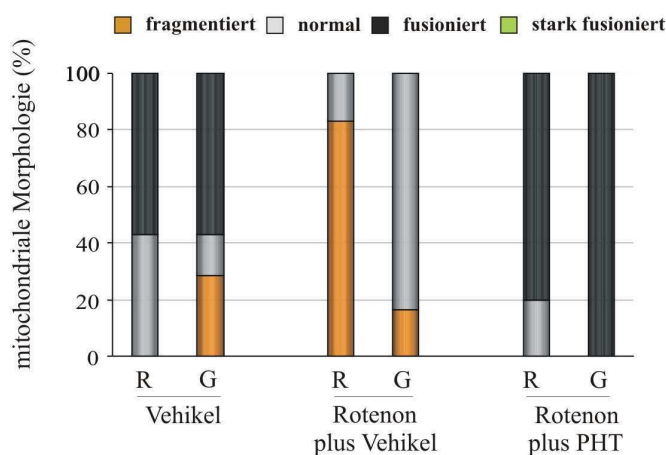


Proteinspiegel sind in diesen Behandlungen reduziert (siehe Abb. 3.2.12.C., repräsentativ dargestellt für die MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppe nach 24 h).

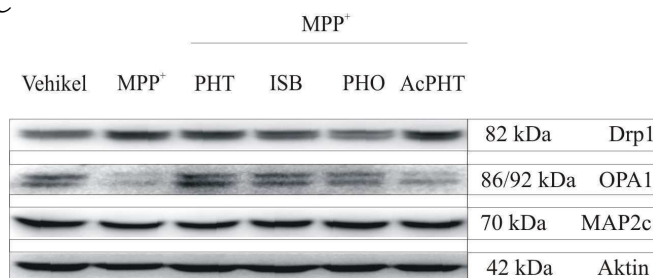
**A**



**B**



**C**



**Abb. 3.2.11.**

**Darstellung der Auswertung der mitochondrialen Morphologie in MPP<sup>+</sup>- und Rotenonbehandlungsgruppen der Primärzellkultur nach 6 und 24 h Inubation.**

A+B) Differenzierte, mit MitoTracker Red gefärbte Primärzellkulturen wurden mit 200 μM MPP<sup>+</sup> bzw. 150 nM Rotenon in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert, nach 6 h Behandlung mit MitoTracker Green gefärbt und bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Die Auswertung beinhaltet die morphologische Evaluierung der Morphologie alter (R) und neuer (G) Mitochondrien in den Behandlungsgruppen. Die mitochondriale Morphologie ist in vier Klassen unterteilt: fragmentiert (orange), normal (grau – leicht stäbchenförmig), fusioniert (schwarz – stäbchenförmig) und stark fusioniert (grün). R beschreibt alte Mitochondrien, gefärbt mit MitoTracker Red, G steht für MitoTracker Green, neue Mitochondrien.

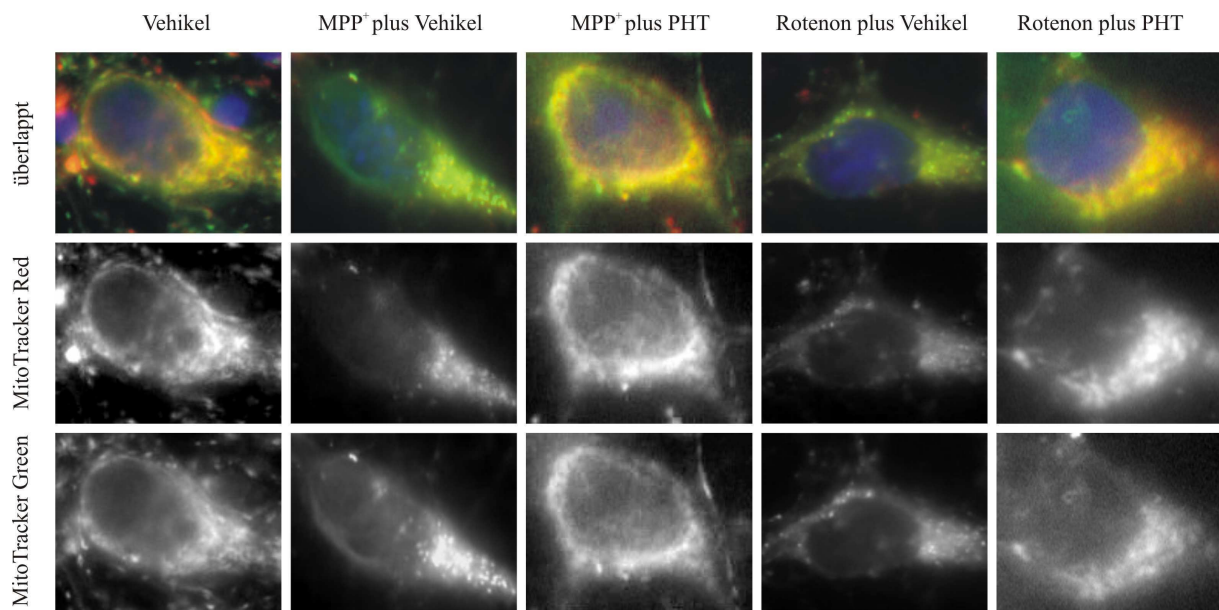
Im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt es in Toxinbehandlungen zu einer Fragmentierung der Mitochondrien. In Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT neigen Mitochondrien zur Fusion. Dieses Verhalten ist in der MPP<sup>+</sup>-Behandlung stärker ausgeprägt als in der Rotenon-Behandlung. Die Auswertung beinhaltet zwei Experimente mit der Auszählung von fünf Zellen in jeweils fünf Bildern.

C) Differenzierte Primärzellkulturen wurden für 24 h mit 200 μM MPP<sup>+</sup> in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT, ISB, PHO oder AcPHT inkubiert und der Immunoblot-Analyse unterzogen. Das Drp1-Signal wird bei 82 kDa detektiert, OPA1 besitzt 86 und 92 kDa schwere Banden, MAP2c wird bei 70 kDa detektiert, Aktin dient als Referenzprotein (42 kDa).

Nach 24 h Behandlung zeigen sich die Proteinspiegel des Drp1 in allen Toxinbehandlungen leicht hochreguliert mit der stärksten Induktion bei der alleinigen Toxinbehandlung oder Ko-Inkubation mit AcPHT, mit paralleler Herunterregulierung der OPA1-Proteinspiegel. Bisarylimine stabilisieren oder erhöhen das OPA1-Protein bei Ko-Inkubation mit Toxinen.

Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT zeigen nach 6 h ein stark ausgeprägtes mitochondriales Fusionsverhalten, Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT weisen eine eher stäbchenförmige Morphologie der Mitochondrien auf, ähnlich der mitochondrialen Morphologie un behandelter Zellen (siehe Abb. 3.2.10. und 3.2.11. A und B). Nach 12 h zeigen Mitochondrien in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelten Zellen in Anwesenheit von PHT einen eher stäbchenförmigen Phänotyp, manche

Mitochondrien bilden ein fusioniertes mitochondriales Netzwerk aus (siehe Abb. 3.2.12. bis 3.2.14.). Diese morphologischen Merkmale der Mitochondrien bleiben bis nach 48 h erhalten (siehe Abb. 3.2.15.). In frühen Phasen der Ko-Inkubation mit Toxinen und Bisaryliminen kommt es zur leichten Erhöhung der Drp1-Proteinspiegel, OPA1-Proteinspiegel werden verstärkt hochreguliert (nicht gezeigt) und senken nach 24 h Behandlung sowohl die Drp1- als auch die OPA1-Proteinspiegel etwa auf das Niveau der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.2.11.C.). So werden auch auf Proteinebene verstärkte Fragmentierungs- (siehe Toxinbehandlung) als auch Fusionsprozesse (siehe Ko-Inkubation mit Toxinen und Bisaryliminen) widerspiegelt.

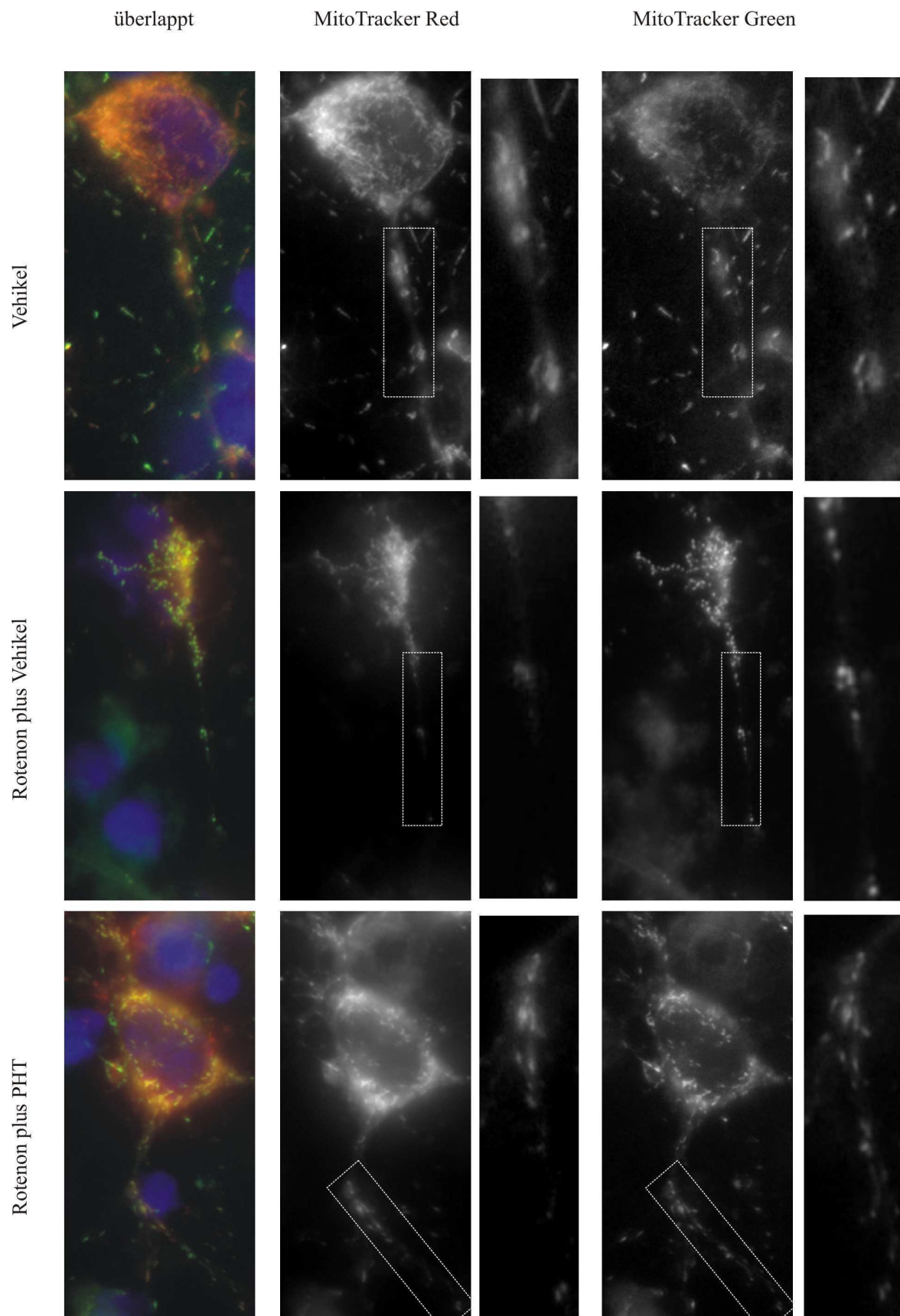


**Abb. 3.2.12. Darstellung der mitochondrialen Neubildung und mitochondrialer Morphologie nach 24 h in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen.**

Zur Darstellung der mitochondrialen Neubildung und der mitochondrialen Morphologie wurden differenzierte, mit MitoTracker Red gefärbte Primärzellkulturen mit 200  $\mu$ M bzw. 150 nM Rotenon in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert. Nach 24 h Behandlung wurden die Zellen mit MitoTracker Green gefärbt und bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Dargestellte Bilder zeigen Vergrößerungen repräsentativer Zellen in den Behandlungsgruppen.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigen MPP<sup>+</sup>-behandelte Zellen eine Induktion der grün gefärbten Mitochondrien (erhöhte Entstehung neuer Mitochondrien). Die Mitochondrien besitzen eine abgerundete, fragmentierte Morphologie. Rotenon-behandelte Zellen besitzen stark abgerundete, gespaltene Mitochondrien. Die Anzahl der grün und rot gefärbten Mitochondrien nimmt im Vergleich zu unbehandelten Zellen ab. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT führen zur leichten Induktion der mitochondrialen Neubildung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT zeigen einen fusionierten Mitochondrienphänotyp, Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT weisen eher stäbchenförmige Mitochondrien auf.





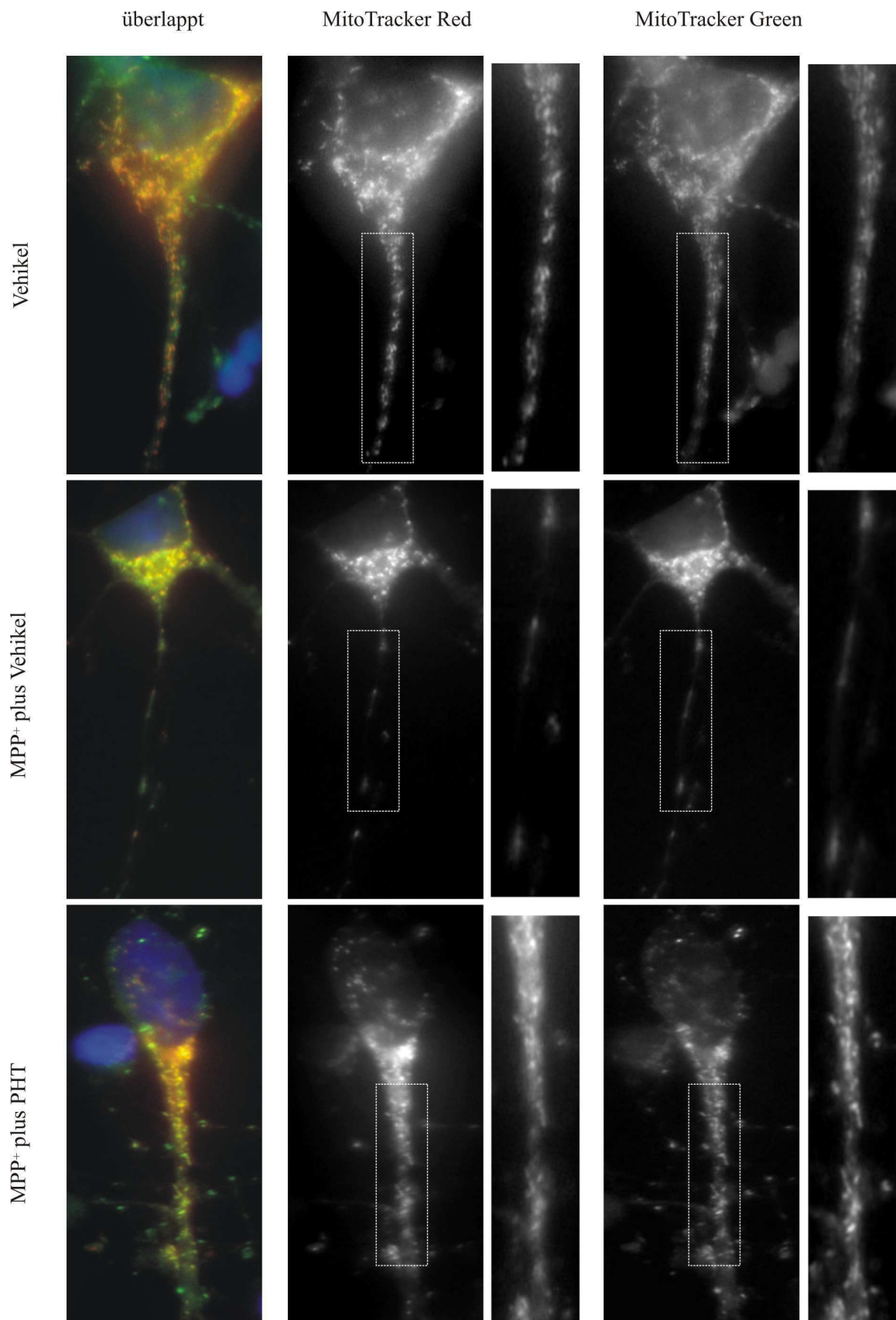
**Abb. 3.2.13. Darstellung mitochondrialer Morphologie und Verteilung innerhalb der Neuriten nach 12 h in Rotenon-Behandlungsgruppen.**

Zur Darstellung mitochondrialer Morphologie und Verteilung innerhalb der Neuronenfortsätze wurden differenzierte, mit MitoTracker Red gefärbte Primärzellkulturen mit 150 nM Rotenon in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert, nach 12 h Behandlung mit MitoTracker Green gefärbt und bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Dargestellte Bilder zeigen Vergrößerungen repräsentativer Zellen in den Behandlungsgruppen mit einer Vergrößerung der axonalen Struktur zur Rechten.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen, zeigen Rotenon-behandelte Zellen eine starke Reduktion der axonal lokalisierten Mitochondrien (Reduktion der mitochondrialen Beweglichkeit). Mitochondrien nehmen eine stark abgerundete Morphologie in Rotenon-Inkubationen an. Hingegen weisen die Axone der Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT vergleichbare Anzahl und Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Axone wie unbehandelte Zellen.

Die mitochondriale Verteilung in den Fortsätzen der Neurone ist nach 12 h Toxinbehandlung stark gestört (siehe Abb. 3.2.13. und 3.2.14.). Die Mehrheit der fragmentierten Mitochondrien verbleibt im Soma und am Axonhügel. Mitochondrien verteilen sich ungleichmäßig über das Axon mit mitochondrialen Ansammlungen und lokalen Lücken ohne mitochondriale Strukturen. Nach 48 h Toxinbehandlung erscheinen MitoTracker-positive, aggregierte Strukturen ohne jeglichen Verteilungscharakter (siehe Abb. 3.2.15.). Es kann gezeigt werden, dass die Beweglichkeit der Mitochondrien in Toxinbehandlungen stark abnimmt und Mitochondrien eher im Zellkörper versammelt werden. Die gestörte Beweglichkeit der Mitochondrien konnte an zeitversetzten Lebendaufnahmen bestätigt werden (nicht gezeigt).

In Ko-Inkubationen mit Toxin und PHT bleibt die mitochondriale Verteilung innerhalb der Neurone nach 12 h gleich der Verteilung in unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.2.13.). Nach 24 h Ko-Inkubation kommt es zu einem verstärkten Auftreten der Mitochondrien innerhalb des Axonhügels und der Fortsätze, der Zellkörper weist in individuellen Zellen eine verringerte Anzahl an Mitochondrien, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, auf (siehe Abb. 3.2.12. und 3.2.14.). Nach 48 h Toxin und PHT Behandlung erscheint die mitochondriale Verteilung ähnlich der alleinigen Toxin-Inkubation nach 12 h (vergleiche 3.2.13. und 3.2.15.). Die Mitochondrienverteilung zeigt innerhalb des Axons mitochondriale Ansammlungen und Lücken, frei an Mitochondrien, im Soma ist die Verteilung, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, verändert (siehe Bild 3.2.15.). Bis zu 48 h nach Toxinbehandlung kann die mitochondriale Mobilität in Anwesenheit von Bisaryliminen aufrechterhalten werden. Mitochondrien werden nicht selektiv zum Zellkörper transportiert, bleiben somit in entfernten Strukturen funktionstüchtig (siehe Abschnitt 4.1.2.).



**Abb. 3.2.14. Darstellung mitochondrialer Morphologie und Verteilung innerhalb der Neuriten nach 24 h in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen.**

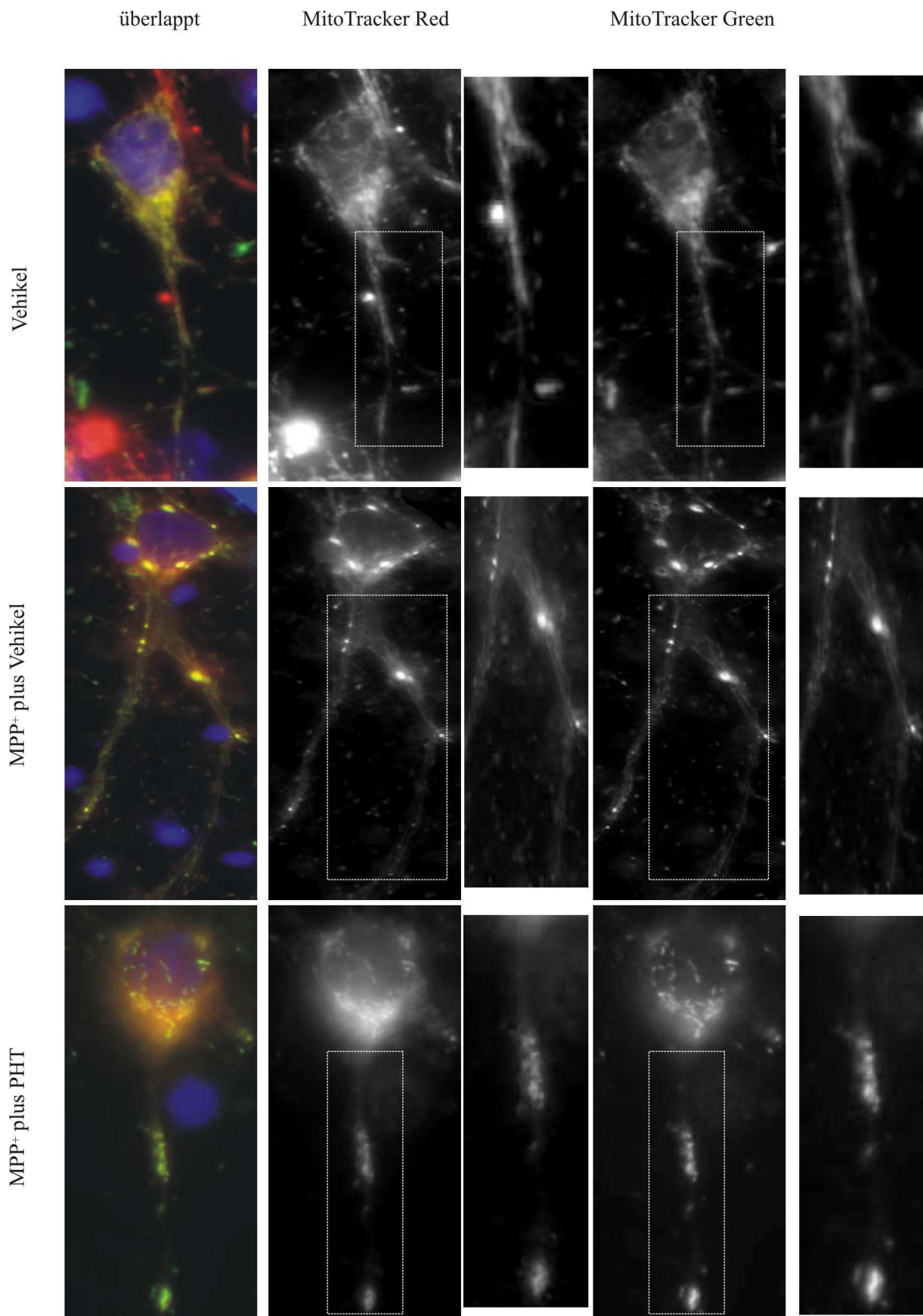
Zur Darstellung mitochondrialer Morphologie und Verteilung innerhalb der Neuronenfortsätze wurden differenzierte, mit MitoTracker Red gefärbte Primärzellkulturen mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert, nach 24 h Behandlung mit MitoTracker Green gefärbt und bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Dargestellte Bilder zeigen Vergrößerungen repräsentativer Zellen in den Behandlungsgruppen mit einer Vergrößerung der axonalen Struktur zur Rechten.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigen MPP<sup>+</sup>-behandelte Zellen eine starke Reduktion der axonal lokalisierten Mitochondrien nach 24 h (Reduktion der mitochondrialen Beweglichkeit). Mitochondrien erscheinen fragmentiert. Hingegen weisen die Axone der Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT vergleichbare Anzahl und Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Axone wie unbehandelte Zellen auf, im Zellkörper ist die mitochondriale Anzahl und Verteilung im Vergleich zu Kontrollbehandlungen verändert.

Die Neubildung der Mitochondrien wird durch die Toxinbehandlung hochreguliert. Es kommt zu einer verstärkten Bildung an neuen Mitochondrien, dargestellt mithilfe der zeitversetzten mitochondrialen Färbung, welche selektiv alte und neu entstandene mitochondriale Strukturen einbezieht (Zunahme der grünen MitoTracker-Strukturen, siehe Abb. 3.2.11.). Nach 24 h erscheint in MPP<sup>+</sup>-Behandlungen eine starke Zunahme an neu gebildeten Mitochondrien, mit paralleler leichter Abnahme der rot leuchtenden Strukturen. In Rotenon-Behandlungen kommt es nach 24 h Inkubation sowohl zu einem leichten Verlust des grünen als auch des roten mitochondrialen Signals (siehe Abb. 3.2.12.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT zeigen nach 24 h ähnliche Anzahl an grünen und roten mitochondrialen Signalen wie unbehandelte Zellen (siehe Abb. 3.11. und 3.2.14.).

Parallel konnte der Prozess des lysosomalen Abbaus mithilfe der LysoTracker-Färbung untersucht werden. Nach 24 und 48 h kommt es zu einer starken Induktion der lysosomalen Abbauprozesse in Toxin-behandelten Kulturen (siehe Abb. 3.2.16.). Die Lysosomen erscheinen voluminös und sind v.a. im Zellkörper organisiert und in weiten distalen Bereichen der Fortsätze. In Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT ist eine leichte Induktion lysosomaler Prozesse, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, festzustellen (siehe Abb. 3.2.16.).

Des Weiteren kann ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials bei Behandlung mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> nach 48 h detektiert werden. JC-1 aggregiert innerhalb von Mitochondrien mit hohem Membranpotential zu sog. J-Aggregaten, die rot fluoreszieren (Smiley et al., 1990). In der monomeren Form leuchtet JC-1 grün (siehe Abb. 3.2.17.). Die JC-1 Färbung zeigt in unbehandelten Zellen zwei Populationen an Mitochondrien, stäbchenförmige und fusionierte Mitochondrien mit einem hohen Membranpotential (rot) und kleine Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential (grün) (siehe Abb. 3.2.17.). Behandlung mit dem Entkoppler FCCP ermöglicht einen schnellen selektiven Verlust des Membranpotentials durch Aufhebung des Protonengradienten. Es kann dargestellt werden, dass bei dieser Behandlung die meisten Mitochondrien ihr Potential verlieren und grün leuchten. Eine ähnliche mitochondriale Situation ist in MPP<sup>+</sup>-Behandlungen nach 48 h zu detektieren. Nur wenige, stark

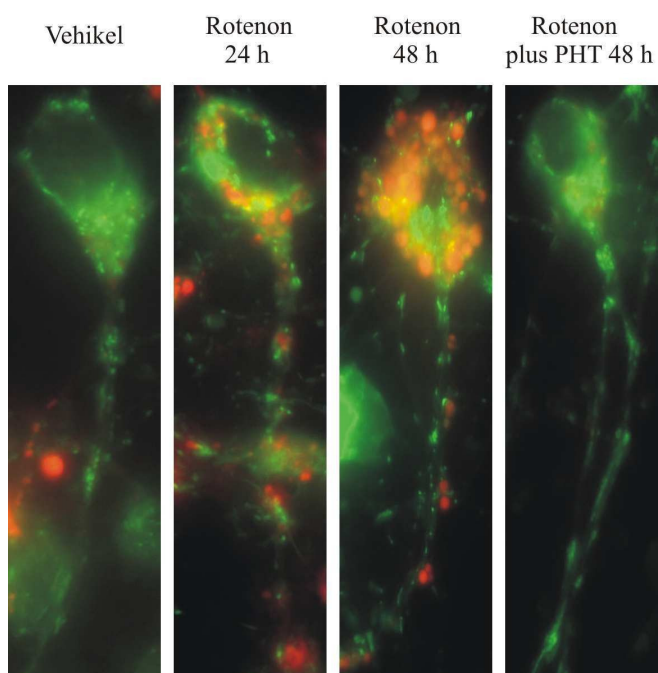
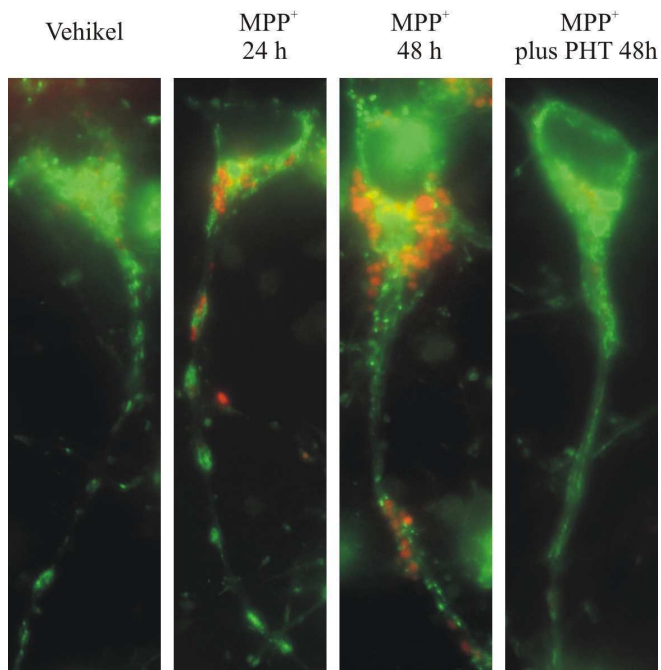




**Abb. 3.2.15. Darstellung mitochondrialer Morphologie und Verteilung innerhalb der Neuriten nach 48 h in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen.**

Zur Darstellung mitochondrialer Morphologie und Verteilung innerhalb der Neuronenfortsätze wurden differenzierte, mit MitoTracker Red gefärbte Primärzellkulturen mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert, nach 48 h Behandlung mit MitoTracker Green gefärbt und bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Dargestellte Bilder zeigen Vergrößerungen repräsentativer Zellen in den Behandlungsgruppen mit einer Vergrößerung der axonalen Struktur zur Rechten.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigen MPP<sup>+</sup>-behandelte Zellen eine starke Reduktion der axonal lokalisierten Mitochondrien (Reduktion der mitochondrialen Beweglichkeit). Die Mitochondrien nehmen eine stark abgerundete Morphologie in MPP<sup>+</sup>-Inkubationen an oder fusionieren zu großen MitoTracker-positiven Strukturen. Axone der Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT reduzieren die Anzahl der Mitochondrien und die Beweglichkeit scheint zu einem gewissen Ausmaß gestört. Im Soma sieht die Morphologie der Mitochondrien stäbchenförmig aus, im axonalen Bereich runden sich die Organellen eher ab.

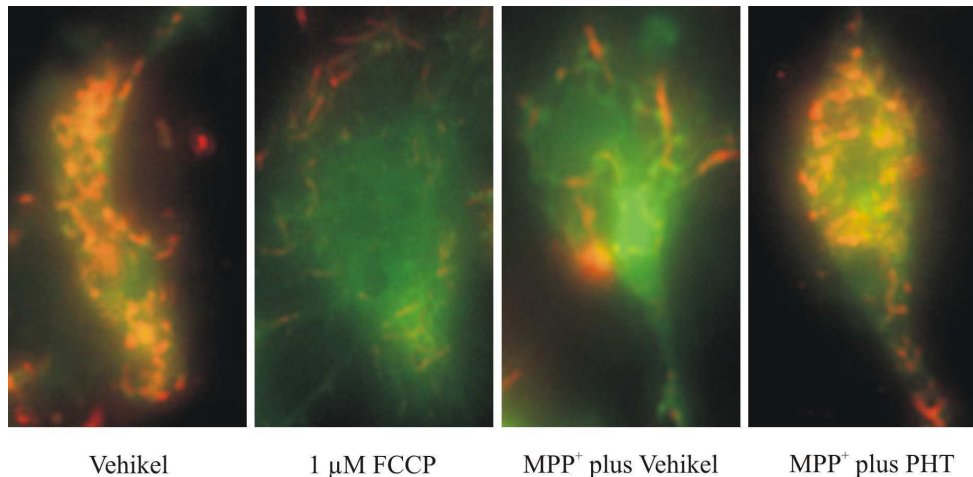


**Abb. 3.2.16. Darstellung der Mitochondrien und Lysosomen nach 24 und 48 h in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen.**

Zur Darstellung der lysosomalen und mitochondrialen Situation in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen, wurden differenzierte, mit MitoTracker (grün) gefärbte Primärzellkulturen mit 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> oder 150 nM Rotenon in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert, nach 24 und 48 h Behandlung mit LysoTracker gefärbt (rot) und bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Dargestellte Bilder zeigen Vergrößerungen repräsentativer Zellen in den Behandlungsgruppen.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt es in Toxin-behandelten Zellen zu einer starken Induktion lysosomaler Abbauprozesse. Es erscheinen große lysosomale Strukturen v.a. im Zellkörper, aber auch in distalen Fortsätzen. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT weisen nur eine leichte Induktion lysosomaler Prozesse auf.

fusionierte und verzweigte Mitochondrienstrukturen erscheinen rot. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT zeigen viele große stäbchenförmige und fusionierte Mitochondrien mit hohem Membranpotential. Die Anzahl der grün gefärbten kleinen Mitochondrien nimmt leicht im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu (siehe Abb. 3.2.17.).



**Abb. 3.2.17. Darstellung der JC-1 Färbung in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen der Primärzellkultur zur Evaluierung des mitochondrialen Membranpotentials.**

Differenzierte Primärzellkulturen wurden mit 200 µM MPP<sup>+</sup> in An- oder Abwesenheit von 50 nM PHT inkubiert, nach 48 h mit JC-1 gefärbt und bei 400x Vergrößerung mit den Exzitations-/Emissionsfilterpaaren 490/510 nm (grün) und 535/610 nm (rot) aufgenommen. Des Weiteren wurden Zellen mit 1 µM FCCP (Carbonyl-cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; Entkoppler) für 4 h inkubiert und mit JC-1 gefärbt. JC-1 aggregiert innerhalb von Mitochondrien mit hohem Membranpotential zu sog. J-Aggregaten, welche rot fluoreszieren. In der monomeren Form leuchtet JC-1 grün.

Mitochondrien der Kontrollzellen weisen zwei Populationen an Mitochondrien auf, große fusionierte Mitochondrien mit hohem Membranpotential (rot), sowie kleine Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential (grün). Behandlung mit dem Entkoppler FCCP führt zur drastischen Senkung des Membranpotentials in fast allen Mitochondrien. Eine ähnliche Situation ist in MPP<sup>+</sup> behandelten Zellen nach 48 h zu beobachten. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT weisen nach 48 h in der Mehrzahl der Mitochondrien einen ähnlichen JC-1 Phänotyp wie unbehandelte Zellen mit einer leichten Zunahme an Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential auf.

Bisarylimine ermöglichen in nanomolaren Konzentrationen eine Neuroprotektion gegenüber den beiden Parkinson-Toxinen und Komplex I Inhibitoren, MPP<sup>+</sup> und Rotenon, als auch gegenüber einer Glutathiondepletion, sowohl in der sensiblen dopaminergen Neuronenpopulation des ventralen Mittelhirns als auch der gesamten neuronalen Primärkultur. Das zelluläre antioxidative Abwehrsystem wird durch Biarylimine stabilisiert und die mitochondriale Integrität erhalten. Im nächsten Abschnitt werden Bisarylimine in einem *in vivo* Modell auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften hin untersucht.

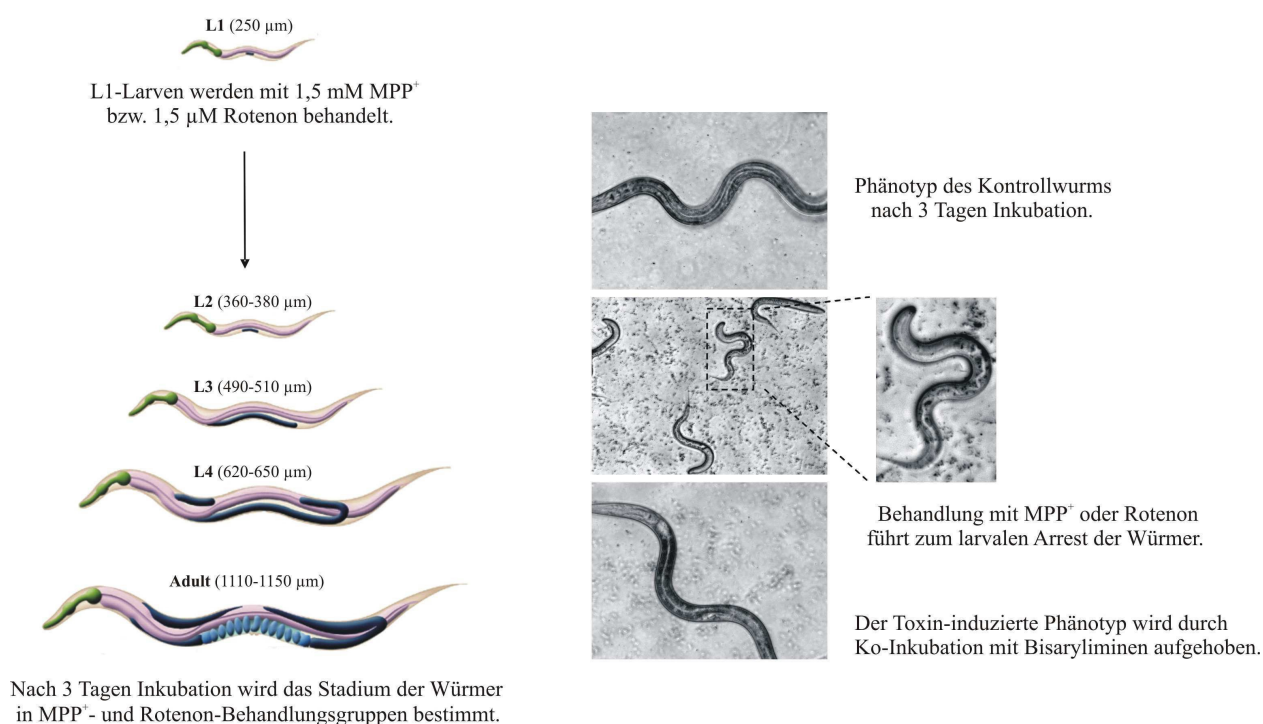
### 3.3. *Caenorhabditis elegans* zur Untersuchung des protektiven Potentials von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin gegen Parkinson-Toxin induzierten Phänotyp *in vivo*

*C. elegans* wird in dieser Arbeit als Modellorganismus zur Analyse des protektiven Charakters der untersuchten Substanzen *in vivo* genutzt. Hierfür werden MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induzierte *C. elegans* Modelle etabliert, welche charakteristische Phänotypen in L1-Larven (Braungart et al., 2004) bzw. adulten *C. elegans* einführen. Im MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-L1-Larvenmodell wird mithilfe der Toxine ein Entwicklungsarrest induziert, protektive Substanzen sollten diesen Phänotyp aufheben. Mithilfe dieses Modells können potentielle symptomatische und neuroprotektive PD-Therapeutika evaluiert und protektive Konzentrationen der untersuchten Substanzen *in vivo* bestimmt werden (Braungart et al., 2004). Des Weiteren wird die dopaminerge Population in Toxin-behandelten Würmern untersucht. Hierfür wird eine transgene Wurmlinie erstellt mit dopaminerger *DsRed2*-Expression und pan-neuronaler *CFP*-Expression. Mithilfe dieser Wurmlinie kann die Wirkung der Toxine und Bisarylimine spezifisch auf dopaminerge Neurone analysiert werden, parallel zur Untersuchung des Gesamtnervensystems. Das dopaminerge System wird in der transgenen *C. elegans* Linie in MPP<sup>+</sup>- bzw. Rotenon-behandelten L1-Larven und adulten Würmern analysiert in Ko-Inkubation mit den potentiell protektiven Substanzen. Zur Darstellung des Wirkungsmechanismus der Bisarylimine (PHT, ISB und PHO) *in vivo* werden neben den bislang analysierten N-substituierten Bisaryliminstrukturen, AcPHT, CPRZ und PRZ, weitere Substanzen untersucht. CPRZ, PRZ und Promethazin (PMZ) stellen nicht-antioxidative N-substituierte Strukturanaloga des Phenothiazins dar mit neuroleptischer Wirkung (siehe Abb. 1.11.), mithilfe dieser Strukturen kann der antioxidative, nicht Rezeptor-vermittelte Protektionsmechanismus der Bisarylimine *in vivo* dargestellt werden. Parallel zu typischen Neuroleptika (Dopaminrezeptor-Antagonisten) werden den Bisaryliminen atypische Neuroleptika, Clozapin (CLOZ) und Risperidon (RISP), gegenübergestellt. Zusätzlich werden Dopamin (DA) und Apomorphin (Apo) (Dopaminrezeptor-Agonisten) untersucht, welche eine Aufhebung des fehlenden dopaminergen Einbezugs in das Gesamtnervensystem ermöglichen (symptomatische Therapeutika) und hiermit den Toxin-induzierten Phänotyp verhindern können. Mit Dopaminrezeptor-Agonisten können die untersuchten *C. elegans* Modelle als Parkinson-Modelle bestätigt werden. Bekannte Kontroll-Antioxidantien,  $\beta$ -Catechin (Cat), Epigallocatechingallat (EGCG) und  $\alpha$ -Tocopherol (VitE), werden zur Darstellung des antioxidativen Protektionsmechanismus, sowie zur Einschätzung der Effektivität von PHT, ISB und PHO genutzt.



### 3.3.1. Das Parkinson-Toxin induzierte L1-Larvenmodell

Das „Parkinson-Toxin induzierte L1-Larvenmodell“ stellt ein etabliertes System zur Charakterisierung des protektiven Potentials von Parkinson-Therapeutika dar (Braungart et al., 2004). Synchronisierte L1-Larven werden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5 mM MPP<sup>+</sup> oder 1,5  $\mu$ M Rotenon inkubiert und der Entwicklungsprozess der Larven analysiert. Nach drei Inkubationstagen entwickeln sich unbehandelte Wurmulturen zu adulten Individuen, hingegen bleiben MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelte Larven in der Entwicklung arretiert (siehe Abb. 3.3.1.). Toxin-behandelte Würmer verbleiben in ihrer anfänglichen Größe auf dem L1/L2-Larvenniveau. Zusätzlich wird ein charakteristischer Bewegungsphänotyp in den Toxin-behandelten Würmern beobachtet, welcher sich als ein Sich-Einrollen (engl. curling) beschreiben lässt. Die Analyse protektiver Substanzen erfolgt anhand des Entwicklungsstatus der Würmer nach drei Inkubationstagen (siehe Abb. 3.3.1.).

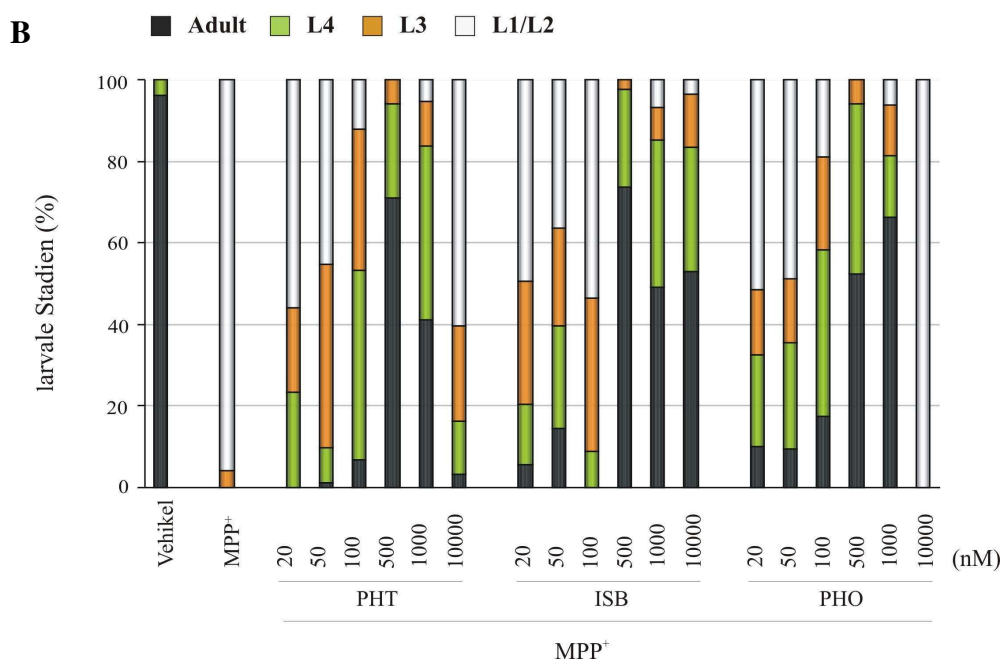
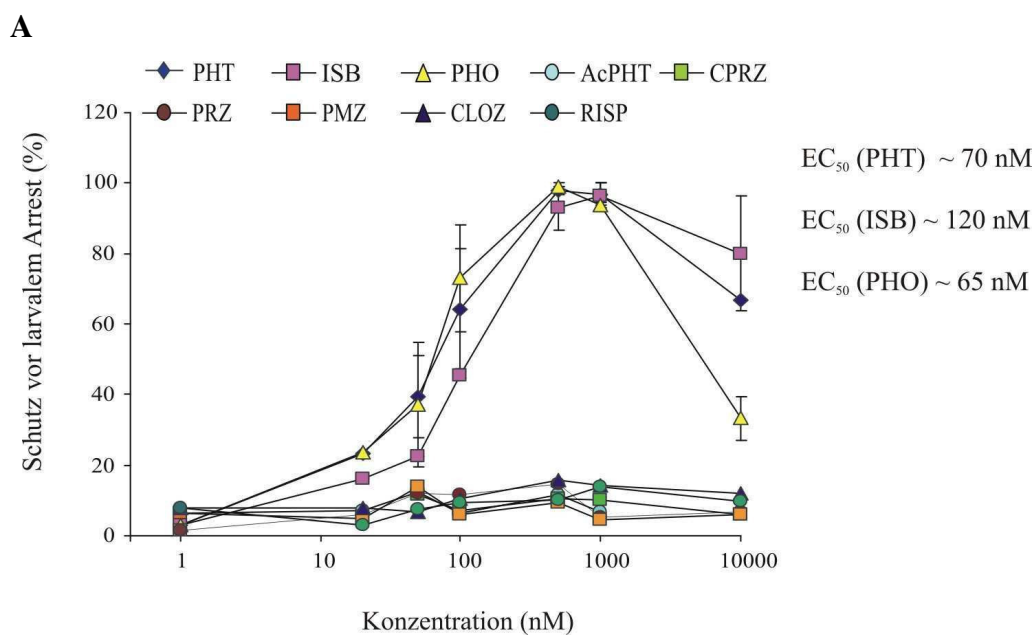


**Abb. 3.3.1.** Darstellung des larvalen Parkinson-Toxin-Modells des *C. elegans*.

Links sind Larvalstadien des *C. elegans* dargestellt (verändert nach <http://www.wormatlas.org/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>). Synchronisierte L1-Larven, die in Flüssigkultur mit 1,5 mM MPP<sup>+</sup> bzw. 1,5  $\mu$ M Rotenon behandelt werden, zeigen einen larval-arretierten Phänotyp. Nach drei Tagen entwickeln sich unbehandelte L1-Larven zu adulten Individuen (siehe rechts oberes Bild). Toxin-behandelte L1-Larven zeigen nach drei Tagen Inkubation keinen Entwicklungsfortschritt (siehe rechts mittleres Bild) und weisen des Weiteren einen charakteristischen Bewegungsphänotyp auf. Dieser Bewegungsphänotyp kann als ein Sich-Einrollen (engl. curling) beschrieben werden. In diesem Parkinson-Toxin-induzierten Modell werden Behandlungsgruppen auf ihren Entwicklungsfortschritt hin nach drei Tagen analysiert.

### 3.3.1.1. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin verhindern die MPP<sup>+</sup>-Effekte im L1-Larvenmodell

Im MPP<sup>+</sup>-induzierten L1-Larvenmodell wird der typische L1/L2-larvale Arrest beobachtet zusammen mit dem veränderten Bewegungsphänotyp (siehe Abb. 3.3.2. A und B). Unter Einsatz der Bisarylimine mit freier Iminogruppe wird eine Weiterentwicklung der Larven im MPP<sup>+</sup>-Modell ermöglicht (siehe Abb. 3.3.2. A und B).

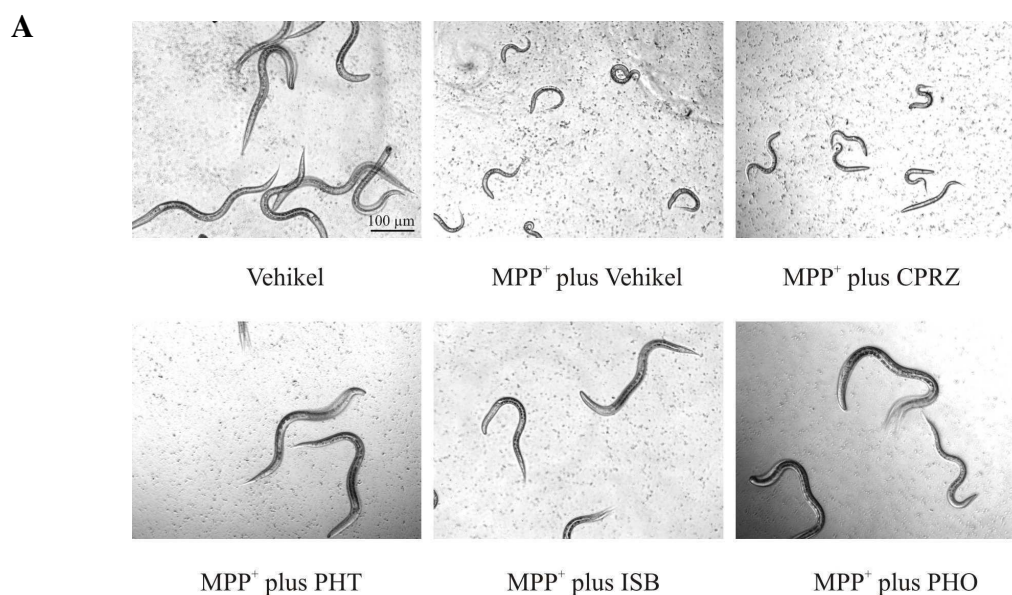


**Abb. 3.3.2. Nanomolare Konzentrationen an PHT, ISB und PHO schützen MPP<sup>+</sup>-behandelte L1-Larven vor larvalem Arrest.**

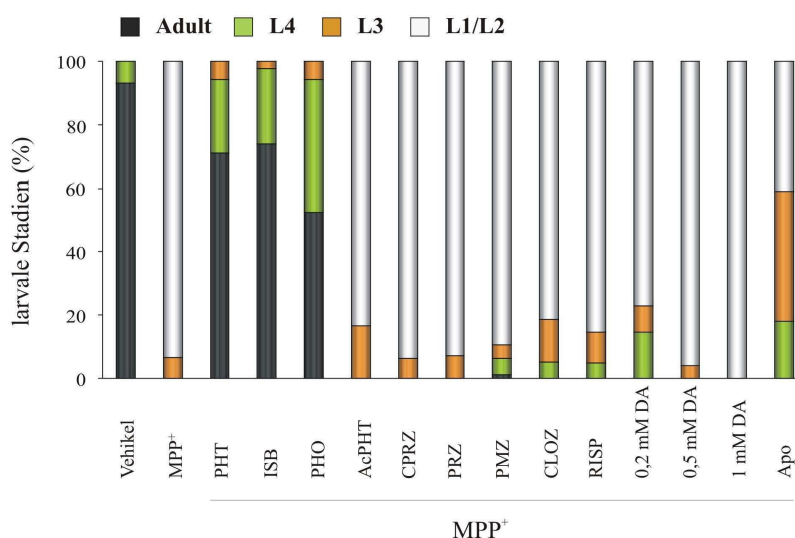
Darstellung der Auswertung der Protektions-Assays des L1-Larven MPP<sup>+</sup>-Modells. Synchronisierte L1-Larven wurden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5 mM MPP<sup>+</sup> und 20 bis 10000 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ oder RISP für drei Tage inkubiert und das Entwicklungsstadium der Würmer anhand von Bildern bei 100x Vergrößerung bestimmt. A) Darstellung der Protektions-Assays der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen. Schutz vor larvalem Arrest, welches die y-Achse beschreibt, meint den Prozentsatz an Würmern in der jeweiligen Behandlungsgruppe, die weiterentwickelt sind als L1/L2-Stadium. B) Darstellung der Larvalstadien in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen inkubiert in Anwesenheit von PHT, ISB oder PHO. Larvalstadien unterteilen sich in Adult (schwarze Balken), L4 (grüne Balken), L3 (orangene Balken) und L1/L2 (weiße Balken).

Unbehandelte Würmer entwickeln sich in der angegebenen Zeit zu adulten Würmern. MPP<sup>+</sup>-behandelte L1-Larven bleiben arretiert. PHT, ISB und PHO zeigen ab 50 nM leichten Schutz gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität und erreichen EC<sub>50</sub>-Werte bei etwa 70 nM für PHT und PHO und 120 nM für ISB. In einer Konzentration von 100 bis 1000 nM ist der beste Schutz gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität zu verzeichnen. In diesen Konzentrationen und v.a. bei 500 nM PHT, ISB und PHO entwickeln sich die MPP<sup>+</sup>-behandelten Larven bis ins L4- und adulte Stadium, somit wird bei diesen Konzentrationen die Toxinwirkung in Würmern vollständig detoxifiziert. N-substituierte Strukturanaloga und Neuroleptika zeigen keine protektiven Effekte. Alle Substanzen weisen einen zusätzlichen toxischen Effekt gegenüber MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmern in Konzentrationen höher als 40 µM auf. Die Auswertung umfasst fünf unabhängige Experimente mit Bestimmung der Larvalstadien in jeweils 40 Würmern in Triplikat.

Ko-Inkubationen mit PHT, ISB oder PHO zeigen einen sehr deutlichen Schutz gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität in Konzentrationen zwischen 100 und 1000 nM. 500 nM scheint die Konzentration zu sein, bei welcher *in vivo* die höchste protektive Wirkung erreicht werden kann (siehe Abb. 3.3.2.B.). In dieser Konzentration befinden sich die meisten Würmer im L4- oder adulten Stadium (siehe Abb. 3.3.2.B.). Das Verlassen des larval-arretierten Phänotyps unter diesen Inkubationsbedingungen zeigt auf, dass Bisarylimine *in vivo* vor MPP<sup>+</sup>-Toxizität schützen und die Wirkung dieses Toxins vollständig verhindern. Die halbmaximalen Konzentrationen, bei welchen ein Entkommen der Würmer aus dem MPP<sup>+</sup>-induzierten Entwicklungsarrest ermöglicht wird, belaufen sich auf etwa 70 nM für PHT und PHO und 120 nM für ISB.



B



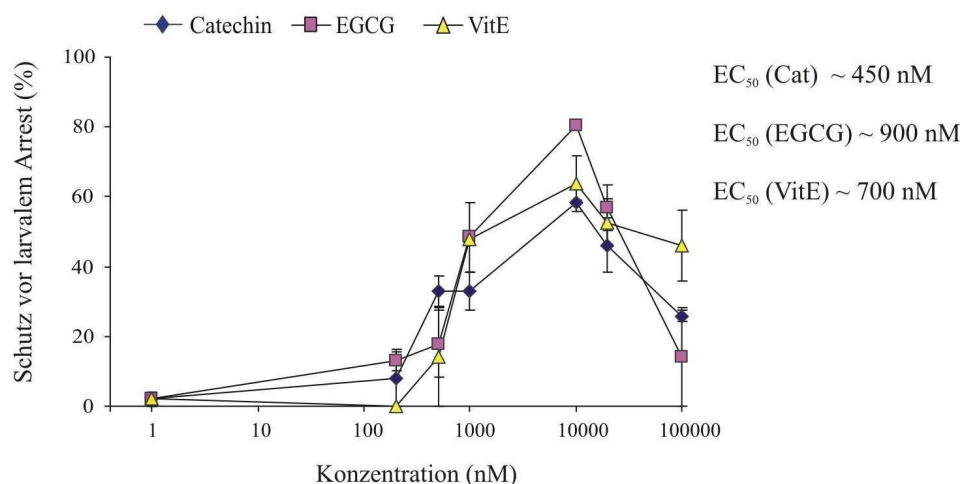
**Abb. 3.3.3. Darstellung der Larvalstadien in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen des L1-Larvenmodells bei Ko-Inkubation mit 500 nM an untersuchten Substanzen.**

Dargestellt werden die larvalen Stadien in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen ko-inkubiert mit 500 nM an untersuchten Substanzen. Hierfür wurden synchronisierte L1-Larven in Flüssigkultur mit 1,5 mM MPP<sup>+</sup> inkubiert in Anwesenheit von 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ, RISP oder Apo oder 0,2 bis 1 mM DA. A) Darstellung repräsentativer Bilder der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen nach drei Tagen Inkulturnahme. Bilder sind mit 100x Vergrößerung aufgenommen, der Maßstab definiert 100 µm. Repräsentativ für die Behandlungsgruppen mit Neuroleptika oder Dopamin wird die Ko-Inkubation mit MPP<sup>+</sup> und CPRZ dargestellt. B) Auswertung der Larvalstadien der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen ko-inkubiert mit 500 nM an untersuchten Substanzen. Die Larvalstadien unterteilen sich in Adult (schwarze Balken), L4 (grüne Balken), L3 (orangene Balken) und L1/L2 (weiße Balken) und wurden anhand von Bildern bei 100x Vergrößerung bestimmt. Die Auswertung beinhaltet fünf unabhängige Experimente mit jeweils 40 Würmern in Triplikat.

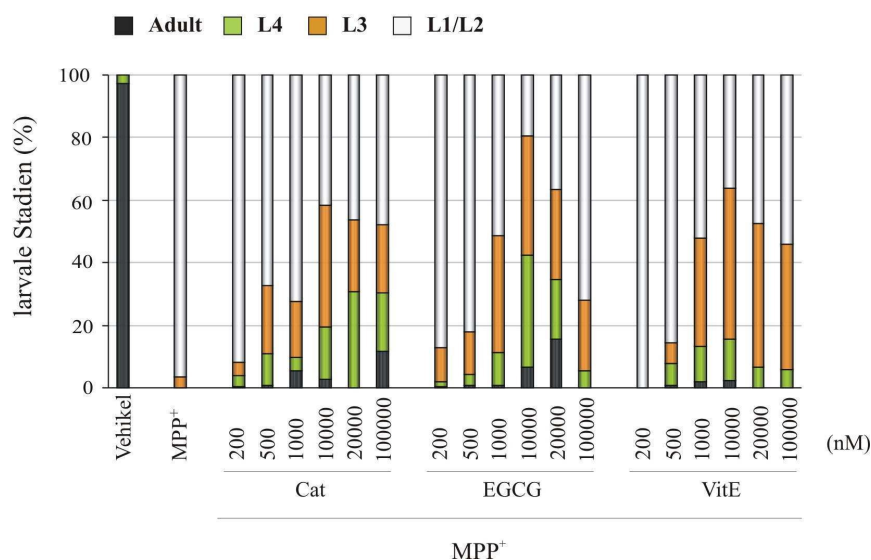
In Abbildung 3.3.3.A. werden repräsentative Bilder der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen nach drei Tagen Kultur dargestellt. MPP<sup>+</sup>-behandelte Larven sind larval-arretiert und weisen den charakteristischen Bewegungsphänotyp auf. PHT, ISB und PHO ermöglichen in MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmern ein Fortschreiten der Entwicklung, welches in einer großen Anzahl der Würmer bis hin zum adulten Stadium ermöglicht wird. Etwa 60 bis 70 % der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen, ko-inkubiert mit 500 nM PHT, ISB oder PHO, weisen eine Entwicklung bis hin zum adulten Stadium auf, etwa 30 bis 40 % entwickeln sich bis zum L4-Stadium und nur wenige L1-Larven erreichen unter diesen Bedingungen nach drei Tagen das L3-Stadium (siehe Abb. 3.3.3.B.). Der charakteristische Bewegungsphänotyp wird mithilfe der Bisarylimine aufgehoben. Ko-Inkubationen mit Apomorphin (Apo), einem symptomatischen Parkinson-Therapeutikum, ermöglicht eine Fortentwicklung in etwa 60 bis 70 % der larval-arretierten Würmer, die meisten Larven befinden sich im L3- oder L4-Stadium (siehe Abb. 3.3.3.B., beispielhaft dargestellt für 500 nM). Die Weiterentwicklung der Würmer bei Ko-Inkubation mit Apo bestätigt dieses Modell als Parkinson-Modell. Ko-Inkubationen mit dem nicht-antioxidativen Strukturanalogen, AcPHT, oder mit den Neuroleptika, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ und RISP, zeigen nur bei einer minimalen Anzahl der MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmer eine leicht protektive Wirkung (siehe Abb. 3.3.3.B.; repräsentativ dargestellt für die Ko-Inkubation mit MPP<sup>+</sup> und CPRZ, siehe Abb. 3.3.3.A.). Unter diesen Bedingungen wird der MPP<sup>+</sup>-induzierte Bewegungsphänotyp beibehalten. Die untersuchten Konzentrationen des Dopamins (DA; Dopaminrezeptor-Agonist) ermöglichen nur in

5 bis 15 % der Gesamtpopulation eine Weiterentwicklung, mit Erreichen des L3-Stadiums und in seltenen Fällen des L4-Stadiums (siehe Abb. 3.3.3.B.). Kontroll-Antioxidantien wurden auf ihr protektives Potential hin untersucht. Cat, EGCG und VitE sind bekannte Antioxidantien und dienen in den Untersuchungen als antioxidative Kontrollsubstanzen zur Einschätzung des relativen protektiven Potentials von PHT, ISB und PHO. Wie in Abbildung 3.3.4. A und B dargestellt wird, schützen Cat, EGCG und VitE vor MPP<sup>+</sup>-induziertem larvalen Arrest. Diese Antioxidantien ermöglichen in bis zu 60 bis 80 % der MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmer deren Weiterentwicklung. Die EC<sub>50</sub>-Werte liegen bei 450 nM für Cat, und 700 bis 900 nM für EGCG und VitE. Die protektive Wirkung zeigt sich jedoch bei diesen Antioxidantien nicht vollständig ausgeprägt. Die Entwicklungsstadien, die mithilfe dieser Strukturen erreicht werden, liegen eher zwischen dem L3/L4-Stadium (siehe Abb. 3.3.4.B.), wohingegen PHT, ISB und PHO in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen die Entwicklung bis hin zum adulten Stadium ermöglichen (siehe Abb. 3.3.3.B.). Hiermit kann *in vivo* dargestellt werden, dass Bisarylimine als antioxidative Substanzen in niedrigen Konzentrationen vollständig die Wirkung des MPP<sup>+</sup> auf den Gesamtorganismus detoxifizieren.

A



B



**Abb. 3.3.4. Darstellung der Auswertung der Ko-Inkubationen von L1-Larven mit MPP<sup>+</sup> und Cat, EGCG oder VitE.**

Darstellung der Auswertung der Protektions-Assays des L1-Larven MPP<sup>+</sup>-Modells bei Ko-Inkubation mit Cat, EGCG und VitE. Synchronisierte L1-Larven wurden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5 mM MPP<sup>+</sup> und 0,2 bis 100 µM Cat, EGCG oder VitE für drei Tage inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Entwicklungsstadium der Würmer anhand von Bildern in 100x Vergrößerung bestimmt. A) Darstellung der Protektions-Assays der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen. Schutz vor larvalem Arrest, welches die y-Achse beschreibt, meint den Prozentsatz an Würmern in der jeweiligen Behandlungsgruppe, die weiterentwickelt sind als L1/L2-Stadium. B) Darstellung der Larvalstadien in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen inkubiert in Anwesenheit von Cat, EGCG oder VitE. Die Larvalstadien unterteilen sich in Adult (schwarze Balken), L4 (grüne Balken), L3 (orangene Balken) und L1/L2 (weiße Balken).

Unbehandelte Würmer entwickeln sich in der angegebenen Zeit zu adulten Würmern. MPP<sup>+</sup>-behandelte L1-Larven bleiben arretiert. Cat, EGCG und VitE zeigen ab 500 nM leichten Schutz gegenüber der MPP<sup>+</sup>-Toxizität und erreichen EC<sub>50</sub>-Werte bei etwa 450 nM für Cat, 700 nM für VitE und 900 nM für EGCG. Die Protektion ist jedoch nicht vergleichbar ausgeprägt, wie bei Behandlungen mit PHT, ISB oder PHO. 10 bis 20 µM scheinen protektive Konzentrationen dieser antioxidativen Strukturklassen darzustellen. Die meisten Würmer befinden sich bei diesen Konzentrationen im L3- bzw. L4-Stadium, das adulte Stadium wird mithilfe dieser Antioxidantien meist nicht erreicht. Alle Substanzen weisen einen zusätzlichen toxischen Effekt gegenüber MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmern in Konzentrationen höher als 100 µM auf. Die Auswertung umfasst zwei unabhängige Experimente mit Bestimmung der Larvalstadien in jeweils 40 Würmern in Triplikat.

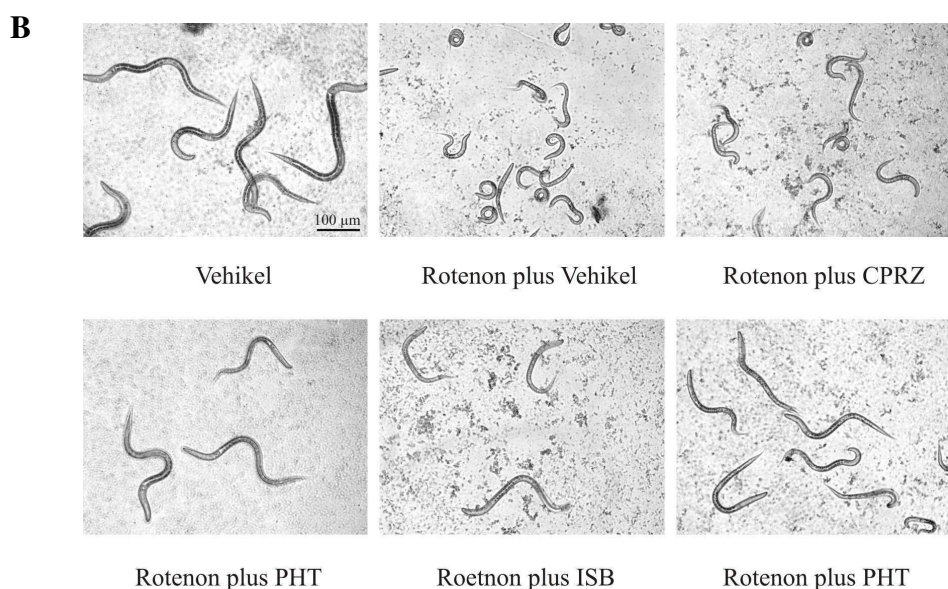
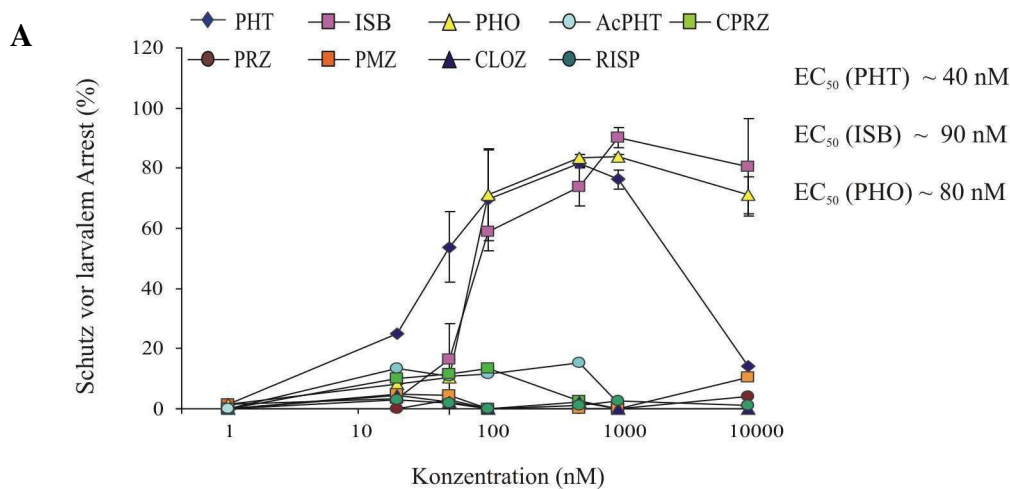
**3.3.1.2. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin verhindern die Rotenon-Effekte im L1-Larvenmodell**

Im Rotenon-induzierten L1-Larvenmodell wird der typische L1/L2-larvale Arrest beobachtet zusammen mit dem veränderten Bewegungsphänotyp (siehe Abb. 3.3.5. A bis C). Unter Einsatz der Bisarylimine mit freier Iminogruppe wird eine Weiterentwicklung der Larven im Rotenon-Modell ermöglicht und der Bewegungsphänotyp wird aufgehoben (siehe Abb. 3.3.5. A bis C). Rotenon scheint einen stärkeren Effekt auf L1-Larven auszuüben als MPP<sup>+</sup>. PHT, ISB und PHO besitzen eine protektive Wirkung gegenüber Rotenon in L1-Larven, die Toxizität des Rotenons kann mit Antioxidantien jedoch nicht vollständig aufgehoben werden. 500 nM PHT zeigen auch bei Rotenon-Behandlung gute protektive Eigenschaften. Mit über 60 % an adulten Würmern und 30 % L4-Larven, hebt diese antioxidative Struktur fast das gesamte Spektrum der Rotenon-Toxizität auf (siehe Abb. 3.3.5. A und B). Ko-Inkubationen mit PHO und ISB weisen nur eine geringe Anzahl an adulten Würmern nach drei Inkubationstagen auf, den größten Anteil bilden hier L4-Larven mit etwa 70 % (siehe Abb. 3.3.5. A und B). Bisarylimine mit freier Iminogruppe zeigen eine protektive Wirkung ab 50 nM und erreichen EC<sub>50</sub>-Werte bei 40 nM für PHT und etwa 90 nM für ISB und PHO. Neuroleptika und Dopamin zeigen nur in einer geringen Anzahl der Rotenon-behandelten Würmer eine geringe protektive Wirkung (siehe Abb. 3.3.5. A bis C).

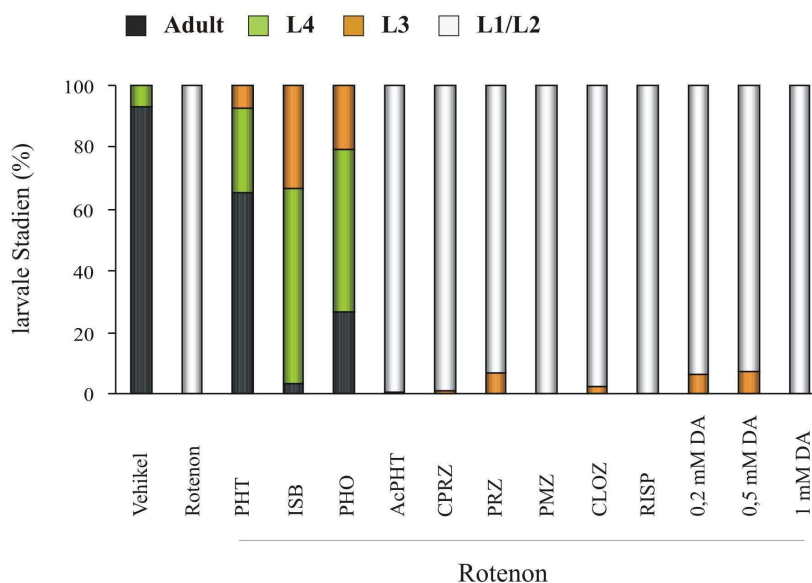
Die bekannten Kontroll-Antioxidantien, Cat, EGCG und VitE, werden auf ihr protektives Potential gegenüber der Toxizität des Rotenons untersucht und ermöglichen eine relative Einschätzung des protektiven Potentials von PHT, ISB und PHO. Cat, EGCG und VitE schützen Rotenon-behandelte Würmer vor larvalem Arrest in Konzentrationen höher als 10 µM, erreichen die halbmaximale



protektive Wirkung bei etwa 14  $\mu\text{M}$  für VitE, für Cat und EGCG liegen die  $\text{EC}_{50}$ -Werte bei 50  $\mu\text{M}$  (siehe Abb. 3.3.6.). Konzentrationen, die bis zu 60 und 80 % der Würmer vor der Rotenon-Toxizität schützen, liegen bei 100  $\mu\text{M}$ . Die meisten Würmer befinden sich bei diesen Konzentrationen im L3- bzw. L4-Stadium, das adulte Stadium wird mithilfe dieser Antioxidantien meist nicht erreicht (nicht gezeigt). Hiermit ist gezeigt, dass Bisarylimine in Konzentrationen, die im Vergleich mit bekannten antioxidativen Strukturen zwei bis drei Potenzen niedriger liegen, effizientere protektive Eigenschaften *in vivo* gegenüber Parkinson-Toxinen aufweisen.



C

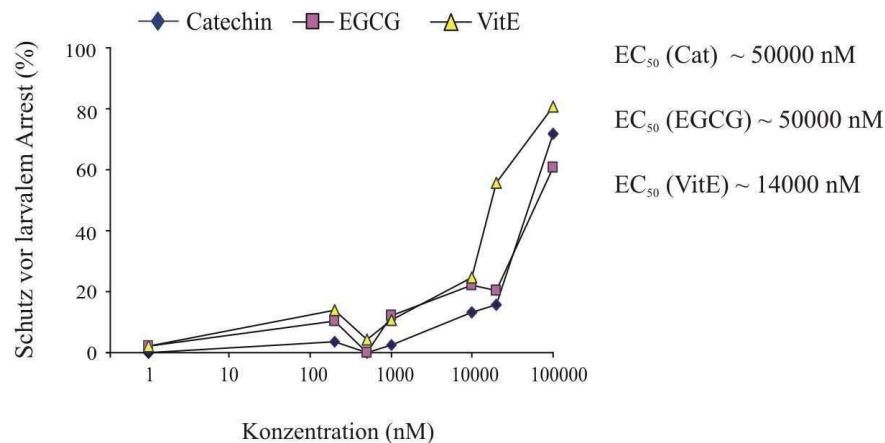


**Abb. 3.3.5. PHT, ISB und PHO schützen Rotenon-behandelte L1-Larven vor larvalem Arrest in nanomolaren Konzentrationen.**

Darstellung der Auswertung der Protektions-Assays des L1-Larven Rotenon-Modells. Synchronisierte L1-Larven wurden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5  $\mu\text{M}$  Rotenon und 20 nM bis 10  $\mu\text{M}$  (A) oder 500 nM (B+C) PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ, RISP oder 0,2 bis 1 mM DA für drei Tage inkubiert, die Würmer bei 100x Vergrößerung aufgenommen und die Entwicklungsstadien in den Behandlungsgruppen bestimmt. A) Schutz vor larvalem Arrest, welches die y-Achse beschreibt, meint den Prozentsatz an Würmern in der jeweiligen Behandlungsgruppe, die weiterentwickelt sind als L1/L2-Stadium. B) Darstellung repräsentativer Bilder der Rotenon-Behandlungsgruppen bei Ko-Inkubation mit 500 nM an untersuchten Substanzen nach drei Tagen Inkulturnahme. Bilder sind mit 100x Vergrößerung aufgenommen, der Maßstab definiert 100  $\mu\text{m}$ . Repräsentativ für Behandlungsgruppen mit Neuroleptika und DA wird die Ko-Inkubation mit Rotenon und CPRZ dargestellt. C) Auswertung der Larvalstadien der Rotenon-Behandlungsgruppen ko-inkubiert mit 500 nM an untersuchten Substanzen. Die Larvalstadien unterteilen sich in Adult (schwarze Balken), L4 (grüne Balken), L3 (orangene Balken) und L1/L2 (weiße Balken) und wurden anhand von Bildern bei 100x Vergrößerung bestimmt.

Unbehandelte Würmer entwickeln sich in der angegebenen Zeit zu adulten Würmern. Rotenon-behandelte L1-Larven bleiben arretiert. PHT, ISB und PHO zeigen ab 50 nM leichten Schutz gegenüber der Rotenon-Toxizität und erreichen  $\text{EC}_{50}$ -Werte bei etwa 40 nM für PHT und etwa 90 nM für ISB und PHO. In einer Konzentration von 100 bis 1000 nM ist der beste Schutz gegenüber der Rotenon-Toxizität zu verzeichnen. In diesen Konzentrationen und v.a. bei 500 nM PHT, ISB und PHO entwickeln sich die Rotenon-behandelten Larven bis hin ins L3/L4- und in geringer Anzahl ins adulte Stadium, somit wird bei diesen Konzentrationen die Toxinwirkung auf die Würmer zu einem großen Anteil detoxifiziert. Neuroleptika zeigen eine leichte protektive Wirkung. Alle Substanzen weisen einen zusätzlichen toxischen Effekt gegenüber Rotenon-behandelten Würmern in Konzentrationen höher als 40  $\mu\text{M}$  auf, PHT sogar bei 10  $\mu\text{M}$ . Die Auswertung umfasst fünf unabhängige Experimente mit Bestimmung der Larvalstadien in jeweils 40 Würmern in Triplikate (A+C).





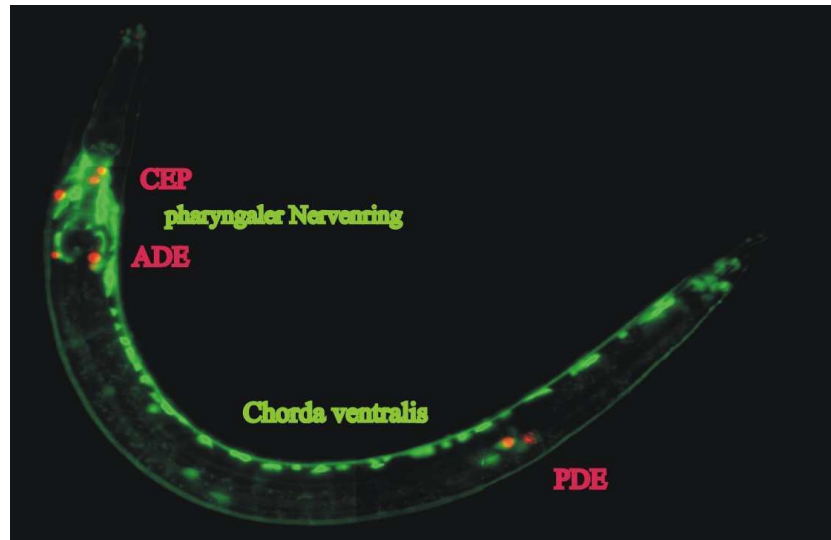
**Abb. 3.3.6. Darstellung der Auswertung der Ko-Inkubation von L1-Larven mit Rotenon und Cat, EGCG oder VitE.**

Auswertung der Protektions-Assays des L1-Larven Rotenon-Modells bei Ko-Inkubation mit Cat, EGCG und VitE. Synchronisierte L1-Larven wurden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5  $\mu\text{M}$  Rotenon und 0,2 bis 100  $\mu\text{M}$  Cat, EGCG oder VitE für drei Tage inkubiert, bei 100x Vergrößerung aufgenommen und die Entwicklungsstadien in den Behandlungsgruppen bestimmt. Schutz vor larvalem Arrest, welches die y-Achse beschreibt, meint den Prozentsatz an Würmern in der jeweiligen Behandlungsgruppe, die weiterentwickelt sind als L1/L2-Stadium.

Unbehandelte Würmer entwickeln sich in der angegebenen Zeit zu adulten Individuen. Rotenon-behandelte L1-Larven bleiben arretiert. Cat, EGCG und VitE zeigen ab 10  $\mu\text{M}$  leichten Schutz gegenüber der Rotenon-Toxizität und erreichen  $\text{EC}_{50}$ -Werte bei etwa 14  $\mu\text{M}$  für VitE und 50  $\mu\text{M}$  für Cat und EGCG. Die Protektion ist in diesen Behandlungsgruppen nicht stark ausgeprägt. Konzentrationen bei 100  $\mu\text{M}$  erweisen sich als protektiv. Die meisten Würmer befinden sich bei diesen Konzentrationen im L3- bzw. L4-Stadium, das adulte Stadium wird mithilfe dieser Antioxidantien meist nicht erreicht. Die Auswertung umfasst zwei unabhängige Experimente mit Bestimmung der Larvalstadien in jeweils 40 Würmern in Triplikate.

### 3.3.2. Etablierung einer transgenen *Caenorhabditis elegans* Linie zur Untersuchung des dopaminergen Systems nach Behandlung mit Parkinson-Toxinen

*C. elegans* stellt ein geeignetes Modellsystem zur Analyse spezifischer Zellpopulationen *in vivo* dar. Zellpopulationen können *in vivo* mithilfe genetischer Manipulationen diskriminiert werden, die fluoreszente Proteine unter zellspezifische Promotoren integrieren. Für die Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften der Bisarylimine im Toxin-induzierten Parkinson-Modell des Wurms, wurde eine transgene Wurmlinie etabliert, welche dopaminerg das rot fluoreszierende *DsRed2* exprimiert und das cyan leuchtende *CFP* im gesamten Nervensystem (pan-neuronale Expression). In dieser Wurmlinie ist die selektive Analyse der dopaminergen Integrität mit paralleler Detektion anderer Neuronenpopulationen ermöglicht. Wie in Abbildung 3.3.7. dargestellt und in Abschnitt 1.8.3. beschrieben, besitzt *C. elegans* acht dopaminerge Neurone, vier cephalische Neurone (CEP) und zwei anteriore Deidriten (ADE), welche in der Kopffregion organisiert sind, sowie zwei posterior liegende Deidriten (PDE; siehe Abb. 3.3.7.).



**Abb. 3.3.7.** Analyse der Integrität der dopaminergen Zellpopulation im Vergleich zum Gesamtnervensystem *in vivo*.

Das dopaminerge System des *C. elegans* besteht aus acht Neuronen, sechs Neurone sind in der Kopfreion organisiert (4 CEP und 2 ADE) und zwei PDE-Neurone liegen posterior. Zur Diskriminierung der Integrität dieser neuronalen Subpopulation vom Gesamtnervensystem wurden dopaminerge Zellen in der transgenen Wurmlinie mithilfe einer dopaminerg-spezifischen *DsRed2*-Expression ( $P_{Cat-2}::DsRed2$ ; rot) visualisiert, parallel wurde das Gesamtnervensystem mithilfe eines pan-neuronal exprimierten Vektors ( $P_{Sng-1}::CFP$ ; grün) analysiert. Das Gesamtnervensystem kann unterteilt werden in den Hauptnervenstrang (*Chorda ventralis*), den Nebennervenstrang (*Chorda dorsalis*) und einen Ganglienkomplex in der Pharynxregion, welcher als Nervenring bezeichnet wird.

Die transgene Wurmlinie dient in dieser Arbeit zur Analyse der selektiven Vulnerabilität und Protektion dopaminerg Neurone im  $MPP^+$ - und Rotenon-induzierten *in vivo* Modell in L1-Larven sowie in adulten *C. elegans*.

### **3.3.2.1. Phentiazin, Iminostilben und Phenoxazin wirken neuroprotektiv im $MPP^+$ - und Rotenon-induzierten L1-Larvenmodell**

Zur Analyse des neuroprotektiven Charakters der Bisarylimine im Toxin-induzierten transgenen L1-Larvenmodell, wird die dopaminerge Integrität (dopaminerge *DsRed2*-Expression), mit paralleler Beobachtung der Motorneurone im ventralen Nervenstrang, sowie anderer Neuronenpopulationen im Nervenringbereich (pan-neuronale *CFP*-Expression), untersucht. Transgene L1-Larven werden unter gleichen Behandlungskriterien wie die N2-Wurmlinie inkubiert in Anwesenheit der protektiven Konzentration der Bisarylimine (500 nM; siehe Abschnitt 3.3.1.). In der transgenen Wurmlinie kommt es durch  $MPP^+$ - und Rotenon-Behandlung zum larvalen Arrest (siehe Abb. 3.3.8. und 3.3.9.). Das dopaminerge *DsRed2*-Signal ist in den meisten Individuen der  $MPP^+$ - und Rotenon-Behandlung sehr schwach, in vielen Würmern nicht detektierbar (siehe Abb. 3.3.8. bis 3.3.10.). Diesen Signalverlust kontrastiert das stabile pan-neuronale *CFP*-Signal (siehe Abb. 3.3.8. und 3.3.9.). Wie jedoch schon in Abschnitt 3.3.1. gezeigt, besitzt Rotenon einen stärker ausgeprägten Effekt auf L1-Larven. Manche

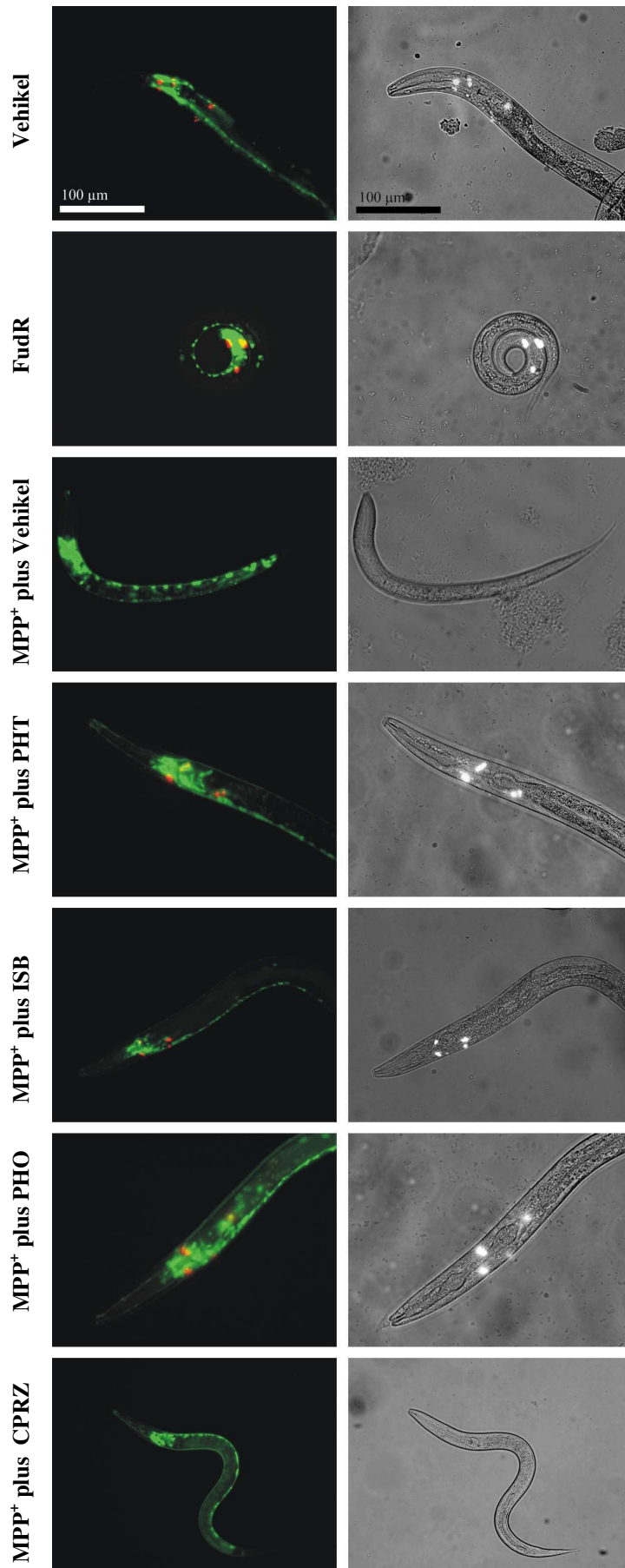
Individuen weisen eine leicht veränderte Morphologie einzelner Strukturen des Hauptnervenstranges und der pharyngealen Ganglienansammlung nach Rotenon-Behandlung auf.

5-Fluoro-2`-desoxyuridin (FudR) stellt einen Inhibitor der DNA-Synthese dar und bewirkt einen Arrest der L1-Larven durch Suppression der Zellteilung. Zur Verifizierung des MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induzierten dopaminergen DsRed2-Signalverlustes, wurden L1-Larven mit FudR für die Zeit der Inkubation behandelt. In FudR-behandelten L1-Larven kommt es zum Entwicklungsarrest, das DsRed2-Signal ist in L1-Larven um 40 % zu entwickelten Würmern reduziert (siehe Abb. 3.3.8. und 3.3.10.). Es kann dargestellt werden, dass die drastische Abnahme des DsRed2-Signals in arretierten MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelten L1-Larven einen Verlust der dopaminergen Zellintegrität aufzeigt und somit beide Toxine zur selektiven Degeneration der dopaminergen Neuronenpopulation in diesem *in vivo* Modell führen.

Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen mit freier Iminogruppe führen zur Entwicklung der transgenen Würmer in L4- und adulte Stadien mit stabiler Expression des DsRed2-Signals in allen dopaminergen Zellen und morphologisch unverändertem Gesamtnervensystem (siehe Abb. 3.3.8. bis 3.3.10.). Bisarylimine stabilisieren bei Ko-Inkubation mit Rotenon das DsRed2-Signal in allen dopaminergen Neuronen, die Intensität des DsRed2 erscheint jedoch leicht schwächer zu unbehandelten Würmern (siehe Abb. 3.3.10.), wie auch das Gesamtnervensystem morphologisch unverändert bleibt mit einer leichten Intensitätsabnahme des CFP-Signals.

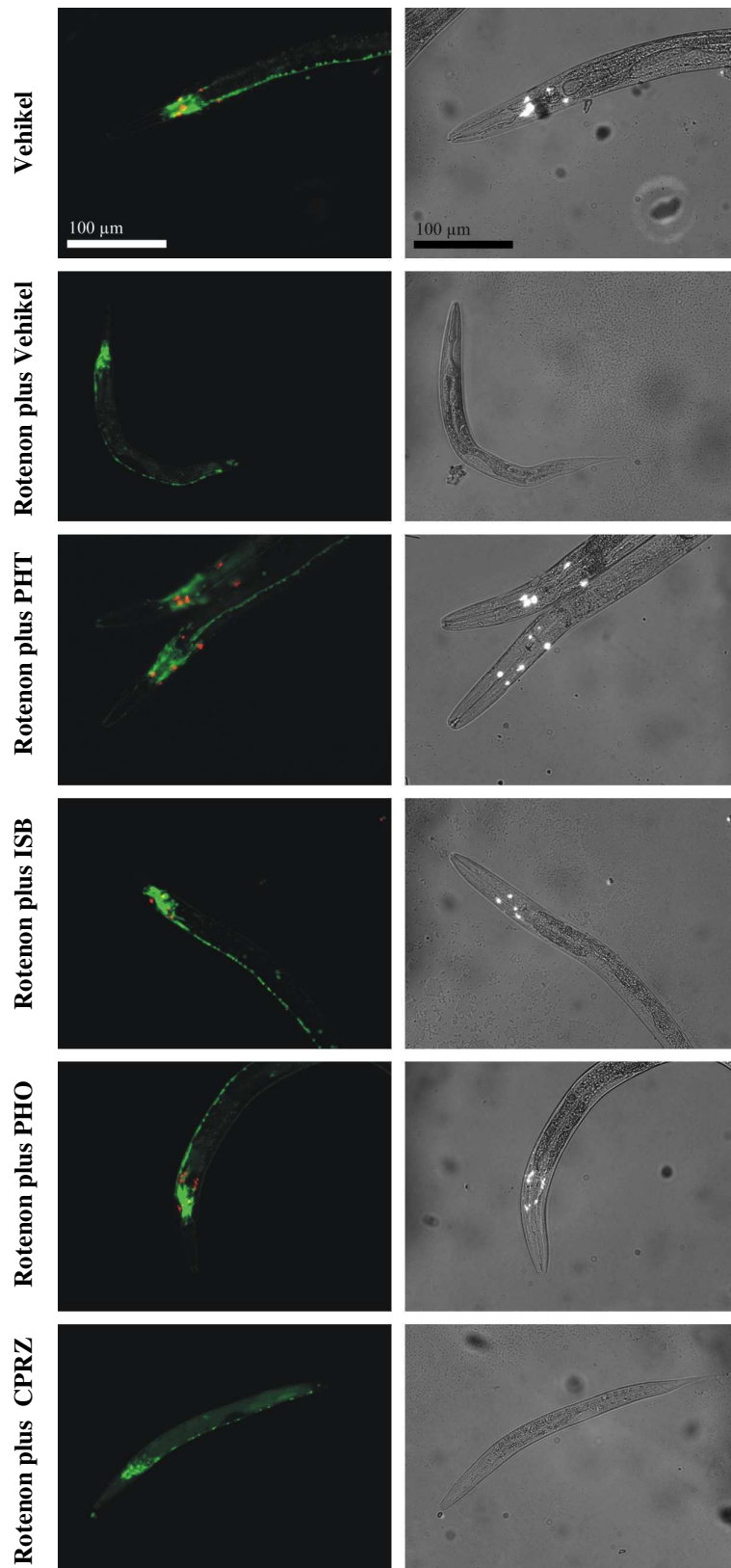
Ko-Inkubationen mit Toxinen und Neuroleptika oder Dopamin führen zum selektiven dopaminergen DsRed2-Signalverlust, heben somit den Toxineffekt auf die dopaminerge Population nicht auf. In der Mehrheit der Individuen dieser Behandlungsgruppe bleibt das Gesamtnervensystem unbeeinträchtigt, wenige Individuen zeigen jedoch leichte morphologische Veränderungen an Strukturen des Nervenstranges und des Nervenringes (siehe Abb. 3.3.8. und 3.3.9.).

Bisarylimine stabilisieren in nanomolaren Konzentrationen die hoch vulnerable dopaminerge Neuronenpopulation im MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Modell. Alle dopaminergen Neurone werden in diesen Behandlungsgruppen erhalten. Mithilfe der Analyse der dopaminergen Neurone in der Larvenpopulation (larvaler Arrest durch Zellteilungssuppression), konnte gezeigt werden, dass der drastische DsRed2-Signalverlust in Toxin-behandelten Würmern eine selektive Degeneration dopaminergener Neurone aufzeigt. Neuroleptika weisen keine Neuronen-stabilisierende Funktion auf. Bisarylimine stabilisieren das dopaminerge System mithilfe antioxidativer Eigenschaften.

**Abb. 3.3.8.****Darstellung dopaminergener Neurone in Kontrast zum Gesamtnervensystem in MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen.**

Synchronisierte L1-Larven des transgenen Stammes wurden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5 mM MPP<sup>+</sup> und 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ, RISP oder 0,5 mM DA für drei Tage inkubiert. Zur Darstellung des neuronalen Systems im L1/L2-Larvenstadium, wurden L1-Larven mit 1 ng/ml FudR für die Inkubationsdauer behandelt. Links wird das dopaminerge DsRed2-Signal (rot) und das pan-neuronale CFP-Signal (grün) überlappt dargestellt, rechts sind DIC-Aufnahmen dargestellt mit dem leuchtenden dopaminergen DsRed2-Signal. Die Aufnahmen sind bei 200x Vergrößerung erstellt, der Maßstab definiert 100 µm.

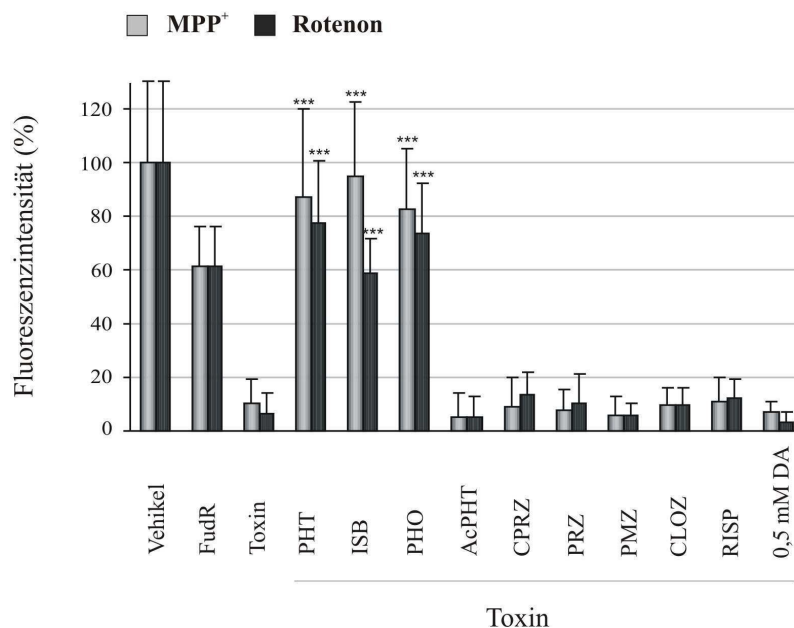
Unbehandelte Würmer der transgenen Linie entwickeln sich in der Zeit der Inkubation zu adulten Individuen und zeigen ein intensives DsRed2-Leuchten in der dopaminergen Zellpopulation. MPP<sup>+</sup>-behandelte L1-Larven verbleiben arretiert, das dopaminerge DsRed2-Signal leuchtet bei der Mehrheit der Individuen sehr schwach oder ist nicht detektierbar. Der DsRed2-Signalverlust lässt auf einen Verlust der dopaminergen Neuronenpopulation schließen (vergleiche FudR-Inkubation). Die Neurodegeneration zeigt sich auf dopaminerge Zellen beschränkt, da das Gesamtnervensystem, dargestellt im CFP-Signal, morphologisch unverändert erscheint. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und PHT, ISB oder PHO führen in der transgenen Linie zum Auswachsen der L1-Larven und zum stabilen, jedoch in der Intensität schwächeren DsRed2- und normalen CFP-Signal. Alle dopaminergen Neurone sind erhalten. Ko-Inkubationen mit MPP<sup>+</sup> und Neuroleptika oder DA besitzen den gleichen neuronalen Phänotyp wie die alleinige MPP<sup>+</sup>-Behandlung. Das Gesamtnervensystem bleibt in der Mehrheit der Individuen morphologisch unbeeinträchtigt, wenige Individuen zeigen ein schwächeres Signal und leichte Veränderungen in der Nervenringregion, dargestellt repräsentativ für die Ko-Inkubation mit MPP<sup>+</sup> und CPRZ.

**Abb. 3.3.9.****Darstellung dopaminergener Neurone in Kontrast zum Gesamtnervensystem in Rotenon-Behandlungsgruppen.**

Synchronisierte L1-Larven des transgenen Stammes wurden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5 µM Rotenon und 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ, RISP oder 0,5 mM DA für drei Tage inkubiert. Links wird das dopaminerge DsRed2-Signal (rot) und das pan-neuronale CFP-Signal (grün) überlappt dargestellt, rechts sind DIC-Aufnahmen gezeigt mit dem leuchtenden dopaminergen DsRed2-Signal. Die Aufnahmen sind bei 200x Vergrößerung erstellt, der Maßstab definiert 100 µm.

Kontrollwürmer der transgenen Linie entwickeln sich in der Zeit der Inkubation zu adulten Individuen und zeigen ein intensives dopaminerges DsRed2-Leuchten. Rotenon-behandelte L1-Larven verbleiben arretiert, das dopaminerge DsRed2-Signal leuchtet bei der Mehrheit der Individuen sehr schwach, ist nicht detektierbar, oder es sind schwache Signale in einzelnen dopaminergen Neuronen zu erkennen. Der DsRed2-Signalverlust lässt auf einen Verlust der dopaminergen Neuronenpopulation schließen. Die Neurodegeneration zeigt sich auf dopaminerge Zellen beschränkt, da das Gesamtnervensystem, dargestellt im CFP-Signal, morphologisch in der Mehrheit der Individuen unverändert mit schwächerem CFP-Signal erscheint, in wenigen Würmern lassen sich leichte Veränderungen einzelner Strukturen an der ventralen Chorda oder im Nervenring erkennen. Ko-Inkubationen mit Rotenon und PHT, ISB oder PHO führen in der transgenen Linie zum Auswachsen der L1-Larven und zum stabilen, jedoch in der Intensität schwächeren DsRed2- und CFP-Signal. Alle dopaminergen Neurone sind erhalten. Ko-Inkubationen mit Rotenon und Neuroleptika oder Dopamin besitzen den gleichen neuronalen Phänotyp wie die alleinige Rotenon-Behandlung. Das Gesamtnervensystem bleibt in der Mehrheit der Individuen morphologisch unbeeinträchtigt mit schwächerem CFP-Signal, wenige Individuen zeigen jedoch leichte Veränderungen in der ventralen Nervenstrangstruktur und in der Nervenringregion, dargestellt repräsentativ für die Ko-Inkubation mit Rotenon und CPRZ.



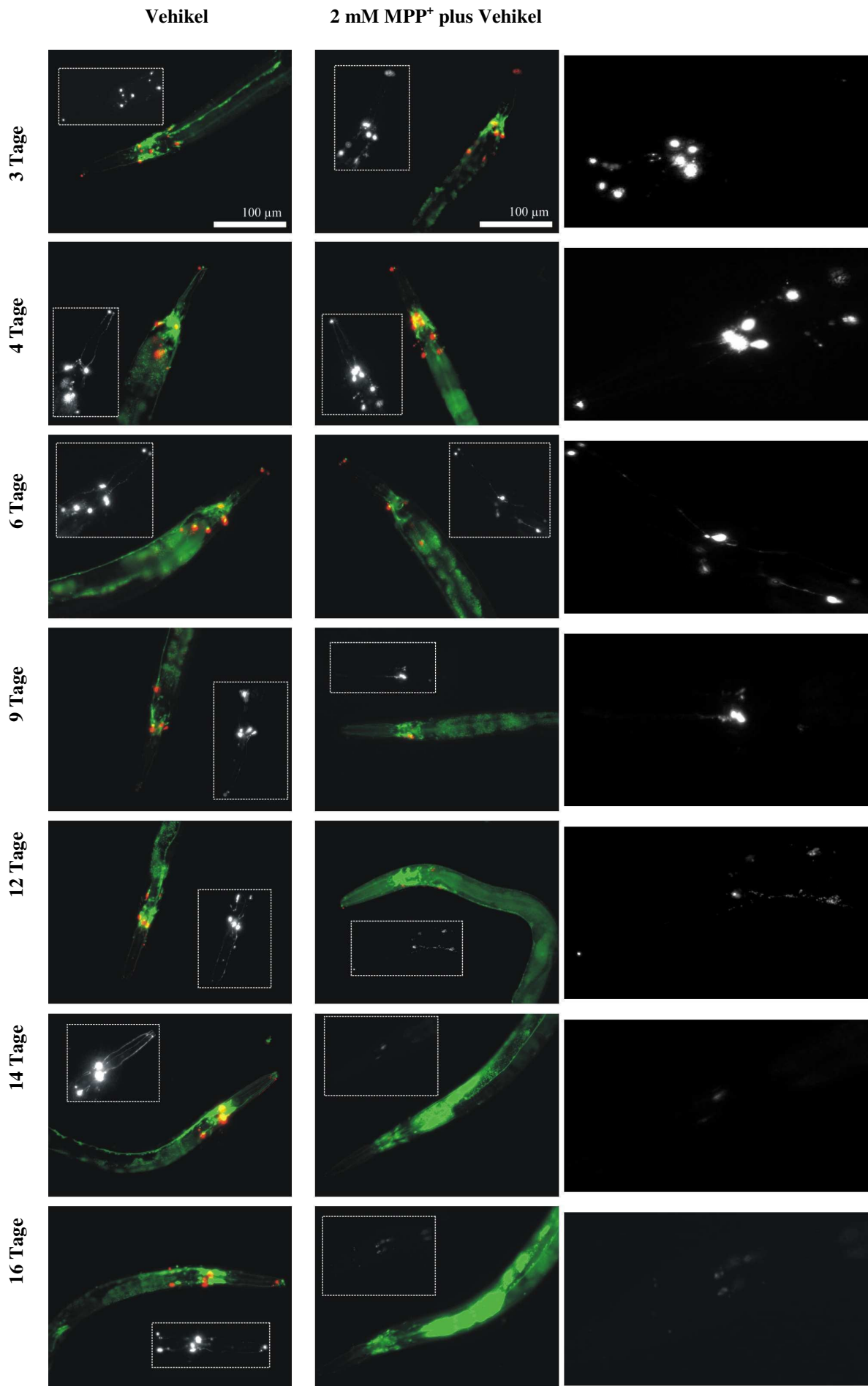


**Abb. 3.3.10. Darstellung der Auswertung der dopaminergen DsRed2-Signalintensität im Toxin-induzierten L1-Larvenmodell der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen.**

Synchronisierte L1-Larven des transgenen Stammes wurden in Flüssigkultur in Anwesenheit von 1,5 mM MPP<sup>+</sup> oder 1,5  $\mu$ M Rotenon und 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ, RISP oder 0,5 mM DA für drei Tage inkubiert. Zur Darstellung des neuronalen Systems im L1/L2-Larvenstadium wurden L1-Larven mit 1 ng/ml FudR für die Inkubationsdauer behandelt. Würmer wurden nach drei Inkubationstagen bei 200x Vergrößerung im 535/610 nm Exzitations-/Emissionskanal bei konstanter Belichtungszeit photographiert und die dopaminerge DsRed2-Signalintensität mithilfe der MetaVue Software quantifiziert. Die y-Achse bezeichnet die prozentuelle DsRed2-Fluoreszenzintensität, bezogen auf die DsRed2-Fluoreszenzintensität unbehandelter Würmer. Die dopaminerge DsRed2-Signalintensität ist schwächer in FudR-behandelten arretierten L1-Larven verglichen mit ausgewachsenen unbehandelten Würmern (etwa 60 % der Intensität). MPP<sup>+</sup>- oder Rotenon-Behandlung führt in den arretierten Larven zu einem drastischen DsRed2-Signalverlust (Beeinträchtigung des dopaminergen Systems mithilfe der Parkinson-Toxine). Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO stabilisieren das DsRed2-Signal in den entwickelten Würmern auf 60 bis 90 % der Intensität der Kontrollwürmer (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Neuroleptika oder Dopamin verhindern nicht den dopaminergen DsRed2-Signalverlust in den arretierten Larven. Die Auswertung beinhaltet fünf unabhängige Experimente mit jeweils fünf untersuchten Würmern in Triplikat.

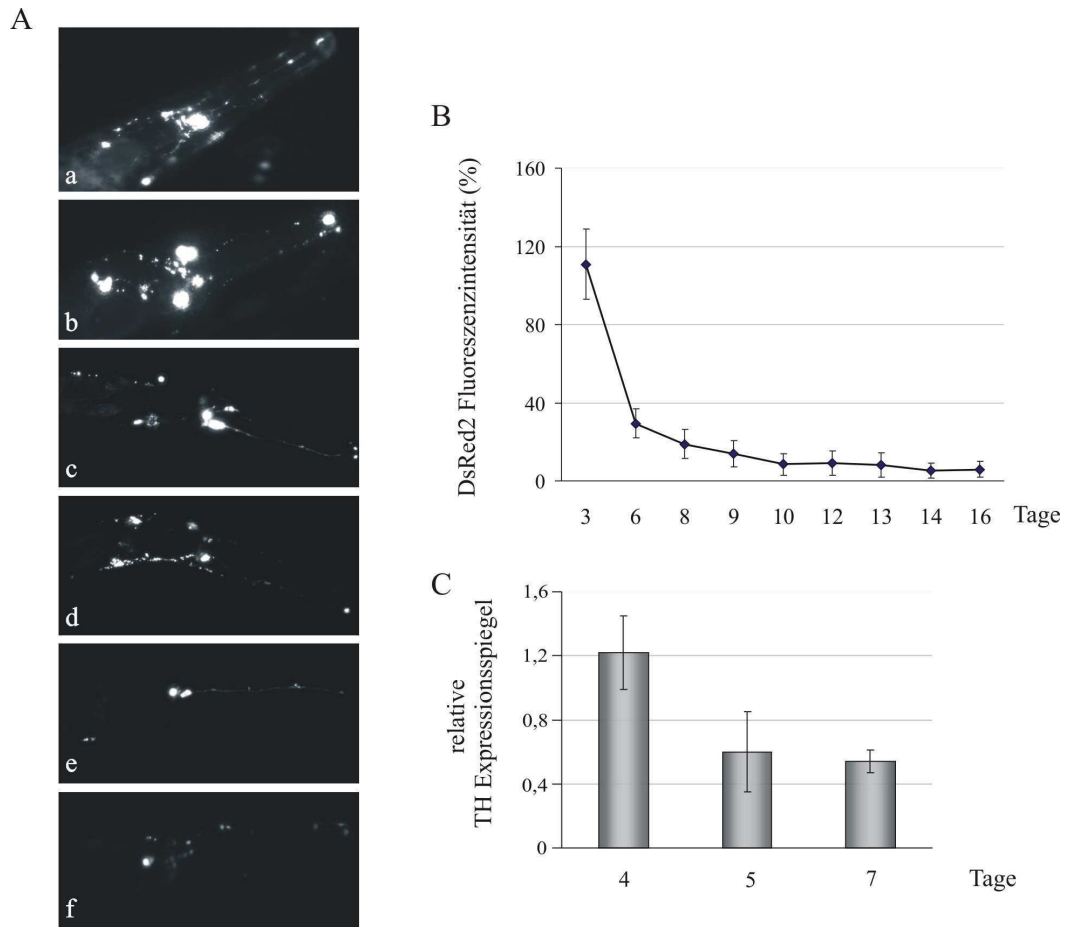
### 3.3.2.2. Etablierung eines adulten *Caenorhabditis elegans* Modells mit Toxin-induzierter spezifischer dopaminergener Neurodegeneration

Zur Etablierung des Toxin-induzierten adulten *C. elegans* Modells mit selektiver dopaminergener Zelldegeneration, wurden transgene Würmer im jung adulten Stadium 2 mM MPP<sup>+</sup> oder 1,5  $\mu$ M Rotenon ausgesetzt und in der Zeit der Inkubation detailliert das dopaminerge System und das Gesamtnervensystem analysiert. In Abbildung 3.3.11. werden repräsentative Würmer zu den angegebenen Zeitpunkten der Inkubation dargestellt.



**Abb. 3.3.11. Darstellung adulter Würmer mit Toxin-induzierter selektiver dopaminerger Neurodegeneration in der Zeit.**

Synchronisierte jung adulte Würmer wurden in Flüssigkultur mit 2mM MPP<sup>+</sup> behandelt für die angegebene Zeit mit Mediumwechsel an jeden dritten Tag. Nach 3, 4, 6, 9, 12, 14 und 16 Inkubationstagen wurden Würmer bei 200x Vergrößerung photographiert, der Maßstab definiert 100 µm. Illustriert sind repräsentative Bilder für die Inkubation mit MPP<sup>+</sup> zu den angegebenen Zeitpunkten, das dopaminerge DsRed2-Signal (rot) ist überlappt mit dem pan-neuronalem CFP-Signal (grün). In der Mitte sind Würmer der MPP<sup>+</sup>-Inkubation zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt, parallele Bilder unbehandelter Würmer sind links gezeigt. In umrahmten Kästchen wird eine Vergrößerung des jeweiligen DsRed2-Signals dargestellt. Rechts sind Vergrößerungen des DsRed2-Signals der MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmer gezeigt.



**Abb. 3.3.12. Auswertung des dopaminergen Zellverlustes in adulten Würmern über die Zeit mithilfe der Quantifizierung der DsRed2-Intensität in transgenen Würmern und der Expression der Tyrosinhydroxylase in N2-Würmern.**

Synchronisierte jung adulte Würmer des transgenen bzw. N2-Stammes wurden in Flüssigkultur mit 2mM MPP<sup>+</sup> behandelt für die angegebene Zeit mit Mediumwechsel an jeden dritten Tag. A) Darstellung der progressiven dopaminergen Degeneration bei MPP<sup>+</sup>-Behandlung; a+b) 5 Tage; c bis f) 7 bis 9 Tage MPP<sup>+</sup>-Behandlung; B) Im Zeitraum zwischen 3 bis 16 Tagen der MPP<sup>+</sup>-Inkubation wurden Würmer bei 200x Vergrößerung photographiert und die DsRed2-Signalintensität mithilfe der MetaVue Software quantifiziert. Die DsRed2-Intensität der MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmer bezieht sich prozentuell auf die DsRed2-Intensität un behandelter Würmer zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Auswertung beinhaltet zwei Experimente mit der DsRed2-Intensitätsermittlung in jeweils vier Würmern in Triplikate. C) Ermittlung des TH-Expressionsstatus im Zeitraum zwischen 4 bis 7 Tagen in MPP<sup>+</sup>-behandelten N2-Würmern. Der Expressionsstatus bezieht sich prozentuell auf den Expressionsspiegel der TH in un behandelten Würmern zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Auswertung beinhaltet drei Experimente mit jeweils zehn zusammengeführten N2-Würmern evaluiert in Triplikate.



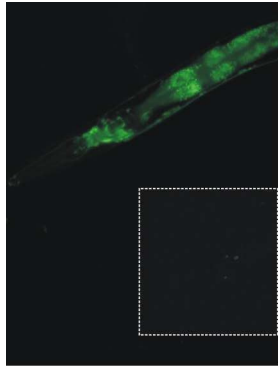
In adulten Würmern konnte ein selektiver und progressiver Verlust der dopaminergen Neurone mit der Zeit detektiert werden, sowohl in MPP<sup>+</sup>- (siehe Abb. 3.3.11. und 3.3.12.) als auch in Rotenon-behandelten (nicht gezeigt) Würmern. Im adulten Stadium konnte die dopaminerge Degeneration detailliert analysiert werden. Untersuchte Konzentrationen an MPP<sup>+</sup> oder Rotenon führen in adulten *C. elegans* zunächst zu einer positiven Regulation der TH in dopaminergen Neuronen, sowohl auf Proteinebene, analysiert mithilfe der DsRed2-Intensitätszunahme (*DsRed2* unter *Cat-2* Promotor), als auch auf Expressionsebene, untersucht in N2-Würmern (nicht gezeigt). Ab dem fünften bis sechsten Tag der Toxinbehandlung kommt es zum kontinuierlichen Verlust dopaminergener Integrität mit anfänglichen Zeichen der axonalen Fragmentierung dopaminergener Neurone (siehe Abb. 3.3.12.A. a und b). Die Fragmentierung der axonalen Strukturen beginnt mit Projektionen der ADE-Neurone, worauf bald die Axone aller dopaminergen Nervenzellen betroffen sind. Der Verlust des DsRed2-Signals in dopaminergen Perikaryen beginnt mit PDE Neuronen, hierauf folgen ADE und letztendlich verlieren CEP Zellkörper das DsRed2-Signal (siehe Abb. 3.3.12.A. c bis f). Restliches DsRed2-Signal wird kontinuierlich mit der Zeit eliminiert (siehe Abb. 3.3.12.B. und C). Das Nervensystem erscheint durch MPP<sup>+</sup>-Behandlung im gesamten Zeitrahmen der Inkubation unbeeinflusst, wohingegen die Rotenon-Behandlung in allen Individuen von einer Intensitätsabnahme des CFP-Signals begleitet wird, jedoch mit unveränderter Morphologie neuronaler Strukturen in den meisten Individuen.

### **3.3.2.3. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen dopaminerge Neurone des adulten Toxin-induzierten *Caenorhabditis elegans* Modells**

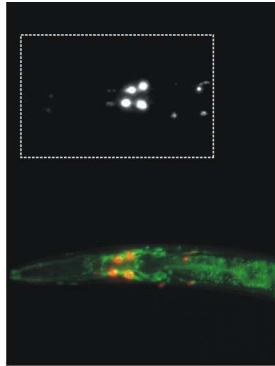
In Abschnitt 3.3.2.2. konnte die selektive dopaminerge Degeneration innerhalb adulter Organismen des transgenen Wurmstammes und indirekt des N2-Stammes (Abnahme der TH-Expression) detailliert dargestellt werden. Der Zeitraum, in welchem schwache Signale der Zellkörper zu erkennen sind, Axone jedoch stark fragmentiert erscheinen oder inkorporiert sind, umfasst den siebten und neunten Tag. Dieser Zeitraum wird gewählt zur Darstellung der Protektion dopaminergener Neurone in adulten Würmern mithilfe der untersuchten Substanzen.

PHT, ISB und PHO zeigen neuroprotektive Eigenschaften. Zu den Zeitpunkten, da dopaminerge Neurone der Toxin-behandelten Würmer stark beeinträchtigt sind und fragmentierte oder eliminierte Axone und ein schwaches Leuchten in den Zellkörpern zeigen, bleibt die Integrität dopaminergener Neurone in der Mehrzahl der Individuen der Bisarylamin-Behandlungsgruppen erhalten. Die Zellkörper leuchten etwas schwächer, Axone zeigen keine Anzeichen der Fragmentierung (siehe Abb. 3.3.13. und 3.3.14.). Ko-Inkubationen mit 500 nM Neuroleptika, Apomorphin oder 0,5 mM Dopamin zeigen keine neuroprotektiven Eigenschaften in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen (siehe Abb. 3.3.13. und 3.3.14.).

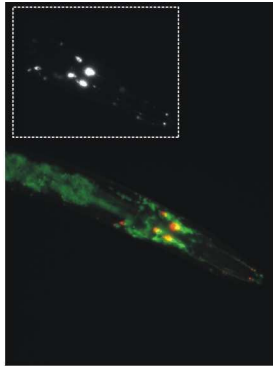
MPP<sup>+</sup> plus CPRZ



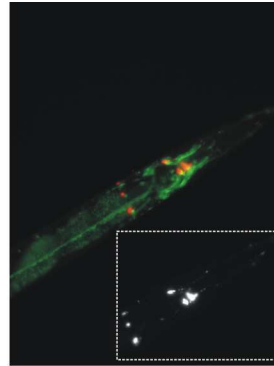
MPP<sup>+</sup> plus PHO



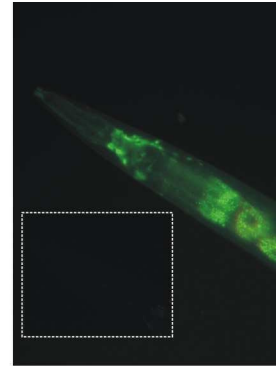
MPP<sup>+</sup> plus ISB



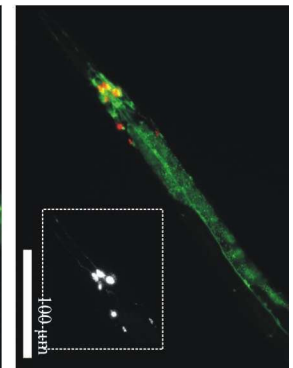
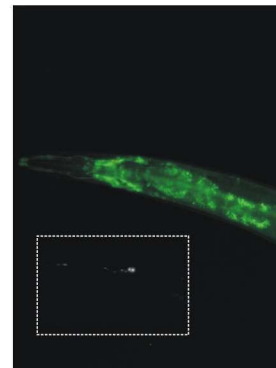
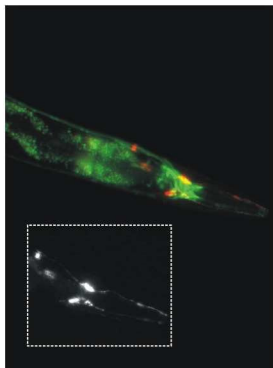
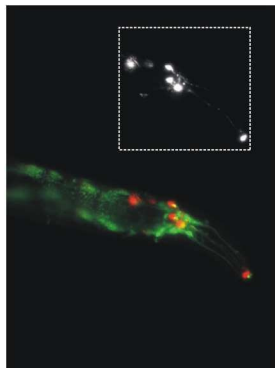
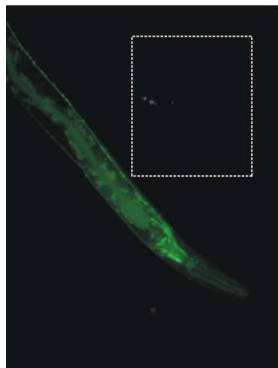
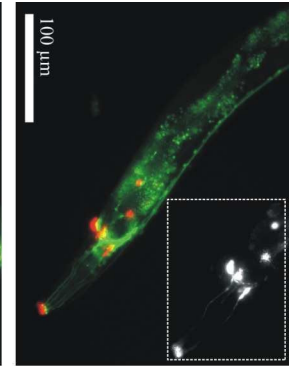
MPP<sup>+</sup> plus PHT



MPP<sup>+</sup> plus Vehikel



Vehikel



Rotenon plus CPRZ

Rotenon plus PHO

Rotenon plus ISB

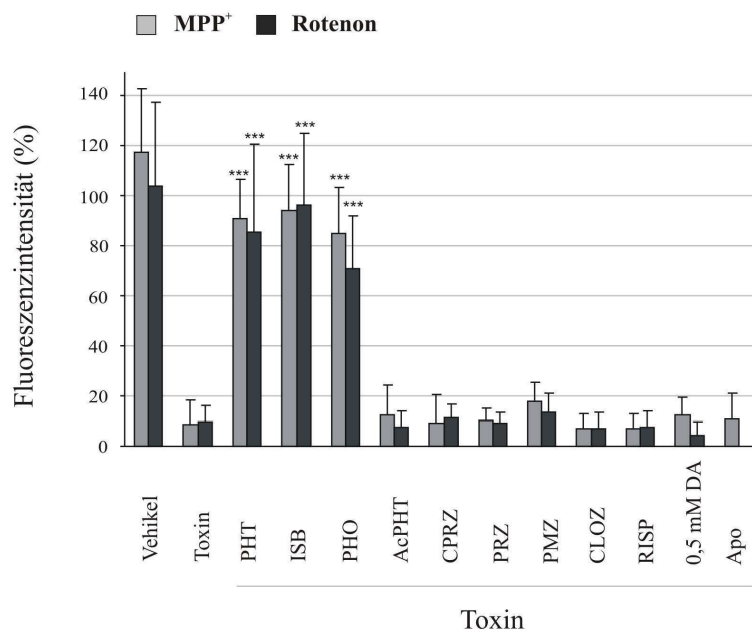
Rotenon plus PHT

Rotenon plus Vehikel

Vehikel

**Abb. 3.3.13. Darstellung der Protektion dopaminerger Neurone durch Bisarylimine im MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induzierten adulten Wurmodell.**

Synchronisierte jung adulte Würmer wurden in Flüssigkultur mit 2mM MPP<sup>+</sup> bzw. 1,5 µM Rotenon für 7 bis 9 Tage behandelt in Anwesenheit von 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ, RISP, Apo oder 0,5 mM DA. Aufnahmen zeigen die überlappten Signale des DsRed2 (rot) und CFP (grün) und sind im 535/610 bzw. 490/510 nm Exzitations-/Emissionskanal mit konstanter Belichtungszeit bei 200x Vergrößerung erstellt, der Maßstab definiert 100 µm. Links sind repräsentative Bilder der MPP<sup>+</sup>-Behandlungsgruppen dargestellt, rechts der Rotenon-Behandlungsgruppen. Gestreifte Kästchen zeigen eine Vergrößerung des alleinigen DsRed2-Signals. In Toxinbehandlungen kommt es zum DsRed2-Signalverlust mit leichter Abnahme der CFP-Intensität, jedoch meist unveränderter morphologischer Charakteristika des Gesamtnervensystems. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO zeigen stabile, leicht schwächere DsRed2-Signale mit leicht schwächerem CFP-Signal. Ko-Inkubationen mit Toxinen und Neuroleptika, Apo oder DA zeigen den gleichen neuronalen Phänotyp wie die alleinige Toxin-Inkubation.



**Abb. 3.3.14. Auswertung der dopaminergen DsRed2 Fluoreszenzintensität in adulten MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen.**

Synchronisierte jung adulte Würmer wurden in Flüssigkultur mit 2mM MPP<sup>+</sup> bzw. 2 µM Rotenon für 7 bis 9 Tage behandelt in Anwesenheit von 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PRZ, PMZ, CLOZ, RISP, Apo oder 0,5 mM DA. Aufnahmen sind im 535/610 nm Exzitations-/Emissionskanal bei 200x Vergrößerung mit konstanter Belichtungszeit erstellt und die DsRed2-Fluoreszenzintensität mithilfe der MetaVue Software quantifiziert worden.

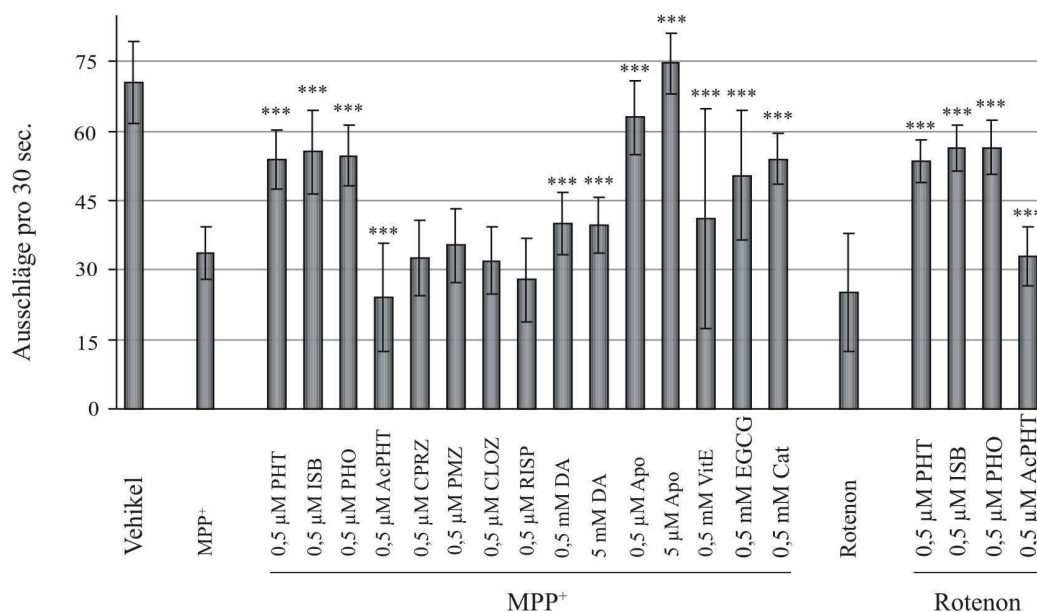
In Toxinbehandlungen kommt es zum drastischen DsRed2-Signalverlust. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO zeigen stabile DsRed2-Signale mit leicht schwächerer Intensität im Vergleich zu unbehandelten Würmern (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Ko-Inkubationen mit Toxinen und Neuroleptika, Apo oder DA zeigen einen starken DsRed2-Intensitätsverlust. Die Auswertung beinhaltet fünf unabhängige Experimente mit der DsRed2-Intensitätsermittlung in jeweils fünf Würmern in Triplikat.

### 3.3.3. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin schützen MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelte adulte *Caenorhabditis elegans* vor einer reduzierten Beweglichkeit

Da das dopaminerge System in *C. elegans* durch die sensorische Erfassung von Umweltfaktoren die Bewegung des Wurms steuert (siehe Abschnitt 1.8.3. und 4.2.2.), wurde das Bewegungsverhalten der adulten Individuen in den Behandlungsgruppen untersucht. Mit der Untersuchung der Beweglichkeit

der Würmer kann dargestellt werden, ob durch Toxinbehandlung die Funktionalität der dopaminergen Neurone eliminiert wird und ob Bisarylimine bei Ko-Inkubationen die Funktionalität dieser Neuronenpopulation erhalten können. Parallel können potentielle Dopaminrezeptor-Agonisten und -Antagonisten aufgedeckt werden. In MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelten Würmern konnte eine Abnahme der Beweglichkeit in Flüssigkultur festgestellt werden. Adulte Würmer des N2-Stammes wurden in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen nach sieben Inkubationstagen in ihrer Beweglichkeit analysiert. Diese Analyse umfasste die Auszählung der Ausschläge der Schlängelbewegung pro 30 sec in M9-Puffer. Die N2-Wurmlinie wurde für fünf Tage mit 2 mM MPP<sup>+</sup> bzw. 1,5 µM Rotenon in Anwesenheit von 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, PMZ, CLOZ, RISP, Apo oder 0,5 und 5 mM DA inkubiert. Zur Aufdeckung potentieller Agonisten und Antagonisten der Dopaminrezeptoren, wurden Würmer parallel mit 0,5 oder 5 µM PHT, CPRZ, CLOZ, RISP, PMZ oder Apo oder 0,5 und 5 mM DA oder 0,5 mM VitE, Cat oder EGCG in Abwesenheit der Toxine inkubiert. Wie in Abbildung 3.3.15.A. dargestellt, kommt es in Toxin-behandelten Würmern zur Abnahme der Häufigkeit der Bewegungsinitiation sowie zur Abnahme der Schnelligkeit der Bewegungsausführung. Ko-Inkubationen mit Toxinen und PHT, ISB oder PHO zeigen eine relative Beweglichkeitszunahme auf etwa 80 % der unbehandelten Würmer, hingegen zeigen Ko-Inkubationen mit Toxinen und AcPHT oder Neuroleptika eine etwa 50 %ige relative Beweglichkeit. Bisarylimine und Apomorphin (symptomatisches PD-Therapeutikum) können die Toxin-induzierte Reduktion der Bewegung fast vollständig aufheben. Dies zeigt, dass die Bewegungsreduktion nach Toxinbehandlung auf dem Verlust dopaminergischer Neurone basiert, da der Bewegungsphänotyp mithilfe des Apomorphins aufgehoben werden kann, und dass in Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen dopaminerge Neurone funktionell aktiv bleiben (siehe Abb. 3.3.15.A.).

A



B

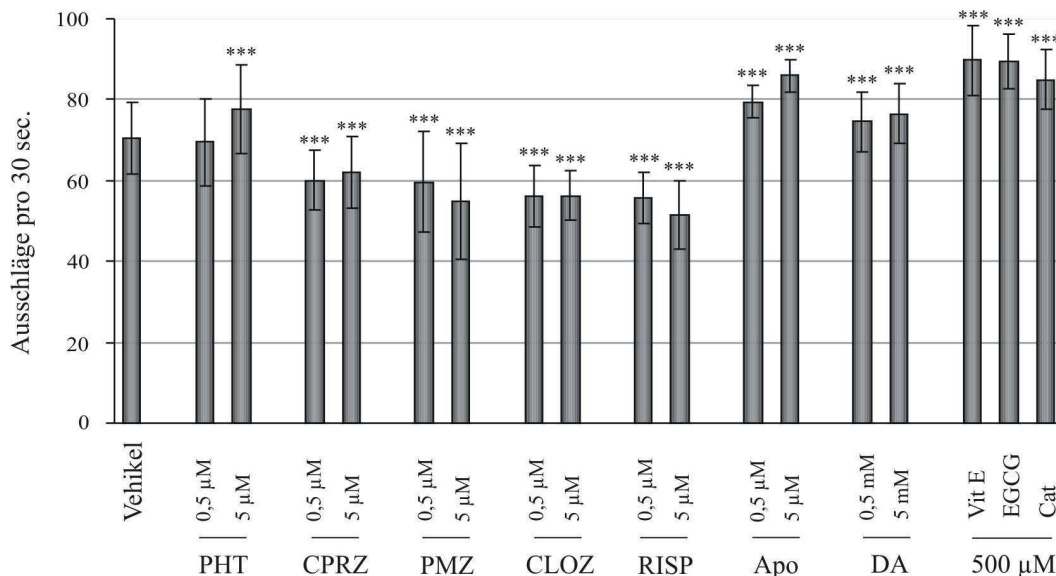


Abb. 3.3.15.

**Darstellung der Auswertung der Beweglichkeitsuntersuchung in adulten N2-Würmern.**

Synchronisierte jung adulte Würmer des N2-Stammes wurden in Flüssigkultur mit (A) 2 mM MPP<sup>+</sup> bzw. 1,5 µM Rotenon in Anwesenheit von 500 nM PHT, ISB, PHO, AcPHT, CPRZ, CLOZ, RISP, PMZ, Apo oder 0,5 und 5 mM DA oder (B) 500 und 5000 nM PHT, CPRZ, RISP, PMZ, Apo oder 0,5 und 5 mM DA oder 0,5 mM VitE, Cat oder EGCG in Abwesenheit der Toxine für fünf Tage behandelt. Die Beweglichkeit der Würmer wurde analysiert anhand der Ausschläge der Schlängelbewegung in M9-Puffer innerhalb einer Zeitspanne von 30 sec.

A) In Toxinbehandlungen kommt es zur Abnahme der Beweglichkeit um etwa 60 bis 70 %. Ko-Inkubationen mit PHT, ISB, PHO oder Apo zeigen eine 80 bis 100%ige relative Beweglichkeit, wohingegen Ko-Inkubationen mit AcPHT oder Neuroleptika eine 40 bis 50 %ige Beweglichkeit zeigen. B) Apomorphin, Dopamin und antioxidative Substanzen (PHT, ISB, PHO, VitE, Cat und EGCG) erhöhen die Beweglichkeit der Würmer, Neuroleptika reduzieren die Beweglichkeit (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ). Die Auswertung beinhaltet drei unabhängige Experimente mit der Auszählung von jeweils zehn Würmern in Triplikat.

In Abbildung 3.3.15.B. wird die Modulatorfunktion des dopaminergen Systems in dem untersuchten Bewegungsverhalten bei Behandlung mit potentiellen Dopaminrezeptor-Agonisten und -Antagonisten untersucht, um darzustellen, ob PHT Rezeptor-vermittelt agiert. Behandlung mit Dopamin oder Apomorphin (Agonisten) führt zur Bewegungszunahme der Würmer, hingegen reduzieren Antagonisten (CPRZ, CLOZ, RISP und PMZ) die Beweglichkeit. Phenothiazin und bekannte Antioxidantien (VitE, Cat, EGCG) ermöglichen eine Verstärkung der Beweglichkeit. Hiermit kann dargestellt werden, dass PHT nicht Rezeptor-vermittelt in *C. elegans* agiert.

MPP<sup>+</sup> und Rotenon induzieren eine selektive Degeneration dopaminergere Neurone sowohl im L1-Stadium als auch im adulten *C. elegans* Modell. Die Integrität dopaminergere Neurone wird durch Bisarylimine erhalten, dopaminergere Neurone bleiben funktionell aktiv. Der Toxin-induzierte larval-arretierte Phänotyp und der Bewegungsphänotyp in L1- und adulten Toxinmodellen werden mithilfe der Bisarylimine aufgehoben. Durch die Untersuchung des symptomatischen Therapeutikums Apomorphin kann verdeutlicht werden, dass die Toxin-induzierten Modelle des *C. elegans* als Parkinson-Modelle geeignet sind und potentielle Therapeutika der PD aufdecken können. Bisarylimine sind neuroprotektiv im *in vivo* Parkinson-Modell.

### 3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die drei untersuchten Bisarylimine, Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin, in MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induzierten *in vitro* und *in vivo* Parkinson-Modellen in nanomolaren Konzentrationen protektiv wirken.

Für *in vitro* Untersuchungen wurden SH-SY5Y-Neuroblastomazellen sowie primäre Neurone des ventralen Mittelhirns der Ratte herangezogen. In beiden Zellmodellen konnten mithilfe der Komplex I Inhibitoren, MPP<sup>+</sup> und Rotenon, Parkinson-phänotypische Charakteristika etabliert werden. Die primäre Beeinträchtigung der dopaminergen Neurone innerhalb des neuroglialen Systems der Primärzellen konnte mithilfe der Bisarylimine aufgehoben werden. Ebenso konnten Toxin-induzierte retrograde Degenerationsprozesse der Primärneurone sowie apoptotische und nekrotische Marker des Zellsterbens in der Neuroblastomazelllinie bei Ko-Inkubation mit Bisaryliminen aufgehoben werden. Der Toxin-induzierte Verlust der zelleigenen antioxidativen Kapazität in Form des Glutathions und antioxidativer Enzyme wird mithilfe der Bisarylimine reduziert. In Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen werden oxidative Stressmarker wie auch lysosomale Abbauprozesse bis in fortgeschrittene Phasen der Toxinwirkung minimiert. Des Weiteren wird das mitochondriale Membranpotential, welches durch die Toxine beeinträchtigt wird, mithilfe der Bisarylimine stabilisiert. In Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen erhalten Mitochondrien ihre Dynamik innerhalb des Zellgefüges und die intermitochondriale Interaktionsfähigkeit.

In Untersuchungen an *C. elegans* im larvalen und adulten Stadium konnte durch MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlung ein selektiver Verlust der dopaminergen Neurone *in vivo* erreicht werden. Die dopaminerge Neurodegeneration konnte mithilfe der Bisarylimine aufgehoben werden. Es konnte in Bewegungsanalysen gezeigt werden, dass die dopaminergen Neurone ihre Funktionalität bei Ko-Inkubation mit Bisaryliminen erhalten und parallel dargestellt werden, dass Bisarylimine in *C. elegans* keine Bindungsfähigkeit an Dopaminrezeptoren aufweisen und über antioxidative Mechanismen protektiv wirken. Dies konnte durch den Einsatz von Dopaminrezeptoragonisten und -antagonisten bestätigt werden.

## 4. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnten potente antioxidative und neuroprotektive Eigenschaften der drei Bisarylimine, Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin, in *in vitro* und *in vivo* Parkinson-Modellsystemen in nanomolarer Konzentration dargestellt und detailliert untersucht werden. Die eingesetzten Parkinson-Modelle beinhalten humane dopaminerge SH-SY5Y Zellen, primäre Mittelhirnneurone der Ratte, sowie *C. elegans* als Modellorganismus und gründen auf den etablierten Neurotoxinen, MPP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-Phenylpyridiniumion) und Rotenon, die eine selektive dopaminerge Neurodegeneration in der *SNpc* (*Substantia nigra pars compacta*) von Nagetieren und Primaten induzieren (Beal, 2001). Neuroprotektive Eigenschaften der Bisarylimine sind auf eine hoch effiziente antioxidative Aktivität dieser Strukturen zurückzuführen. In den akuten Toxin-Modellen konnten nanomolare Konzentrationen an Bisaryliminen *in vitro* und *in vivo* die schädliche Wirkung des oxidativen Stresses in so weit verringern, dass die neuronale Integrität fast vollständig erhalten werden konnte.

### 4.1. Neuroprotektion *in vitro*

Für *in vitro* Untersuchungen wurde in dieser Arbeit eine humane dopaminerge Neuroblastomazelllinie sowie primäre Mittelhirnneurone der Ratte herangezogen, welche auf der Toxizität des MPP<sup>+</sup> und Rotenons basierend, etablierte *in vitro* Parkinson-Modelle darstellen. Die SH-SY5Y Neuroblastomazelllinie stellt ein humanes *in vitro* Modellsystem der Parkinson-Forschung dar (siehe auch Abschnitt 1.8.3.1.). Das *in vitro* Modell der differenzierten primären Mittelhirnzellen beruht auf einem für das Nervensystem charakteristischen Vernetzungsmodus, mit langen axonalen Strukturen der Neurone, die interneuronale Kontakte (siehe Abb. 3.2.1.A. und 3.2.2.A.) als auch neurogliale Interaktionen aufbauen, und hiermit ein Modell etablieren, welches der *in vivo* Situation nahe kommt. Aufnahme der dopaminergen Zellen der *SN* in dieses System (ventrales Mittelhirn), ermöglicht die selektive Vulnerabilität dieser Neuronenpopulation zu studieren. Diese *in vitro* Parkinson-Modelle werden zur Untersuchung des neuroprotektiven Charakters von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin genutzt.

#### 4.1.1. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin heben die Zytotoxizität in Parkinson-Modellen auf

Nach akuter MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlung kommt es in SH-SY5Y Zellkulturen zu einer massiven Fragmentierung und Kondensation des Chromatins (siehe Abb. 3.1.1.A., 3.1.4.A. und 3.1.2.). Parallel

kann eine deutliche Erniedrigung der Plasmamembranintegrität in beiden Toxin-Modellen detektiert werden (siehe Abb. 3.1.1.B., 3.1.4.B. und 3.1.2.). Fragmentierung und Kondensation des Chromatins ist ein charakteristisches Anzeichen der apoptotischen Zelleliminierung (Candé et al., 2002a,b; Krysko et al., 2008), der Verlust der Plasmamembranintegrität eliminiert die letzte Instanz der Zellintegrität in nekrotischen Zellen (Krysko et al., 2008). Toxin-behandelte Zellen geben nach 60 h die Zellintegrität auf. Nach 72 h kann in MPP<sup>+</sup>-Behandlungen kein Signal der Zellvitalität detektiert werden (siehe Abb. 3.1.3.). In primären Mittelhirnkulturen induzieren MPP<sup>+</sup> und Rotenon nach 72 h eine komplette Destabilisierung des neuroglialen Netzwerkes. Neuronale Strukturen sind fast vollständig eliminiert (siehe Abb. 3.2.1. und 3.2.2.). Erhaltene Neurone weisen fragmentierte Axone auf (siehe Abb. 3.2.1.A, 3.2.2.A. und 3.2.3.), welches auf einen „dying back“-Mechanismus schließen lässt. Die Beobachtung, dass der Grad des Verlustes dopaminerger synaptischer Nervenendigungen im Striatum stärker fortschreitet, als der dopaminerge Neuronenverlust in der *SNpc* (Bernheimer et al., 1973), suggeriert, dass dopaminerge Nervenendigungen primär im Degenerationsprozess beeinträchtigt werden und dass der neuronale Verlust in Parkinson-Patienten retrograd („dying back“-Prozess) erfolgt (Morrish et al., 1996; Dauer und Przedborski, 2003). Experimentelle Unterstützung dieses Mechanismus konnte an MPTP-behandelten Affen gewonnen werden, die Degeneration der striatalen Nervenendigungen erfolgt vor der Eliminierung der Zellkörper in der *SNpc* (Herkenham et al., 1991). Wie für die neuropathologische Situation in Parkinson-Patienten beschrieben, induzieren MPP<sup>+</sup> und Rotenon innerhalb der kultivierten Primärneurone retrograde Degenerationsprozesse. Ein retrograder Integritätsverlust fordert eine primäre Veränderung der Funktionalität innerhalb der neuronalen Fortsätze, welche durch Toxine hervorgerufen werden kann (siehe Abschnitt 4.1.2.). Primärzellkulturen des ventralen Mittelhirns stellen Mischkulturen verschiedener neuronaler Populationen dar und beinhalten bei der Ratte etwa 3 bis 5 % dopaminerge Neurone, welche sich besonders vulnerabel gegenüber einer Komplex I Inhibition durch MPP<sup>+</sup> oder Rotenon *in vitro* und *in vivo* zeigen (Moon et al., 2005). Basierend auf mikroskopischen Beobachtungen, konnte eine kleine Population an Neuronen in der Mischkultur des Mittelhirns identifiziert werden, die zu einem früheren Zeitpunkt im Vergleich zur Mehrheit der Neurone, Zeichen der Zytotoxizität aufwies. Die Reduktion der *Tyrosinhydroxylase* (*TH*)-Expression (Enzym der Dopaminsynthese) ist mit der Beeinträchtigung der dopaminergen Neuronenpopulation assoziiert (Moon et al., 2005). Innerhalb von 24 h sinken TH-Proteinspiegel auf etwa 60 % des TH-Proteinsignals unbehandelter Kulturen (siehe Abb. 3.2.6.). Die dopaminerge Population wird in primären Zellkulturen frühzeitig in der Zellintegrität durch MPP<sup>+</sup> und Rotenon beeinträchtigt. Die selektive Vulnerabilität dopaminerger Neurone verweist auf die Selektivität der beiden Parkinson-Toxine.

Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin zeigen in den akuten Toxin-Modellen der *in vitro* Kulturen ihre neuroprotektive Wirkung in nanomolaren Konzentrationen. In SH-SY5Y Zellen wird sowohl die Integrität des Zellkerns als auch der Plasmamembran in Anwesenheit der Bisarylimine



bewahrt (siehe Abb. 3.1.1., 3.1.4. und 3.1.2.), ab 50 bis 100 nM ist ein fast vollständiges Zellüberleben in Toxin-behandelten Zellen ermöglicht (siehe Abb. 3.1.3. und 3.1.6.). Die Stabilisierung der primären Mittelhirnneurone mithilfe nanomolarer Konzentrationen an Bisaryliminen gegenüber der akuten Toxinwirkung, verdeutlicht die hochpotenten neuroprotektiven Eigenschaften dieser antioxidativen Strukturen. Zu dem Zeitpunkt der neuronalen Eliminierung der Toxinbehandlungsgruppen wird die Integrität der Neurone mithilfe von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin aufrechterhalten. Es sind keine Auffälligkeiten der zellulären Schädigung, sowohl in den Zellkörpern als auch in den Fortsätzen, zu erkennen (siehe Abb. 3.2.1. und 3.2.2.). Die selektive frühzeitige Beeinträchtigung der dopaminergen Population durch MPP<sup>+</sup> und Rotenon wird mithilfe der Bisarylimine eliminiert. Die TH-Proteinspiegel befinden sich in Anwesenheit nanomolarer Konzentrationen der Bisarylimine auf dem Niveau der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.2.6.). Schutz der hoch vulnerablen Neuronenpopulation vor den Auswirkungen einer Komplex I Inhibition und erhöhter ROS-Generierung verweist auf die hoch neuroprotektiven Eigenschaften von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin. Konzentrationen an Bisaryliminen, welche eine vollständige Protektion gegenüber MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Toxizität ermöglichen, liegen zwischen 50 und 100 nM (siehe Abschnitt 3.1. und 3.2.).

In *post mortem* Studien konnte gezeigt werden, dass dopaminerge Neurone der *SNpc* erniedrigte Werte an Glutathion aufweisen (Abbott et al., 1990; Chen et al., 1989; Kang et al., 1999). Schon zu einem frühen Zeitpunkt der Parkinsonschen Krankheit (PD) ist eine verstärkte Glutathiondepletion innerhalb der *SNpc* zu detektieren, sogar noch bevor Komplex I Defekte auftreten. Glutathion sinkt kontinuierlich mit der Progression der Krankheit (Sofic et al., 1992; Sian et al., 1994 a,b). Als eines der wichtigsten Komponenten des antioxidativen Systems, wirkt sich eine Glutathiondepletion prooxidativ auf Zellen aus (siehe Abschnitt 1.3.2.). MPP<sup>+</sup> und Rotenon rekapitulieren innerhalb neuronaler Systeme neuropathologische Charakteristika der PD, Glutathiondepletion ist ein wichtiger Faktor der verstärkten Vulnerabilität der nigralen dopaminergen Neuronenpopulation (siehe Abschnitt 1.2.). Somit ist es von Interesse, den Redoxstatus des Glutathions in den untersuchten Toxin-Modellen zu evaluieren.

Behandlung der humanen dopaminergen SH-SY5Y Zelllinie mit beiden Komplex I Inhibitoren resultiert erwartungsgemäß in einer Abnahme der reduktiven Kapazität des Glutathions. MPP<sup>+</sup> führt zu einer leichten Erhöhung der Glutathionwerte innerhalb von 24 und 48 h und zur Verschiebung des Redoxgleichgewichts des Glutathions zur oxidierten Seite hin (siehe Abb. 3.1.7; dargestellt für 48 h MPP<sup>+</sup>-Behandlung). Inkubationen mit Rotenon resultieren hingegen in einer Reduktion der Verfügbarkeit des Glutathions nach 24 h Behandlung (nicht gezeigt). Nach 48 h nehmen die Glutathionwerte auf über die Hälfte ab (siehe Abb. 3.1.7.). Parallel verschiebt sich der Redoxzustand des Glutathions zur oxidierten Glutathionform hin. Der Redoxzustand des Glutathions stellt einen

Biomarker des oxidativen Stresses und einen Indikator der reduktiven Kapazität der Zelle dar (Schafer und Buettner, 2001). Die gewonnenen Ergebnisse weisen auf einen erhöhten oxidativen Zustand innerhalb der Toxin-behandelten Zellen hin. Bisarylimine scheinen bei Ko-Inkubation mit MPP<sup>+</sup> und Rotenon keinen Einfluss auf die Toxin-dirigierte Glutathionmenge, als auch auf das Redoxgleichgewicht des Glutathions, zu nehmen. Die fehlende Regeneration der reduktiven Kapazität des Glutathions mithilfe der Bisarylimine kann mit den Befunden von Drechsel et al. (2007) erklärt werden. Drechsel et al. zeigen, dass MPP<sup>+</sup>-Behandlungen nach 12 h die zellulären Glutathionmengen reduzieren, nach 24 h werden die Glutathionspiegel leicht erhöht, parallel erhöht sich die oxidierte Glutathionform und ROS-Emission. Des Weiteren konnte aber gezeigt werden, dass durch MPP<sup>+</sup>-Behandlung die Aktivität der Glutathion-Reduktase und  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthase ( $\gamma$ -GCS) bis zu 25 % reduziert wird (siehe auch Abschnitt 1.3.2.). Auch Sian et al. (1994b) postulierten, dass erniedrigte Glutathionmengen in der *SNpc* nicht primär auf die erhöhte Detoxifizierungsfunktion des Glutathions zurückzuführen sind, sondern sich früh Synthese und Abbau des Glutathions in Parkinson-Patienten verschieben. Die fehlende Wiedererlangung des Glutathions und seines Redoxzustandes mithilfe der antioxidativen Bisarylimine könnte auf diese veränderten regulatorischen Effekte auf die Enzyme der Glutathionsynthese und seiner Regeneration durch die Toxine zurückzuführen sein. Diese Befunde zeigen, dass neuroprotektive Effekte der Bisarylimine unabhängig von der reduktiven Kapazität des Glutathions sind.

Ein selektiver Inhibitor der Glutathionsynthese ist das Buthionin-Sulfoximin (BSO). BSO inhibiert selektiv und irreversibel das Enzym  $\gamma$ -GCS, das verantwortlich für die Synthese des Glutathions ist (siehe auch Abschnitt 1.3.2.). Inhibition der  $\gamma$ -GCS durch BSO führt nach 24 h zu einer fast vollständig Depletion des zellulären Glutathions (siehe Abb. 3.1.7.). Zur Untersuchung der Fragestellung, ob Bisarylimine die zelluläre Integrität aufrechterhalten können bei einer vollständigen Glutathiondepletion, wurden sowohl SH-SY5Y Zellen als auch primäre Mittelhirnzellkulturen auf zytotoxische Marker bei Ko-Inkubationen mit BSO und Phenothiazin, Iminostilben oder Phenoxazin hin untersucht. Es konnte ein fast vollständiger Schutz beider Zellkulturen mithilfe der Bisarylimine in nanomolaren Konzentrationen gegenüber der Glutathiondepletion erreicht werden (siehe Abb. 3.1.8. bis 3.1.10. und 3.2.7. und 3.2.8.). Reine Glutathiondepletion führt in SHSY5Y Zellen innerhalb von 60 h zur Desintegration des Zellkerns und der Zellmembran, primäre Neurone sind nach 72 h BSO-Behandlung vollständig eliminiert. Dies deutet darauf hin, dass die Störung des oxidativen Gleichgewichts innerhalb beider Zellkulturen in einer vergleichbaren Zeitspanne ähnliche zytotoxische Effekte hervorruft, wie MPP<sup>+</sup>- oder Rotenon-Behandlungen. Neuroprotektive Effekte der Bisarylimine gegenüber der Glutathiondepletion und damit gegenüber einem reinen, zellulären Redoxungleichgewicht zeigen sich sogar leicht ausgeprägter als bei einer Komplex I Inhibition durch MPP<sup>+</sup> oder Rotenon (vergleiche 3.2.1. bis 3.2.6. und 3.2.7. bis 3.2.8.). Sherer et al. (2003) konnten zeigen, dass in der zytotoxischen Wirkung des Rotenons, die Glutathiondepletion und erhöhte ROS-Generierung,

vermittelt durch die Komplex I Inhibition, höher einzustufen sind als eine ATP-Depletion. Hiermit kann bestätigt werden, dass Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin rein antioxidativ wirken, dies wird durch die fehlende Protektion der N-substituierten Bisaryliminstrukturen (N-Acetylphenothiazin, Chlorpromazin und Promazin) gegenüber den Toxinen unterstützt (siehe Abschnitt 3.1. und 3.2.).

Da Bisarylimine bei Depletion eines der wichtigsten antioxidativen Moleküle die Integrität der SH-SY5Y Zellen und der Primärzellkulturen aufrechterhalten, sowie vor der Wirkung der Parkinson-Toxine in dopaminergen humanen SH-SY5Y Zellen, in primären dopaminergen Neuronen und in einem neuronalen Netzwerk schützen, wurde das Ausmaß der Oxidationsinduktion durch MPP<sup>+</sup> und Rotenon auf dem Niveau der zellulären Komponenten untersucht. Oxidativ modifizierte Proteine in Form von Proteincarbonylierungen stellen einen prominenten Marker des zellulären Redoxungleichgewichts und der ROS-Emission dar (Berlett und Stadtman, 1997). Nach 60 h MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlung wird eine ausgeprägte Proteincarbonylierung innerhalb der Zellkulturen identifiziert (siehe Abb. 3.1.11.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und 50 nM Phenothiazin, Iminostilben oder Phenoxazin weisen eine Verringerung oxidativer Stressmarker auf (siehe Abb. 3.1.11.), hiermit erhalten zu einem gewissen Ausmaß Bisarylimine in niedrigen Konzentrationen bis nach 60 h das Redoxgleichgewicht der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelten Zellen.

Um die Wirkung der Parkinson-Toxine und Bisarylimine auf das enzymatische antioxidative System der Primärzellkulturen zu untersuchen, wurden die antioxidativen Enzyme GPx1 (Glutathionperoxidase 1), MnSOD (mitochondriale Mangan-Superoxiddismutase), SOD1 (zytosolische Cu/Zn-Superoxiddismutase) und Katalase (siehe Abschnitt 1.3.2.) innerhalb der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen auf Proteinebene analysiert. Innerhalb von 12 h werden in allen MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen die antioxidativen Enzyme GPx1, MnSOD und SOD1, weniger Katalase, hochreguliert (nicht gezeigt). Nach 36 h Toxinbehandlung kommt es zu einer Destabilisierung des antioxidativen Systems in der neuroglialen Kultur. Alle antioxidativen Enzyme werden auf Proteinebene auf 20 bis 60 % herunterreguliert, bei MPP<sup>+</sup>-Behandlung werden v.a. Katalase und SOD1, bei Rotenon-Behandlung v.a. GPx1 und SOD1 reduziert (siehe Abb. 3.2.9.). Somit führt, nach einer kurzzeitigen Erhöhung des antioxidativen Abwehrsystems des neuroglialen Netzwerkes, eine längere akute Toxineinwirkung hingegen zur Destabilisierung des antioxidativen Systems der Zellen. Interessanterweise zeigen Kunikowska und Jenner, dass in Parkinson-Patienten in der *SNpc* eine Erniedrigung der *GPx1*- und *SOD1*-Expression erfolgt. In gesunden Primaten ist die Expression von *GPx1* und *SOD1* in der *SN* im Vergleich zu anderen Komponenten der Basalganglien erhöht, wie auch bei Ratten die *SN* erhöhte Expressionsspiegel an *MnSOD*, *SOD1* und *GPx1* im Vergleich zu anderen Hirnarealen aufweist. MPTP-behandelte Primaten zeigen eine starke Reduktion der *SOD1*-Expression, die *GPx1*-Expression wird hingegen nicht signifikant verändert, in 6-Hydroxydopamin behandelten Ratten sinken die Expressionsspiegel der *SOD1* und *MnSOD*

drastisch ab, *GPx1*-Expressionspiegel sind nicht signifikant verändert (Kunikowska und Jenner, 2001; 2002; 2003). Somit kann gezeigt werden, dass nach kompensatorischen antioxidativen Mechanismen als Antwort auf erhöhte oxidative Bedingungen, das antioxidative System in Parkinson-Modellen destabilisiert wird. Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin erhalten und stabilisieren hingegen bis nach 36 h Toxinbehandlung das antioxidative enzymatische System des neuroglialen Netzwerkes. GPx1 und SOD1 werden bei Ko-Inkubationen herunterreguliert, zeigen sich jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu alleinigen Toxinbehandlungen (siehe Abb. 3.2.9.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und dem N-substituierten Acetylphenothiazin zeigen keine positive Wirkung auf die antioxidativen Enzyme.

Mithilfe von MPP<sup>+</sup> und Rotenon konnten Marker der PD-Pathogenese innerhalb der *in vitro* Modellsysteme etabliert werden. MPP<sup>+</sup> und Rotenon wirken v.a. prooxidativ innerhalb der *in vitro* Modelle. Die primäre Wirkung von MPP<sup>+</sup> und Rotenon ist die Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Cadenas et al., 1977; Ramsay und Singer, 1992; Dauer und Przedborski, 2003; Sherer et al., 2003). Auf diesem primären Effekt der Toxine scheint die Selektivität der nigralen dopaminergen Vulnerabilität zu basieren (siehe Abschnitt 1.2. und 1.8.2.). Somit stellt sich die Frage, wie Mitochondrien auf Parkinson-Toxine reagieren und ob Bisarylimine die Toxin-induzierten mitochondrialen Veränderungen verhindern können.

#### **4.1.2. Mitochondrialer Phänotyp unter Komplex I Inhibition**

##### **Das mitochondriale Membranpotential**

Barrientos und Moraes (1999) zeigen, dass eine Komplex I Inhibition ab dem Schwellenwert von 60 % nach 4 h die Zellrespirationsrate um etwa 35 % erniedrigt, die ROS-Bildungsrate bei 100 %iger Komplex I Inhibition (nach 4 h 100 nM Rotenon-Behandlung) um etwa 25 % ansteigt und das Membranpotential auf etwa 75 % sinkt. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist mit einer Absenkung des Protonengradienten verbunden. Durch Oxidation des Hauptproduktes der Reduktionsäquivalenten der Glucoseoxidation stellt Komplex I den Hauptelektronenkonsumenten der mitochondrialen Atmungskette dar. Parallel zum Elektronentransfer stellt sich in aktiven Mitochondrien ein Potentialgleichgewicht von etwa -180 mV ein (siehe auch Abb. 1.7. und Abschnitt 1.3.1.). Eine Komplex I Inhibition führt zum erniedrigten Elektronentransfer über die Membran und somit erniedrigter Protonenausschleusung, die zur Absenkung des mitochondrialen Membranpotentials und zur Abnahme der ATP-Generierung beitragen. Inhibition des Komplex I führt zur vermehrten ROS-Produktion (Takeshige und Minakami, 1979; Takayanagi et al., 1980; Turrens und Boveris, 1980; Hasegawa et al., 1990). Die Bindung des Rotenons und des MPP<sup>+</sup> an die Ubichinon-Bindestelle des Komplex I (Cadenas et al., 1977; Ramsay und Singer, 1992) vermittelt einen erhöhten

Reduktionsstatus des Flavomononukleotid-Redoxzentrums des Komplex I. Der Reduktionsgrad dieses Elektronenakzeptors wird durch das  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ -Gleichgewicht bestimmt. Da kein Elektronentransfer auf Ubichinon erfolgt, verbleiben Elektronen an diesem Redoxzentrum und diese akkumulierte Reduktionskraft wird Sauerstoff zum Superoxidradikal reduzieren (Murphy, 2009). Die erhöhte ROS-Emission ist in der zytotoxischen Wirkung einer Komplex I Inhibition höher einzustufen als eine ATP-Depletion (Sherer et al., 2003).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das mitochondriale Membranpotential nach 24 und 48 h Toxinbehandlung auf etwa die Hälfte bis zu einem Drittel der Kontrollwerte sinkt und dass Bisarylimine das Membranpotential in Toxinbehandlungen erhalten (siehe Abb. 3.1.15. bis 3.1.18. und 3.2.17.). Der drastische mitochondriale Membranpotentialverlust könnte auf eine Einbindung der mitochondrialen Transitions-pore (MTP) in diesen Prozess zurückzuführen sein (siehe auch Abschnitt 1.4.).  $\text{MPP}^+$  (Cassarino et al., 1999) und Rotenon (Isenberg und Klaunig, 2000) induzieren die Öffnung der mitochondrialen Pore. Die Öffnung der MTP kann in Etappen eingeteilt werden, in welchen es initial zur Öffnung der inneren Pore kommt und erst beim Erreichen eines intramitochondrial-unkontrollierbaren Prozesses, die Öffnung der äußeren MTP einsetzt, welche mit der Freisetzung proapoptotischer Komponenten und möglicher Einleitung der Apoptose oder Nekrose einhergeht (Gazaryan und Brown, 2007). Eine initiale Öffnung der inneren MTP kann durch Oxidation des in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten ANT (Adenin-Nukleotid-Translokator) erfolgen (Petronilli et al., 1994; Costantini et al., 1998; 2000; Vieira et al., 2001; Kowaltowski et al., 2001; He und Lemasters, 2002; Gazaryan und Brown, 2007; Halestrap, 2009). Die Öffnung der MTP wird durch Senkung des mitochondrialen Membranpotentials moduliert (Bernardi, 1992; Bernardi et al., 1993; Petronilli et al., 1993), gleichzeitig führt eine Öffnung der inneren MTP zur vermehrten mitochondrialen Depolarisierung. Dieser Prozess kann sich bis zu einem gewissen Stadium nur auf die innere MTP beziehen. Öffnung der äußeren MTP (spannungsabhängiger Anionenkanal; VDAC) führt zur Freisetzung proapoptotischer Komponenten und zur Induktion der Apoptose oder Nekrose.

Wie kann durch antioxidative Strukturen das Membranpotential aufrechterhalten werden? Wenn man annimmt, dass der drastische mitochondriale Potentialverlust in den Toxin-behandelten Zellen auf die Öffnung der inneren MTP zurückzuführen ist, die durch vermehrte ROS-Emission (ROS überwiegt gegenüber dem zellulären antioxidativen System) auftritt, sollten Antioxidantien diesen Prozess aufhalten. Die Mitochondrien-interne Membranpotentialkontrolle, welche durch ATP-abhängige Protonentranslokation in den Intermembranraum, das Membranpotential stabilisieren kann, wird sowohl in Toxinbehandlungen als auch in Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen durch die Komplex I Inhibition erschwert. Kompensatorisch könnte durch Induktion der Glykolyse das zytosolisch gebildete ATP zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials beitragen

(Buchet und Godinot, 1998). Barrientos und Moraes beschreiben, dass eine bis zu 75 %ige Komplex I Inhibition beim Einsatz niedriger Rotenon-Konzentrationen zur Hyperpolarisierung der Mitochondrien bis nach 48 h Toxinbehandlung führt (Barrientos und Moraes, 1999). Dies zeigt, dass intramitochondriale Kontrollmechanismen die Integrität der Mitochondrien innerhalb des Zellgefüges erhalten, solange nicht-kontrollierbare Prozesse die Degradation der Mitochondrien oder die Zelltodeinleitung induzieren.

Um sekundäre Effekte der Komplex I Inhibition und der mitochondrialen Depolarisierung auf Mitochondrien zu untersuchen, wurde die mitochondriale Beweglichkeit in den Behandlungsgruppen analysiert. In Parkinson-Patienten und MPTP-Modellen beginnt der Degenerationsprozess der nigralen Neurone mit synaptischen Endigungen und setzt sich retrograd zu den Zellkörpern fort (Lach et al., 1992; Morrish et al., 1996; Dauer und Przedborski, 2003; Herkenham et al., 1991; siehe Abb. 3.2.3., dargestellt in der gemischten Primärzellkultur). Nigrale dopaminerge Neurone senden sehr lange Axone an das Striatum (Goldstein, 2003), in diesen Neuronen wird ein sehr hoher Prozentsatz (über 95 %) des Gesamtvolumens in axonalen Fortsätzen organisiert (Feng, 2006). Die primäre terminale Eliminierung oder retrograde Degeneration könnte durch gestörte axonale Transportprozesse verursacht werden (Gajdusek, 1985; Goldman, 1987; Lach et al., 1992; Trimmer et al., 2009) und in die selektive Vulnerabilität nigraler dopaminergener Neurone involviert sein. In Ultrastrukturanalysen an striatalen Biopsien von Parkinson-Patienten werden nigrale dystrophische Axonendigungen beobachtet (Lach et al., 1992).

### **Mitochondriale Beweglichkeit**

Trimmer et al. (2009) zeigen, dass der mitochondriale Transport innerhalb des Parkinson-Cybrid-Modells (Mitochondrien-freie Rezipientenzellen, die mtDNA aus Blutplättchen von Parkinson-Patienten enthalten) gestört ist und eine Reduktion der mitochondrialen Wanderung detektiert werden kann. Zytoplasmatische Hybride neuronaler Zellen mit der mtDNA von Parkinson-Patienten stellen ein *in vitro* Parkinson-Modell mit PD spezifischem mitochondrialen Hintergrund dar. In Abschnitt 3.2.5. wird dargestellt, dass es durch Toxinbehandlung in primären Neuronen zur Reduktion der Mobilität der Mitochondrien kommt. Nach 12 h Toxinbehandlung verbleiben Mitochondrien der Primärneurone hauptsächlich im Zellkörper und am Axonhügel arretiert. Entlang der Axone sind wenige Mitochondrien vorhanden und ihre Verteilung ist ungleichmäßig, mit lokalen Ansammlungen und Mitochondrien-freien Strukturen. Nach 48 h erscheinen Mitochondrien als aggregierte Strukturen ohne jeglichen Verteilungscharakter (siehe Abb. 3.2.13. bis 3.2.15.). Eine gestörte Beweglichkeit der Mitochondrien bis zur Arretierung der mitochondrialen Bewegung konnte auch in zeitversetzten Lebendaufnahmen bestätigt werden (nicht gezeigt). In Abbildungen 3.2.13. bis 3.2.15. wird deutlich, dass eine Reduktion mitochondrialer Mobilität innerhalb der Axone einen negativen Einfluss auf die

Versorgung entfernter Strukturen nimmt, welches mit dem primären Verlust der Nervenendigungen und einem retrograden Degenerationsprozess (siehe Abb. 3.2.3.) korreliert werden könnte. Bisarylimine, repräsentativ gezeigt für Phenothiazin, können den negativen Einfluss der Toxine auf die Beweglichkeit innerhalb der Neurone aufhalten. In Ko-Inkubationen wird eine normale Verteilung der Mitochondrien mit leichter Veränderung nach 48 h Behandlung beobachtet (siehe Abb. 3.2.13. bis 3.2.15., bestätigt an zeitversetzten Lebendaufnahmen).

Durch beide Komplex I Inhibitoren wird die Beweglichkeit der Mitochondrien früh negativ beeinflussen. Mit der Dauer der Behandlung treten wenige Mitochondrien in distalen Strukturen auf und verbleiben innerhalb der Fortsätze in „mitochondrialen Aggregaten“ in ihrer Beweglichkeit arretiert (siehe Abb. 3.2.15.). Gestörte Transportprozesse wurden vielfach als ein wichtiger Faktor der PD-Pathogenese postuliert (Gajdusek, 1985; Goldman, 1987; Lach et al., 1992; Feng, 2006; Sulzer, 2007; De Vos et al., 2008; Borland et al., 2008; Liang et al., 2008; Büeler, 2009; Trimmer et al., 2009; Van Laar und Berman, 2009). Ein Zusammenhang mit gestörter Beweglichkeit konnte für MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Toxizität beschrieben werden (Meisner und Sorensen, 1966; Brinkley et al., 1974; Marshall und Himes, 1978; Ren et al., 2005; Diaz-Corrales et al., 2005; Jiang et al., 2006a,b; Feng, 2006; Richter et al., 2007; Srivastava und Panda, 2007; Cai et al., 2009). Oxidativer Stress führt zum hyperphosphorylierten Tau, Mikrotubuli-Depolymerisierung und hierdurch zur Einschränkung der mitochondrialen Dynamik (Melov et al., 2007; Jendrach et al., 2008). Da in Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen bis nach 48 h Toxinwirkung die Verteilung der Mitochondrien vergleichbar ist mit der mitochondrialen Verteilung in unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.2.15.), deutet darauf hin, dass der durch MPP<sup>+</sup> und Rotenon induzierte oxidative Stress innerhalb der Zellen einen wichtigen Faktor der mitochondrialen Dynamik darstellt. Das mitochondriale Membranpotential beeinflusst die Beweglichkeit der Mitochondrien (Chang und Reynolds, 2006). Inhibition des Komplex I durch MPP<sup>+</sup> und Rotenon führt zum drastischen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (siehe oben und Abb. 3.1.15. bis 3.1.18. und 3.2.17.) und zur gestörten mitochondrialen Mobilität (siehe Abb. 3.2.13. bis 3.2.15.).

### **Fusion und Fragmentierung der Mitochondrien**

Neben der Bewegung der Mitochondrien innerhalb der Zelle werden intermitochondriale Dynamiken beobachtet. Mitochondrien sind in ihrer Morphologie sehr heterogen und erscheinen als isolierte, fragmentierte Einheiten oder als fusionierte, interagierende Vernetzungen. Die mitochondriale Fragmentierung erfolgt mithilfe des zytosolischen Drp1 (dynamamin-related protein 1) und dem an der äußeren Membran lokalisierter hFis1 Protein, welche durch GTP-Hydrolyse die mechanische Teilung der Mitochondrienmembran bewerkstelligen. Der Fusionsprozess wird durch das in der inneren

Mitochondrienmembran lokalisierte OPA1 (optic atrophy 1) und den an der äußeren Membran lokalisierten GTPasen, Mitofusin 1 und 2 (Mfn1/2), vermittelt (Gazaryan und Brown, 2007).

Sowohl in SH-SY5Y Zellen als auch in primären Mittelhirnneuronen kommt es zu einer mitochondrialen Umstrukturierung durch die beiden Parkinson-Toxine. Alleinige Toxininkubationen weisen eine verstärkte mitochondriale Fragmentierung auf. In SH-SY5Y Zellen wurde die mitochondriale Morphologie nach 24 und 48 h untersucht und zeigt, dass parallel zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Mitochondrien fragmentiert erscheinen und in späteren Phasen auch rundliche MitoTracker-positive Aggregate, v.a. bei Rotenon-Behandlung, ausbilden (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.). Parallel konnte in den frühen Phasen der Toxinbehandlung (4 und 8 h) ein erhöhtes Drp1-Signal detektiert werden, OPA1 hingegen zeigt sich nicht stark beeinflusst durch die Toxingabe (siehe Abb. 3.1.19.). Nach 24 und 48 h kommt es zur Abnahme des Drp1-Signals und leichter Zunahme des OPA1-Signals (siehe Abb. 3.1.19.; dargestellt für 48 h). Parallel konnten vermehrt rundliche Mitochondrienaggregate beobachtet werden, welche jedoch morphologisch einem fusionierten Mitochondrienphänotyp nicht entsprechen (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen erhalten das mitochondriale Membranpotential und weisen einen fusionierten bis stäbchenförmigen mitochondrialen Phänotyp auf (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.). Diese Behandlungen zeigen nach 4 h eine leichte Hochregulation des Drp1 und OPA1, nach 8 h befinden sich die Drp1- und OPA1-Proteinspiegel auf dem Niveau der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 3.1.19.). Nach 24 und 48 h erhöhen sich die OPA1-Proteinspiegel und es ist eine leichte Abnahme des Drp1-Proteins zu detektieren (siehe Abb. 3.1.19.). Parallel zu den mitochondrialen Regulationsmechanismen, erscheinen Mitochondrien eher fusioniert (siehe Abb. 3.1.16. und 3.1.17.).

Mitochondrien der Primärzellkulturen wurden nach 6, 12, 24 und 48 h Toxinbehandlung oder in Ko-Inkubationen mit Toxinen und Phenothiazin untersucht. Nach Toxinbehandlung erscheinen Mitochondrien stark fragmentiert und diese Morphologie bleibt erhalten bis nach 24 h (siehe Abb. 3.2.10. bis 3.2.14.). Nach 48 h werden v.a. MitoTracker-positive Strukturen, die als große Aggregate auftreten, detektiert (siehe Abb. 3.2.15.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und Phenothiazin weisen nach 6 h Behandlung fusionierte Mitochondrien auf, in Ko-Inkubationen mit Rotenon und Phenothiazin treten häufig stäbchenförmige Mitochondrien auf (ähnlich der Mitochondrien unbehandelter Zellen; siehe Abb. 3.2.10. und 3.2.11.A. und B.). Nach 12 bis 48 h Ko-Inkubation treten eher stäbchenförmige und weniger fusionierte Mitochondrien auf (siehe Abb. 3.2.12. bis 3.2.15.). Nach 12 h Toxinbehandlung wird in allen Behandlungsgruppen das Drp1-Protein herunterreguliert, v.a. in alleinigen Toxinbehandlungen, OPA1 zeigt sich nur in Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen erhöht (nicht gezeigt). Nach 24 h wird Drp1 in Toxinbehandlungen und Ko-Inkubationen mit dem N-substituierten Acetylphenothiazin erhöht, OPA1 hingegen verstärkt herunterreguliert (siehe Abb. 3.2.11.C.). Proteinspiegel des Drp1 und OPA1 befinden sich in Ko-



Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen nach 24 h auf etwa dem Proteinniveau der unbehandelten Zellen, mit einer leichten Erhöhung des OPA1-Proteins (siehe Abb. 3.2.11.C.).

So kann dargestellt werden, dass Mitochondrien in Toxinbehandlungen sehr früh einen fragmentierten Phänotyp annehmen und Ko-Inkubationen mit Phenothiazin, Iminostilben oder Phenoxazin diesen Phänotyp aufheben oder verstärkt fusionieren. Parallel kann dieses mitochondriale Verhalten auf Niveau der Proteine der Teilungs-/Fusionsmaschinerie dargestellt werden. Mitochondriale Fusions- und Teilungsmechanismen schützen Zellen vor mitochondrialer Dysfunktion (Alexander et al., 2000; Inoue et al., 2000; Kijima et al., 2005; Chen et al., 2005a). Die basale Steuerung der mitochondrialen Teilung ermöglicht die Dynamik der Mitochondrien als isolierte Einheiten. Die mitochondriale Fusion wird als protektiver Prozess verstanden (Cheung et al., 2007; Cribbs und Strack, 2007), in welchem eine Stabilisierung des mitochondrialen Genoms vermittelt wird und es somit zur Regeneration beanspruchter Mitochondrien kommen kann (Westermann, 2003; Bossy-Wetzel et al., 2003; Chen et al., 2007a). Insbesondere bei einer Komplex I Inhibition und vermehrter ROS-Induktion bietet der Fusionsmechanismus einen Schutz der mitochondrialen Integrität. Dieser Prozess erfordert jedoch ein gewisses mitochondriales Membranpotential (Meeusen et al., 2004). Toxin-behandelte Mitochondrien sind nach 24 und 48 h stark depolarisiert (siehe Abb. 3.1.15., 3.1.18. und 3.2.17.). Hiermit wird eine protektive Fusion der geschädigten Mitochondrien nicht ermöglicht. Eine nicht-basale mitochondriale Fragmentierung depolarisierter Mitochondrien wird mit Mitophagie (bis zu einem gewissen Grad protektiv, Chu, 2009; siehe unten) oder der Apoptoseeinleitung assoziiert (Karbowski et al., 2004; Youle und Karbowski, 2005; Yuan et al., 2007; Gomez-Lazaro et al., 2008; Sandebring et al., 2009).

### **Kompensatorische Biogenese der Mitochondrien**

Als kompensatorische Antwort auf einen erniedrigten ATP-Spiegel, kann die mitochondriale Neusynthese angeschaltet werden. Mitochondrien alternder Zellen weisen ein reduziertes Membranpotential auf, welches durch die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle kompensiert wird (Joo et al., 1999; Huang et al., 2005; Gazayaran und Brown, 2007). Sowohl in SH-SY5Y Zellen als auch in primären Neuronen konnte eine erhöhte Neusynthese der Mitochondrien nach Toxinbehandlung nachgewiesen werden. In SH-SY5Y Zellen kann nach 36 h dargestellt werden, dass alte Mitochondrien (vor Toxingabe gefärbte Mitochondrien) sich in Toxinbehandlungen an einem Pol der Zelle versammeln und vermehrt neue Mitochondrien detektiert werden können (siehe Abb. 3.1.22.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und Phenothiazin, Iminostilben oder Phenoxazin weisen hingegen eine den unbehandelten Zellen ähnliche Verteilung alter Mitochondrien auf, eine leichte Zunahme neu gebildeter Mitochondrien kann beobachtet werden (siehe Abb. 3.1.22.). In primären Neuronen wird eine Hochregulation der mitochondrialen Neusynthese detektiert (siehe Abb. 3.2.12.). Nach 24 h MPP<sup>+</sup>-Behandlung kommt es zur Zunahme an neu gebildeten Mitochondrien mit paralleler leichter

Abnahme der vor Toxingabe gefärbten Mitochondrien (siehe Abb. 3.2.12.). In Rotenon-Behandlungen ist die Menge an neu gebildeten Mitochondrien nicht sehr hoch, alte Mitochondrien nehmen in der Anzahl zu unbehandelten Zellen ab (siehe Abb. 3.2.12.), somit wird in Rotenon-Behandlungen die Gesamtanzahl an Mitochondrien reduziert. Ko-Inkubationen mit Toxinen und Phenothiazin weisen nach 24 h eine ähnliche Anzahl an alten und neu gebildeten Mitochondrien wie unbehandelten Zellen auf (siehe Abb. 3.2.12.), die Anzahl neu gebildeter Mitochondrien erhöht sich nach 48 h (siehe Abb. 3.2.15.).

### **Oxidativer Stress induziert autophagische Prozesse in Parkinson-Modellen**

Oxidativer Stress führt zu oxidativ modifizierten Proteinen (siehe Abschnitt 1.3.3., Abb. 1.8. und Abb. 3.1.11.). Modifizierte Proteine werden über das proteosomale und lysosomale Abbausystem eliminiert (siehe Abschnitt 1.3.4.). Langlebige Proteinkomplexe, sowie veränderte Organellen, wie dysfunktionelle Mitochondrien, werden über autophagische Prozesse entfernt (siehe Abschnitt 1.3.4.). Autophagische Prozesse sind in dopaminergen Neuronen der *SNpc* von Parkinson-Patienten hochreguliert (Anglade et al., 1997), wie auch in Parkinson-Modellen erhöhte autophagische Prozesse beschrieben sind (Larsen et al., 2002; Gomez-Santos et al., 2003; Zhu et al., 2003; Cuervo et al., 2004), wie z.B. *in vitro* für Rotenon (Pan et al., 2009), MPP<sup>+</sup> (Zhu et al., 2007) und Paraquat (González-Polo et al., 2007). Nach 24 h Toxin-Behandlung kommt es in SH-SY5Y Zellen zu einer drastischen Induktion lysosomaler Prozesse (siehe Abb. 3.1.20.). Lysosomen sind v.a. am Zellrand verteilt und es erscheinen oft größere lysosomale Strukturen. Nach 48 h Toxinbehandlung kommt es zur Reduktion der Lysosomenanzahl. Etwa 70 % der Zellen weisen schwach leuchtende und kleine Lysosomen auf, in etwa 30 % sind groß erscheinende Lysosomen zu erkennen, welche sich v.a. am Zellrand organisieren (siehe Abb. 3.1.20.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und den protektiven Bisaryliminen, beispielhaft dargestellt für Phenothiazin, weisen nach 24 h ein lysosomales Abbaunetz ähnlich den unbehandelten Zellen auf, nach 48 h kommt es zur lysosomalen Induktion mit meist größeren lysosomalen Strukturen, die am Zellrand organisiert sind (siehe Abb. 3.1.20.). Lysosomale Prozesse sind jedoch nach 48 h in Ko-Inkubationen nicht so weit ausgeprägt, wie nach 24 h der alleinigen Toxinbehandlung. Auch in Primärzellkulturen werden lysosomale Abbauprozesse durch beide Toxine hochreguliert. Nach 24 h sind in Toxin-behandelten Primärzellen große lysosomale Strukturen, v.a. im Zellkörper, aber auch in Bereichen der Fortsätze, zu erkennen (siehe Abb. 3.2.16.). Die Anzahl lysosomaler Strukturen nimmt nach 48 h Toxinbehandlung zu (siehe Abb. 3.2.16.). Ko-Inkubationen mit Toxinen und Phenothiazin weisen eine leichte Induktion des lysosomalen Abbaus nach 48 h Behandlung auf (siehe Abb. 3.2.16.).

Erhöhte ROS-Produktion durch Inhibition des Komplex I (Sherer et al., 2003; Fiskum et al., 2003; Turrens, 2003) durch die beiden Parkinson-Toxine propagiert die Entstehung modifizierter Proteine

(siehe Abschnitt 1.3.3., Abb. 1.8. und Abb. 3.1.11.). Parallel verlieren Mitochondrien ihr Potential (siehe oben und Abb. 3.1.15. bis 3.1.18. und 3.2.17.), die Möglichkeit zur Wanderung (siehe Abb. 3.2.13. bis 3.2.15.), sowie die Möglichkeit zur protektiven Fusion (siehe Abb. 3.1.16., 3.1.17., 3.1.19., 3.2.10. bis 3.2.15.). Mitochondrien werden innerhalb der Toxin-behandelten Zellen eliminiert und kompensatorisch neue Mitochondrien gebildet (siehe Abb. 3.1.22., 3.2.10. und 3.2.12.). Fragmentierte Mitochondrien (siehe Abb. 3.1.16., 3.1.17., 3.2.10. bis 3.2.15.) können durch Mitophagie eliminiert werden, bevor dysfunktionelle Mitochondrien die Freisetzung proapoptotischer Komponenten einleiten (Kim et al., 2007; Zhang et al., 2007). Mitophagie ist abhängig von dem Fragmentierungsgrad der Mitochondrien (Barsoum et al., 2006), vom erniedrigten mitochondrialen Membranpotential (Kim et al., 2007; Nowikovsky et al., 2007; Narendra et al., 2008), Lipidperoxidationen (Kissová et al., 2006), der Öffnung der MTP (Xue et al., 2001; Elmore et al., 2001; Tolkovsky et al., 2002; Rodriguez-Enriquez et al., 2006) sowie von der mitochondrialen ROS-Emission (Scherz-Shouval et al., 2007). Antioxidantien können die Induktion der Mitophagie verhindern, u.a. auch durch die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Potentials (Gandhi et al., 2009; Pan et al., 2009). Ein kontrollierter Mitophagieprozess stellt einen protektiven Mechanismus dar, da nicht-funktionelle, potentiell toxische Mitochondrien eliminiert werden können, bevor sie proapoptotische Signal in das Zytosol freisetzen.

### **Zusammenfassung der *in vitro* Ergebnisse**

Mithilfe von MPP<sup>+</sup> und Rotenon konnten Marker der PD-Pathogenese innerhalb der *in vitro* Modellsysteme etabliert werden. Mit der primären Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, konnte ein verändertes Verhalten der Mitochondrien nach alleiniger Toxinbehandlung detektiert werden. Das Membranpotential ist stark reduziert durch die Behandlung mit den Komplex I Inhibitoren, hierdurch kommt es zur Störung der Transportprozesse der Mitochondrien und somit einer unvollständigen Verteilung der Energie-Produzenten innerhalb der Zellen. Gestörte Fusions- und Teilungsprozesse verhindern den protektiven intermitochondrialen Informationsaustausch, es kommt zur verstärkten Eliminierung der Mitochondrien mit paralleler Induktion kompensatorischer Neusynthese in den Anfangsphasen der Toxinbehandlung. Die Komplex I Inhibition wirkt sich prooxidativ auf die Zellen aus. Parallel wird eine Depletion des energetischen Status in späteren Phasen eingeleitet. Das antioxidative System der Zelle und hiermit die reduktive Kapazität der Zelle, in Form des Glutathions und enzymatischer ROS-Detoxifizierungsenzyme, wird in den späten Phasen stark herunterreguliert. Es können verstärkt oxidative Marker und autophagische Prozesse detektiert werden. All diese Ereignisse führen in den Toxin-behandelten Zellen zur Apoptose und Nekrose (SH-SY5Y Zellen), sowie zur Eliminierung der neuronalen Strukturen über einen retrograden Mechanismus (primäre Neuronenkultur). Dopaminerge Neurone zeigen eine frühzeitige Beeinträchtigung. Dies bestätigt die Selektivität der untersuchten Modelle.

Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin erhalten die Integrität der Mitochondrien mithilfe der antioxidativen Wirkung und können durch ROS-Entgiftung den verstärkten Verlust des Membranpotentials und des energetischen Status einschränken. Mithilfe der hoch potenten antioxidativen Wirkung werden alle oben genannten Prozesse zu einem gewissen Grad verhindert und die Integrität der Zellen bei akuter Komplex I Inhibition und Glutathiondepletion aufrechterhalten.

#### 4.2. Neuroprotektion der dopaminergen Neurone *in vivo*

In dieser Arbeit wurde *C. elegans* als Modellorganismus zur Untersuchung des protektiven Charakters der Bisarylimine im *in vivo* Parkinson-Modell eingesetzt. Die untersuchten *C. elegans* Modellsysteme basieren auf den Parkinson-Toxinen, MPP<sup>+</sup> und Rotenon, welche spezifische Phänotypen in larvalen und adulten Nematoden induzieren. Hierbei wurde neben der Untersuchung der Auswirkungen von MPP<sup>+</sup> und Rotenon auf den Gesamtorganismus (Larvenmodell), die Beweglichkeit der Würmer (Larven- und adultes Modell) sowie die Integrität des neuronalen Netzwerkes analysiert (Larven- und adultes Modell). Dopaminerge Neurone wurden in der transgenen N2-Wurmlinie mithilfe dopaminerg-spezifischer *DsRed2*-Expression (*DsRed2* unter *Cat-2*-Promotor) visualisiert und dem Gesamtnervensystem (pan-neuronale *CFP*-Expression) gegenübergestellt. Toxin-induzierte Parkinson-Modelle in *C. elegans* sind für 6-Hydroxydopamin (Nass et al., 2002; Cao et al., 2005), sowie MPP<sup>+</sup> und Rotenon (Braungart et al., 2004) bekannt. Diese *in vivo* Modellsysteme rekapitulieren die erhöhte Sensibilität dopaminerger Neurone und eignen sich zur Evaluierung antisymptomatischer und protektiver Therapeutika (Braungart et al., 2004; Schmidt et al., 2007).

##### 4.2.1. L1-Larven Parkinsonmodell

L1-Larven bleiben in Anwesenheit von MPP<sup>+</sup> oder Rotenon im larvalen Stadium arretiert (siehe Abb. 3.3.1. bis 3.3.6.) und weisen einen veränderten Bewegungsphänotyp auf (siehe Abb. 3.3.1.). Nach drei Inkubationstagen entwickeln sich unbehandelte L1-Larven zu adulten Individuen. Apomorphin ist ein bekannter Dopaminrezeptor-Agonist und wird in Parkinson-Patienten zur symptomatischen Behandlung eingesetzt (Antonini und Tolosa, 2009). Apomorphin hebt den larval-arretierten Phänotyp auf (siehe Abb. 3.3.3., siehe auch Braungart et al., 2004) und ermöglicht in etwa 60 % der Larven eine Weiterentwicklung meist ins L3-Stadium. Nur wenige Individuen entwickeln sich bis hin zum L4-Stadium (siehe Abb. 3.3.3.). Ein wichtiges Kriterium dieser Parkinson-Modelle ist die selektive Degeneration dopaminerger Neurone. Zur Untersuchung der selektiven Beeinträchtigung des dopaminergen Systems durch die beiden Parkinson-Toxine in *C. elegans*, wurde eine transgene Wurmlinie etabliert, welche dopaminerg-spezifisch *DsRed2* und pan-neuronale *CFP* exprimiert. Diese Wurmlinie ermöglicht einzelne neuronale Strukturen morphologisch *in vivo* zu untersuchen mit der

selektiven Analyse des dopaminergen Systems (siehe Abb. 3.3.7.). An FudR-behandelten L1-Larven konnte bestätigt werden, dass im L1-Larvenstadium alle dopaminergen Neurone entwickelt sind (siehe Abb. 3.3.8. und 3.3.10.). FudR ist ein Inhibitor der DNA-Synthese, durch Inhibition der Zellteilung kommt es im Wurm zum Entwicklungsarrest (Mitchell et al., 1979). Behandlung der L1-Larven mit MPP<sup>+</sup> oder Rotenon führt zu einer selektiven Degeneration dopaminergere Neurone innerhalb des neuronalen Systems des *C. elegans* (siehe Abb. 3.3.8. bis 3.3.10.). Die selektive Beeinträchtigung der dopaminergen Neuronenpopulation konnte an der unveränderten Morphologie des Gesamtnervensystems (pan-neuronale Expression des *CFP*) bestätigt werden (siehe Abb. 3.3.8. und 3.3.9.).

Der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induzierte larvale Phänotyp wird mithilfe nanomolarer Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben oder Phenoxazin aufgehoben. Larven entwickeln sich im MPP<sup>+</sup>-Modell unter Einbezug dieser Strukturen bis hin zum L4- und adulten Stadium (siehe Abb. 3.3.2. und 3.3.3.), Bisarylimine heben somit den gesamten toxischen Effekt des MPP<sup>+</sup> in L1-Larven auf. Rotenon scheint einen ausgeprägteren Effekt auf die Entwicklung von *C. elegans* auszuüben, unter Einbezug der Bisarylimine ist eine Fortentwicklung bis hin zum L3- und L4-Stadium festzustellen (siehe Abb. 3.3.5.). Bisarylimine entfalten ihre schützenden Eigenschaften ab 50 nM, protektive Konzentrationen liegen zwischen 100 bis 1000 nM, mit der wirksamsten Konzentration bei 500 nM (siehe Abb. 3.3.2., 3.3.3. und 3.3.5.). Der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induzierte Bewegungsphänotyp wird mithilfe der Bisarylimine aufgehoben (nicht gezeigt). Im transgenen MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Modell weisen Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin einen protektiven Effekt auf die Integrität dopaminergere Neurone auf. Das dopaminerge System des *C. elegans* bleibt mithilfe nanomolarer Konzentrationen an Bisaryliminen im MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Modell erhalten (siehe Abb. 3.3.8. bis 3.3.10.).

Im MPP<sup>+</sup>-Modell ermöglicht der Dopaminrezeptor-Agonist Apomorphin eine Weiterentwicklung ins L3-, in wenigen Individuen ins L4-Stadium und hebt den Toxin-induzierten Bewegungsphänotyp auf. Eine Beeinflussung des Dopamin-rezipienten Systems kann den Toxin-induzierten larvalen Arrest zu einem gewissen Grad aufheben und verweist darauf, dass die Funktionalität dopaminergere Neurone entscheidend für die Weiterentwicklung ist (siehe auch Abschnitt 4.2.2.). Im Vergleich zum „symptomatischen Therapeutikum“ wird jedoch deutlich, dass antioxidative Bisarylimine den gesamten toxischen Effekt der beiden Parkinson-Toxine in L1-Larven detoxifizieren. Der Entwicklungsarrest beruht nicht ausschließlich auf dem dopaminergen Verlust, sondern auch auf einer Stressantwort der L1-Larven auf MPP<sup>+</sup> und Rotenon. Um auszuschließen, dass Bisarylimine, v.a. Phenothiazin, als Strukturanaloga trizyklischer Neuroleptika an dopaminergere Rezeptoren antagonistisch *in vivo* wirken (siehe auch Abschnitt 4.2.2.), wurden Chlorpromazin, Promazin und Promethazin auf ihr Potential hin untersucht, den Toxin-induzierten larval-arretierten Phänotyp aufzuheben. Innerhalb der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Behandlungsgruppen konnte mithilfe trizyklischer (Chlorpromazin, Promazin oder Promethazin) oder atypischer Neuroleptika (Clozapin oder

Risperidon) und dem N-substituierten Acetylphenothiazin in Konzentrationen bis 10  $\mu\text{M}$  kein Fortschreiten der Entwicklung erzielt werden (siehe Abb. 3.3.2., 3.3.3. und 3.3.5.). N-substituierte Strukturanaloga oder atypische Neuroleptika zeigen keine protektiven Effekte auf den Toxin-induzierten Verlust der dopaminergen Neuronenpopulation (siehe Abb. 3.3.10.). So kann anhand der N-substituierten Substanzen die antioxidative Wirksamkeit der Bisarylimine hervorgehoben werden, da nicht-antioxidative Strukturanaloga des Phenothiazins keine Protektion gegenüber dem Toxin-induzierten Phänotyp aufweisen, und parallel dargestellt werden, dass die protektive Wirkung der Bisarylimine nicht Rezeptor-vermittelt erfolgt (siehe auch Abschnitt 4.2.2.). Um den antioxidativen Wirkungsmechanismus der Bisarylimine hervorzuheben und die relative antioxidative Wirksamkeit *in vivo* aufzuzeigen, wurden bekannte Antioxidantien auf ihr protektives Potential hin untersucht.  $\beta$ -Catechin und Epigallocatechingallat (EGCG) sind Flavonoide, Vitamin E ist eines der häufigsten lipophilen Antioxidantien der Nahrung. Diese Strukturen sind in *C. elegans* antioxidativ wirksam (Adachi und Ishii, 2000; Ye et al., 2008; Abbas und Wink, 2009; Saul et al., 2009). Protektive Konzentrationen von  $\beta$ -Catechin, Vitamin E und EGCG liegen im MPP<sup>+</sup>-induzierten L1-Larvenmodell zwischen 10 und 20  $\mu\text{M}$ , bei diesen Konzentrationen befinden sich die meisten Würmer im L3- und L4-Stadium (siehe Abb. 3.3.4.). Die halbmaximalen effektiven Konzentrationen der Bisarylimine gegenüber MPP<sup>+</sup> und Rotenon liegen zwischen 40 und 120 nM (siehe Abb. 3.3.2. und 3.3.5.), die EC<sub>50</sub>-Werte der Kontroll-Antioxidantien liegen zwischen 450 und 900 nM gegenüber MPP<sup>+</sup> (siehe Abb. 3.3.4.) und bei 14  $\mu\text{M}$  für Vitamin E und 50  $\mu\text{M}$  für  $\beta$ -Catechin und EGCG gegenüber Rotenon (siehe Abb. 3.3.6.). Parallel zur niedrigen effektiven Dosis (um etwa zwei bis drei Potenzen niedriger als für bekannte Antioxidantien) kann dargestellt werden, dass Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin die Toxinwirkung *in vivo* fast vollständig detoxifizieren (vergleiche Abb. 3.3.2., 3.3.3. und 3.2.4.).

Bisarylimine und Neuroleptika entwickeln in höheren mikromolaren Konzentrationen einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Würmer, welcher als Paralyse beschrieben werden kann. Antipsychotika, wie Chlorpromazin, Clozapin und Risperidon, zeigen in höheren Konzentrationen (ab 40  $\mu\text{M}$ ) negative Effekte auf die Entwicklung von *C. elegans* (Donohoe et al., 2006). Bis 5  $\mu\text{M}$  weisen alleinige Inkubationen mit Neuroleptika keine negativen Effekte auf die Larvalentwicklung auf (nicht gezeigt). Phenothiazin beeinflusst die Entwicklung der Larven bis 500 nM nicht negativ, es treten vermehrt größere adulte Individuen innerhalb der Population auf (nicht gezeigt), 5  $\mu\text{M}$  Phenothiazin wirkt sich in Abwesenheit der Toxine negativ auf die Wurmentwicklung aus, 10  $\mu\text{M}$  Phenothiazin paralyisiert die Würmer. Phenothiazin wird als Anthelminthikum (gegen Wurminfektionen) eingesetzt (Mitchell, 2006).

#### 4.2.2. Adultes *Caenorhabditis elegans* Parkinsonmodell

In adulten Individuen konnte ein langsam fortschreitender Prozess der dopaminergen Neurodegeneration beschrieben werden (siehe Abschnitt 3.3.2.2.). Anhand morphologischer Untersuchungen der *DsRed2*-exprimierenden Neurone konnte dargestellt werden, dass im MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-Modell in adulten Tieren als erstes PDE Neurone durch die Toxinwirkung beeinträchtigt werden, hierauf degenerieren ADE Neurone und letztendlich verlieren CEP Neurone ihre Integrität (siehe Abb. 3.3.12.A.). Innerhalb der in der Kopfregion liegenden dopaminergen ADE und CEP Neurone kommt es ab dem sechsten und siebten Tag in MPP<sup>+</sup>- oder Rotenon-behandelten Würmern zu einer drastischen Abnahme der *DsRed2*-Fluoreszenzintensität (siehe Abb. 3.3.12. A und B). Parallel wird im nicht transgenen N2-Stamm eine drastische Reduktion der *Tyrosinhydroxylase* mRNA (Enzym der Dopaminsynthese) detektiert (siehe Abb. 3.3.12.C.). Andere Neuronengruppen, wie Motorneurone des ventralen Nervenstranges oder Ganglienansammlungen im pharyngealen Nervenring, werden durch die Toxinbehandlung meist nicht beeinträchtigt, eine leichte Abnahme des pan-neuronalen Signals (*CFP* unter *Sng-1*-Promotor) wird v.a. in Rotenon-Behandlungsgruppen detektiert, in wenigen Individuen sind Strukturen des Nervenstranges und der Ganglienansammlung verändert (siehe Abschnitt 3.3.2.1. und 3.3.2.3.).

Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin erhalten das dopaminerge System in Toxin-behandelten adulten *C. elegans* (siehe Abb. 3.3.13. und 3.3.14.). Axonalen Strukturen sowie Zellkörper dopaminergener Neurone weisen keine Auffälligkeiten des Integritätsverlustes auf. Eine *DsRed2*-Fluoreszenzabnahme ist in Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen zu detektieren, im Vergleich zu Toxinbehandlungen ist die Abnahme nicht hoch (siehe Abb. 3.3.14.). N-substituierte Strukturanaloga (N-Acetylphenothiazin, Chlorpromazin, Promazin und Promethazin), atypische Neuroleptika (Clozapin und Risperidon), Dopamin oder Apomorphin zeigen keine neuroprotektive Wirkung gegenüber der Toxinbehandlung (siehe Abb. 3.3.10. und 3.3.14.).

Dopaminerge Neurone zeigen in Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen *in vivo* morphologisch keine Auffälligkeiten des Integritätsverlustes. Um die Funktionalität der dopaminergen Neurone in Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen zu untersuchen, wurden Verhaltensanalysen durchgeführt. *C. elegans* besitzt acht dopaminerge Neurone, welche als sensorische Neurone beschrieben sind, da sie in einem Wimperepithelium in der Cutikula enden (Ward et al., 1975; Perkins et al., 1986; White et al., 1986). Dopaminerge Neurone modulieren verschiedene Verhaltensmuster des *C. elegans* (siehe Abschnitt 1.8.3.2.). Mithilfe dieser Verhaltensmuster und Screening-Analysen konnten vier Dopaminrezeptoren (DOP-1 bis DOP-4), Homologe der D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptortypen, in *C. elegans* identifiziert werden (Jorgensen, 2004; Schmidt et al., 2007). Dopamin-defiziente Stämme oder Antagonisierung dopaminergener Rezeptoren führen in *C. elegans* zu Defekten der Erfassung von

Nahrungsquellen, Stimulation dopaminerger Rezeptoren hebt diese Defekte auf (Duerr et al., 1999; Sawin et al., 2000; Suo et al., 2004; Hills et al., 2004; Schmidt et al., 2007). Eines der Verhaltensmuster, das durch das dopaminerge System moduliert wird, ist das sog. „area restricted searching“ (Hills et al., 2004). Würmer, welche in einer nährstoffreichen Umgebung kultiviert wurden, werden bei Kontakt mit einer Umgebung ohne Nahrungsquellen, die nahen Bereiche in schnellen Wendungen nach Nahrung durchsuchen. Bei Ablation dopaminerger Neurone oder Antagonisierung der Dopaminrezeptoren fehlt dieses Verhalten und die Würmer werden ohne das verstärkte Wendeverhalten weiterschwimmen (Hills et al., 2004). In adulten MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelten Individuen konnte eine reduzierte Beweglichkeit im Bakterien-freien Puffer beobachtet werden (siehe Abb. 3.3.15.A.), dieses Verhalten könnte mit dem oben beschriebenen Verhaltensmuster korreliert werden. Unter Berücksichtigung der Ausschläge der Schlängelbewegung der Würmer innerhalb von 30 sec in M9-Puffer, konnte eine Abnahme der Bewegungsinitiation und der Schnelligkeit der Bewegungsausführung in Toxin-behandelten Individuen beobachtet werden, welche insgesamt in einer Abnahme der Ausschläge innerhalb der definierten Zeit resultierte (siehe Abb. 3.3.15.A.). Ko-Inkubation mit dem Dopaminrezeptor-Agonisten Apomorphin ermöglicht eine Bewegungszunahme der Toxin-behandelten Würmer des N2-Stammes (siehe Abb. 3.3.15.A.). Zu diesem Zeitpunkt der Toxinbehandlung sind dopaminerge Neurone in transgenen Wümmern degeneriert (siehe Abb. 3.3.13. und 3.3.14.). Hiermit kann gezeigt werden, dass es innerhalb Toxin-behandelter Würmer zum Verlust dopaminerger Funktionalität kommt und dass das verlangsamte Bewegungsverhalten durch fehlendes Dopamin verursacht wird, da Apomorphin die Bewegung positiv beeinflusst (siehe Abb. 3.3.15.A.). Dopamin selbst scheint in den eingesetzten Konzentrationen nur einen leicht positiven Effekt auf dieses Bewegungsverhalten auszuüben (siehe Abb. 3.3.15.A.). In den Abbildungen 3.3.13. und 3.3.14. wird dargestellt, dass die Integrität dopaminerger Neurone mithilfe von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin in Toxin-behandelten Wümmern aufrechterhalten wird. In Bewegungsanalysen zeigen Ko-Inkubationen mit Toxinen und Bisaryliminen eine signifikante Erhöhung der Beweglichkeit gegenüber Toxin-behandelten Wümmern (siehe Abb. 3.3.15.A.). Dies weist darauf hin, dass dopaminerge Neurone mithilfe von Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin funktionell aktiv bleiben. Um auszuschließen, dass Bisarylimine, v.a. Phenothiazin, Rezeptor-vermittelt agieren, wurde das Bewegungsverhalten in Toxin-behandelten Wümmern bei Ko-Inkubation mit Neuroleptika untersucht. Wie N-Acetylphenothiazin, weisen Neuroleptika (Chlorpromazin, Promazin, Promethazin, Clozapin und Risperidon) keine Neuroprotektion der dopaminergen Population in MPP<sup>+</sup>- oder Rotenon-Behandlungen auf. Parallel kann dargestellt werden, dass Neuroleptika und N-Acetylphenothiazin keine, bis leichte Effekte auf das Bewegungsverhalten in MPP<sup>+</sup>-behandelten Würmer haben (siehe Abb. 3.3.15.A.). Um die Modulationsmöglichkeiten dieses Verhaltens genauer zu analysieren, wurden adulte Würmer parallel mit den untersuchten Substanzen in Abwesenheit der Toxine inkubiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Apomorphin und Dopamin die relative Bewegungsrate um 10 bis 15 % erhöhen und Neuroleptika die relative Beweglichkeit der Würmer um



etwa 15 % reduzieren (siehe Abb. 3.3.15.B.). Interessanterweise erhöhen Antioxidantien (Bisarylimine, Vitamin E,  $\beta$ -Catechin und EGCG) die relative Beweglichkeit der Würmer, pro Zeiteinheit werden 5 bis 20 % mehr Ausschläge im Vergleich zu unbehandelten Würmern beobachtet (siehe Abb. 3.3.15.B.).

Im adulten *C. elegans* Modell konnte mithilfe von MPP<sup>+</sup> und Rotenon eine selektive und progressive Degeneration dopaminerger Neurone induziert werden. Nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin erhalten die Integrität dopaminerger Neurone. Innerhalb der MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-behandelten Wurmulturen kann eine Reduktion der Beweglichkeit beobachtet werden. Der dopaminerge Neuronenverlust kann mit der reduzierten Beweglichkeit korreliert werden, da Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin die Integrität dopaminerger Neurone erhalten und die relative Beweglichkeit in Toxin-behandelten Würmern erhöhen, wie auch der Dopaminrezeptor-Agonist Apomorphin die Bewegungsrate in Toxin-behandelten Würmern erhöht, und somit die Stimulation Dopamin-rezeptiver Neurone, die Beweglichkeit positiv beeinflusst. Hiermit kann dargestellt werden, dass innerhalb der Ko-Inkubationen mit Bisaryliminen die Funktionalität der dopaminergen Neurone erhalten bleibt. Neuroleptika weisen keine protektive Wirkung gegenüber dopaminerger Degeneration auf, nehmen keinen positiven Einfluss auf die Beweglichkeit der Würmer und induzieren in Abwesenheit der Toxine eine erniedrigte Bewegungsrate. Phenothiazin, wie bekannte Antioxidantien, haben einen positiven Einfluss auf die Beweglichkeit der Würmer.

Im *C. elegans* Modell konnte gezeigt werden, dass nanomolare bis niedrige mikromolare Konzentrationen an Bisaryliminen vor MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induziertem larvalen Arrest und dopaminergem Verlust schützen. Im Toxin-induzierten *C. elegans*-Modell kommt es zur selektiven Degeneration dopaminerger Neurone, sowohl im larvalen Stadium (siehe Abschnitt 3.3.2.1.) als auch in adulten Würmern (siehe Abschnitt 3.3.2.3.). Neben der dopaminerg-spezifischen Wirkung auf das neuronale System, kann im L1-Larvenmodell ein larvaler Arrest mit einem veränderten Bewegungsphänotyp mithilfe der beiden Parkinson-Toxine induziert werden (siehe Abschnitt 3.3.1.), in adulten Individuen wird eine Bewegungsreduktion beobachtet (siehe Abschnitt 3.3.3.). Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin wirken *in vivo* neuroprotektiv gegenüber einer MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-induzierten Degeneration dopaminerger Neurone im larvalen und adulten Wurmssystem (siehe Abschnitt 3.3.2.). Die Integrität der dopaminergen Neurone wird mithilfe der Bisarylimine *in vivo* stabilisiert. Auch weitere Effekte der beiden Toxine (larvaler Arrest und Bewegung) werden fast vollständig durch nanomolare Konzentrationen an Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin aufgehoben. Es konnte in Bewegungsanalysen dargestellt werden, dass Bisarylimine antioxidativ und nicht Rezeptor-vermittelt in *C. elegans* wirken.

### 4.3. Bisarylimine als effektive Antioxidantien zur Therapie der Parkinsonschen Krankheit

Nun stellen sich zwei wesentliche Fragen: Ist eine antioxidative Strategie in der neuroprotektiven Therapie der Parkinsonschen Erkrankung sinnvoll und könnten Bisarylimine in Menschen ihre potentiell neuroprotektive Wirksamkeit erlangen? Warum sind Bisarylimine potente Antioxidantien und besitzen sie potentielle Eigenschaften von Pharmakostrukturen?

Oxidativer Stress ist in den Prozess der Alterung und der altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen eingebunden (Lin und Beal, 2006; Nunomura et al., 2006). In Parkinson-Patienten werden oxidative Modifikationen zellulärer Komponenten in der *SNpc* detektiert (Sanchez-Ramos et al., 1994; Floor und Wetzel, 1998; Zhang et al., 1999; Kikuchi et al., 2002; Andersen, 2004; Keeney et al., 2006). Wie in der Einleitung und in oberen Abschnitten dargestellt, sind dopaminerge, Neuromelanin-positive Neurone der *SNpc* besonders vulnerabel gegenüber einer Komplex I Inhibition und oxidativem Stress. Antioxidantien als Protektionsstrategie der vulnerablen dopaminergen Neurone sind sehr vielversprechend. In präklinischen Untersuchungen konnte *in vitro* und *in vivo* die protektive Potenz der Antioxidantien bestätigt werden. In Toxin-induzierten Nagetiermodellen wurden verschiedenste antioxidative Strukturen als neuroprotektiv eingestuft, wie z.B. Ubichinon (Beal et al., 1998; Beal, 2002; Cleren et al., 2008), wasserlösliches Ubichinon (Somayajulu-Nitu et al., 2009), Ubichinon plus Kreatin (Yang et al., 2009a), Vitamin E (Perry et al., 1985; Itoh et al., 2006), Glutathionmimetika (Bahat-Stroomza et al., 2005; Chen et al., 2007b; Sharma et al., 2007),  $\alpha$ -Liponsäure (Karunakaran et al., 2007), mitochondrial akkumulierende Szeto-Schiller-Peptide (Yang et al., 2009b), *Ginkgo bilboa* Extrakt (Rojas et al., 2008), Resveratrol (Lu et al., 2008; Blanchet et al., 2008), Metalloporphyrine (SOD-Mimetika) (Peng et al., 2005; Liang et al., 2007b), Epigallocatechingallat (Levites et al., 2001; Choi et al., 2002; Mandel et al., 2004) und synthetische Radikalfänger (Phenyl-tert-Butylnitron, PBN) (Fredriksson et al., 1997; Ferger et al., 2000). Zudem ermöglicht eine erhöhte Expression antioxidativer Enzyme, wie z.B. der Cu/Zn-SOD, GPx und MnSOD, in Toxin-induzierten Nagetiermodellen einen Schutz der dopaminergen Neurone (Przedborski et al., 1992; Klivenyi et al., 1998; Thiruchelvam et al., 2005; Ridet et al., 2006; Choi et al., 2006). So konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass Antioxidantien die dopaminerge Neuronenpopulation in etablierten Parkinson-Modellsystemen schützen und eine gute Strategie der neuroprotektiven Therapie darstellen. In klinischen Studien erzielten potentiell protektive Substanzen in neurodegenerativen Erkrankungen bisher keine bis geringfügige neuroprotektive Effekte (Moosmann und Behl, 2002; Weber und Ernst, 2006). Die DATATOP-Studie (Deprenyl and Tocopherol Antioxidant Therapy of Parkinsonism) wurde an 8900 Patienten in frühen Stadien der PD für 14 Monate Placebo-kontrolliert durchgeführt mit Vitamin E, Deprenyl (MAO-B Inhibitor), sowie Vitamin E und Deprenyl in Kombination. In dieser Studie konnte keine Verbesserung der Parkinson-Symptome durch Vitamin E Supplementierung erreicht werden (Shoulson, 1998). Eine Meta-Analyse

der klinischen Studien mit Vitamin E unterstützt die fehlende protektive Wirkung des Vitamin E in neurodegenerativen Erkrankungen (Pham und Plakogiannis, 2005). In epidemiologischen Studien (Nurses`Health Study: 76890 Frauen über 14 Jahre untersucht und Health Professionals Follow-Up Study: 47331 Männer über 12 Jahre untersucht) konnte aber gezeigt werden, dass Vitamin E reiche Nahrung das Risiko der PD erniedrigt, hingegen Multivitamin Supplementierung und Verabreichung von Vitamin E nicht mit einem erniedrigten Risiko der PD korrelieren (The Parkinson Study Group, 1993; Zhang et al., 2002; Kamat et al., 2008). In einer 16 monatigen, Placebo-kontrollierten, doppelblinden und dosierungsabhängigen klinischen Studie an 80 Patienten mit frühem Stadium der PD konnte Ubichinon als leicht protektiv eingestuft werden (Shults et al., 2002; Weber und Ernst, 2006). Ein wichtiges Kriterium der Neuroprotektion ist die Aufnahme der neuroprotektiven Substanzen in das ZNS. Die Blut-Hirn-Schranke kann als Barriere für Substanzen dienen und die Bioverfügbarkeit der Pharmaka an Stellen des Einsatzes sehr stark herabsenken. Vitamin E und Ubichinon werden trotz massiver Supplementierung nicht signifikant im Gehirn akkumuliert (Vatassery et al., 1998; Dallner und Sindeler, 2000). Die fehlende neuroprotektive Wirkung gut charakterisierter Antioxidantien in Patienten könnte des Weiteren auf eine nicht ausreichende Detoxifizierungskraft der untersuchten Strukturen *in vivo* zurückzuführen sein. Bekannte Antioxidantien sind in *in vitro* Kulturen erst in mikromolaren Konzentrationen wirksam, wie z.B. Ubichinon bei 10  $\mu\text{M}$  (Gille et al., 2004; Li et al., 2005), Vitamin E bei 100  $\mu\text{M}$  (Testa et al., 2005; Wu et al., 2007), Glutathionmimetika bei 500 bis 750  $\mu\text{M}$  (Penugonda et al., 2005), *Ginkgo bilboa* bei 10 bis 100  $\mu\text{M}$  (Zhou und Zhu, 2000), in weiteren Studien werden sogar hohe mikro- und niedrige millimolare Konzentrationen zum antioxidativen Schutz in SH-SY5Y Zellen eingesetzt (Seaton et al., 1997; Kitamura et al., 1998; Chen et al., 2005b). Übertragen auf einen Organismus, kann eine hohe Konzentration an Pharmakostrukturen, Nebeneffekte hervorrufen und sich auf den Organismus negativ auswirken.

Für eine protektive Therapie *in vivo* sollten effektive, biochemisch potente, antioxidative Strukturen, welche eine gute Blut-Hirn-Schrankengängigkeit aufweisen, etabliert werden (Gilgun-Sherki et al., 2001; Moosmann und Behl, 2002). Bisarylimine (siehe Abb. 1.11.), welche in dieser Arbeit als potente Antioxidantien in Parkinson-Modellen etabliert werden, wurden als sehr effiziente ROS-Detoxifizierungsstrukturen beschrieben (Moosmann et al., 2001; Hajieva et al., 2009). In *in vitro* Kulturen wirken Bisarylimine in nanomolaren Konzentrationen gegenüber ROS-induzierenden Toxinen (effektive Konzentrationen liegen zwei bis vier Potenzen niedriger im Vergleich zu vielen antioxidativen Strukturen). Bisarylimine stellen kleine Moleküle dar mit lipophilem Charakter, diese Eigenschaften sollten die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen (siehe auch später). Effiziente Antioxidantien, welche eine hohe ROS-Detoxifizierungsrate bei niedrigen Konzentrationen ermöglichen und eine gute Blut-Hirn-Schrankengängigkeit aufweisen, sollten ihre neuroprotektive Wirkung im ZNS entfalten.

### Strukturelle Eigenschaften der Bisarylimine

Ein Radikal zeichnet sich durch mindestens ein freies, ungepaartes Elektron aus. Die Relation von Elektronen zu Atomen des radikalisierten Moleküls macht diese Struktur sehr instabil und reaktiv. Die Zerfallszeit für das Hydroxyradikal beträgt etwa  $10^{-9}$  sec. Im Gegensatz hierzu sollten antioxidative Strukturen leicht radikalisiert werden, somit leicht ein entradikalisiertes Atom auf Radikale abgeben und gleichzeitig in der radikalisierten Form stabil bleiben.

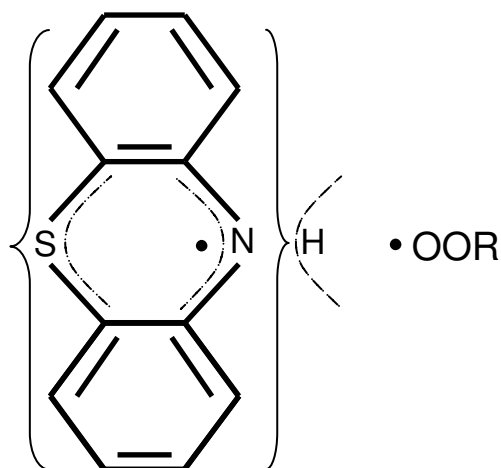


Abb. 4.1.  
Interaktion des Phenothiazins mit einem Radikal.

Das Imin des Phenothiazins ist leicht oxidierbar durch Radikale. Unter Abgabe des Wasserstoffatoms der Iminogruppe wird das reaktive Radikal entkräftet und die entstehende Radikalform in der mesomeren Bisarylstruktur stabilisiert.

Die antioxidative Aktivität der Bisarylimine lässt sich durch ein zentrales Stickstoffatom mit gebundenem Wasserstoff beschreiben, welches in einer mesomeren Struktur eingebettet ist (siehe Abb. 4.1.). Mit diesen Eigenschaften werden Bisarylimine zu sehr potenten Kettenabbruch-Antioxidantien (Murphy et al., 1950; Moosmann et al., 2001). Moosmann et al. charakterisierten die antioxidative Effektivität aromatischer Amin- und Iminstrukturen. Es lässt sich eine deutliche Beziehung zwischen antioxidativer Effizienz und den strukturellen Eigenschaften eines Moleküls feststellen. Wichtige Parameter der antioxidativen Wirkung sind die leichte Abgabe des entradikalisierenden Atoms, dieser Prozess wird durch die Elektronendichte am Stickstoffatom bestimmt (Reduktionsmittel), die Stabilität der entstehenden Radikalform mithilfe mesomere Elektronendichteverteilung, sowie die Lipophilie der Substanz, welche die Bioverfügbarkeit des Antioxidans, v.a. im Gehirn, bestimmt (Moosmann et al., 2001). Die Stabilität des Phenothiazin-Radikals wird, neben der Resonanzstabilität, durch die entstehende planare und somit energetisch arme Radikalkationform vermittelt (Rawashdeh, 2005). Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin besitzen  $EC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich und entfalten ihre antioxidative Aktivität bei Konzentrationen, die im Vergleich zu anderen antioxidativen aromatischen Strukturen mindestens zwei bis vier Potenzen niedriger liegen (Moosmann et al., 2001; Hajieva et al., 2009, siehe auch oben). Ein effizientes Antioxidans ermöglicht eine hohe Detoxifizierungsrate oxidativer Zustände bei niedrigen Konzentrationen. Eine hohe Effizienz pro eingesetzte Einheit des Antioxidans minimiert mögliche adverse Effekte der Pharmakostruktur. Die hoch effektive antioxidative Wirkung in niedrigen nanomolaren Konzentrationen in *in situ*, *in vitro*

und *in vivo* Untersuchungen ist auf die potente Kettenabbruchskapazität der Bisarylimine zurückzuführen (siehe Abb. 3.1.11. bis 3.1.14; Murphy et al., 1950; Moosmann et al., 2001).

Ein effektives Antioxidans zur Medikation oxidativer Verschiebungen im ZNS muss leicht über die Blut-Hirn-Schranke gelangen. Blut-Hirn-Schrankengängigkeit wird durch die Lipophilie der Substanz bestimmt. Lipophile Substanzen mit langen Alkylketten, die innerhalb von Membranen verankert werden, verhindern eine passive Aufnahme in das Gehirn (Seelig et al., 1994; Moosmann und Behl, 2002), wie dies z. B. für  $\alpha$ -Tocopherol und Ubichinon gezeigt werden konnte. Trotz massiver Supplementierung, wird keine signifikante Akkumulation dieser Substanzen im Gehirn erreicht (Vatassary et al., 1998; Dallner und Sindelar, 2000). Bisarylimine stellen kleine Moleküle (~ 200 Da) dar mit lipophilem Charakter (logP: 2-4), diese Eigenschaften sollten die Passage über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Phenothiazin- und Iminostilben-Derivate, welche als Pharmaka eingesetzt werden, zeigen eine gute Blut-Hirn-Schrankengängigkeit. Für Chlorpromazin, welches ein Derivat des Phenothiazins darstellt (siehe Abb. 1.11.), ist eine Bioverfügbarkeit am D<sub>2</sub>-Rezeptor nach intramuskulärer Injektion innerhalb von 15 bis 30 min, nach oraler Verabreichung innerhalb von 30 bis 60 min erreicht (symptomatisch bestimmt; <http://www.rxmed.com/>). Radioaktiv-markiertes Phenothiazin wird im Gehirn von Säugern und Menschen detektiert (Tadros und Wahab, 1962).

Derivate des Phenothiazins sind an bestimmten Stellen des planaren Dreiringsystems substituiert, v.a. an der antioxidativen Iminogruppe. Viele dieser Strukturen (z.B. Chlorpromazin, Promazin und Promethazin) werden als trizyklische Neuroleptika zur Medikation von Psychosen (v.a. bei Schizophrenie), gegen Angst und Erregungszustände, als Sedativa (Beruhigungsmittel) und Antihistaminika (gegen allergische Reaktionen) seit Jahrzehnten bewährt eingesetzt. Neuroleptika blockieren D<sub>2</sub>-, Histamin1-, muskarinische- und adrenergen Rezeptoren. Hochpotente Neuroleptika können durch D<sub>2</sub>-Rezeptorblockade Parkinson-ähnliche Symptome auslösen. Die Wirkung der atypischen Neuroleptika, wie Clozapin (Dibenzepin-Derivat, wirkt vorwiegend an D<sub>4</sub>-Rezeptoren) und Risperidon (Benzisoxazol-Derivat, zeigt eine erhöhte antagonistische Wirksamkeit an serotoninergen 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren), zeigt keine Effekte auf das Extrapiramidalmotorische System. Iminostilben gehört zur Klasse der Dibenzazepine, welche in substituierter Form, als trizyklische Antidepressiva eingesetzt werden. Trizyklische Antidepressiva hemmen die Rückaufnahme der Catecholamine aus dem synaptischen Spalt, des Weiteren besitzen diese Strukturen häufig anticholinerge und antihistaminische Wirkung. Auch Phenothiazin kann einen pharmazeutischen Einsatz vorweisen. Es wird veterinär und klinisch als Anthelminthikum seit langem eingesetzt (Mitchell, 2006), toxische Effekte sind erst in kumulativen Konzentrationen von über 9 g bekannt (Ottman, 1952). Der langjährig bewährte Einsatz zeigt, dass die klinische Verwendung dieser Strukturen kontrollierbare Effekte *in vivo* erfasst.

Der Hauptwirkungsmechanismus der typischen Neuroleptika stellt der antagonisierende Effekt an D<sub>2</sub>-Rezeptoren dar. Horn und Snyder (1971) konnten zeigen, dass die Substituentenkomposition an der Iminogruppe des Phenothiazins, die Affinität zu dopaminergen Rezeptoren determiniert. In Tabelle 4.1. werden die K<sub>i</sub>-Werte der Affinität der untersuchten Strukturen für D<sub>2</sub>- und D<sub>1</sub>-Rezeptoren dargestellt. Phenothiazin zeigt nur in sehr hohen Konzentrationen eine mögliche Interaktion mit dopaminergen Rezeptoren (Andersen et al., 1985), besitzt somit keine signifikante Bindungsaffinität zu Dopaminrezeptoren. Neuroleptika, die z.T. N-substituierte Strukturanaloga des Phenothiazins darstellen (siehe Abb. 1.11.), wurden in dieser Studie eingesetzt zur Darstellung des antioxidativen Wirkungsmechanismus der Bisarylimine, ohne Einbezug Rezeptor-vermittelter Effekte der antioxidativen Strukturen.

	D <sub>1</sub> -Rezeptor K <sub>i</sub> -Wert (nM)	D <sub>2</sub> -Rezeptor K <sub>i</sub> -Wert (nM)
Apomorphin	> 8	>15
Chlorpromazin	> 25	> 1,2
Clozapin	> 85	> 73
Dopamin	> 17	> 250
<b>Phenothiazin</b>	<b>15630</b>	<b>20000</b>
Promazin	7100	> 72
Promethazin	> 1780	250
Risperidon	> 75	0,44 – 4,3

Tab. 4.1. Darstellung der K<sub>i</sub>-Werte der Affinität der untersuchten Substanzen an D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren. Ermittelt unter <http://pdsp.med.unc.edu>.

Da Phenothiazin-Derivate eine lange Geschichte des pharmazeutischen Einsatzes aufweisen und nur minimale Nebeneffekte im Organismus auslösen (Stavrovskaya et al., 2004), stellen sie klinisch anerkannte Medikamente dar. Die hohe Potenz der Bisarylimine, zelluläre oxidative Zustände zu beseitigen und die mitochondriale Integrität bei einer Komplex I Inhibition aufrechtzuerhalten, sowie die Grundstruktur pharmazeutisch bekannter, gehirngängiger Medikamente, machen Bisarylimine zu attraktiven Molekülen und versprechen für die Zukunft eine mögliche neuroprotektive Therapie.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Parkinsonschen Krankheit kommt es zu einer selektiven Degeneration der Neuromelanin-positiven, dopaminergen Neurone in der Gehirnregion der *Substantia nigra pars compacta*. Die Rolle des oxidativen Stresses in der Pathogenese dieser Erkrankung konnte an *post mortem* Untersuchungen der Parkinson-Patienten, wie auch an zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Modellen bestätigt werden. Die Anwendung von Antioxidantien wurde als therapeutische Strategie der Parkinsonschen Krankheit vorgeschlagen. In dieser Hinsicht wurden bereits antioxidative Substanzen in klinischen Studien evaluiert. Klinische Studien mit Antioxidantien haben jedoch bislang nur wenig überzeugende Ergebnisse erbracht, mit Ausnahme des Einsatzes des Ubichinons (Coenzym Q). Eine kritische Analyse der klinischen Studien lässt zusammenfassen, dass auf Seiten der verwendeten Antioxidantien noch massiver Optimierungsbedarf besteht. Für einen erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Antioxidantien bei dieser Krankheit sind folgende Eigenschaften der Substanzen von höchster Bedeutung: i) maximale neuroprotektive Aktivität bei geringen Dosen; ii) geringe Nebenwirkungen; iii) eine hohe Blut-Hirn-Schrankgängigkeit.

In dieser Arbeit wurde das neuroprotektive Potential von drei Bisarylimin-basierten antioxidativen Strukturen (Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin) in *in vitro* und *in vivo* Parkinson-Modellsystemen evaluiert. Beide experimentellen Modelle basieren auf der Wirkung der mitochondrialen Komplex I Inhibitoren 1-Methyl-4-Phenylpyridin (MPP<sup>+</sup>) und Rotenon, welche pathophysiologische Charakteristika der Parkinsonschen Krankheit reproduzieren. Unsere *in vitro* Untersuchungen an primären Neuronen des Mittelhirns und der klonalen SH-SY5Y-Neuroblastomazelllinie konnten zeigen, dass die Komplex I Inhibition krankheitsspezifische zelluläre Merkmale induziert, wie die Abnahme der antioxidativen Verteidigungskapazität, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der mitochondrialen Mobilität, sowie Induktion lysosomaler Abbauprozesse. Zusätzlich kommt es in primären Neuronen des Mittelhirns zur selektiven Degeneration dopaminergener Neurone, welche in der Parkinsonschen Erkrankung besonders betroffen sind. Ko-Inkubation der *in vitro* Modelle mit Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin in niedrigen Konzentrationen (50 nM) halten die pathologischen Prozesse fast vollständig auf. *In vivo* Untersuchungen am MPP<sup>+</sup>- und Rotenon-basierten *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) Modell bestätigen das neuroprotektive Potential der Bisarylimine. Hierfür wurde eine transgene *C. elegans* Linie mithilfe einer dopaminerg spezifischen *DsRed2*- (Variante des rot fluoreszierenden Proteins von *Discosoma sp.*)-Expression und pan-neuronaler *CFP*- (cyan fluoreszierendes Protein)-Expression zur Visualisierung der dopaminergen Neuronenpopulation in Kontrast zum Gesamtnervensystem erstellt. Behandlung des *C. elegans* mit MPP<sup>+</sup> und Rotenon im larvalen und adulten Stadium führt zu einer selektiven Degeneration dopaminergener Neurone, sowie zum Entwicklungsarrest der larvalen

Population. Die dopaminerge Neurodegeneration, wie auch weitere phänotypische Merkmale des *C. elegans* Modells, können durch Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin in niedrigen Konzentrationen (500 nM) komplett verhindert werden. Ein systemischer Vergleich aromatischer Bisarylimine mit bekannten, gut charakterisierten Antioxidantien, wie  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Epigallocatechingallat und  $\beta$ -Catechin, zeigt, dass effektive Konzentrationen für Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin um Zehnerpotenzen niedriger liegen im Vergleich zu natürlichen Antioxidantien. Der Wirkungsmechanismus der Bisarylimine konnte in biochemischen und *in vitro* Analysen, sowie in Verhaltensuntersuchungen an *C. elegans* von der Wirkungsweise strukturell ähnlicher, neuroleptisch wirkender Phenothiazin-Derivate differenziert werden. Die Analyse des dopaminerg-gesteuerten Verhaltens (Beweglichkeit) in *C. elegans* konnte verdeutlichen, dass antioxidative und Dopaminrezeptor-bindende Eigenschaften der Bisaryliminstrukturen sich gegenseitig ausschließen. Diese qualitativen Merkmale unterscheiden Bisarylimine fundamental von klinisch angewandten Neuroleptika (Phenothiazin-Derivate), welche als Dopaminrezeptor-Antagonisten zur Behandlung psychischer Erkrankungen klinisch eingesetzt werden.

Aromatische Bisarylimine (Phenothiazin, Iminostilben und Phenoxazin), welche in dieser Arbeit auf ihr neuroprotektives Potential hin untersucht wurden, besitzen günstige strukturelle Eigenschaften zur antioxidativ-basierter Neuroprotektion. Durch die Anwesenheit der antioxidativ wirkenden, nicht-substituierten Iminogruppe unterscheiden sich Bisarylimine grundlegend von neuroleptisch-wirkenden Phenothiazin-Derivaten. Wichtige strukturelle Voraussetzungen eines erfolgreichen antioxidativen Neuropharmakons, wie eine hohe Radikalisierbarkeit, die stabile Radikalform und der lipophile Charakter des aromatischen Ringsystems, werden in der Bisaryliminstruktur erfüllt. Antioxidative Bisarylimine könnten in der Therapie der Parkinsonschen Krankheit als eine effektive neuroprotektiv-therapeutische Strategie weiter entwickelt werden. Diese Substanzen besitzen eine attraktive Leitstruktur für die Entwicklung noch besserer Antioxidantien.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas S, Wink M.** (2009) Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* 75(3):216-21.
- Abbott LC, Nejad HH, Bottje WG, Hassan AS.** (1990) Glutathione levels in specific brain regions of genetically epileptic (tg/tg) mice. *Brain Res Bull.* 25(4):629-31.
- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW.** (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 7(3):207-19. Review.
- Adachi H, Ishii N.** (2000) Effects of tocotrienols on life span and protein carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55(6):B280-5.
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B.** (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 26(2):211-5.
- Andersen PH, Grønvald FC, Jansen JA.** (1985) A comparison between dopamine-stimulated adenylate cyclase and 3H-SCH 23390 binding in rat striatum. *Life Sci.* 37(21):1971-83.
- Andersen JK.** (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 10 Suppl:S18-25. Review.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA.** (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc).* 70(2):200-14. Review.
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y.** (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 12(1):25-31.
- Antonini A, Tolosa E.** (2009) Apomorphine and levodopa infusion therapies for advanced Parkinson's disease: selection criteria and patient management. *Expert Rev Neurother.* 9(6):859-67. Review.
- Autere J, Moilanen JS, Finnilä S, Soininen H, Mannermaa A, Hartikainen P, Hallikainen M, Majamaa K.** (2004) Mitochondrial DNA polymorphisms as risk factors for Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Hum Genet.* 115(1):29-35.
- Bahat-Stroomza M, Gilgun-Sherki Y, Offen D, Panet H, Saada A, Krool-Galron N, Barzilai A, Atlas D, Melamed E.** (2005) A novel thiol antioxidant that crosses the blood brain barrier protects dopaminergic neurons in experimental models of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 21(3):637-46.
- Barrientos A, Moraes CT.** (1999) Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem.* 274(23):16188-97.
- Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Gräber S, Kovacs I, Lee WD, Waggoner J, Cui J, White AD, Bossy B, Martinou JC, Youle RJ, Lipton SA, Ellisman MH, Perkins GA, Bossy-Wetzel E.** (2006) Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J.* 25(16):3900-11.
- Beal MF, Matthews RT, Tieleman A, Shults CW.** (1998) Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain Res.* 783(1):109-14.
- Beal MF.** (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2(5):325-34. Review.
- Beal MF.** (2002) Coenzyme Q10 as a possible treatment for neurodegenerative diseases. *Free Radic Res.* 36(4):455-60. Review.
- Beal MF.** (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *J Bioenerg Biomembr.* 36(4):381-6. Review.
- Beal MF.** (2007) Mitochondria and neurodegeneration. *Novartis Found Symp.* 287:183-92; discussion 192-6. Review.
- Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM.** (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet.* 38(5):515-7.
- Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB.** (1991) Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 57(5):1609-14.

- Ben-Shachar D, Zuk R, Glinka Y.** (1995) Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem.* 64 (2):718-23.
- Berlett BS, Stadtman ER.** (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272(33):20313-6. Review.
- Bernardi P.** (1992) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem.* 267(13):8834-9.
- Bernardi P, Veronese P, Petronilli V.** (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me<sup>2+</sup> binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem.* 268(2):1005-10.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F.** (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci.* 20(4):415-55.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT.** (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3(12):1301-6.
- Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK.** (2002) Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):1037-48. Review.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS.** (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38(11 Pt 1):3751-7.
- Biskup S, Moore DJ.** (2006) Detrimental deletions: mitochondria, aging and Parkinson's disease. *Bioessays.* 28(10):963-7. Review.
- Blanchet J, Longpré F, Bureau G, Morissette M, DiPaolo T, Bronchti G, Martinoli MG.** (2008) Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32(5):1243-50.
- Blin O, Desnuelle C, Rascol O, Borg M, Peyro Saint Paul H, Azulay JP, Billé F, Figarella D, Coulom F, Pellissier JF, et al.** (1994) Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neurol Sci.* 125(1):95-101.
- Borland MK, Trimmer PA, Rubinstein JD, Keeney PM, Mohanakumar K, Liu L, Bennett JP Jr.** (2008) Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells. *Mol Neurodegener.* 3:21.
- Bossy-Wetzell E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA.** (2003) Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 15(6):706-16. Review.
- Bota DA, Davies KJ.** (2001) Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion.* 1(1):33-49.
- Boveris A, Chance B.** (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134(3):707-16.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K.** (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318(1):121-34. Review.
- Braungart E, Gerlach M, Riederer P, Baumeister R, Hoener MC.** (2004) Caenorhabditis elegans MPP<sup>+</sup> model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener Dis.* 1(4-5):175-83.
- Brenner S.** (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics.* 77(1):71-94.
- Brigelius-Flohé R.** (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):951-65. Review.
- Briggs M.P.** (1946) Culture methods for a free-living soil nematode. *MA Thesis, Stanford University*, 63p.
- Brinkley BR, Barham SS, Barranco SC, Fuller GM.** (1974) Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells. *Exp Cell Res.* 85(1):41-6.
- Buchet K, Godinot C.** (1998) Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem.* 273(36):22983-9.
- Büeler H.** (2009) Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 218(2):235-46. Review.

- Cadenas E**, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 180(2):248-57.
- Cai ZL**, Shi JJ, Yang YP, Cao BY, Wang F, Huang JZ, Yang F, Zhang P, Liu CF. (2009) MPP+ impairs autophagic clearance of alpha-synuclein by impairing the activity of dynein. *Neuroreport.* 20(6):569-73.
- Candé C**, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. (2002a) Apoptosis-inducing factor (AIF): Key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of Cell Science* 115(24): 4727-4734.
- Candé C**, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. (2002b) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.* 84(2-3):215-22. Review.
- Cao S**, Gelwix CC, Caldwell KA, Caldwell GA. (2005) Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 25(15):3801-12.
- Cassarino DS**, Parks JK, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. (1999) The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1453(1):49-62.
- Chan DC.** (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 125(7):1241-52. Review.
- Chance B**, **Williams GR.** (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 17:65-134.
- Chang DT**, **Reynolds IJ.** (2006) Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog Neurobiol.* 80(5):241-68. Review.
- Chase DL**, Pepper JS, Koelle MR. (2004) Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci.* 7(10):1096-103.
- Chen TS**, Richie JP Jr, Lang CA. (1989) The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. *Proc Soc Exp Biol Med.* 190(4):399-402
- Chen H**, Chomyn A, Chan DC. (2005a) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 280(28):26185-92.
- Chen LJ**, Gao YQ, Li XJ, Shen DH, Sun FY. (2005b) Melatonin protects against MPTP/MPP+ -induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and in vitro. *J Pineal Res.* 39(1):34-42.
- Chen H**, McCaffery JM, Chan DC. (2007a) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell.* 130(3):548-62.
- Chen CM**, Yin MC, Hsu CC, Liu TC. (2007b) Antioxidative and anti-inflammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP-treated mice. *Nutrition.* 23(7-8):589-97.
- Cheung EC**, McBride HM, Slack RS. (2007) Mitochondrial dynamics in the regulation of neuronal cell death. *Apoptosis.* 12(5):979-92. Review.
- Chiba K**, Trevor A, Castagnoli N Jr. (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 120(2):574-8.
- Chiba K**, Trevor AJ, Castagnoli N Jr. (1985) Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 128(3):1228-32.
- Chinta SJ**, **Andersen JK.** (2008) Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1780(11):1362-7. Review.
- Choi JY**, Park CS, Kim DJ, Cho MH, Jin BK, Pie JE, Chung WG. (2002) Prevention of nitric oxide-mediated 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease in mice by tea phenolic epigallocatechin 3-gallate. *Neurotoxicology.* 23(3):367-74.
- Choi HS**, An JJ, Kim SY, Lee SH, Kim DW, Yoo KY, Won MH, Kang TC, Kwon HJ, Kang JH, Cho SW, Kwon OS, Park J, Eum WS, Choi SY. (2006) PEP-1-SOD fusion protein efficiently protects against paraquat-induced dopaminergic neuron damage in a Parkinson disease mouse model. *Free Radic Biol Med.* 41(7):1058-68.
- Chu CT.** (2010) Tickled PINK1: Mitochondrial homeostasis and autophagy in recessive Parkinsonism. *Biochim Biophys Acta.* 1802(1):20-8.

- Clancy RM**, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson SB. (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(9):3680-4.
- Cleren C**, Yang L, Lorenzo B, Calingasan NY, Schomer A, Sireci A, Wille EJ, Beal MF. (2008) Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurochem*. 104(6):1613-21.
- Cooper JM**, Daniel SE, Marsden CD, Schapira AH. (1995) L-dihydroxyphenylalanine and complex I deficiency in Parkinson's disease brain. *Mov Disord*. 10(3):295-7.
- Cooper AJ**, **Kristal BS**. (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem*. 378(8):793-802. Review.
- Cooper JM**, Korlipara LV, Hart PE, Bradley JL, Schapira AH. (2008) Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy. *Eur J Neurol*. 15(12):1371-9.
- Corral-Debrinski M**, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. (1992) Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet*. 2(4):324-9.
- Costantini P**, Colonna R, Bernardi P. (1998) Induction of the mitochondrial permeability transition by N-ethylmaleimide depends on secondary oxidation of critical thiol groups. Potentiation by copper-orthophenanthroline without dimerization of the adenine nucleotide translocase. *Biochim Biophys Acta*. 1365(3):385-92.
- Costantini P**, Belzacq AS, Vieira HL, Larochette N, de Pablo MA, Zamzami N, Susin SA, Brenner C, Kroemer G. (2000) Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*. 19(2):307-14.
- Cribbs JT**, **Strack S**. (2007) Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep*. 8(10):939-44.
- Cuervo AM**, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 305(5688):1292-5.
- Dallner G**, **Sindelar PJ**. (2000) Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radic Biol Med*. 29(3-4):285-94. Review.
- D'Amato RJ**, Lipman ZP, Snyder SH. (1986) Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. *Science*. 231(4741):987-9.
- Dauer W**, **Przedborski S**. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39(6):889-909. Review.
- Davey GP**, Canevari L, Clark JB. (1997) Threshold effects in synaptosomal and nonsynaptic mitochondria from hippocampal CA1 and paramedian neocortex brain regions. *J Neurochem*. 69(6):2564-70.
- Dawson TM**, **Dawson VL**. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*. 302(5646):819-22. Review.
- De Benedictis G**, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S, Mari D, Mattace R, Franceschi C. (1999) Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J*. 13(12):1532-6.
- De Vos KJ**, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC. (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 31:151-73. Review.
- Diaz-Corrales FJ**, Asanuma M, Miyazaki I, Miyoshi K, Ogawa N. (2005) Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neuroscience*. 133(1):117-35.
- Dick FD**, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, Semple S, Dick S, Counsell C, Mozzoni P, Haites N, Wettinger SB, Mutti A, Otelea M, Seaton A, Söderkvist P, Felice A; Geoparkinson study group. (2007) Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med*. 64(10):666-72.
- Donohoe DR**, Aamodt EJ, Osborn E, Dwyer DS. (2006) Antipsychotic drugs disrupt normal development in *Caenorhabditis elegans* via additional mechanisms besides dopamine and serotonin receptors. *Pharmacol Res*. 54(5):361-72.
- Double KL**, Maywald M, Schmittel M, Riederer P, Gerlach M. (1998) In vitro studies of ferritin iron release and neurotoxicity. *J Neurochem*. 70(6):2492-9.

- Drechsel DA, Liang LP, Patel M.** (2007) 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced alterations of glutathione status in immortalized rat dopaminergic neurons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 220(3):341-8.
- Duerr JS, Frisby DL, Gaskin J, Duke A, Asermely K, Huddleston D, Eiden LE, Rand JB.** (1999) The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. *J Neurosci.* 19(1):72-84.
- Duncan JE, Goldstein LS.** (2006) The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genet.* 2(9):e124. Review.
- Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S, Hofstetter C, Lindqvist E, Thams S, Bergstrand A, Hansson FS, Trifunovic A, Hoffer B, Cullheim S, Mohammed AH, Olson L, Larsson NG.** (2007) Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(4):1325-30.
- Elbaz A, Tranchant C.** (2007) Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 262(1-2):37-44. Review.
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ.** (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* 15(12):2286-7.
- Engelender S.** (2008) Ubiquitination of alpha-synuclein and autophagy in Parkinson's disease. *Autophagy.* 4(3):372-4. Review.
- Enochs WS, Sarna T, Zecca L, Riley PA, Swartz HM.** (1994) The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 7(2):83-100.
- Fahn S.** (1992) A pilot trial of high-dose alpha-tocopherol and ascorbate in early Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 32 Suppl:S128-32.
- Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD.** (2003) Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.* 35(3):236-56. Review.
- Fearnley JM, Lees AJ.** (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 114 (Pt 5):2283-301.
- Feng J.** (2006) Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins. *Neuroscientist.* 12(6):469-76. Review.
- Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K, Oertel WH.** (2000) The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacol Biochem Behav.* 65(3):425-31.
- Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C.** (2003) Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 991:111-9. Review.
- Floor E, Wetzel MG.** (1998) Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem.* 70(1):268-75.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ.** (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell.* 1(4):515-25.
- Fredriksson A, Eriksson P, Archer T.** (1997) MPTP-induced deficits in motor activity: neuroprotective effects of the spintrapping agent, alpha-phenyl-tert-butyl-nitron (PBN). *J Neural Transm.* 104(6-7):579-92.
- Gajdusek DC.** (1985) Hypothesis: interference with axonal transport of neurofilament as a common pathogenetic mechanism in certain diseases of the central nervous system. *N Engl J Med.* 312(11):714-9. Review.
- Garesse R, Vallejo CG.** (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene.* 263(1-2):1-16. Review.
- Gazaryan IG, Brown AM.** (2007) Intersection between mitochondrial permeability pores and mitochondrial fusion/fission. *Neurochem Res.* 32(4-5):917-29.
- Gerlach M, Riederer P.** (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm.* 103(8-9):987-1041. Review.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, DuChen MR, Abramov AY.** (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell.* 33(5):627-38.

- Ghezzi D**, Marelli C, Achilli A, Goldwurm S, Pezzoli G, Barone P, Pellecchia MT, Stanzione P, Brusa L, Bentivoglio AR, Bonuccelli U, Petrozzi L, Abbruzzese G, Marchese R, Cortelli P, Grimaldi D, Martinelli P, Ferrarese C, Garavaglia B, Sangiorgi S, Carelli V, Torroni A, Albanese A, Zeviani M. (2005) Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. *Eur J Hum Genet.* 13(6):748-52.
- Gilgun-Sherki Y**, Melamed E, Offen D. (2001) Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 40(8):959-75. Review.
- Gille G**, Hung ST, Reichmann H, Rausch WD. (2004) Oxidative stress to dopaminergic neurons as models of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1018:533-40.
- Goldman JE**. (1987) Cytoskeletal abnormalities in Parkinson's disease. *Adv Behav Biol.* 34:191-197.
- Goldstein LS**. (2003) Do disorders of movement cause movement disorders and dementia? *Neuron.* 40(2):415-25. Review.
- Gomez-Lazaro M**, Bonekamp NA, Galindo MF, Jordán J, Schrader M. (2008) 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med.* 44(11):1960-9.
- Gómez-Santos C**, Ferrer I, Santidrián AF, Barrachina M, Gil J, Ambrosio S. (2003) Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res.* 73(3):341-50.
- González-Polo RA**, Niso-Santano M, Ortíz-Ortíz MA, Gómez-Martín A, Morán JM, García-Rubio L, Francisco-Morcillo J, Zaragoza C, Soler G, Fuentes JM. (2007) Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci.* 97(2):448-58.
- Graham DG**, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. (1978) Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol.* 14(4):644-53.
- Green DR**, **Kroemer G**. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 305(5684):626-9. Review.
- Green DR**, **Reed JC**. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281(5381):1309-12. Review.
- Griffith OW**. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 106(1):207-12.
- Griffith OW**, **Meister A**. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem.* 254(16):7558-60.
- Griffiths PD**, Dobson BR, Jones GR, Clarke DT. (1999) Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease. An in vitro study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain.* 122 ( Pt 4):667-73.
- Gu M**, Cooper JM, Taanman JW, Schapira AH. (1998) Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44(2):177-86.
- Haas RH**, Nasirian F, Nakano K, Ward D, Pay M, Hill R, Shults CW. (1995) Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 37(6):714-22.
- Hajjeva P<sup>1</sup>**, **Mocko JB<sup>1</sup>**, Moosmann B, Behl C. (2009) Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. *J Neurochem.* 110(1):118-32.
- Halestrap AP**. (2009) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 46(6):821-31.
- Hanna JG**. (1966) *Chemical and physical methods of analysis.* In Patai S. (Ed). The chemistry of the carbonyl group.
- Hansel A**, Kuschel L, Hehl S, Lemke C, Agricola HJ, Hoshi T, Heinemann SH. (2002) Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. *FASEB J.* 16(8):911-3.
- Hasegawa E**, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S. (1990) 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 170(3):1049-55.
- Hattori N**, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y. (1991) Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 30(4):563-71.

- He L**, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM. (2002) Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30(14):e68.
- He L, Lemasters JJ.** (2002) Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett.* 512(1-3):1-7.
- Hengartner MO.** (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407(6805):770-6. Review.
- Herkenham M**, Little MD, Bankiewicz K, Yang SC, Markey SP, Johannessen JN. (1991) Selective retention of MPP+ within the monoaminergic systems of the primate brain following MPTP administration: an in vivo autoradiographic study. *Neuroscience.* 40(1):133-58.
- Hills T**, Brockie PJ, Maricq AV. (2004) Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 24(5):1217-25.
- Hobert O.** (2002) PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *Biotechniques.* 32(4):728-30.
- Horn AS, Snyder SH.** (1971) Chlorpromazine and dopamine: conformational similarities that correlate with the antischizophrenic activity of phenothiazine drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(10):2325-8.
- Huang HM**, Fowler C, Xu H, Zhang H, Gibson GE. (2005) Mitochondrial function in fibroblasts with aging in culture and/or Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 26(6):839-48.
- Huerta C**, Castro MG, Coto E, Blázquez M, Ribacoba R, Guisasola LM, Salvador C, Martínez C, Lahoz CH, Alvarez V. (2005) Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. *J Neurol Sci.* 236(1-2):49-54.
- Hunter Fe Jr**, Gebicki JM, Hoffsten Pe, Weinstein J, Scott A. (1963) Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J Biol Chem.* 238:828-35.
- Inoue K**, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. (2000) Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet.* 26:176-81.
- Isenberg JS, Klaunig JE.** (2000) Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells. *Toxicol Sci.* 53(2):340-51.
- Itoh N**, Masuo Y, Yoshida Y, Cynshi O, Jishage K, Niki E. (2006) gamma-Tocopherol attenuates MPTP-induced dopamine loss more efficiently than alpha-tocopherol in mouse brain. *Neurosci Lett.* 403(1-2):136-40.
- Javitch JA**, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(7):2173-7.
- Jendrach M**, Mai S, Pohl S, Vöth M, Bereiter-Hahn J. (2008) Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion.* 8(4):293-304.
- Jenner P.** (1993) Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 146:6-13. Review.
- Jiang Q**, Yan Z, Feng J. (2006a) Neurotrophic factors stabilize microtubules and protect against rotenone toxicity on dopaminergic neurons. *J Biol Chem.* 281(39):29391-400.
- Jiang Q**, Yan Z, Feng J. (2006b) Activation of group III metabotropic glutamate receptors attenuates rotenone toxicity on dopaminergic neurons through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurosci.* 26(16):4318-28.
- Joo HJ**, Ma JY, Choo YG, Choi BK, Jung KY. (1999) Age-related alteration of intracellular ATP maintenance in the cell suspensions of mice cerebral cortex. *Mech Ageing Dev.* 110(1-2):1-12.
- Jorgensen EM.** (2004) Dopamine: should I stay or should I go now? *Nat Neurosci.* 7(10):1019-21.
- Kamat CD**, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN, Hensley K. (2008) Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis.* 15(3):473-93. Review.
- Kang Y**, Viswanath V, Jha N, Qiao X, Mo JQ, Andersen JK. (1999) Brain gamma-glutamyl cysteine synthetase (GCS) mRNA expression patterns correlate with regional-specific enzyme activities and glutathione levels. *J Neurosci Res.* 58(3):436-41.
- Kang D**, Kim SH, Hamasaki N. (2007) Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion.* 7(1-2):39-44.

- Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ.** (2004) Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol.* 164(4):493-9.
- Karunakaran S, Diwakar L, Saeed U, Agarwal V, Ramakrishnan S, Iyengar S, Ravindranath V.** (2007) Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) and translocation of death-associated protein, Daxx, in substantia nigra pars compacta in a mouse model of Parkinson's disease: protection by alpha-lipoic acid. *FASEB J.* 21(9):2226-36.
- Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr.** (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci.* 26(19):5256-64.
- Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, Ogawa M, Ishizaki Y, Kitamura T, Shozawa Y, Hayasaka K.** (2005) Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet.* 116(1-2):23-7.
- Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, Kimpara T, Hisanaga K, Sato N, Nunomura A, Castellani RJ, Perry G, Smith MA, Itoyama Y.** (2002) Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Dis.* 9(2):244-8.
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ.** (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys.* 462(2):245-53.
- Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, Taniguchi T.** (1998) Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol.* 54(6):1046-54.
- Kissová I, Deffieu M, Samokhvalov V, Velours G, Bessoule JJ, Manon S, Camougrand N.** (2006) Lipid oxidation and autophagy in yeast. *Free Radic Biol Med.* 41(11):1655-61.
- Klivenyi P, St Clair D, Wermer M, Yen HC, Oberley T, Yang L, Flint Beal M.** (1998) Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. *Neurobiol Dis.* 5(4):253-8.
- Koller WC, Langston JW, Hubble JP, Irwin I, Zack M, Golbe L, Forno L, Ellenberg J, Kurland L, Rutenber AJ, et al.** (1991) Does a long preclinical period occur in Parkinson's disease? *Neurology.* 41(5 Suppl 2):8-13.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE.** (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 495(1-2):12-5. Review.
- Kraysberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K.** (2006) Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet.* 38(5):518-20.
- Krige D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, Schapira AH.** (1992) Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol.* 32(6):782-8.
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P.** (2008) Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 44(3):205-21. Review.
- Kunikowska G, Jenner P.** (2001) 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. *Brain Res.* 922(1):51-64.
- Kunikowska G, Jenner P.** (2002) The distribution of copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, and glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in rat basal ganglia. *Biochem Pharmacol.* 63(6):1159-64.
- Kunikowska G, Jenner P.** (2003) Alterations in m-RNA expression for Cu,Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the basal ganglia of MPTP-treated marmosets and patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* 968(2):206-18.
- Lach B, Grimes D, Benoit B, Minkiewicz-Janda A.** (1992) Caudate nucleus pathology in Parkinson's disease: ultrastructural and biochemical findings in biopsy material. *Acta Neuropathol.* 83(4):352-60.
- Lang AE, Lozano AM.** (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med.* 339(16):1130-43. Review.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I.** (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219(4587):979-80.
- Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D.** (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J Neurosci.* 22(20):8951-60.
- Lee HS, Park CW, Kim YS.** (2000) MPP(+) increases the vulnerability to oxidative stress rather than directly mediating oxidative damage in human neuroblastoma cells. *Exp Neurol.* 165(1):164-71.



- Lee G**, Tanaka M, Park K, Lee SS, Kim YM, Junn E, Lee SH, Mouradian MM. (2004) Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation. *J Biol Chem.* 279(8):6834-9.
- Lennox G**, Lowe J, Landon M, Byrne EJ, Mayer RJ, Godwin-Austen RB. (1989) Diffuse Lewy body disease: correlative neuropathology using anti-ubiquitin immunocytochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 52(11):1236-47.
- Leung HW**, Vang MJ, Mavis RD. (1981) The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 664(2):266-72.
- Levine RL**, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186:464-78.
- Levites Y**, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem.* 78(5):1073-82.
- Lewy F.** (1912). E. Forster and F. H. Lewy. "Paralysis agitans". In Pathologische Anatomie. Handbuch der Neurologie (edited by M. Lewandowsky). Berlin: Springer Verlag 1912, 920-933.
- Li G**, Zou LY, Cao CM, Yang ES. (2005) Coenzyme Q10 protects SHSY5Y neuronal cells from beta amyloid toxicity and oxygen-glucose deprivation by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Biofactors.* 25(1-4):97-107.
- Liang CL**, Wang TT, Luby-Phelps K, German DC. (2007a) Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 203(2):370-80.
- Liang LP**, Huang J, Fulton R, Day BJ, Patel M. (2007b) An orally active catalytic metalloporphyrin protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in vivo. *J Neurosci.* 27(16):4326-33.
- Liang Y**, Li S, Wen C, Zhang Y, Guo Q, Wang H, Su B. (2008) Intrastratial injection of colchicine induces striatonigral degeneration in mice. *J Neurochem.* 106(4):1815-27.
- Lin MT**, **Beal MF.** (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443(7113):787-95. Review.
- Lindquist NG**, Larsson BS, Lydén-Sokolowski A. (1988) Autoradiography of [14C]paraquat or [14C]diquat in frogs and mice: accumulation in neuromelanin. *Neurosci Lett.* 93(1):1-6.
- Lints R**, **Emmons SW.** (1999) Patterning of dopaminergic neurotransmitter identity among *Caenorhabditis elegans* ray sensory neurons by a TGFbeta family signaling pathway and a Hox gene. *Development.* 126(24):5819-31.
- Liu Y**, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N and Edwards RH. (1992) A cDNA that suppresses MPP1 toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell.* 70:539-551.
- Liu KS**, **Sternberg PW.** (1995) Sensory regulation of male mating behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron.* 14(1):79-89.
- Lu KT**, Ko MC, Chen BY, Huang JC, Hsieh CW, Lee MC, Chiou RY, Wung BS, Peng CH, Yang YL. (2008) Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. *J Agric Food Chem.* 56(16):6910-3.
- Makino N**, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y. (1994) Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 269(2):1020-5.
- Mandel S**, Maor G, Youdim MB. (2004) Iron and alpha-synuclein in the substantia nigra of MPTP-treated mice: effect of neuroprotective drugs R-apomorphine and green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Mol Neurosci.* 24(3):401-16.
- Marklund SL.** (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(24):7634-8.
- Markey SP**, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. (1984) Intra-neuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 311(5985):464-7.
- Marsden CD.** (1990) Parkinson's disease. *Lancet.* 335(8695):948-52.
- Marshall LE**, **Himes RH.** (1978) Rotenone inhibition of tubulin self-assembly. *Biochim Biophys Acta.* 543(4):590-4.
- Martinou JC**, **Green DR.** (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(1):63-7. Review.

- Meeusen S**, McCaffery JM, Nunnari J. (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*. 305(5691):1747-52.
- Melov S**, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, Schilling B, Mavros C, Masters CL, Volitakis I, Li QX, Laughton K, Hubbard A, Cherny RA, Gibson B, Bush AI. (2007) Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One*. 2(6):e536.
- Meisner HM**, and **Sorensen L**. (1966) Metaphase arrest of Chinese hamster cells with rotenone. *Exp. Cell Res.* 42: 291-295.
- Miller KG**, Alfonso A, Nguyen M, Crowell JA, Johnson CD, Rand JB. (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(22):12593-8.
- Mitchell DH**, Stiles JW, Santelli J, Sanadi DR. (1979) Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J Gerontol*. 34(1):28-36.
- Mitchell SC**. (2006) Phenothiazine: the parent molecule. *Curr Drug Targets*. 7(9):1181-9. Review.
- Moghal S**, Rajput AH, D'Arcy C, Rajput R. (1994) Prevalence of movement disorders in elderly community residents. *Neuroepidemiology*. 13(4):175-8.
- Moon Y**, Lee KH, Park JH, Geum D, Kim K. (2005) Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. *J Neurochem*. 93(5):1199-208.
- Moosmann B**, Skutella T, Beyer K, Behl C. (2001) Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. *Biol Chem*. 382(11):1601-12.
- Moosmann B**, **Behl C**. (2002) Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 11(10):1407-35. Review.
- Morrish PK**, Sawle GV, Brooks DJ. (1996) Regional changes in [18F]dopa metabolism in the striatum in Parkinson's disease. *Brain*. 119 ( Pt 6):2097-103.
- Morrish PK**, Rakshi JS, Bailey DL, Sawle GV, Brooks DJ. (1998) Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [18F]dopa PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 64(3):314-9.
- Murphy CM**, Ravner H and Smith NL. (1950) Mode of action of phenothiazine-type antioxidants. *Indust Eng Chem*. 42, pp. 2479–2489.
- Murphy MP**. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 417(1):1-13. Review.
- Narendra D**, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*. 183(5):795-803.
- Nass R**, Hall DH, Miller DM 3rd, Blakely RD. (2002) Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(5):3264-9.
- Niemi AK**, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylhä M, Majamaa K. (2003) Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet*. 112(1):29-33.
- Nieuwenhuys R**. (1999) The morphological pattern of the vertebrate brain. *Eur J Morphol*. 37(2-3):81-4. Review.
- Nowikovsky K**, Reipert S, Devenish RJ, Schweyen RJ. (2007) Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ*. 14(9):1647-56.
- Nunomura A**, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65(7):631-41. Review.
- Okado-Matsumoto A**, **Fridovich I**. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 276(42):38388-93.
- Ottmann HU**. (1952) Phenothiazin-Vergiftung bei einer Madenwurmkur. *Kinderklinik des Rittbergkrankenhauses Berlin-Lichterfelde-West, Germany* 1952.
- Ostergren A**, Annas A, Skog K, Lindquist NG, Brittebo EB. (2004) Long-term retention of neurotoxic beta-carbolines in brain neuromelanin. *J Neural Transm*. 111(2):141-57
- Packer JE**, Slater TF, Willson RL. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*. 278(5706):737-8.
- Packer L**, Weber SU, Rimbach G. (2001) Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr*. 131(2):369S-73S. Review.
- Pan T**, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J, Le W. (2009) Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*. 164(2):541-51.

- Parker** WD Jr, Parks JK, Swerdlow RH. (2008) Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res.* 1189:215-8.
- Parkinson** J. (1817) An Essay on the Shaking Palsy. *London 1817.*
- Peng** J, Stevenson FF, Doctrow SR, Andersen JK. (2005) Superoxide dismutase/catalase mimetics are neuroprotective against selective paraquat-mediated dopaminergic neuron death in the substantia nigra: implications for Parkinson disease. *J Biol Chem.* 280(32):29194-8.
- Penugonda** S, Mare S, Goldstein G, Banks WA, Ercal N. (2005) Effects of N-acetylcysteine amide (NACA), a novel thiol antioxidant against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cell line PC12. *Brain Res.* 1056(2):132-8.
- Perkins** LA, Hedgecock EM, Thomson JN, Culotti JG. (1986) Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 117(2):456-87.
- Perry** TL, Yong VW, Clavier RM, Jones K, Wright JM, Foulks JG, Wall RA. (1985) Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. *Neurosci Lett.* 60(2):109-14.
- Petronilli** V, Cola C, Bernardi P. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem.* 268(2):1011-6.
- Petronilli** V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, Bernardi P. (1994) The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem.* 269(24):16638-42.
- Pham** DQ, **Plakogiannis** R. (2005) Vitamin E supplementation in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, tardive dyskinesia, and cataract: Part 2. *Ann Pharmacother.* 39(12):2065-72.
- Przedborski** S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini AB, Simonetti S, Fahn S, Carlson E, Epstein CJ, Cadet JL. (1992) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J Neurosci.* 12(5):1658-67.
- Pyle** A, Foltyniec T, Tiangyou W, Lambert C, Keers SM, Allcock LM, Davison J, Lewis SJ, Perry RH, Barker R, Burn DJ, Chinnery PF. (2005) Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol.* 57(4):564-7.
- Qian** T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. (1997) Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 273(6 Pt 1):C1783-92.
- Ramsay** RR, **Singer** TP. (1992) Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP<sup>+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun.* 189(1):47-52.
- Rawashdeh** AMM. (2005) Computing the Redox Potentials of Phenothiazine and N-methylphenothiazine *Abhath Al-Yarmouk "Basic science and Engineering"* 14(2) 195-208.
- Ren** Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. (2005) Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J Biol Chem.* 280(40):34105-12.
- Richter** F, Hamann M, Richter A. (2007) Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice. *J Neurosci Res.* 85(3):681-91.
- Ridet** JL, Bensadoun JC, Déglon N, Aebischer P, Zurn AD. (2006) Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 21(1):29-34.
- Riederer** P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem.* 52(2):515-20.
- Rodriguez-Enriquez** S, Kim I, Currin RT, Lemasters JJ. (2006) Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy.* 2(1):39-46.
- Rojas** P, Serrano-García N, Mares-Sámano JJ, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Ogren SO. (2008) EGb761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress. *Eur J Neurosci.* 28(1):41-50.
- Ross** OA, McCormack R, Curran MD, Duguid RA, Barnett YA, Rea IM, Middleton D. (2001) Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol.* 36(7):1161-78.
- Rossignol** R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochem J.* 370(Pt 3):751-62. Review.

- Ruan H**, Tang XD, Chen ML, Joiner ML, Sun G, Brot N, Weissbach H, Heinemann SH, Iverson L, Wu CF, Hoshi T. (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(5):2748-53.
- Sanchez-Ramos J**, Overvik E and Ames B. (1994) A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2' deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinson's disease brain. *Neurodegeneration*. 3, pp. 197–204.
- Sandebring A**, Thomas KJ, Beilina A, van der Brug M, Cleland MM, Ahmad R, Miller DW, Zambrano I, Cowburn RF, Behbahani H, Cedazo-Mínguez A, Cookson MR. (2009) Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1. *PLoS One*. 4(5):e5701.
- Santoro A**, Salvioli S, Raule N, Capri M, Sevini F, Valensin S, Monti D, Bellizzi D, Passarino G, Rose G, De Benedictis G, Franceschi C. (2006) Mitochondrial DNA involvement in human longevity. *Biochim Biophys Acta*. 1757(9-10):1388-99. Review.
- Sanyal S**, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P, Bigras E, Merz DC, Hébert TE, van der Kooy D, Schafer WR, Culotti JG, Van Tol HH. (2004) Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*. 23(2):473-82.
- Saul N**, Pietsch K, Menzel R, Stürzenbaum SR, Steinberg CE. (2009) Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma. *Mech Ageing Dev*. 130(8):477-86.
- Sawin ER**, Ranganathan R, Horvitz HR. (2000) *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron*. 26(3):619-31.
- Schafer FQ**, **Buettner GR**. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 30(11):1191-212. Review.
- Schapira AH**, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 54(3):823-7.
- Schapira AH**, **Marsden CD**. (1994) Platelet mitochondrial DNA in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 9(1):119-21.
- Schapira AH**. (2001) Causes of neuronal death in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 86:155-62. Review.
- Schapira AH**. (2006) Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*. 66(10 Suppl 4):S10-23.
- Scherz-Shouval R**, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 26(7):1749-60.
- Schmidt E**, Seifert M, Baumeister R. (2007) *Caenorhabditis elegans* as a model system for Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. 4(2-3):199-217. Review.
- Schriner SE**, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 308(5730):1909-11.
- Seaton TA**, Cooper JM, Schapira AH. (1997) Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res*. 777(1-2):110-8.
- Seelig A**, Gottschlich R, Devant RM. (1994) A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(1):68-72.
- Seidler A**, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G, Schneider E. (1996) Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*. 46(5):1275-84.
- Shamoto-Nagai M**, Maruyama W, Akao Y, Osawa T, Tribl F, Gerlach M, Zucca FA, Zecca L, Riederer P, Naoi M. (2004) Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm*. 111(10-11):1253-65.
- Sharma A**, Kaur P, Kumar V, Gill KD. (2007) Attenuation of 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine induced nigrostriatal toxicity in mice by N-acetyl cysteine. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 53(1):48-55.
- Sherer TB**, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*. 179(1):9-16.
- Shoulson I**. (1998) DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. *Ann Neurol*. 44(3 Suppl 1):S160-6. Review.

- Shults** CW, Oakes D, Kieburz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompolti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL, Kurlan R, Molho E, Harrison M, Lew M; Parkinson Study Group. (2002) Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol.* 59(10):1541-50.
- Shuman** S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* 269(51):32678-84.
- Sian** J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD. (1994a) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 36(3):348-55.
- Sian** J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. (1994b) Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 36(3):356-61.
- Singer** TP, Castagnoli N Jr, Ramsay RR, Trevor AJ. (1987) Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem.* 49(1):1-8.
- Smiley** ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(9):3671-5.
- Sofic** E, Riederer P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP, Hebenstreit G, Youdim MB. (1988) Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 74(3):199-205.
- Sofic** E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB. (1991) Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem.* 56(3):978-82.
- Sofic** E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 142(2):128-30.
- Somayajulu-Niṭu** M, Sandhu JK, Cohen J, Sikorska M, Sridhar TS, Matei A, Borowy-Borowski H, Pandey S. (2009) Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and Parkinsonism in adult rats: neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of Coenzyme Q10. *BMC Neurosci.* 10:88.
- Sonnen** JA, Larson EB, Gray SL, Wilson A, Kohama SG, Crane PK, Breitner JC, Montine TJ. (2009) Free radical damage to cerebral cortex in Alzheimer's disease, microvascular brain injury, and smoking. *Ann Neurol.* 65(2):226-9.
- Soong** NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. (1992) Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat Genet.* 2(4):318-23.
- Spillantini** MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388(6645):839-40.
- Srivastava** P, **Panda** D. (2007) Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding. *FEBS J.* 274(18):4788-801.
- Stavrovskaya** IG, Narayanan MV, Zhang W, Krasnikov BF, Heemskerk J, Young SS, Blass JP, Brown AM, Beal MF, Friedlander RM, Kristal BS. (2004) Clinically approved heterocyclics act on a mitochondrial target and reduce stroke-induced pathology. *J Exp Med.* 200(2):211-22.
- Stokes** AH, Hastings TG, Vrana KE. (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res.* 55(6):659-65. Review.
- Sulzer** D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Krantz D, Edwards RH, Greene LA, Zecca L. (2000) Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(22):11869-74.
- Sulzer** D. (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 30(5):244-50. Review.
- Suo** S, Ishiura S, Van Tol HH. (2004) Dopamine receptors in *C. elegans*. *Eur J Pharmacol.* 500(1-3):159-66. Review.
- Takayanagi** R, Takeshige K, Minakami S. (1980) NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol. *Biochem J.* 192(3):853-60.
- Takeshige** K, **Minakami** S. (1979) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation. *Biochem J.* 180(1):129-35.

- Tanaka M**, Gong JS, Zhang J, Yoneda M, Yagi K. (1998) Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet*. 351(9097):185-6.
- Tanaka M**. (2002) Mitochondrial genotypes and cytochrome b variants associated with longevity or Parkinson's disease. *J Neurol*. 249 Suppl 2:III1-8.
- Tandros FW**, **Wahab AF**. (1962) The site of action of phenothiazine S35 in the central nervous system. *J Ment Sci*. 108:816-21.
- Tanner CM**. (2003) Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies. *Adv Neurol*. 91:133-42.
- Taylor KS**, Counsell CE, Harris CE, Gordon JC. (2006) Screening for undiagnosed parkinsonism in people aged 65 years and over in the community. *Parkinsonism Relat Disord*. 12(2):79-85.
- Testa CM**, Sherer TB, Greenamyre JT. (2005) Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol Brain Res*. 134(1):109-18.
- The Parkinson Study Group**. (1993) Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 328:176-183.
- Thiruchelvam M**, Prokopenko O, Cory-Slechta DA, Buckley B, Mirochnitchenko O. (2005) Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat + maneb-induced Parkinson disease phenotype. *J Biol Chem*. 2005 Jun 10;280(23):22530-9.
- Thomas B**, **Beal MF**. (2007) Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 16 Spec No. 2:R183-94. Review.
- Thomas JH** und **Lockery S**. (1999) Neurobiology, in *C. elegans: a Practical. Approach* (Hope I., ed.) *Oxford University Press*. pp. 143-176
- Tolkovsky AM**, Xue L, Fletcher GC, Borutaite V. (2002) Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie*. 84(2-3):233-40. Review.
- Trifunovic A**, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 429(6990):417-23.
- Trimmer PA**, Schwartz KM, Borland MK, De Taboada L, Streeter J, Oron U. (2009) Reduced axonal transport in Parkinson's disease cybrid neurites is restored by light therapy. *Mol Neurodegener*. 4:26.
- Tse DC**, McCreery RL, Adams RN. (1976) Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J Med Chem*. 19(1):37-40.
- Turrens JF**, **Boveris A**. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 191(2):421-7.
- Turrens JF**. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 552(Pt 2):335-44. Review.
- Uryu K**, Richter-Landsberg C, Welch W, Sun E, Goldbaum O, Norris EH, Pham CT, Yazawa I, Hilburger K, Micsenyi M, Giasson BI, Bonini NM, Lee VM, Trojanowski JQ. (2006) Convergence of heat shock protein 90 with ubiquitin in filamentous alpha-synuclein inclusions of alpha-synucleinopathies. *Am J Pathol*. 168(3):947-61.
- van der Walt JM**, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM. (2003) Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet*. 72(4):804-11.
- Van Laar VS**, **Berman SB**. (2009) Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 218(2):247-56. Review.
- Vatassery GT**, Fahn S, Kuskowski MA. (1998) Alpha tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. Parkinson Study Group. *Neurology*. 50(6):1900-2.
- Vieira HL**, Belzacq AS, Haouzi D, Bernassola F, Cohen I, Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Bartle LM, Melino G, Brenner C, Goldmacher V, Kroemer G. (2001) The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene*. 20(32):4305-16.
- Wahlländer A**, Soboll S, Sies H, Linke I, Müller M. (1979) Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett*. 97(1):138-40.
- Ward S**, Thomson N, White JG, Brenner S. (1975) Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol*. 1975 160(3):313-37.

- Weber CA, Ernst ME.** (2006) Antioxidants, supplements, and Parkinson's disease. *Ann Pharmacother.* 40(5):935-8.
- Westermann B.** (2003) Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta.* 1641(2-3):195-202. Review.
- Winterbourn CC, Metodiewa D.** (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys.* 314(2):284-90.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., Brenner, S.** (1986) The structure of the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 314, 1– 340.
- Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW.** (2006) Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 12(11):521-8. Review.
- Wu CW, Ping YH, Yen JC, Chang CY, Wang SF, Yeh CL, Chi CW, Lee HC.** (2007) Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 220(3):243-51.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM.** (2001) Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol.* 11(5):361-5.
- Yang L, Calingasan NY, Wille EJ, Cormier K, Smith K, Ferrante RJ, Beal MF.** (2009a) Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's diseases. *J Neurochem.* 109(5):1427-39.
- Yang L, Zhao K, Calingasan NY, Luo G, Szeto HH, Beal F.** (2009b) Mitochondria targeted peptides protect against 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine neurotoxicity. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Feb 9.
- Ye H, Ye B, Wang D.** (2008) Trace administration of vitamin E can retrieve and prevent UV-irradiation- and metal exposure-induced memory deficits in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Learn Mem.* 90(1):10-8.
- Youle RJ, Karbowski M.** (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(8):657-63. Review.
- Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA, Bossy-Wetzel E.** (2007) Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ.* 14(3):462-71.
- Zamzami N, Kroemer G.** (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(1):67-71. Review.
- Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC; Cache County Study Group.** (2004) Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol.* 61(1):82-8.
- Zareba M, Bober A, Korytowski W, Zecca L, Sarna T.** (1995) The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems. *Biochim Biophys Acta.* 1271(2-3):343-8.
- Zecca L, Pietra R, Goj C, Mecacci C, Radice D, Sabbioni E.** (1994) Iron and other metals in neuromelanin, substantia nigra, and putamen of human brain. *J Neurochem.* 62(3):1097-101.
- Zecca L, Zucca FA, Albertini A, Rizzio E, Fariello RG.** (2006) A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 67(7 Suppl 2):S8-11. Review.
- Zhang ZX, Román GC.** (1993) Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology.* 12(4):195-208. Review.
- Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ.** (1999) Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol.* 154(5):1423-9.
- Zhang SM, Hernán MA, Chen H, Spiegelman D, Willett WC, Ascherio A.** (2002) Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology.* 59(8):1161-9.
- Zhang Y, Qi H, Taylor R, Xu W, Liu LF, Jin S.** (2007) The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. *Autophagy.* 3(4):337-46.
- Zhou LJ, Zhu XZ.** (2000) Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J Pharmacol Exp Ther.* 293(3):982-8.
- Zhu JH, Guo F, Shelburne J, Watkins S, Chu CT.** (2003) Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathol.* 13(4):473-81.

**Zhu JH**, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. (2007) Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol.* 170(1):75-86.

**Zigmond MJ.** (1997) Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 4(3-4):247-53. Review.

### Internetadressen

<http://164.15.232.115/oligofactory/index.jsp>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://frodo.wi.mit.edu/>

[http://hopes.stanford.edu/basics/braintut/f\\_ab19bslgangp.gif&imgrefurl](http://hopes.stanford.edu/basics/braintut/f_ab19bslgangp.gif&imgrefurl)

<http://pdsp.med.unc.edu>

<http://www.biosite.dk/leksikon/images/ellman.gif>

<http://www.clontech.com/>

<http://www.rxmed.com/>

<http://www.wormatlas.org>

Präsentation von Dauer und Przedborski, 2003 (Universität Basel) unter:

[http://209.85.135.132/search?q=cache:2Fj0gVu3WH8J:pages.unibas.ch/fame/4jk/skripten/04.10.18\\_m.tolnay\\_Parkinsonsyndrom.pdf+Dauer+Przedborski+2003+Morbus+Parkinson&cd=2&hl=de&ct=clnk&gl=de](http://209.85.135.132/search?q=cache:2Fj0gVu3WH8J:pages.unibas.ch/fame/4jk/skripten/04.10.18_m.tolnay_Parkinsonsyndrom.pdf+Dauer+Przedborski+2003+Morbus+Parkinson&cd=2&hl=de&ct=clnk&gl=de)



## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AADC	aromatische Aminosäuredecarboxylase
Abb.	Abbildung
AcPHT	10-Acetylphenothiazin, N-Acetylphenothiazin
ADE	anteriore Deidriten (anteriore dopaminerge Neurone des <i>C. elegans</i> )
ADP	Adenosindiphosphat
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor-1
Apo	Apomorphin (D <sub>2</sub> -Rezeptoragonist)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP13A2	<i>PARK9</i> -Genprodukt, autosomal-rezessive Mutationen verantwortlich für familiäre PD
BCA	Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid)
Bcl <sub>2</sub>	B-cell lymphoma 2
bidest.	bidestilliertes
BSA	bovines Serumalbumin
BSO	Buthionin-Sulfoximin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
Cat	β-Catechin
<i>Cat-2</i>	<i>Tyrosinhydroxylase</i> Gen in <i>C. elegans</i> (engl. abnormal CATeCholamine distribution)
cDNA	<i>complementary</i> DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CEP	cephalische Sensilla (cephalische dopaminerge Neurone des <i>C. elegans</i> )
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CLOZ	Clozapin
CMA	Chaperon medierte Autophagie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoQ(H <sub>2</sub> )	Coenzym Q, Ubichinon
COMT	Katecholamin-O-Methyltransferase
CPRZ	Chlorpromazin
C <sub>T</sub>	Schwellenwertzyklus (eng. Cycle Threshold)
CT	Computertomographie
Cu	Kupfer
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfid
Cu/Zn-SOD	SOD1 (cytosolische Superoxiddismutase mit Kupfer/Zink als Zentralmetalle)
Cy <sup>3</sup>	Carbocyanid 3
Cyt c	Cytochrom C
D <sub>1</sub> /D <sub>2</sub> -Rezeptor	Dopaminrezeptortypen

DA	Dopamin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAT	Dopamintransporter
DATATOP	Deprenyl and Tocopherol Antioxidant Therapy of Parkinsonism
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCF	Dichlorfluoreszein
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat-versetztes Wasser
d.h.	das heißt
DIC	Differential Interference Contrast
DJ-1	<i>PARK7</i> -Genprodukt, autosomal-rezessive Mutationen verantwortlich für familiäre PD
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenol
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxynukleotidtrisulphat
DOP-1 bis 4	Dopaminrezeptor 1 bis 4 in <i>C. elegans</i>
DOPAC	3-4-Dihydroxyphenylacetaldehyd
dPBS	Phosphat gepufferte Saline Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei (Gibco)
Drp1	dyneine-related protein 1
<i>DsRed2</i>	rot fluoreszierendes Protein von <i>Discosoma sp</i>
dT <sub>15</sub>	Oligo-Desoxythymidin-Primer
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitobenzoesäure (Ellman`s Reagenz)
e <sup>-</sup>	Elektron
E17	Embryonaltag 17
E <sub>260</sub>	Emissionsmaximum bei 260 nm
E <sub>280</sub>	Emissionsmaximum bei 280 nm
EC <sub>50</sub> -Wert	halbmaximale effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGGC	Epigallactocatechingallat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (lat. und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAD(H <sub>2</sub> )	Flavoadenindinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
Fe	Eisen

Fe <sup>2+</sup> /Asc	Eisen/Ascorbat
FeSO <sub>4</sub>	Eisensulfat
FudR	5-Fluoro-2`-desoxyuridin
GABA	gamma-Aminobuttersäure
γ-GCS	gamma-Glutamyl-Cysteinsynthase
γ-L-Glu-L-Cys-Glu	Glutathion, Tripeptid aus Glutamin-Cystein-Glutamin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
<i>gpd-1</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i> Gen des <i>C. elegans</i>
<i>GPe</i>	<i>Globus pallidus externus</i>
<i>GPI</i>	<i>Globus pallidus internus</i>
GPx	Glutathionperoxidase
GPx1	Glutathionperoxidase 1
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSTNB	Disulfid aus GSH und TNB
GTP	Guanosintriphosphat
H <sup>+</sup>	Proton
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco)
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> DCF	Dihydrodichlorofluoreszein
H <sub>2</sub> DCF-DA	Dihydrodichlorofluoreszeindiacetat
HO·	Hydroxyradikal
HO <sup>-</sup>	Hydroxid
HO <sub>2</sub> ·	Perhydroxyradikal
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse-Radish-Peroxidase)
HVA	Homovanillinsäure
ISB	Iminostilben
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
k-Wert	Konstante
K <sub>i</sub> -Wert	Bindeaffinitätskonstante
K <sub>m</sub> -Wert	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
Komplex I	Ubichinon - Oxidoreduktase, NADH Dehydrogenase
Komplex II	Succinat : Ubichinon - Oxidoreduktase, Succinat Dehydrogenase
Komplex III	Ubihydrochinon : Cytochrom c - Oxidoreduktase, Cytochrom c Reduktase

Komplex IV	Cytochrom c : O <sub>2</sub> - Oxidoreduktase, Cytochrom c Oxidase
Komplex V	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-Synthase
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin (Dopamin-Vorstufe)
L1- 4	Larvenstadium 1 bis 4
LB	Lewy-Körperchen (engl. Lewy bodies)
LB-Medium	Luria broth – Bakterien-Nährmedium
LR	Klonierungsmethode (ortspezifischen Rekombination)
LRRK-2	leucin-rich repeat serin/threonin-kinase 2, Dardarin; <i>PARK8</i> -Genprodukt, autosomal-dominante Mutationen verantwortlich für familiäre PD
M9	Phosphatpuffer
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (neuronaies Markerprotein)
MDA	Malondialdehyd
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MilliQ-H <sub>2</sub> O	MilliQ-Wasser
mind.	mindestens
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
Mnf1/2	Mitofusin 1/2
MnSOD	mitochondriale Superoxiddismutase mit Mangan als Zentralmetall
MPA	Metaphosphorsäure
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenylpyridiniumion
MPDP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxy-pyridiniumion
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MRT	Magnetresonanztomographie, Kernspintomographie
3-MT	3-Methoxytyramin
mtDNA	mitochondriales Genom
MTP	mitochondriale Transitionsproteine
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N2	N2-Bristol Wildstamm-Variante des <i>C. elegans</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sub>2</sub> EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NGM	Nematode Growth Medium
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffoxid
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxidradikal
OPA1	optic atrophy 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>PARK1-9</i>	mutierte <i>PARK</i> -Gene verantwortlich für familiäre PD
PBN	Phenyl- $\alpha$ - <i>tert</i> -butylnitron, synthetischer Radikalfänger
PBS	Phosphat gepufferte Saline (engl. phosphate buffered saline)
PBST	PBS versetzt mit 0,02 % Triton X-100
P <sub>Ca<sub>t</sub>-2</sub>	amplifizierte Promotorregion des <i>Tyrosinhydroxylase</i> Gens
P <sub>Ca<sub>t</sub>-2::DsRed2</sub>	Fusionsprodukt: <i>DsRed2</i> und <i>Tyrosinhydroxylase</i> Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PD	Parkinsonsche Krankheit (engl. Parkinson`s disease)
PDE	posteriore Deidriten (posteriore dopaminerge Neurone des <i>C. elegans</i> )
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i> , Maß für Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
PHT	Phenothiazin
PHO	Phenoxazin
PI	PropidiumIodid
PINK1	PTEN-induced kinase 1; <i>PARK6</i> -Genprodukt; autosomal-rezessive Mutationen verantwortlich für familiäre PD
PMZ	Promethazin
PP 1 bis 4	Primerpaar 1 bis 4
PPB	Phosphatpuffer
PRZ	Promazin
P <sub>Sng-1::CFP</sub>	Fusionsprodukt: <i>CFP</i> und <i>Synaptogyrin-1</i> Promotor
Q	Coenzym Q oder Ubichinon
Q-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
R5A, R7A, R9A	dopaminerge Neurone in der Schwanzgegend des männlichen <i>C. elegans</i>
RET	reverse Elektronenfluß
RISP	Risperidon
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezier (engl. reactive oxygene species)
rpl-1	ribosomales Protein der 60S-Untereinheit des <i>C. elegans</i>
SDS	Natriumdodecylsulphat (engl. sodium dodecylulphate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>SN</i>	<i>Substantia nigra</i>
<i>SNpc</i>	<i>Substantia nigra pars compacta</i>

<i>SNpr</i>	<i>Substantia nigra pars reticulata</i>
S.O.C.	Super Optimal Broth – Bakterien-Nährmedium
SOD	Superoxiddismutase
SOD1	zytosolische Superoxiddismutase mit Kupfer-Zink als Zentralmetalle
SOD2	mitochondriale Superoxiddismutase mit Mangan als Zentralatom
SOD3	extrazelluläre Superoxiddismutase mit Kupfer-Zink als Zentralatome
sog.	sogenannte
SPECT	single positron emission computed tomography
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat -Puffer
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBS	Tris gepufferte Saline (engl. Tris buffered saline)
TB	Terrific broth – Bakterien-Nährmedium
TBST	TBS versetzt mit 0,1 % Tween20
TEAM	Triethanolamin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl, Antioxidant
Tfam	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TH	Tyrosinhydroxylase
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UCH-L1	Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1, <i>PARK-5</i> -Genprodukt; autosomal-dominante Mutationen verantwortlich für familiäre PD
UPDRS	Unified Parkinson`s Disease Rating Scale, standardisierter Test zur Diagnose der PD
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
VDAC	spannungsabhängiger Anionenkanal (engl. voltage dependent anion channel)
VMAT-2	vesikulärer Monoamintransporter-2
VitE	Vitamin E, $\alpha$ -Tocopherol
z.B.	zum Beispiel
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfid
z.T.	zum Teil

°C	Grad Celsius
%	Prozent
a.u.	arbitrary units (willkürliche Skalierung)
Bar	Einheit für Druck
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
Da	Dalton
x	Fach
x g	Fach Gravitationskraft
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
kWatt	Kilowatt – Einheit der Leistung
L	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
mM	Millimolar
ml	Milliliter
min	Minute
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
U	Units - Einheit der Enzymaktivität
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. weight per volume)







### **Eidesstattliche Erklärung**

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

Mainz, den

---

Justyna Barbara Christ