

Aus dem Institut für Pathobiochemie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung der Expression zentraler Mitophagie-Regulatorproteine  
im humanen Zellmodell der Parkinsonschen Krankheit

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Esther-Maria Pauls  
aus Lemgo

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Moosmann

2. Gutachter: PD. Dr. rer. nat. Isabelle Miederer

Tag der Promotion: 11. April 2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung und Ziel der Dissertation.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
2.1 Parkinsonsche Krankheit.....	3
2.1.1 Historie und Epidemiologie.....	3
2.1.2 Klassifizierung und Ätiologie .....	4
2.1.2.1 Genetische Ursachen .....	4
2.1.2.2 Atypisches Parkinson-Syndrom.....	5
2.1.2.3 Sekundäres Parkinson-Syndrom.....	6
2.1.2.4 Idiopathisches Parkinson-Syndrom.....	6
2.1.3 Symptome und Verlauf.....	7
2.1.4 Diagnostik und Therapie .....	8
2.1.5 Charakteristische Eigenschaften dopaminerger Neurone der SNpc und Veränderungen bei der Parkinsonschen Krankheit.....	9
2.1.6 Neurophysiologie und Neuropathophysiologie .....	10
2.1.7 Neuropathologie.....	12
2.1.8 Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit .....	15
2.1.8.1 Die Rolle von $\alpha$ -Synuclein.....	15
2.1.8.2 Neuroinflammation.....	17
2.1.8.3 Mitochondriale Dysfunktion.....	17
2.1.8.4 Oxidativer Stress .....	19
2.2 Mitochondrien .....	20
2.2.1 Morphologie der Mitochondrien .....	20
2.2.2 Funktion der Mitochondrien.....	22

2.2.2.1	Proteinimport über TIM- und TOM-Komplexe.....	22
2.2.2.2	Oxidative Phosphorylierung.....	23
2.2.3	Pro- und antioxidative Mechanismen .....	25
2.2.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies .....	25
2.2.3.2	Antioxidative Abwehrmechanismen.....	26
2.2.4	Mitochondriale Dynamik.....	26
2.2.4.1	Fusion und Fission.....	27
2.2.4.2	Die Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1 .....	29
2.2.4.3	Die Fissionsproteine DLP1, Mff, MiD49, MiD51 und Fis .....	31
2.2.5	Mitophagie .....	32
2.2.5.1	Die Proteine PINK1 und Parkin.....	33
2.2.5.2	Der Mechanismus der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie .....	35
2.2.5.3	Die Proteine BNIP3L/Nix und LC3.....	36
2.2.5.4	Der Mechanismus der BNIP3L/Nix vermittelten Mitophagie .....	37
2.3	Untersuchte Substanzen.....	37
2.3.1	Das Toxin MPTP/MPP+ .....	39
2.3.2	Das Antioxidans Phenothiazin.....	41
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>43</b>
3.1	Material.....	43
3.1.1	Geräte.....	43
3.1.2	Chemikalien.....	44
3.1.3	Materialien.....	46
3.1.4	Weitere Materialien und Kits.....	48
3.1.5	Puffer und Lösungen .....	48
3.1.6	Antikörper .....	55
3.1.6.1	Primäre Antikörper.....	55
3.1.6.2	Sekundäre Antikörper.....	56
3.1.7	Farbstoff .....	57
3.1.8	Zelllinie.....	57

3.2	Methoden.....	58
3.2.1	Zellbiologische Methoden .....	58
3.2.1.1	Beschichtung von Zellkulturschalen und Deckgläsern .....	58
3.2.1.2	Zellkultivierung.....	58
3.2.1.3	Zelldifferenzierung.....	59
3.2.1.4	Behandlung mit MitoTracker Red CM-H <sub>2</sub> XROS .....	60
3.2.1.5	Fixierung, Blockierung und Immunfärbung .....	61
3.2.1.6	Mikroskopie.....	62
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	62
3.2.2.1	Western Blots .....	62
3.2.2.1.1	Proteinisolierung .....	62
3.2.2.1.2	Proteinquantifizierung .....	62
3.2.2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli.....	63
3.2.2.1.4	Western Blot .....	65
3.2.2.1.5	Proteindetektion .....	65
3.2.2.1.6	Dichtemessung.....	66
3.2.3	Statistische Auswertung .....	66
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
4.1	Der Einfluss des Komplex-I-Inhibitors MPP <sup>+</sup> und des Antioxidans Phenothiazin auf die Morphologie der Mitochondrien .....	68
4.1.1	Die Komplex-I-Inhibition durch MPP <sup>+</sup> verändert die Morphologie der Mitochondrien .....	68
4.1.2	Das Antioxidans Phenothiazin beeinflusst die durch MPP <sup>+</sup> induzierten morphologischen Veränderungen der Mitochondrien .....	71
4.2	Der Einfluss des Komplex-I-Inhibitors MPP <sup>+</sup> und des Antioxidans Phenothiazin auf die oxidative Phosphorylierung.....	74
4.2.1	MPP <sup>+</sup> beeinflusst die mitochondriale Atmungskette.....	74
4.2.2	Die ATP-Synthase ist unter MPP <sup>+</sup> unverändert.....	77
4.2.3	Die Komplexe I-V der Mitochondrien bleiben unter Phenothiazin unverändert....	78

4.3	Der Einfluss von MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin auf die Proteinspiegel von TOM20 und TIM23 .....	78
4.3.1	Die Effekte der Komplex-I-Inhibition durch MPP <sup>+</sup> auf die Proteinspiegel von TOM20 und TIM23 .....	79
4.3.2	Der Einfluss von Phenothiazin auf den MPP <sup>+</sup> vermittelten Effekt auf die Proteinspiegel von TOM20 und TIM23 .....	83
4.4	Der Einfluss von MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin auf die mitochondriale Dynamik .....	83
4.4.1	Die Komplex-I-Inhibition durch MPP <sup>+</sup> führt zu reduzierten Proteinspiegeln von Mff und DLP1 .....	84
4.4.2	Der Einfluss von Phenothiazin auf die Fissionsproteine Mff und DLP1 .....	87
4.4.3	Die Komplex-I-Inhibition durch MPP <sup>+</sup> verändert die Proteinspiegel von Mfn1, Mfn2 und Opa1 .....	87
4.4.4	Der Einfluss von Phenothiazin auf die Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1 .....	90
4.5	Die Wirkung von MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin auf die Induktion der Mitophagie .....	90
4.5.1	MPP <sup>+</sup> beeinflusst die Proteinspiegel von PINK1 und Parkin .....	91
4.5.2	Der Effekt von Phenothiazin auf die durch MPP <sup>+</sup> veränderten Proteinspiegel von PINK1 und Parkin .....	94
4.5.3	MPP <sup>+</sup> verändert die Proteinspiegel des Autophagieproteins BNIP3L/Nix .....	94
4.5.4	Phenothiazin hat keinen Effekt auf die Proteinspiegel von BNIP3L/Nix .....	96
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>97</b>
5.1	MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin beeinflussen die Morphologie der Mitochondrien .....	99
5.2	MPP <sup>+</sup> hemmt die oxidative Phosphorylierung .....	100
5.3	Der mitochondriale Proteinimport wird durch MPP <sup>+</sup> beeinflusst .....	103
5.4	Reduzierte Fissions- und Fusionsproteine unter MPP <sup>+</sup> deuten auf eine Induktion der Mitophagie hin .....	106
5.5	Die Induktion der Mitophagie unter MPP <sup>+</sup> .....	108
5.5.1	MPP <sup>+</sup> induziert keine PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie .....	108
5.5.2	MPP <sup>+</sup> könnte die BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie induzieren .....	110
5.6	Ausblick .....	111
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>

6.1	Die Auswirkungen der Komplex-I-Inhibition auf die Morphologie, Dynamik und die Elimination von Mitochondrien.....	112
6.2	Die Rolle der ROS in der Mitophagie .....	113
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>144</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AB-AM	Antibiotika-Antimykotikum
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Bafa1	Bafilomycin A1
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BNIP3L/Nix	<i>Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa-interacting Protein 3-like</i> , Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa-interagierendes, ähnliches Protein 3
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinder-Serumalbumin
Cy	Cyanin
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ctrl	Kontrolle
Cu	Kupfer
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol
DAT	Dopamin-Transporter
db-cAMP	N6,2'-O-dibutyryl-Adenosin 3',5'-cyclisches Monophosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DLP1	<i>Dynamamin like protein 1</i> , Dynamamin-verwandtes Protein 1
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-tetraessigsäure
ETC	<i>Elektron transport chain</i> , Elektronentransportkette
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
FCCP	Carbonyl cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FGF	<i>Fibroblasten Growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor

g	Gramm
GDNF	<i>glia cell line-derived neurotrophic factor</i> , Gliazellen abgeleiteter neurotropher Faktor
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H3	Histon H3
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IHC	Immunhistochemie
IMM	<i>inner mitochondrial membrane</i> , innere Mitochondrienmembran
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
L	Liter
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> , Mikrotubuli-assoziertes Protein 1A/1B-leichte Kette 3 (MAP1LC3)
LUHMES	<i>lund human mesencephalic</i> , Lund-menschliche Mittelhirn (Zelllinie)
M	Molar
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i> , Mikrotubuli-assoziertes Protein 2
Mff	<i>mitochondrial fission factor</i> , mitochondrialer Fissionsfaktor
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mtDNA	mitochondriale DNA
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid

NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OMM	<i>outer mitochondrial membrane</i> , äußere Mitochondrienmembran
Opa1	<i>Optic atrophy 1</i> , Optikusatrophie 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-t	PBS mit Tween 20
PD	<i>Parkinson's disease</i> , Parkinsonsche Krankheit
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , Potential des Wasserstoffs
PHT	Phenothiazin
PINK1	PTEN-induzierte Kinase 1
PLO	Poly-L-Ornithin-Hydrobromid
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RTA	<i>ready to assemble</i> , Fertigbauset
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TH	Tyrosinhydroxylase
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i> , Translokase der inneren Membran
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i> , Translokase der äußeren Membran
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
V	Volt
VMAT 2	Vesikulärer Monoamintransporter 2
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Basalganglienschleife .....	11
Abbildung 2: Verlust dopaminergere Mittelhirnneurone in der Substantia nigra pars compacta	13
Abbildung 3: Lewy-Körperchen in der Substantia nigra.....	13
Abbildung 4: Lewy-Körperchen in der Substantia nigra mit $\alpha$ -Synuclein .....	14
Abbildung 5: Schematische Übersicht eines Mitochondriums .....	20
Abbildung 6: Die oxidative Phosphorylierung .....	24
Abbildung 7: Mitochondriale Fusion, Fission und Mitophagie.....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Mfn1 und Mfn2 .....	30
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Opa1 .....	30
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von DLP1.....	32
Abbildung 11: Die Struktur von PINK1 .....	34
Abbildung 12: Die Struktur von Parkin in geschlossenem und offenem Zustand.....	34
Abbildung 13: PINK1-Abbau und Akkumulation.....	35
Abbildung 14: BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie.....	37
Abbildung 15: Struktur von Dopamin und den wichtigsten Parkinsonmodell-Neurotoxinen .....	38
Abbildung 16: MPTP und seine Oxidationsprodukte MPDP <sup>+</sup> und MPP <sup>+</sup> .....	40
Abbildung 17: Phenothiazin-Derivate .....	41
Abbildung 18: Phenothiazin .....	41
Abbildung 19: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Markerproteins MAP2 .....	69
Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und der Mitochondrien .....	71
Abbildung 21: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und Mitochondrien nach Behandlung mit MPP <sup>+</sup> und PHT .....	73
Abbildung 22: Western-Blot-Analysen von Untereinheiten der Komplexe I-IV der mitochondrialen Atmungskette unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	76
Abbildung 23: Western-Blot-Analyse der Untereinheit von Komplex V unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	77
Abbildung 24: Western-Blot-Analyse des Proteins TOM20 unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	79

Abbildung 25: Western-Blot-Analyse des Proteins TIM23 unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	80
Abbildung 26: Western-Blot-Analyse des Proteins TIM23 unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> , Phenothiazin und dem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette FCCP.....	81
Abbildung 27: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Proteins TIM23.....	82
Abbildung 28: Western-Blot-Analysen der Proteine Mff und DLP1 unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	85
Abbildung 29: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Fissionsproteins Mff.....	86
Abbildung 30: Western-Blot-Analysen der Proteine Mfn1, Mfn2 und Opa1 unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	88
Abbildung 31: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und der Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1.....	89
Abbildung 32: Western-Blot-Analyse des Proteins PINK1 unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	91
Abbildung 33: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Proteins PINK1 .....	93
Abbildung 34: Western-Blot-Analyse des Proteins Parkin unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	94
Abbildung 35: Western-Blot-Analyse des Proteins BNIP3L/Nix unter Exposition mit MPP <sup>+</sup> und Phenothiazin .....	95

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste der verwendeten Geräte und Hersteller.....	43
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Chemikalien mit Bestellnummer und Bezugsquelle .....	44
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Materialien mit Bestellnummer und Bezugsquelle .....	46
Tabelle 4:	Liste der weiteren Materialien und Kits mit Bestellnummer und Bezugsquelle ....	48
Tabelle 5:	Liste der verwendeten primären Antikörper mit Wirts Spezies, Bestellnummer, Bezugsquelle und Verdünnung.....	55
Tabelle 6:	Liste der verwendeten sekundären Antikörper mit Wirts Spezies, Bestellnummer, Bezugsquelle und Verdünnung.....	56
Tabelle 7:	Verwendeter Farbstoff mit Bestellnummer, Bezugsquelle, Konzentration und Zielstruktur.....	57
Tabelle 8:	Verwendete Zelllinie mit Bezugsquelle.....	57
Tabelle 9:	Liste mit Volumenangaben der verwendeten Komponenten pro Schale bzw. Deckglas .....	58
Tabelle 10:	Liste der verwendeten Komponenten für Vorrats-, Proliferations- und Differenzierungsmedium .....	58
Tabelle 11:	Liste der verwendeten Substanzen mit Angabe der Inkubationszeitdauer und finaler Konzentration .....	60
Tabelle 12:	Liste der verwendeten Komponenten für die jeweiligen Trenngele (Angabe der Gele in %) .....	64
Tabelle 13:	Liste der verwendeten Komponenten für die jeweiligen Sammelgele (Angabe der Gele in %) .....	64

## 1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Bei der Parkinsonschen Krankheit handelt es sich um eine chronische neurodegenerative Erkrankung, die durch den Verlust dopaminergener Neurone im Mittelhirn gekennzeichnet ist. Es gibt zahlreiche Arbeiten und Studien, die darauf hinweisen, dass mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Krankheit spielen könnten. Mitochondrien sind die Hauptproduzenten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Erhöhte ROS-Spiegel gehen mit einem Risiko für die Entstehung von oxidativem Stress einher (Drechsel und Patel, 2008), welcher zu mitochondrialen Schäden führen kann. Diese Schäden wurden bei Parkinson-Patienten nachgewiesen und können letztlich zu einer neuronalen Degeneration führen. Das wohl am besten charakterisierte und bekannteste Parkinsontoxin ist 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Es verursacht beim Menschen nahezu alle Parkinson-Symptome und hemmt den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Dadurch kommt es einerseits zu einer erhöhten Produktion von ROS und andererseits zu einer verminderten Energiegewinnung in Form von ATP.

Trotz zahlreicher Forschungsaktivitäten ist bis heute keine pharmakologische oder interventionelle Therapie verfügbar, die die Krankheit kausal behandeln oder die Progredienz bei der Parkinsonschen Krankheit aufhalten kann; lediglich eine Linderung der Symptome ist möglich (Sardi et al., 2018; Dolgacheva et al., 2022).

Ein vielversprechender Ansatz zur Begrenzung der Folgen von reaktiven Sauerstoffspezies und zur Verringerung des neuronalen Verlusts ist der Einsatz von neuroprotektiven und therapeutisch wirksamen Antioxidantien. In den letzten Jahren hat sich dabei die Substanz Phenothiazin (PHT) als besonders potent erwiesen. Die Wirkung von PHT wurde bisher *in vitro* und in Tiermodellen untersucht, dabei konnten antioxidative Effekte in Mitochondrien nachgewiesen werden (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010; Tapias et al., 2019).

Ein wachsendes Forschungsgebiet ist die Untersuchung der epigenetischen Regulation. In der Dissertation von Dr. M. Baeken am Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz wurde *in vitro* (in LUHMES-Zellen) unter Komplex-I-Inhibition mit MPP<sup>+</sup> und *in vivo* im Mausmodell mit MPTP festgestellt, dass es zu epigenetischen Veränderungen kommt (Baeken, 2021). Diese Veränderungen sind mit der erhöhten Expression kernkodierter Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette auf transkriptioneller Ebene verbunden (Baeken, 2021). Die Induktion einer verstärkten Proteinsynthese kernkodierter Untereinheiten, die mit epigenetischen Veränderungen koinzidiert, könnte möglicherweise ein kompensatorischer Mechanismus sein, um mitochondriale Dysfunktion auszugleichen und zu einer verbesserten mitochondrialen Funktion mit vermehrter Energiegewinnung in Form von ATP zu führen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Konsequenzen dieser unter MPP<sup>+</sup>-Exposition in LUHMES-Zellen festgestellten epigenetisch induzierten Hochregulation der mitochondrialen Atmungskette zu untersuchen. Ein besonderes Interesse galt hierbei der mitochondrialen Morphologie, da sie dynamisch und eng mit der Mitochondrienfunktion verbunden ist. Morphologische Veränderungen können wiederum die mitochondriale Homöostase beeinflussen. Diese wird durch eine fein abgestimmte Regulation zwischen Biogenese, mitochondrialer Dynamik und Elimination aufrechterhalten. Die mitochondriale Dynamik umfasst die Ereignisse der Fusion (Verschmelzung) und Fission (Fragmentierung). Die Elimination bezieht sich auf den Abbau von geschädigten Mitochondrien oder solchen, die ihr Membranpotential verloren haben. Die vorliegende Arbeit sollte vor allem Einblicke in die Rolle der Mitochondrien im Hinblick auf ihre Morphologie, Dynamik und Elimination in einem humanen Zellmodell unter Exposition mit dem Parkinsontoxin MPP<sup>+</sup> geben. Zusätzlich sollte die potenzielle Wirksamkeit von Phenothiazin bei diesen Mechanismen untersucht werden, um in Zukunft daraus eine wirksame neuroprotektive Strategie für chronisch kranke Parkinson-Patienten zu entwickeln, die das Auftreten von Symptomen und das Fortschreiten der Krankheit verhindert.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Parkinsonsche Krankheit

Bei der Parkinsonschen Krankheit handelt es sich um eine neurodegenerative, bislang unheilbare Erkrankung des Mittelhirns, bei der es primär zu einem Verlust dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (*SNpc*, kompakter Anteil der schwarzen Substanz) kommt (Forno, 1996; Schnabel, 2010). Der Verlust von dopaminergen Neuronen in der *SNpc* geht mit einer Erschöpfung des Dopaminspiegels an den synaptischen Endigungen nigraler Neurone und einer deutlichen Einschränkung des nigrostriatalen Signalwegs einher (Cheng et al., 2010). Der Mangel an Dopamin im nigrostriatalen Signalweg führt zu motorischen Defiziten sowie nichtmotorischen Symptomen (Bloem et al., 2021; Kalia und Lang, 2015). Weitere Merkmale sind intraneuronale Proteinaggregate, sogenannte Lewy-Körperchen. Es handelt sich hierbei um zytoplasmatische Einschlüsse, die fehlgefaltete und unlösliche alpha ( $\alpha$ )-Synuclein-Aggregate enthalten (Spillantini et al., 1997; Wakabayashi et al., 2013; Simon et al., 2020; Balestrino und Schapira, 2020).

#### 2.1.1 Historie und Epidemiologie

Im Jahr 1817 beschrieb der englische Arzt James Parkinson erstmals die Symptome der später nach ihm benannten Krankheit in „*an essay on the shaking palsy*“ (Parkinson, 1817). Er äußerte sich darin optimistisch, dass es Grund zur Hoffnung gebe, dass bald ein Heilmittel gefunden werde, das zumindest das Fortschreiten der Krankheit aufhalten könne (Parkinson, 1817). Mehr als 200 Jahre später hat sich diese Hoffnung nicht erfüllt. Bis heute ist lediglich eine Linderung der Symptome (Sardi et al., 2018), jedoch weder ein Aufhalten noch eine Heilung der Krankheit möglich (Dolgacheva et al., 2022). Obwohl Levodopa (L-Dopa) seit seiner erstmaligen Anwendung im Jahr 1961 (Birkmayer und Hornykiewicz, 1962; Hornykiewicz, 2017) neben anderen Medikamenten, die die Dopaminkonzentration erhöhen oder die Dopaminrezeptoren stimulieren, bis heute die wirksamste verfügbare Erstlinientherapie bei der Parkinsonschen Krankheit ist, lindert es zwar die Symptome, verändert aber nicht den Krankheitsverlauf (Kalia und Lang, 2015).

Die Parkinsonsche Krankheit ist nach der Alzheimer Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Die durchschnittliche altersstandardisierte Inzidenzrate beträgt in Industrieländern 14/100.000 Personen in der Gesamtbevölkerung und 160/100.000 Personen ab 65 Jahren (Ascherio und Schwarzschild, 2016). Die Prävalenz steigt mit dem Alter an. In einer Meta-Analyse von vier nordamerikanischen Populationen wurde festgestellt, dass die Prävalenz der Parkinsonschen Krankheit bei Frauen und Männern zwischen 45 und 54 Jahren weniger als 1 % beträgt und bei Frauen ab 85 Jahren auf 2 % und bei Männern auf 4 % ansteigt (Marras et al., 2018). Diese Daten zeigen auch, dass Männer häufiger betroffen sind als Frauen. In den USA wurde

das Lebenszeitrisko für die Parkinsonsche Krankheit bei Männern im Alter von 40 Jahren auf 2 % und bei Frauen auf 1,3 % geschätzt (Ascherio und Schwarzschild, 2016). Gemäß Schätzungen, die auf einer Analyse der „Global Burden of Disease“-Studie beruhen, wies die Parkinsonsche Krankheit im Zeitraum zwischen 1990 und 2015 im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen den höchsten Anstieg altersstandardisierter Sterbe- und Prävalenzraten auf (Feigin et al., 2017). Es ist zu erwarten, dass diese Zahlen aufgrund des demografischen Wandels in Zukunft weiter ansteigen werden.

### 2.1.2 Klassifizierung und Ätiologie

Seit der Erstbeschreibung der Parkinsonschen Krankheit durch James Parkinson im Jahre 1817 wurden zahlreiche Bemühungen unternommen, die Ätiologie dieser Krankheit zu klären. Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts galt eine genetische Ursache als zweifelhaft (Hardy et al., 2003; Vaughan et al., 2001). Dies änderte sich, als verschiedene Genmutationen identifiziert wurden und nachgewiesen werden konnte, dass diese eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen (Gwinn-Hardy, 2002) (siehe Abschnitt 2.1.2.1). Bei der Parkinsonschen Krankheit kann neben genetischen Ursachen gemäß der Einteilung der Gesellschaft für Neurologie (Höglinger et al., 2023) zwischen der atypischen (siehe Abschnitt 2.1.2.2), der sekundären (siehe Abschnitt 2.1.2.3) und der idiopathischen Form unterschieden werden (siehe Abschnitt 2.1.2.4).

#### 2.1.2.1 Genetische Ursachen

Obwohl nur eine Minderheit (5-10%) der Parkinson-Erkrankungen auf monogenetische Mutationen zurückzuführen ist (Deng et al., 2018; Guadagnolo et al., 2021), hat die Identifizierung der betroffenen Gene, die zur Degeneration dopaminerger Neurone führen, zum Verständnis der molekularen Mechanismen beigetragen. Zu den monogenen Ursachen zählen sowohl autosomal-dominant als auch rezessiv vererbte Mutationen. Bislang wurden 23 Genorte und 19 Gene als Parkinson-verursachend identifiziert (Deng et al., 2018). Im Folgenden werden einige der am häufigsten und besten untersuchten Genmutationen vorgestellt.

Im Jahr 1997 wurde das erste Gen entdeckt, das für eine autosomal-dominante Form der Parkinsonschen Krankheit verantwortlich ist: Polymeropoulos et al. identifizierten eine Mutation im SNCA-Gen, welches für das Protein  $\alpha$ -Synuclein kodiert (Polymeropoulos et al., 1997), ein hauptsächlich präsynaptisch in Nervenendigungen lokalisiertes Protein, das unter anderem an der Exozytose und Wiederaufnahme von Neurotransmittern beteiligt ist (siehe Abschnitt 2.1.8.1). Mutiertes  $\alpha$ -Synuclein lagert sich in Form von Lewy-Körperchen ab (Singleton et al., 2013) (siehe Abschnitt 2.1.8.1). Diese späte, erst Ende des 20. Jahrhunderts gemachte Entdeckung der Mutation

im  $\alpha$ -Synuclein-Gen führte auch zu der Erkenntnis, dass  $\alpha$ -Synuclein ein Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen bei der idiopathischen Parkinson-Form ist (Simon et al., 2020). Die häufigste Form von Parkinson, die autosomal-dominant vererbt wird, wird durch Mutationen im LRRK2-Gen verursacht, das für die Leucinreiche Wiederholungskinasen 2 (*Leucin Rich Repeat Kinase 2*) kodiert (Zimprich et al., 2004; Alessi und Sammler, 2018). Die LRRK2 kann den Vesikeltransport, die Zytoskelettfunktion und die Lysosomenfunktion beeinflussen oder die Autophagie regulieren; Mutationen können zur Degeneration und zum Tod dopaminergischer Neuronen führen, auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind (Martin et al., 2014; Roosen und Cookson, 2016; Alessi und Sammler, 2018).

Zu den autosomal-rezessiv vererbten Parkinson-Formen gehören solche, die früh, vor dem 50. Lebensjahr auftreten (*early-onset Parkinson's Disease*) (Singleton et al., 2013), wie die autosomal-rezessiv vererbte Form aufgrund von Mutationen im Parkin-Gen (Lücking et al., 2000) und der vor dem 20. Lebensjahr auftretende, autosomal-rezessiv vererbte juvenile Parkinsonismus (AR-JP) (Matsumine et al., 1997; Kitada et al., 1998). Parkin und die PTEN-induzierte Kinase 1 (PINK1) spielen eine Rolle bei der Mitophagie (siehe Abschnitt 2.2.5.1 und 2.2.5.2), und deren Genmutationen führen zu weiteren autosomal-rezessiv vererbten Parkinson-Formen (Valente et al., 2004). Mutationen im PARK7-Gen, das für die Parkinson-assoziierte Deglycase, bekannt auch als DJ-1, kodiert, führt ebenfalls zu einer autosomal-rezessiv vererbten und früh einsetzenden Parkinson-Form (Bonifati et al., 2003). PARK steht hierbei für PARKinson. DJ-1 hat eine antioxidative Wirkung, die auf mehreren Mechanismen beruht, einschließlich der Stimulierung der Glutathionsynthese zur antioxidativen Abwehr (Raniga et al., 2017). Der Verlust dieser antioxidativen Einflüsse führt zur Ausprägung der Parkinson-Form. Die Mutationen in den Genen, die für  $\alpha$ -Synuclein, LRRK2, PINK1, Parkin und DJ-1 kodieren, haben alle gemeinsam, dass diese Proteine an der Aufrechterhaltung der physiologischen Mitochondrienfunktion beteiligt sind oder mit der Abwehr von oxidativem Stress assoziiert sind. Insbesondere haben die identifizierten Genmutationen einen Zusammenhang zwischen der Parkinsonschen Krankheit und der Rolle der Mitochondrien bei dieser Erkrankung herstellen können.

#### 2.1.2.2 *Atypisches Parkinson-Syndrom*

Eine Parkinson-Symptomatik, die aufgrund einer anderen, sporadisch auftretenden neurodegenerativen Erkrankung auftritt, wird als atypisches Parkinson-Syndrom bezeichnet (Levin et al., 2016). Zu diesen schweren und oft rasch fortschreitenden neurodegenerativen Erkrankungen zählen unter anderem die Lewy-Body-Demenz, die Multisystematrophie, die progressive supranukleäre Blickparese und die kortikobasale Degeneration (Deutschländer et al., 2017; Levin et al., 2016). Im Vergleich zur idiopathischen Form ist beim atypischen Parkinson-Syndrom das Ansprechen auf eine pharmakologische Levodopa-Therapie eingeschränkt oder

fehlt vollständig. Zudem fehlen der einseitige Krankheitsbeginn und Tremor, insbesondere Ruhetremor, tritt eher nicht auf (Deutschländer et al., 2017). Eine kausale Therapie gibt es derzeit nicht (Levin et al., 2016).

#### 2.1.2.3 Sekundäres Parkinson-Syndrom

Die häufigste Ursache für das sekundäre Parkinson-Syndrom ist die Einnahme verschiedener Medikamente, die direkt die dopaminerge Übertragung beeinflussen, wie beispielsweise Antipsychotika oder Kalziumkanalblocker (Höllerhage, 2019). Weitere, jedoch seltene Ursachen sind Hirntumore, Traumata und Infektionskrankheiten (Höllerhage, 2019; Fahn, 2003). Auch Umweltgifte wie die Pestizide Paraquat und Rotenon können eine sekundäre Parkinson-Symptomatik verursachen (Jenner, 2001). Beide Substanzen inhibieren den mitochondrialen Komplex I der Atmungskette, führen zu oxidativem Stress und sind potenziell neurotoxisch (Jenner, 2001; Betarbet et al., 2002; Di Monte et al., 2002). Das wohl bekannteste Toxin, das als Nebenprodukt bei der Herstellung von synthetischem Heroin entsteht (Javitch et al., 1985) und zu einer Parkinson-Symptomatik führt, ist 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) bzw. sein Metabolit 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) (Langston et al., 1983; Langston et al., 1984) (siehe Abschnitt 2.4.1).

#### 2.1.2.4 Idiopathisches Parkinson-Syndrom

Das idiopathische Parkinson-Syndrom, auch als Parkinsonsche Krankheit oder Morbus Parkinson bezeichnet, macht 90 % der Parkinson-Fälle aus. Seine Ätiologie bis heute nicht aufgeklärt; vermutlich ist sie multifaktoriell bedingt und resultiert aus einer Kombination von genetischer Veranlagung, Umwelteinflüssen und Gen-Umwelt-Interaktionen (Bloem et al., 2021; Kalia und Lang, 2015; Noyce et al., 2012). Der größte Risikofaktor ist das Alter, da mit zunehmendem Alter die Parkinson-Prävalenz steigt (Marras et al., 2018; Simon et al., 2020; Ascherio und Schwarzschild, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass im Alter vermehrt molekulare Schäden auftreten, die unter anderem die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigen und damit den Krankheitsausbruch beeinflussen können (Bender et al., 2006). Pathognomonisch ist das Vorhandensein von  $\alpha$ -Synuclein in Lewy-Körperchen (Spillantini et al., 1997) (siehe Abschnitt 2.1.8.1). Im Folgenden bezieht sich die Erwähnung der Parkinsonschen Krankheit in dieser Arbeit auf diese idiopathische Form.

### 2.1.3 Symptome und Verlauf

Aufgrund des Verlusts dopaminergener Neurone in der *SNpc* kommt es bei der Parkinsonschen Krankheit zu verminderten Dopaminspiegeln im nigrostriatalen Signalweg (Cheng et al., 2010). Dies führt zu einer motorischen Dysfunktion mit den Kardinalsymptomen Zittern (Tremor), Muskelsteifigkeit (Rigor) und einer verlangsamten Bewegung (Bradykinesie) (Fahn, 2003). Da neben der *SNpc* auch weitere Gehirnbereiche bzw. Neuronenpopulationen und Neurotransmitter betroffen sind (Braak et al., 2003), treten auch nichtmotorische Symptome wie neuropsychiatrische Stigmata, Schlafstörungen und autonome Dysfunktionen auf (Sauerbier et al., 2016; Chaudhuri et al., 2006; Todorova et al., 2014).

Der Verlust dopaminergener Neurone der *SNpc* ist durch einen schleichenden Krankheitsbeginn gekennzeichnet. Zunächst treten meist einseitige körperliche Symptome auf, die sich im Laufe der Zeit auf beide Seiten ausweiten (Fahn, 2003). Der Tremor äußert sich in Form eines regelmäßigen, unwillkürlich auftretenden Ruhetremors (Gelb et al., 1999), der z. B. beim Pillendrehen beobachtet werden kann. Unter Rigor ist der erhöhte Widerstand gegenüber der passiven Bewegung der Extremitäten eines Patienten zu verstehen. Die Bradykinesie ist eine Verlangsamung der Willkürmotorik und äußert sich in einer verminderten Bewegungsamplitude, beispielsweise durch einen verlangsamten und verminderten Ausschlag der Armbewegung sowie Kleinschrittigkeit (Fahn, 2003; Postuma et al., 2015). Hypomimie, also eine verminderte Mimik und eine leisere Stimme, sind ebenfalls typische Symptome (Fahn, 2003). In späteren Stadien kann eine posturale Instabilität auftreten (Postuma et al., 2015). Das bedeutet, dass aufgrund des Ausfalls von Gleichgewichtsreflexen die Fähigkeit verloren geht, den Körper während der Bewegung auszubalancieren. Auch die Stabilität bei aufrechter Körperhaltung geht verloren, die Patienten weisen eine gebeugte Rumpfhaltung auf. Mit Einsetzen der motorischen Symptome sind schätzungsweise bereits 60-70% der dopaminergen Neurone in der *SNpc* abgestorben (Fearnley und Lees, 1991).

Die nichtmotorischen Symptome treten als Prodromi häufig teilweise schon Jahre vor den motorischen Symptomen auf. Sie umfassen ein vielschichtiges Bild mit neuropsychiatrischen Symptomen wie Depressionen, Halluzinationen und Demenz, autonomer Dysfunktion wie orthostatischer Hypotonie, Blasenfunktionsstörungen sowie Obstipation, Schlafstörungen und weiteren Symptomen (Sauerbier et al., 2016; Chaudhuri et al., 2006; Todorova et al., 2014; Schapira et al., 2017). Gemäß der Hypothese und Einteilung von Braak et al. breitet sich die Parkinson-Pathologie mit den Lewy-Körperchen aller beteiligten Neuronenpopulationen in sechs 6 Stufen aus, beginnend mit Stadium 1, das durch Hyposmie gekennzeichnet ist, d.h. Riechstörungen aufgrund einer Degeneration des Riechkolbens (Braak et al., 2003). Tatsächlich ist die Hyposmie eines der ersten nichtmotorischen Symptome (Schapira et al., 2017). Die nichtmotorischen Symptome kennzeichnen aber auch insbesondere das klinische Bild der

fortgeschrittenen Parkinsonschen Krankheit und können zu einer verminderten Lebensqualität und Lebenserwartung führen (Chaudhuri et al., 2006).

#### 2.1.4 Diagnostik und Therapie

Die Diagnose der Parkinsonschen Krankheit ist in erster Linie durch Anamnese und körperliche Untersuchung klinisch begründet und basiert auf den motorischen Merkmalen sowie dem Ausschluss anderer Erkrankungen (Fahn, 2003; Armstrong und Okun, 2020). Die aktuellen diagnostischen Kriterien der Arbeitsgruppe Movement Disorder Society (MDS) definieren die Parkinsonsche Krankheit als das Vorliegen einer Bradykinesie kombiniert mit Ruhetremor, Rigor oder beidem (Postuma et al., 2015). Insbesondere differenzialdiagnostisch können zum Ausschluss ischämischer, entzündlicher oder raumfordernder Prozesse bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt werden (Armstrong und Okun, 2020; Balestrino und Schapira, 2020).

Die Therapie bei der Parkinsonschen Krankheit ist rein symptomatisch und basiert aufgrund des progredienten Untergangs dopaminerger Neurone insbesondere auf dem Ausgleich des Dopaminmangels. Die Behandlung beruht vor allem auf der pharmakologischen Substitution von Levodopa (L-Dopa) (Hornykiewicz, 2017), einer Aminosäurevorstufe von Dopamin. L-Dopa dient der Kontrolle der motorischen Defizite und ist seit Jahrzehnten bis heute das Erstlinienmedikament (Hornykiewicz, 2017; Fahn, 2015; Bloem et al., 2021). Ergänzend zu L-Dopa wird häufig der Decarboxylasehemmer Carbidopa verabreicht (Pahwa et al., 2014; Hauser et al., 2013). Dieser verhindert die periphere Umwandlung von L-Dopa in nicht Blut-Hirn-Schranken-gängiges Dopamin. L-Dopa/Carbidopa haben das beste Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil (Jankovic und Tan, 2020). Allerdings verhindern sie unabhängig vom Therapiebeginn nicht die Krankheitsprogredienz (Verschuur et al., 2019). Darüber hinaus lässt die Wirkung mit der Zeit nach (Nagatsua und Sawadab, 2009; Fahn, 2015). Nach etwa 4-6 Jahren weisen schätzungsweise 40-60% der Patienten unter L-Dopa-Therapie ernsthafte Nebenwirkungen auf, darunter Dyskinesien, das heißt unwillkürliche, unkontrollierbare Bewegungen wie Grimassieren oder Schmatzen sowie einem Nachlassen der Medikamentenwirkung zwischen den einzelnen Einnahmen („wearing-off“) (Fahn, 2003; Ahlskog und Muentert, 2001). Das Portfolio der pharmakologischen Therapie umfasst neben L-Dopa/Carbidopa auch Dopaminagonisten, Monoaminoxidase-B-Hemmer (MAO-B-Hemmer) und Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer (COMT-Hemmer) (Espay et al., 2018). Die beiden letztgenannten hemmen den enzymatischen Abbau von Dopamin und verlängern somit dessen Wirkung im synaptischen Spalt (Armstrong und Okun, 2020). Sie werden als Zusatztherapie oder insbesondere bei den bereits erwähnten Nebenwirkungen unter L-Dopa-Therapie eingesetzt (Fox

et al., 2018). Keines der verfügbaren Medikamente ist in der Lage, den Krankheitsverlauf zu verzögern oder zu verhindern (Fox et al., 2018). Wenn trotz einer Dosissteigerung und/oder Medikamentenanpassung keine Besserung der Symptome erreicht wird, kann eine tiefe Hirnstimulation in Erwägung gezogen werden (Deuschl et al., 2022). Die tiefe Hirnstimulation ist ein invasives Verfahren, das auf der elektrischen Stimulation von Kerngebieten der Basalganglien beruht.

Neben der Behandlung der Symptome, die auf der Degeneration der dopaminergen Neurone der *SNpc* beruhen, müssen auch die nichtsymptomatischen Symptome diagnostiziert und behandelt werden, dies ist jedoch häufig nur unzureichend der Fall (Chaudhuri et al., 2006). Dabei kennzeichnen diese insbesondere die fortgeschrittene Parkinsonsche Krankheit und lassen sich mit geeigneten Maßnahmen wie beispielsweise Laxantien und Antidepressiva bei Obstipation und Schlafstörungen behandeln (Chaudhuri et al., 2006). Polypharmazie, die aufgrund der vielfältigen Symptome mit der häufigen Verschreibung anticholinergischer Medikamente einhergeht, kann wiederum zu schweren Komplikationen führen (Lertxundi et al., 2015).

#### 2.1.5 Charakteristische Eigenschaften dopaminergischer Neurone der *SNpc* und Veränderungen bei der Parkinsonschen Krankheit

Wie bereits erwähnt, sind bei der Parkinsonschen Krankheit hauptsächlich die dopaminergen Neurone in der *SNpc* betroffen. Diese Neurone synthetisieren charakteristischerweise Dopamin und setzen diesen Neurotransmitter frei. Die relativ großen Neurone haben nicht-myelinisierte, lange und stark verzweigte Axondorne, die zu Hunderttausenden und damit einer im Vergleich zu anderen Neuronenpopulationen deutlich erhöhten Anzahl Synapsen führen (Bolam und Pissadaki, 2012; Matsuda et al., 2009). Daraus resultiert ein hoher Energiebedarf (Pacelli et al., 2015). Um diesen Bedarf zu decken, ist eine kontinuierliche Stimulation der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) erforderlich (Bolam und Pissadaki, 2012). Allerdings geht eine solche Stimulation mit dem Preis erhöhter ROS-Spiegel einher, was das Risiko für oxidativen Stress und Schäden in den dopaminergen Neuronen der *SNpc* erhöht (Bolam und Pissadaki, 2012). Pacelli et al. haben herausgefunden, dass dopaminerge Neurone der *SNpc* bereits im basalen bzw. physiologischen Zustand energetisch an der Grenze ihrer Kapazitäten arbeiten (Pacelli et al., 2015). Dabei scheint auch die ausgeprägte Länge der Axondorne eine Rolle zu spielen, es konnte gezeigt werden, dass verkürzte Axondorne die Anfälligkeit für oxidativen Stress vermindern (Pacelli et al., 2015).

Zur Synthese des Neurotransmitters Dopamin aus der Aminosäure Tyrosin wird zunächst L-Tyrosin unter Katalyse des Enzyms Tyrosinhydroxylase zu L-Dopa umgewandelt (Nagatsu et al., 1964). Anschließend erfolgt die Umwandlung von L-Dopa zu Dopamin durch die Dopa-

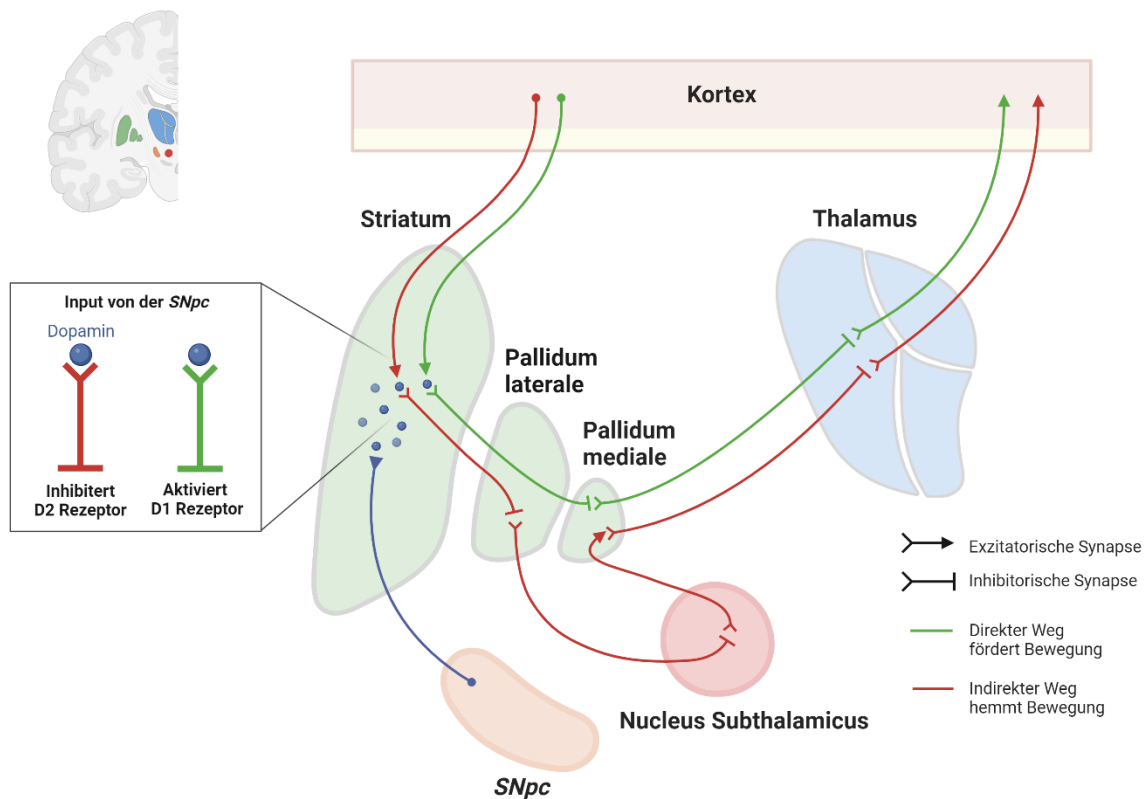
Decarboxylase (Juárez Olgúin et al., 2016). Durch Vermittlung des vesikulären Monoamintransporters 2 (VMAT2) wird Dopamin in Vesikeln gespeichert (Eiden, 2000; Yaffe et al., 2018), zur präsynaptischen Endigung transportiert und bei Auslösung eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt freigesetzt, wo es an postsynaptische Rezeptoren bindet (Brichta et al., 2013). Die Entfernung von Dopamin aus dem synaptischen Spalt erfolgt entweder durch enzymatischen Abbau durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase (MAO) oder durch Wiederaufnahme durch das präsynaptische Neuron über den Dopamintransporter (DAT) (Juárez Olgúin et al., 2016; Mulvihill, 2019). Wenn Dopamin nicht ordnungsgemäß in Vesikeln verpackt wird und zytosolisch erhöht vorliegt, kann es aufgrund der spontanen Autooxidation in Gegenwart von Eisen zur Bildung hochreaktiver Dopamin-Chinon-Spezies und ROS wie dem Superoxidationion ( $O_2^{\cdot-}$ ) sowie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) kommen (Lotharius und Brundin, 2002).

Es wird angenommen, dass die charakteristische Schwarzfärbung und Grund für die Namensgebung der nigralen Neurone auch durch die Oxidation von Katecholaminen, insbesondere durch Dopamin in Gegenwart von Eisen, entsteht (Double et al., 2002; Nagatsu et al., 2022). Neben der ROS-Produktion durch Autooxidation von Dopamin ist daher auch der Eisengehalt in den dopaminergen Neuronen von Relevanz. Die Eisenhomöostase in neuronalen Netzwerken wird durch Mikroglia und Astrozyten reguliert. Durch aktivierte Mikroglia und die anschließende Produktion von proinflammatorischen Zytokinen kann es zu einem Anstieg der Eisenablagerung im Zentralnervensystem kommen (Dong-Chen et al., 2023). Dies konnte in den Neuronen der *SNpc* bei Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Dexter et al., 1989b; Riederer et al., 1989; Double et al., 2000). Erhöhte Eisenspiegel sind wiederum mit der Entstehung von ROS verbunden: An Ferritin gebundenes Eisen in Form von  $Fe^{3+}$  ist chemisch inaktiv, in ungebundener Form als  $Fe^{2+}$  jedoch aktiv, und kann sich in der Fenton-Reaktion mit  $H_2O_2$  verbinden, um das reaktive Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ) zu erzeugen (Double et al., 2000). Dopaminerge Neurone der *SNpc* unterliegen also hohen metabolischen Anforderungen, gleichzeitig sind sie einer vermehrten ROS-Produktion durch erhöhte OXPHOS, den Dopaminstoffwechsel und durch Mikrogliaaktivität im Rahmen der Neuroinflammation (siehe Abschnitt 2.1.8.2) erhöhten Eisenablagerungen ausgesetzt.

### 2.1.6 Neurophysiologie und Neuropathophysiologie

Für die Planung und Steuerung von Körperhaltung, Rumpfstabilität und größeren Bewegungsabläufen bedarf es komplexer Kontrollmechanismen. Diese werden unter anderem durch das Extrapyramidalmotorische System (EPMS) mittels motorischer Bahnen, die zum Rückenmark führen, vermittelt. Die zuständigen Kerngebiete befinden sich unter anderem in den

subkortikal gelegenen sog. *Nuclei basales* (Basalganglien). Die Basalganglien regulieren die koordinierte und ausgewogene Aktivierung der proximalen Rumpf- und Extremitätenmuskulatur, um die Körperhaltung zu stabilisieren und Bewegungsabläufe durchzuführen. Sie bestehen morphologisch aus verschiedenen Anteilen und sind in komplexen Regelschleifen miteinander verbunden. Bei der Parkinsonschen Krankheit treten funktionelle Störungen innerhalb dieses Regelkreislafs auf.



**Abbildung 1: Basalganglienschleife**

**Direkter Weg:** Unter physiologischen Bedingungen aktivieren dopaminerge Neurone der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) die D1-Rezeptoren hemmender GABAerger Neurone des Striatums. Diese Neurone projizieren inhibitorische Signale ins Pallidum mediale, welches wiederum inhibitorisch in den Thalamus projiziert. Die Disinhibition durch Hintereinanderschalten von zwei hemmenden Neuronen führt zu einer Weiterleitung von motorikfördernden Signalen über den Thalamus, der den motorischen Kortex aktiviert. Über den „indirekten Weg“ hemmen dopaminerge Neurone der SNpc die D2-Rezeptoren GABAerger Neurone im Striatum und projizieren ins Pallidum laterale, Teil einer motorikmodulierenden Nebenschleife. Dieses sendet wiederum inhibitorische GABAerge Signale an den *Nucleus Subthalamicus*, den motorikfördernden Teil des Pallidums. Der *Nucleus Subthalamicus* erregt wiederum GABAerge Neurone im medialen Pallidumsegment, und es kommt zur Motorikhemmung. Erstellt mit BioRender.com

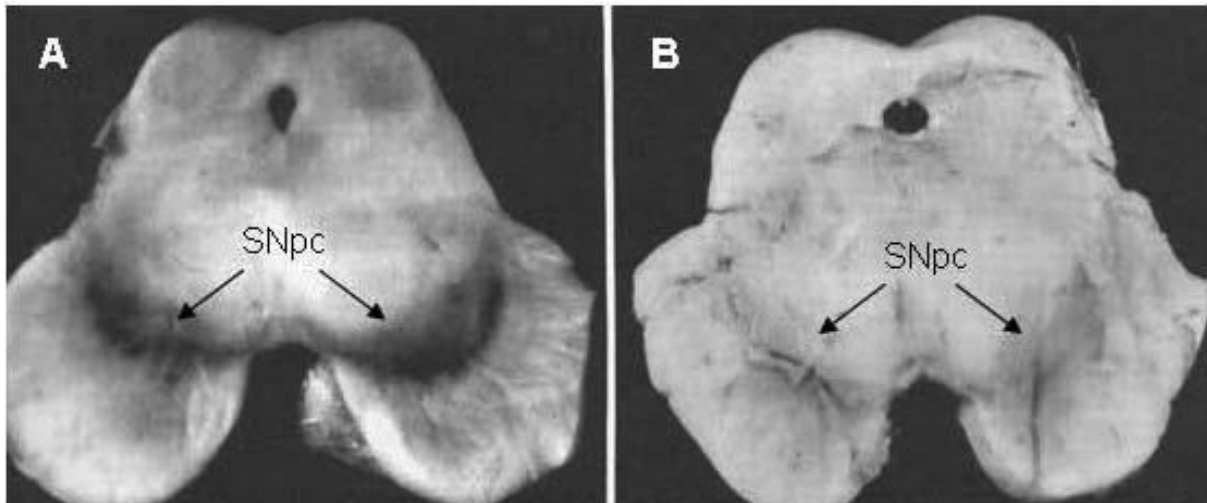
Der Haupteingang der Basalganglienschleife ist das Striatum, welches aus dem *Nucleus caudatus* und dem Putamen besteht. Im Striatum wird der Bewegungsantrieb aus der Großhirnrinde (Kortex) verarbeitet (siehe Abbildung 1). Der Hauptaussgang ist das mediale Pallidumsegment.

Teile der motorik-modulierenden Nebenschleifen sind das laterale Pallidumsegment und der *Nucleus Subthalamicus*. Die *Substantia nigra (SN)* beheimatet die dopaminerge *pars compacta* und die GABAerge *pars reticularis*. Letztere ist wie das mediale Pallidumsegment Teil des Ausgangs der Basalganglienschleife. Unter physiologischen Bedingungen aktivieren die dopaminergen Neurone der *SNpc* über den „direkten Weg“ die GABAergen Neurone des Striatums. Dem medialen Pallidumsegment wird eine motorikhemmende Funktion zugesprochen. Durch die hemmende Projektion des Striatums auf dieses wiederum hemmende Segment kommt es zu einer Disinhibition, wodurch die motorikfördernden Impulse im Thalamus überwiegen. Über den „indirekten Weg“ hemmen dopaminerge Neurone die hemmenden Neurone des Striatums, die ins laterale Pallidumsegment projizieren, welches Teil einer motorikmodulierenden Nebenschleife ist. Diese sendet wiederum inhibitorische Signale an den *Nucleus Subthalamicus*, den motorikfördernden Teil des Pallidums. Der *Nucleus Subthalamicus* erregt wiederum hemmende GABAerge Neurone im medialen Pallidumsegment. Die Hemmung des motorikfördernden Teils wirkt somit motorikhemmend.

Bei der Parkinsonschen Krankheit führt der Verlust dopaminergener Neurone zu einer Abnahme des inhibitorischen Neurotransmitters Dopamin in der *SNpc*. Dadurch wird die Wirkung auf den motorikfördernden „direkten Weg“ und den motorikhemmenden „indirekten Weg“ verringert. Dies führt zu der vorherrschenden motorischen Symptomatik mit Tremor, Bradykinesie und posturaler Instabilität.

### 2.1.7 Neuropathologie

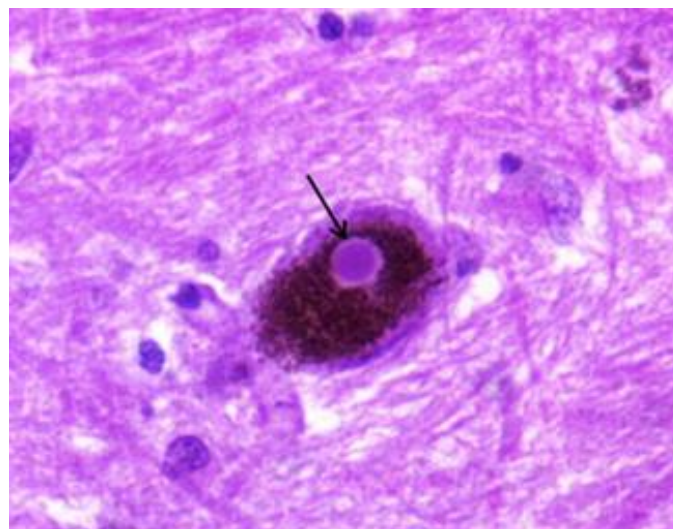
Neuropathologisch ist die Parkinsonsche Krankheit durch zwei bedeutsame Merkmale gekennzeichnet: Zum einen durch den progredienten Verlust der Neuromelanin enthaltenen dopaminergen Neurone in der *SNpc* (Nagatsu et al., 2022) (siehe Abbildung 2). Die *Substantia nigra* verdankt ihren Namen dem schwarz-bräunlichen Pigment Neuromelanin, bei dem angenommen wird, dass es durch die Oxidation von zytosolischen Katecholaminen, wie beispielsweise Dopamin entsteht (Double et al., 2002; Nagatsu et al., 2022). Der Verlust dopaminergener Neurone stellt sich bei der fortgeschrittenen Parkinsonschen Krankheit als Depigmentierung der *SNpc* dar (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Verlust dopaminerger Mittelhirnneurone in der Substantia nigra pars compacta**

Menschliche postmortale bilaterale Mittelhirnschnitte mit (A) neuromelaninhaltigen dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) und (B) deutlichem Verlust der dopaminergen Neurone der SNpc bei einem Parkinson-Patienten (Lima et al., 2012)

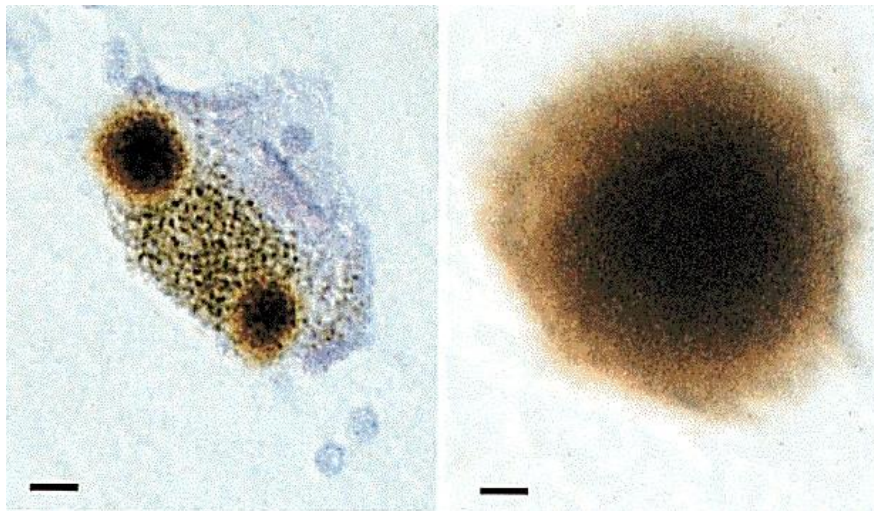
Ein weiteres histopathologisches Merkmal bei Parkinson-Patienten sind die Lewy-Körperchen. Diese wurden erstmals 1912 vom Pathologen Friedrich Heinrich Lewy beschrieben und befinden sich im dorsalen Vagus Kern und im *Nucleus basalis von Meynert* (Forno, 1996; Wakabayashi et al., 2013). Das Vorhandensein von Lewy-Körperchen in der *Substantia nigra* wurde von dem Neuropathologen Tretiakoff bestätigt, der sie nach dem Erstbeschreiber als Lewy-Körperchen benannte (Wakabayashi et al., 2013). Klassischerweise sind Lewy-Körperchen in den verbleibenden, nicht degenerierten Neuronen als eosinophile, proteinreiche intrazytoplasmatische Einschlüsse in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung mikroskopisch erkennbar (Taipa et al., 2012) (siehe Abbildung 3). Sie sind kugelig oder länglich geformt und weisen einen dichten Kern mit peripherem Lichthof auf (Taipa et al., 2012).



**Abbildung 3: Lewy-Körperchen in der Substantia nigra**

Rundes, konzentrisches Lewy-Körperchen in einem Neuron der *Substantia nigra* mit peripherem Lichthof. Die Abbildung zeigt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung. 400-fache Vergrößerung (Taipa et al., 2012)

Der Proteingehalt der Lewy-Körperchen wird hauptsächlich durch  $\alpha$ -Synuclein bestimmt (Spillantini et al., 1997) (siehe Abbildung 4). Daneben sind auch Ubiquitin (Takahashi und Wakabayashi, 2001; Alexander, 2004) und Parkin (Alexander, 2004) nachweisbar. Alpha-Synuclein ist ein neuronales Protein, das bei gesunden Menschen in den präsynaptischen Endigungen lokalisiert ist (Maroteaux et al., 1988; Jakes et al., 1994) und pathologisch fehlgefaltet und aggregiert in den Lewy-Körperchen vorliegt (Mehra et al., 2019).



**Abbildung 4: Lewy-Körperchen in der Substantia nigra mit  $\alpha$ -Synuclein**

(Links) Ein pigmentiertes Neuron enthält zwei  $\alpha$ -Synuclein-positive Lewy-Körperchen. Maßstabsbalken = 8  $\mu$ m. (Rechts) Ein  $\alpha$ -Synuclein-positives, extrazelluläres Lewy-Körperchen. Maßstabsbalken = 4  $\mu$ m, (Links und Rechts) Immunfärbung für  $\alpha$ -Synuclein (Spillantini et al., 1997)

Lewy-Körperchen wurden nicht nur bei der Parkinsonschen Krankheit, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Lewy-Body Demenz oder der Alzheimer Krankheit nachgewiesen (Spillantini et al., 1997; Hamilton, 2000; Jellinger, 2018). Post mortale Analysen von Gehirnen von Parkinson-Patienten haben darüber hinaus gezeigt, dass Lewy-Körperchen nicht nur in den Neuronen der *Substantia nigra*, sondern auch in anderen Gehirnregionen, wie beispielsweise dem *Locus coeruleus*, einem pigmentierten, neuromelaninhaltigen Kern des Hirnstamms, in den cholinerg projizierenden Neuronen des *Nucleus basalis von Meynert* und im Hypothalamus, vorliegen (Ohama und Ikuta, 1976; Hartog Jager und Bethlem, 1960; Takahashi und Wakabayashi, 2001).

Neben den dopaminergen Neuronen der *SNpc* sind bei der Parkinsonschen Krankheit weitere Neurone im zentralen, sympathischen und parasymphatischen Nervensystem von der Degeneration und dem Verlust der jeweiligen Neurotransmitter wie z.B. Acetylcholin, Glutamat, Adrenalin und Noradrenalin betroffen (Alexander, 2004). Dies erklärt auch die nichtmotorischen

Symptome, die neben den motorischen Defiziten bei der Parkinsonschen Krankheit auftreten. Ein Verlust von Acetylcholin in bestimmten Gehirnregionen kann zu verschiedenen Symptomen führen. Zum Beispiel kann der Verlust von Acetylcholin im *Nucleus basalis* zur Demenz führen (Gibb, 1989; Alexander, 2004) und der Verlust von Acetylcholin im vorderen Riechkern zur Hyposmie (Hawkes et al., 1997; Alexander, 2004).

### 2.1.8 Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit

Obwohl die Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit nicht vollständig geklärt ist, geht man davon aus, dass multifaktorielle molekulare Mechanismen in den Zellen des nigrostriatalen Systems zugrunde liegen. Dazu gehören unter anderem die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und Neuroinflammation. Es wird angenommen, dass Mitochondrien durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Akkumulation mitochondrialer DNA-Mutationen zum Altern beitragen (Lin und Beal, 2006). Da Neurone nicht teilungsfähig sind, aber nicht alle Neurone der Neurodegeneration unterliegen, deutet dies darauf hin, dass die dopaminergen Neurone der *SNpc* aufgrund spezifischer Merkmale (siehe Abschnitt 2.1.5) besonders anfällig sind oder dass eine Kombination mehrerer Mechanismen für die Pathogenese verantwortlich sein könnte.

#### 2.1.8.1 Die Rolle von $\alpha$ -Synuclein

Das kleine Protein  $\alpha$ -Synuclein ist hauptsächlich in präsynaptischen Nervenendigungen lokalisiert (Maroteaux et al., 1988; Jakes et al., 1994). Seine Funktion ist noch nicht vollständig geklärt (Burré, 2015), es wird jedoch angenommen, dass es regulatorischen Einfluss an der neuronalen Synapse auf die Neurotransmitterfreisetzung, den Dopaminspiegel sowie die Anzahl und den Transport synaptischer Vesikel nimmt (Burré et al., 2010; Burré, 2015; Bridi und Hirth, 2018). Zusätzlich ist  $\alpha$ -Synuclein mitochondrial lokalisiert (Li et al., 2007) und interagiert mit der ATP-Synthase (Ludtmann et al., 2016). Da  $\alpha$ -Synuclein der Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen sowohl bei der idiopathischen als auch bei der familiären Parkinson-Form ist (Spillantini et al., 1997; Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003), stellt es ein wichtiges pathogenes Merkmal dar (Mehra et al., 2019). Physiologisch liegt  $\alpha$ -Synuclein in einem Gleichgewicht von Mono-, Di- und Tetrameren vor (Calabresi et al., 2023). Im Gegensatz dazu kommt es bei der Parkinsonschen Krankheit zu einer Fehlfaltung und Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein. Dabei liegt es zunächst in einer löslichen präfibrillären Form, den sogenannten Oligomeren, vor (Mehra et al., 2019). Im weiteren Verlauf aggregieren die Oligomere zu unlöslichen fibrillären Aggregaten, die in Lewy-Körperchen eingeschlossen werden (Mehra et al., 2019; Calabresi et al., 2023).

Das Vorhandensein von präfibrillären Oligomeren, die als neurotoxisch gelten (Winner et al., 2011), kann die zelluläre Homöostase auf verschiedene Weise beeinflussen und insbesondere die Mitochondrien auf verschiedene Weise schädigen. Die pathologischen  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate beeinträchtigen die Aktivität von Komplex I (Devi et al., 2008; Chinta et al., 2010) und der ATP-Synthase (Ludtmann et al., 2018). Es wurde gezeigt, dass pathologisches  $\alpha$ -Synuclein die Morphologie der Mitochondrien stört, indem es mit den mitochondrialen Membranen interagiert und zu vermehrter Fragmentierung führt (Plotegher et al., 2014; Nakamura et al., 2011). Zudem führt es zu gesteigerter Mitophagie (Gao et al., 2017; Chinta et al., 2010). Des Weiteren löst pathologisches  $\alpha$ -Synuclein eine chronische Neuroinflammation aus (siehe Abschnitt 2.1.8.2).

Die Exposition von Neuronen gegenüber  $\alpha$ -Synuclein-Oligomeren führt auch zu erhöhten intrazellulären Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Spiegeln mit Folge einer vermehrten Induktion der Dopamin-Freisetzung (Ronzitti et al., 2014). Durch erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel steigt der ATP-Bedarf, um das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) aufrecht zu erhalten und es kommt zu einer veränderten Neurotransmitterfreisetzung (Calabresi et al., 2023). Erhöhtes mitochondriales  $\text{Ca}^{2+}$  und oxidative Phosphorylierung fördern wiederum die weitere  $\alpha$ -Synuclein-Aggregation (Wong et al., 2019). Der Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  in dopaminergen Neuronen in Kombination mit pathologischen  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten kann somit eine toxische Kaskade auslösen, die zur Neurodegeneration beiträgt (Calabresi et al., 2023).

Der vesikuläre Monoamintransporter 2 (VMAT2) vermittelt die Speicherung von Dopamin in Vesikeln (Yaffe et al., 2018; Eiden, 2000), welche zur Reduzierung schädlicher oxidativer Wirkungen von Dopamin-Metaboliten im Zytosol unerlässlich sind (Lotharius und Brundin, 2002). Es wird angenommen, dass  $\alpha$ -Synuclein regulatorischen Einfluss auf den VMAT2 nehmen kann (Guo et al., 2008). Mutiertes  $\alpha$ -Synuclein führte nachweislich zu verringerten VMAT2-Spiegeln (Lotharius et al., 2002). Dadurch könnte vermehrt zytosolisches, nicht in Vesikeln verpacktes Dopamin vorliegen. Zytosolisches Dopamin neigt zur Autooxidation, welche mit der Entstehung von ROS verbunden ist (Lotharius und Brundin, 2002).

Von Bedeutung ist auch die Degradation von  $\alpha$ -Synuclein in Neuronen. Hierfür sind unter anderem die zwei intrazellulären proteolytischen Systeme Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und der Autophagie-Lysosomen-Signalweg (ALP) verantwortlich (Xilouri et al., 2013). Mit zunehmendem Alter kommt es einerseits zum Rückgang der Aktivität des UPS und des APL. Dadurch kann es aufgrund eines beeinträchtigten Abbaus zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein kommen (Xilouri et al., 2013). Andererseits fördert eine erhöhte  $\alpha$ -Synuclein-Belastung die Inhibition vom Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Devi et al., 2008; Chinta et al., 2010). Dadurch kommt es zu erhöhten Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Entstehung von oxidativem Stress, der wiederum die Funktion des UPS oder ALP beeinträchtigen

könnte (Gu et al., 2005). Der hierdurch entstehende Teufelskreis aus oxidativer Zellschädigung und toxischer  $\alpha$ -Synuclein-Akkumulation könnte zur Pathogenese beitragen und zum Absterben von Neuronen führen (Xilouri et al., 2013; Gu et al., 2005). Außerdem kann es aufgrund der Fehlfaltung von  $\alpha$ -Synuclein in Folge zu einer Verhinderung des proteasomalen Abbaus kommen (McNaught und Olanow, 2003).

#### 2.1.8.2 Neuroinflammation

Ein weiteres wesentliches Merkmal der Parkinsonschen Krankheit ist die chronische Neuroinflammation (Wang et al., 2015). Die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein spielt hierbei eine tragende Rolle, das sie zur Aktivierung von Mikroglia, einer Zellpopulation mit wichtiger immunologischer Funktion, führt (Ferreira und Romero-Ramos, 2018; Nimmerjahn et al., 2005). Mikroglia untersuchen ihre Mikroumgebung (Nimmerjahn et al., 2005) und können sehr empfindlich Veränderungen, wie Zelltrümmer, oxidierte Lipoproteine und pathogene Erreger wahrnehmen und darauf reagieren (Husemann et al., 2002). Eine durch  $\alpha$ -Synuclein induzierte Aktivierung von Mikroglia führt zu einer Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), welche neurotoxisch wirken (Hirsch und Hunot, 2009; Glass et al., 2010; Zhang et al., 2005). Untersuchungen im Liquor und Serum von Parkinson-Patienten belegen dies, hier wurden erhöhte Zytokinspiegel von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 gefunden, was auf eine  $\alpha$ -Synuclein-vermittelte Mikroglia-Aktivierung schließen lässt (Karpenko et al., 2018). Die mikrogliale Aktivierung führt zu einer gesteigerten ROS-Produktion (Zhang et al., 2005). Zudem führen von Mikroglia freigesetzte pro-inflammatorische Mediatoren zur Aktivierung von Astrozyten, welche inflammatorische Signale weiter verstärken (Wang et al., 2015). Auch das adaptive Immunsystem scheint bei der Neurodegeneration der Parkinsonschen Krankheit beteiligt zu sein, da beobachtet wurde, dass T-Zellen in die *SNpc* eindringen und zur Neurodegeneration beitragen (Brochard et al., 2009). Eine akute und kurzfristige Aktivierung von Immunzellen wirkt neuroprotektiv und ist notwendig, um die Beseitigung von Zelltrümmern und pathogenen Erregern anzuregen (Jankovic und Tan, 2020). Eine unkontrollierte Neuroinflammation jedoch, die durch die chronische Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten durch  $\alpha$ -Synuclein stimuliert wird, führt zu erhöhten ROS-Spiegeln und kann zur verstärkten Neurodegeneration in der *SNpc* beitragen (Glass et al., 2010; Rocha et al., 2018).

#### 2.1.8.3 Mitochondriale Dysfunktion

Mitochondriale Dysfunktion ist ein weiteres Ereignis in der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit. Hier verursachen zum einen Mutationen in Genen, die unter anderem für die Proteine Parkin, PINK1 und DJ-1 kodieren, früh einsetzende Parkinson-Formen (Beilina und Cookson,

2016; Singleton et al., 2013) (siehe Abschnitt 2.1.2.1). Da diese Proteine an der Aufrechterhaltung der physiologischen Mitochondrienfunktion beteiligt sind (Singleton et al., 2013), resultiert aufgrund der Mutationen ein Funktionsverlust mit mitochondrialer Dysfunktion.

Zum anderen liegen Defekte in der mitochondrialen Atmungskette vor. Einer der ersten Belege dafür war die signifikante Reduktion des Komplex I in der *SNpc* bei post mortem Analysen von Parkinson-Patienten (Schapira et al., 1990), die später auch von anderen Autoren bestätigt wurde (Franco-Iborra et al., 2018; Prasertsuksri et al., 2023). Keeney et al. fanden heraus, dass in Gehirnen von Parkinson-Patienten katalytische Untereinheiten des Komplex I oxidiert vorlagen, was mit einer fehlerhaften Assemblierung von Komplex I korreliert (Keeney et al., 2006). Eine gestörte Assemblierung von Komplex I führt zu einem vermehrten Elektronenaustritt und damit zu erhöhten ROS-Spiegeln (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988), was das Risiko für die Entstehung von oxidativem Stress erhöht (Drechsel und Patel, 2008) (siehe Abschnitt 2.1.8.4). Dies könnte den beobachteten Anstieg der oxidativen Schädigung mitochondrialer Proteine erklären (Navarro et al., 2009). Sowohl ältere Menschen als auch Parkinson-Patienten weisen in den dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* einen erhöhten Anteil an somatischen Deletionen mitochondrialer DNA auf, die aufgrund von oxidativem Stress auftreten könnten (Bender et al., 2006). Folglich kann es zu fehlerhafter Proteinsynthese und/oder -Assemblierung kommen, was beispielsweise zu einem dysfunktionalen Komplex I führt (Bender et al., 2006). Letztlich besteht ein Teufelskreis. In dopaminergen Neuronen im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust der mitochondrialen Komplex I Funktion (ausgelöst durch Depletion einer katalytischen Kernuntereinheit des Komplex I) ausreicht, um eine fortschreitende menschenähnliche und auf Levodopa ansprechende Parkinson-Symptomatik auszulösen (González-Rodríguez et al., 2021).

Diese Beobachtungen unterstreichen, dass dopaminerge Neurone der *SNpc* besonders empfindlich auf mitochondriale Dysfunktion reagieren. Es bleibt jedoch die Frage, warum gerade diese Neurone so selektiv anfällig für mitochondriale Dysfunktion sind. Möglicherweise ist dies auf ihre im Vergleich zu anderen Neuronenpopulationen besonderen metabolischen Anforderungen zurückzuführen (siehe Abschnitt 2.1.5), aus denen resultiert, dass sie bereits in physiologischem Zustand energetisch an der Grenze ihrer Kapazitäten arbeiten (Pacelli et al., 2015). Die erhöhte ROS-Bildung, die mit der hohen OXPHOS-Aktivität einhergeht, verbunden mit einer erhöhten ROS-Produktion durch den Dopaminstoffwechsel und den erhöhten Eisenwerten in dopaminergen Neuronen könnte die Anfälligkeit für oxidativen Stress und die daraus resultierende mitochondriale Dysfunktion erklären (Chinta und Andersen, 2008). Die Kombination aus erhöhter ROS-Produktion und geringer Reservekapazität kann mitochondriale Dysfunktion begünstigen und es den Neuronen erschweren, verschiedene zelluläre Belastungen,

die mit Umwelt-, genetischen Faktoren oder zunehmendem Alter einhergehen, abzupuffern (Bolam und Pissadaki, 2012).

#### 2.1.8.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht durch eine gesteigerte Produktion und/oder unzureichende Beseitigung von prooxidativen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch antioxidative Mechanismen (Sanders und Timothy Greenamyre, 2013). Die bisherigen Ausführungen zeigen, dass die Entstehung von oxidativem Stress bei der Parkinsonschen Krankheit multifaktoriell bedingt ist. Einerseits verursachen  $\alpha$ -Synuclein-Oligomere durch die Aktivierung von Mikrogliazellen mit chronischer Neuroinflammation oxidativen Stress (Zhang et al., 2005). Andererseits führen auch dysfunktionale proteolytische Systeme zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein (Xilouri et al., 2013) und damit zu einem Anstieg von ROS. Eine weitere Ursache für oxidativen Stress ist die vermehrte Ansammlung von intrazellulärem Eisen, das bei post mortem Untersuchungen der Basalganglien von Parkinson-Patienten nachgewiesen wurde (Jellinger et al., 1992; Sofic et al., 1988; Dexter et al., 1989b) (siehe Abschnitt 2.1.5). Auch nicht-vesikulär verpacktes Dopamin im Zytosol kann schnell ROS bilden. Erst durch die vesikuläre Speicherung wird es unschädlich gemacht (Lotharius und Brundin, 2002) (siehe Abschnitt 2.1.5).

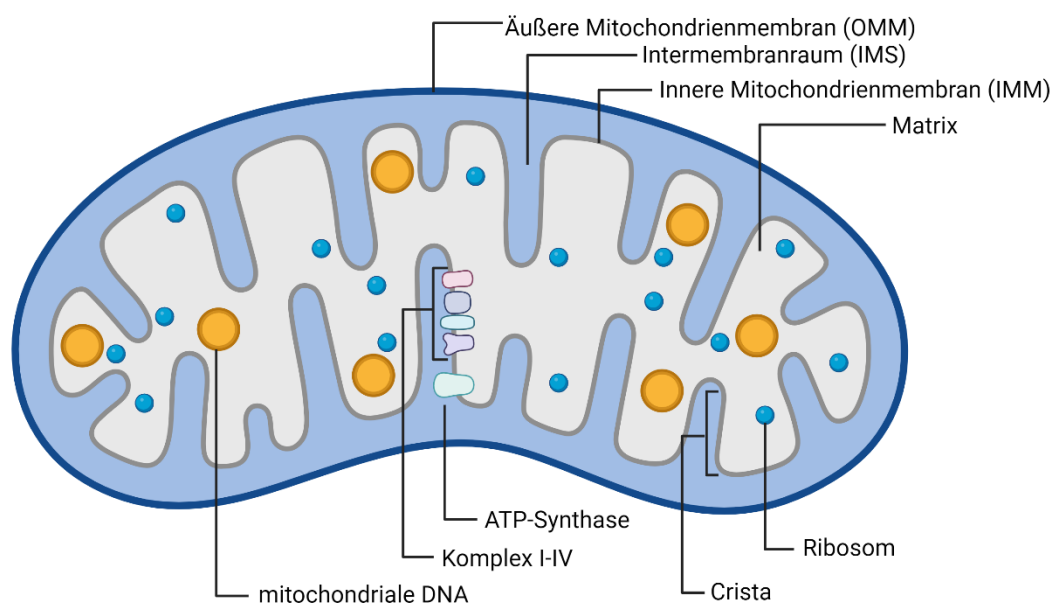
Zudem sind Mitochondrien sowohl empfindlich für ROS als auch eine Quelle von ROS (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Bei vermehrter Produktion oder unzureichender Elimination können ROS die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigen, indem sie sowohl die DNA als auch Lipide schädigen: Postmortale Analysen der *SNpc* haben einen deutlichen Anstieg oxidierten Produkte von Lipiden sowie mitochondrialer DNA-Mutationen nachgewiesen (Dexter et al., 1989a; Bender et al., 2006). Die Lipidperoxidation bzw. Oxidation von Fettsäuren führt zu einer Beeinträchtigung der Zellmembran (Sanders und Timothy Greenamyre, 2013). Schäden an der mitochondrialen DNA gehen mit einer verminderten Synthese mitochondrial kodierter Proteine, wie beispielsweise für die Komplexe der Atmungskette einher, was zu einer verminderten Atmung führt (Bender et al., 2006). Darüber hinaus wurden auf zellulärer Ebene bei Parkinson-Patienten auch Schäden an zytoplasmatischer DNA und RNA nachgewiesen (Zhang et al., 1999). Dies könnte ebenfalls zu einer beeinträchtigten Proteinsynthese führen (Zhang et al., 1999). Im Gegenzug dazu wurde festgestellt, dass der Gehalt an wichtigem antioxidativem Glutathion in der *SNpc* bei Parkinson-Patienten vermindert ist (Sofic et al., 1992; Sian et al., 1994). Oxidativer Stress führt letztlich zu einem progredienten Rückgang der physiologischen Mitochondrien- und damit Zellfunktion.

## 2.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, deren Form und Größe je nach Zelltyp und metabolischem Zustand variieren. Ihre Bedeutung wurde lange Zeit unterschätzt, insbesondere im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen wie der Parkinsonschen Krankheit.

### 2.2.1 Morphologie der Mitochondrien

Mitochondrien bestehen aus einer Doppelmembran und gliedern sich in vier Kompartimente: die äußere mitochondriale Membran (OMM, *outer mitochondrial membrane*), die innere mitochondriale Membran (IMM, *inner mitochondrial membrane*), den dazwischenliegenden Intermembranraum (IMS, *inter membrane space*) sowie die von der IMM umschlossene Matrix (Pfanner et al., 2019) (siehe Abbildung 5).



#### Abbildung 5: Schematische Übersicht eines Mitochondriums

Abgebildet sind die äußere und innere Mitochondrienmembran, der Intermembranraum, die Matrix, die mitochondriale DNA, die Ribosomen und die Cristae, die die Komplexe I-IV und die ATP-Synthase beherbergen. Erstellt mit BioRender.com

Die glatte OMM besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die unterschiedliche Funktionen erfüllt. Zum einen dient sie als Barriere für Makromoleküle, die größer als ~5000 Dalton (Da) sind (Giacomello et al., 2020), während kleinere Moleküle und Ionen über Porine in den IMS

diffundieren können (Kühlbrandt, 2015). Größere Proteine werden über den integralen Translokase-Komplex der äußeren Membran (TOM, *translocase of outer membrane*) transportiert (Rehling et al., 2004). Andererseits schützt die OMM die Zelle vor schädlichen mitochondrialen Produkten wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Außerdem ermöglicht die OMM Interaktionen mit anderen zellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen, Peroxisomen und der Plasmamembran (Giacomello et al., 2020). Darüber hinaus beherbergt die OMM auch Proteine, die an der Fusion und Fission der Mitochondrien beteiligt sind (Giacomello et al., 2020) (siehe Abschnitt 2.2.4.2 und 2.2.4.3). Die OMM bietet aufgrund ihres strukturellen Aufbaus eine besondere Flexibilität (Pernas und Scorrano, 2016). Da die OMM für kleine Moleküle und Ionen durchlässig ist, existiert an ihr kein Membranpotential.

Die IMM ist im engeren Sinne eine Membran, da sie selbst für kleine gelöste Stoffe wie Ionen undurchlässig ist (Vogel et al., 2006). Bemerkenswert ist hier der im Vergleich zur OMM höhere Protein- und niedrigere Lipidgehalt. Die IMM weist ein Protein/Lipid-Verhältnis von ca. 3:1 auf und ist somit eine der proteinreichsten Lipid-Doppelmembranen im menschlichen Körper (Ardail et al., 1990; Simbeni et al., 1991; Horvath und Daum, 2013). Das Phospholipid Cardiolipin kommt exklusiv fast ausschließlich an der IMM vor und wird dort für die optimale Funktion mitochondrialer Enzyme sowie für die mitochondriale Fusion und Fission benötigt (Houtkooper und Vaz, 2008). Der Transport von Proteinen über die IMM wird durch die Translokasen der inneren Mitochondrienmembran TIM22 und TIM23 (TIM, *translocase of inner membrane*) vermittelt (Rehling et al., 2004). Gelöste Stoffe wie Ionen werden dabei an Trägerproteine gebunden (Vogel et al., 2006). Die IMM lässt sich in zwei Subkompartimente unterteilen: Sie weist eine innere Grenzmembran parallel zur OMM auf und besitzt Einstülpungen, sogenannte Cristae (Vogel et al., 2006). Die gewundenen Cristae vergrößern die Oberfläche um ein Vielfaches. Sie beherbergen unter anderem die Komplexe I-IV der Elektronentransportkette sowie die ATP-Synthase (Komplex V) zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) (Vogel et al., 2006; Pfanner et al., 2019). Die ATP-Synthase hat eine besondere morphologische Lokalisation an der Spitze der Cristae (Strauss et al., 2008). Die durch die Windungen der Cristae vergrößerte Oberfläche der IMM ermöglicht eine höhere Anzahl von Atmungskomplexen und damit eine vermehrte Synthese von ATP (Giacomello et al., 2020).

Die mitochondriale Matrix ist der Ort, an dem der Citratzyklus und die  $\beta$ -Oxidation stattfinden. Sie enthält auch das mitochondriale Genom in Form von zirkulärer DNA. Das mitochondriale Genom besteht aus 37 Genen und kodiert für 2 ribosomale RNAs, 22 Transfer-RNAs (Adebayo et al., 2021) und 13 Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Annesley und Fisher, 2019). Diese werden an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert, die sich in der Matrix befinden. Der Großteil der mitochondrialen Proteine (>1000) wird jedoch von nukleären Genen kodiert, an zytosolischen

Ribosomen synthetisiert und dann in die Mitochondrien importiert (Annesley und Fisher, 2019; Wiedemann und Pfanner, 2017).

## 2.2.2 Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien besitzen ein eigenes kleines Genom, mit dem jedoch nur ein kleiner Teil der mitochondrialen Proteine synthetisiert werden kann. Der größte Teil muss an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und in das Mitochondrium transportiert werden. Der Transport dieser Proteine und anderer gelöster Stoffe wird durch Trägerproteine gewährleistet, die durch die Translokasen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran befördert werden (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Die Hauptaufgabe der Mitochondrien, die klassischerweise als Kraftwerke bezeichnet werden, besteht darin, Energie in Form von ATP zu generieren und dieses den Zellen zur Verfügung zu stellen (Pfanner et al., 2019). Darüber hinaus sind Mitochondrien an einer Reihe weiterer Stoffwechselwege beteiligt. Dazu gehören die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern, Qualitätskontroll- und Abbauprozesse einschließlich Mitophagie sowie die Regulation der Apoptose (Pfanner et al., 2019).

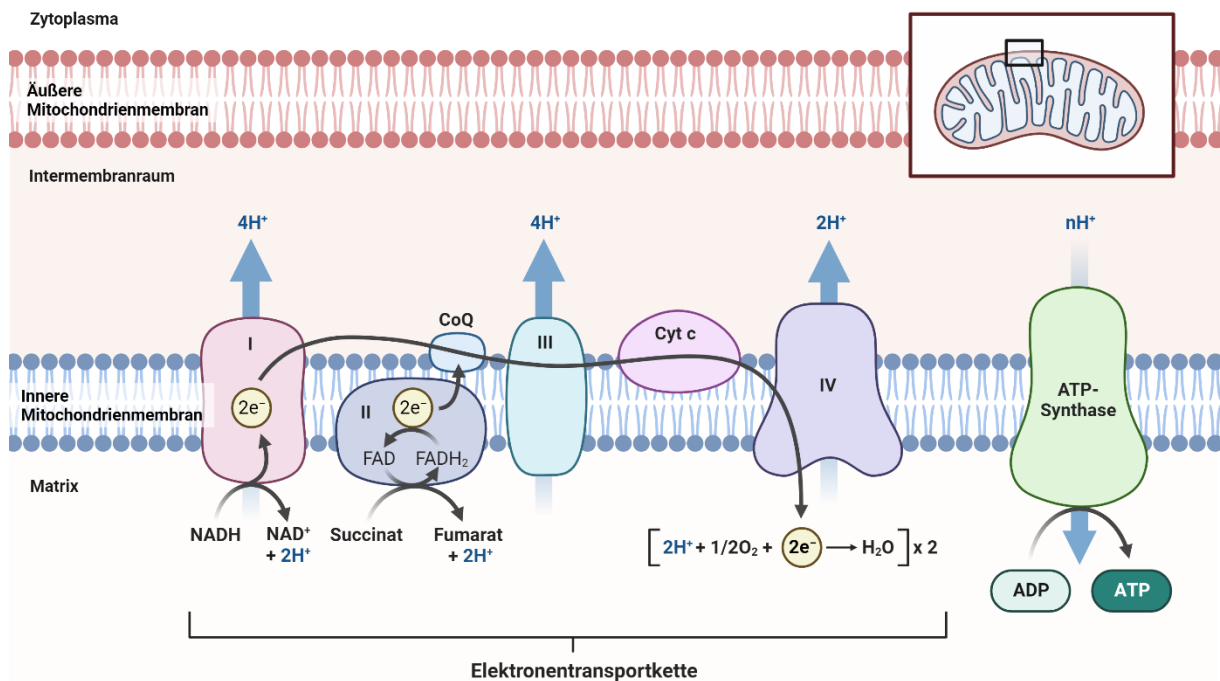
### 2.2.2.1 Proteinimport über TIM- und TOM-Komplexe

Für die Biogenese und Funktion der Mitochondrien ist der Import von mehr als 1000 kernkodierten und zytosolisch synthetisierten Vorläuferproteinen erforderlich (Becker et al., 2019). Dies gelingt über eine Proteinimportmaschinerie, die aus drei Komplexen besteht: Einem in der Außenmembran befindlichen TOM-Komplex und zwei in der Innenmembran lokalisierten TIM-Komplexen (Neupert und Herrmann, 2007). Die Multiproteinkomplexe bestehen aus einer oder mehreren Poren als Durchtrittskanal und Präsequenzrezeptoren (Shiota et al., 2015; Neupert und Herrmann, 2007). Für die Passage über den TOM-Komplex werden die Vorläuferproteine anhand ihrer spezifischen mitochondrialen Targeting-Signale (MTS) zunächst von den ins Zytosol ragenden Präsequenzrezeptoren TOM20 oder TOM70 erkannt, konnektiert und gelangen dann über eine Pore, die vor allem von TOM40 gebildet wird, in den IMS (Rosario et al., 2019; Becker et al., 2008). Dort werden die Vorläuferproteine durch verschiedene Proteintranslokasen weiter sortiert (Becker et al., 2019). Die beiden an der IMM lokalisierten Komplexe TIM22 und TIM23 importieren unterschiedliche Proteine: TIM22 erleichtert den Transport von Proteinen, die interne Ziel-Signale tragen, in die IMM. TIM23 ist für den Transport Präsequenz enthaltener Vorläuferproteine in die Matrix verantwortlich (Geissler et al., 2002; Rehling et al., 2004).

### 2.2.2.2 *Oxidative Phosphorylierung*

In der mitochondrialen Matrix werden im Rahmen des Abbaus von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten durch Enzyme des Citratzyklus die Elektronenträger Nicotinamadenindinucleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FADH<sub>2</sub>) generiert (Nunnari und Suomalainen, 2012). NADH und FADH<sub>2</sub> übertragen Elektronen auf die an der mitochondrialen Innenmembran lokalisierte Atmungs- bzw. Elektronentransportkette (ETC, *electron transfer chain*) (siehe Abbildung 6). Diese ist durch vier Komplexe definiert, von denen jeder einzelne wiederum aus einer Reihe von Untereinheiten besteht. Die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) ist beispielsweise aus 45 Untereinheiten assembliert (Stroud et al., 2016).

Die Komplexe I und II vermitteln einen Zwei-Elektronen-Transfer (2e<sup>-</sup>) von NADH bzw. FADH<sub>2</sub> zu Coenzym Q (CoQ). Die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus entspricht dabei dem Komplex II und stellt somit die direkte Verbindung zum Citratzyklus her. Die Cytochrom-Reduktase (Komplex III) empfängt zwei Elektronen vom reduzierten CoQ, leitet einzelne Elektronen an Cytochrom c (Cyt c) weiter und nimmt Protonen aus der Matrix auf. Die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) beendet die ETC, indem sie Elektronen von Cyt c aufnimmt und diese nutzt, um Sauerstoff vollständig zu Wasser zu reduzieren. Durch die aufeinanderfolgenden Redoxreaktionen fallen Elektronen innerhalb der ETC von höheren auf niedrigere Energieniveaus, die dabei freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen aus der Matrix in den IMS zu pumpen. Der durch die Komplexe I, III und IV wiederum erzeugte Protonengradient dient unter Rückstrom von Protonen vom IMS (pH 7,2-7,4) in die Matrix (pH 7,9-8) der ATP-Synthase als Triebkraft, um unter Verwendung von organischem Phosphat die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) zu katalysieren (Okuno et al., 2011; Kühlbrandt, 2015). Der zuletzt beschriebene Prozess wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.



**Abbildung 6: Die oxidative Phosphorylierung**

Das Schema zeigt die äußere Mitochondrienmembran, den Intermembranraum, die Matrix und die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Elektronentransportkette mit ihren 4 Komplexen (I-IV) und der ATP-Synthase. Die Komplexe I und II vermitteln den Zwei-Elektronen-Transfer (2e<sup>-</sup>) von NADH bzw. FADH<sub>2</sub> zu Coenzym Q (CoQ), Komplex II bildet auch die Schnittstelle zwischen Atmungskette und Citratzyklus. Der Komplex III erhält 2e<sup>-</sup> vom reduzierten CoQ und gibt einzelne Elektronen an Cytochrom c (Cyt c) ab. Der Komplex IV beendet die Elektronentransportkette, indem er Elektronen von Cyt c aufnimmt und damit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) vollständig zu Wasser (H<sub>2</sub>O) reduziert ( $2\text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ). Die Komplexe I, III und IV pumpen die durch die aufeinanderfolgenden Redoxreaktionen freigesetzte Energie in Form von H<sup>+</sup> aus der Matrix in den Intermembranraum. Der dadurch erzeugte Protonengradient (nH<sup>+</sup>) zwischen Intermembranraum und Matrix wird wiederum von der ATP-Synthase genutzt, um die Phosphorylierung von ADP zu ATP zu katalysieren. Erstellt mit BioRender.com

Ein Charakteristikum von Mitochondrien ist ihr elektrochemischer Gradient bzw. ihr Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ), das über der Innenmembran erzeugt und durch Protonen vermittelt wird. Das  $\Delta\psi_m$  beruht einerseits auf einer elektrischen Potentialdifferenz (Spannung) zwischen der Matrix und dem IMS, die aufgrund unterschiedlicher Ladungen zwischen den einzelnen Kompartimenten entsteht. Andererseits besteht ein chemischer Gradient, der auf unterschiedlichen Protonenkonzentrationen basiert. Der Protonengradient ist, wie bereits erwähnt, für die ATP-Synthase von Bedeutung und wurde 1961 von Mitchell erstmalig beschrieben (Mitchell, 1961). Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung findet jedoch nicht nur die ATP-Synthase statt, sondern es entstehen auch toxische reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Nebenprodukte aufgrund von Elektronenverlust am Komplex I und III (St-Pierre et al., 2002; Muller et al., 2004) (siehe Abschnitt 2.2.3.1).

### 2.2.3 Pro- und antioxidative Mechanismen

Die Mitochondrien sind besonders von prooxidativen Mechanismen betroffen, da sie Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sind. Allerdings verfügen sie auch über eine Reihe von antioxidativen Abwehrmechanismen.

#### 2.2.3.1 *Reaktive Sauerstoffspezies*

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind schädliche Formen des Sauerstoffs. Sie umfassen freie Radikale, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen enthalten, wie das Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ ) und das Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ), sowie nichtradikale Spezies wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), was jedoch leicht in ein Radikal umgewandelt werden kann (Sanders und Timothy Greenamyre, 2013). ROS spielen eine wichtige physiologische Rolle, z. B. im Rahmen der Immunabwehr zur Abtötung pathogener Erreger oder bei der Synthese von Schilddrüsenhormonen (Halliwell, 2006; Brieger et al., 2012). Anhaltende und hohe Konzentrationen von ROS können jedoch zu Schädigungen zellulärer Proteine, Lipide und DNA führen (Brieger et al., 2012; Wiseman und Halliwell, 1996). Freie Radikale sind in unterschiedlichem Maße reaktionsfreudig, und entwickeln sich häufig kaskadenartig mit Übergängen von einer Spezies zur anderen (Brieger et al., 2012; Sanders und Timothy Greenamyre, 2013). Die Mitochondrien sind die Hauptproduzenten von ROS (Sanders und Timothy Greenamyre, 2013) und verbrauchen einen Großteil des eingeatmeten Sauerstoffs (Babcock, 1999), der im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung zu Wasser reduziert wird (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Bei der Elektronenübertragung im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung entweichen insbesondere an den Komplexen I und III der Atmungskette ein kleiner Teil der Elektronen (St-Pierre et al., 2002; Muller et al., 2004) und es kommt im Rahmen einer Ein-Elektronen-Übertragung auf molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) zunächst zur Bildung des Superoxidanions ( $O_2^{\cdot-}$ ) (St-Pierre et al., 2002; Brieger et al., 2012). Dies ist eines der reaktionsfreudigsten Sauerstoffradikale. Wenn es mit Stickstoffmonoxid (NO) reagiert, entsteht das hochreaktive Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) (Brieger et al., 2012), eine reaktive Stickstoffverbindung. Normalerweise wird  $O_2^{\cdot-}$  jedoch schnell zunächst durch die mitochondriale Superoxiddismutase (Mn-SOD) oder Superoxiddismutase (SOD2) in das etwas weniger reaktive  $H_2O_2$  umgewandelt und anschließend durch die Katalase unschädlich gemacht (Dong-Chen et al., 2023; Yan et al., 2013).  $H_2O_2$  ist kein Radikal und membrangängig, daher kann es sich schnell in der Zelle ausbreiten, und in Anwesenheit von Eisen in Form von  $Fe^{2+}$  und anderen Übergangsmetallionen reagieren und das äußerst gefährliche Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ) bilden (Starkov, 2008; Subramaniam und Chesselet, 2013). Neben den Mitochondrien produzieren auch die NADPH-Oxidasen z.B. im Rahmen der Immunabwehr, die Acyl-CoA-Oxidase der Peroxisomen und die

Cytochrom-P450-Oxidasen im Rahmen ihrer enzymatischen Aktivität mit Übertragung von Sauerstoff auf ein Substrat ROS (Dolgacheva et al., 2022; Hrycay und Bandiera, 2015).

Auch das Toxin MPP<sup>+</sup> führt aufgrund der Inhibition des Komplex I zu einer Beeinträchtigung in der Atmungskette, was zu vermehrtem Elektronenaustritt und erhöhter ROS-Produktion führt (Drechsel und Patel, 2008).

#### 2.2.3.2 *Antioxidative Abwehrmechanismen*

Antioxidantien dienen der Kompensation der prooxidativen Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies, indem sie sich selbst opfern und oxidiert werden (Iuga et al., 2015). Man unterscheidet zwischen antioxidativen Enzymen und nicht-enzymatischen Antioxidantien. Wichtige antioxidative Enzyme sind die Glutathionperoxidase, die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase (Matés et al., 1999). Die mitochondriale SOD und Katalase dienen z.B. dazu, die in den Mitochondrien an den Komplexen I und III gebildeten Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) unschädlich zu machen. Dabei setzt die Superoxiddismutase  $O_2^{\cdot-}$  zu Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  und die Katalase  $H_2O_2$  zu  $O_2$  und Wasser ( $H_2O$ ) um (Yan et al., 2013; Dong-Chen et al., 2023). Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen einerseits körpereigenes Glutathion und Coenzym Q10 sowie exogen zugeführte Antioxidantien in Form von wasserlöslichem Vitamin C (Ascorbinsäure) oder der fettlöslichen Vitamine A (Retinol) und E (Tocopherol).

#### 2.2.4 Mitochondriale Dynamik

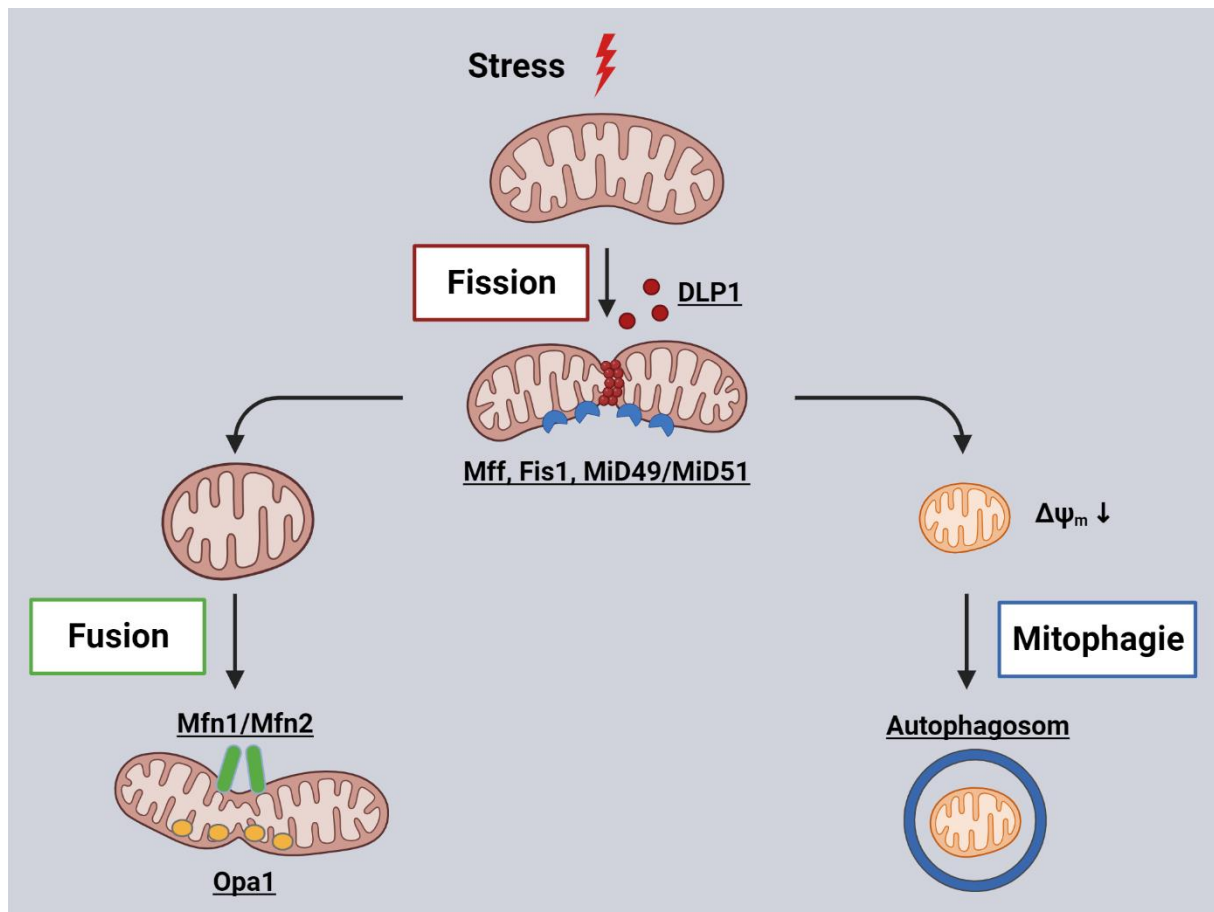
Für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase sind neben der Biogenese die Prozesse mitochondrialen Dynamik und Mitophagie von grundlegender Bedeutung.

Die mitochondriale Dynamik ist durch zwei unterschiedliche Ereignisse gekennzeichnet: Fission (Fragmentierung) und Fusion (Verschmelzung). Mitochondrien sind dynamische Organellen, die kontinuierlich koordinierten Fissions- und Fusionsereignissen unterliegen, dadurch verändert sich ihre Morphologie, Anzahl und Größe (Tilokani et al., 2018; Adebayo et al., 2021). Die Fusion von Mitochondrien ist wichtig für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion, da dadurch geschädigte Inhalte, wie mutierte DNA, ausgetauscht und vermischt werden können (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012; Chen et al., 2007). Fission führt zur Teilung und sorgt somit für eine ausreichenden Anzahl von Mitochondrien (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012), um die Zellfunktion zu gewährleisten. Außerdem dient Fission dazu, Mitochondrien während der Zellteilung auf die Tochterzellen zu verteilen (Smirnova et al., 2001) und sie ist unerlässlich für die Abtrennung geschädigter Mitochondrienanteile (Kraus et al., 2021), die dann dem Abbau über Mitophagie zugeführt werden (Chen et al., 2016). Fission und Fusion dienen somit der Qualitätskontrolle und durch ein an die jeweilige Stoffwechselsituation angepasstes Verhältnis

von Fusion und Fission der Aufrechterhaltung einer gesunden mitochondrialen und damit auch zellulären Funktion (van der Bliek, Alexander M. et al., 2013). Bei nicht-mitochondrialen Stoffwechselstörungen kommt es zunächst zu einer übermäßigen Fusion der Mitochondrien (Tondera et al., 2009). Im Gegensatz dazu wird bei mitochondrialen Störungen durch Hemmung der ATP-Synthase (Pletjushkina et al., 2006) mit Verlust von ATP oder durch Verminderung des  $\Delta\psi_m$  eine Fragmentierung ausgelöst (Twig et al., 2008).

#### 2.2.4.1 *Fusion und Fission*

An der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase durch Fusion und Fission sind verschiedene Proteine beteiligt. Bei Säugetieren wird die mitochondriale Fission (siehe Abbildung 7) durch ein einziges Protein der Dynamin-Familie, DLP1 (*dynammin-like protein 1*), vermittelt. DLP1, das hauptsächlich im Zytosol vorkommt, wird für die Fission durch spezifische zelluläre Signale aus dem Zytosol an das Mitochondrium rekrutiert (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012; van der Bliek, Alexander M. et al., 2013). Dort ist es in der Lage, sich ring- oder spiralförmig zu polymerisieren (Smirnova et al., 2001), um den abzutrennenden Teil zu legen und beim Zusammenziehen unter GTP-Hydrolyse und in Zusammenarbeit mit dem Protein Dynamin 2 sowohl die äußere als auch in der Regel die innere Mitochondrienmembran zu durchtrennen (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012; van der Bliek, Alexander M. et al., 2013; Lee et al., 2016). Als Rezeptor und zur Rekrutierung von DLP1 dient Mff (*Mitochondrial fission factor*), ein relativ kleines Protein, das in der mitochondrialen Außenmembran verankert ist (van der Bliek, Alexander M. et al., 2013; Otera et al., 2010), sowie die ebenfalls in der äußeren Membran verankerten Proteine Fis1, MiD49 und MiD51 (*mitochondrial dynamic proteins, 49 und 51 kDa*) (Otera et al., 2010; Losón et al., 2013). Dient die Fission der Abtrennung beschädigter Teile, so werden dysfunktionale Mitochondrienanteile mit Verlust des Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) der Mitophagie zugeführt (Chen et al., 2016) (siehe Abschnitt 2.2.5).



**Abbildung 7: Mitochondriale Fusion, Fission und Mitophagie**

Schematische Darstellung von Fusion, Fission und Einleitung der Mitophagie. Stressbelastete Mitochondrien werden durch Fission geteilt. Dazu rekrutieren Mff, Fis1, Mi49 und Mi51 das zytosolische Protein DLP1. Nach der Fission wird der dysfunktionale Teil mit Verlust des Membranpotentials der Mitophagie zugeführt und abgebaut (hier keine Darstellung der daran beteiligten Proteine). Der intakte Teil wird unter Vermittlung von Mfn1, Mfn2 und Opa der Fusion zugeführt, um ein verbundenes, intaktes mitochondriales Netzwerk zu erzeugen. Erstellt mit BioRender.com

Für die Fusion von Mitochondrien (siehe Abbildung 7) sind drei Proteine notwendig: Mfn1 (*Mitofusin 1*) und Mfn2 (*Mitofusin 2*) sind an der Außenmembran der Mitochondrien verankerte Proteine der Dynamin-Familie und Homologe bei Säugetieren (van der Bliek, Alexander M. et al., 2013; Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012). Sie vermitteln die Fusion zwischen den mitochondrialen Außenmembranen (Chen et al., 2003), während Opa1 (*Optic atrophy protein 1*), das dritte Dynaminprotein, hauptsächlich an der inneren Membran (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012), aber auch im Intermembranraum lokalisiert ist (Chen et al., 2016) und deren Fusion vermittelt (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012).

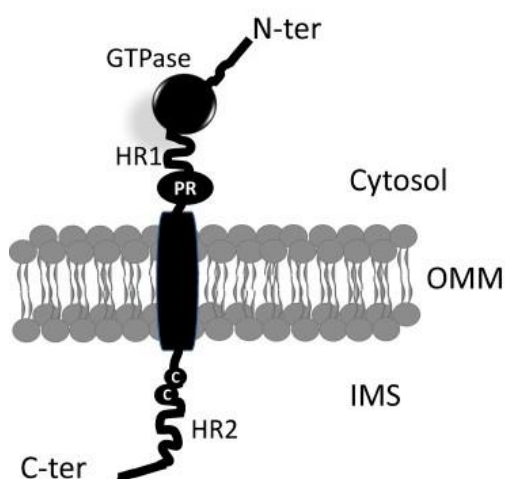
Da Mitochondrien über eine Doppelmembran verfügen, erfolgt die Fusion in einem mehrstufigen Prozess: Zunächst docken die Mfn1- oder Mfn2-GTPasen zweier Mitochondrien durch Dimerisierung an der äußeren Mitochondrienmembran an, wodurch der Abstand zwischen den beiden Außenmembranen verringert wird (Ishihara et al., 2004). Anschließend erfolgt die

Mitofusin-vermittelte irreversible Fusion der äußeren Mitochondrienmembranen unter Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) (Ishihara et al., 2004) zu Guanosindiphosphat (GDP) und anorganischem Phosphat. Nahezu zeitgleich mit der Fusion der äußeren Membran erfolgt auch die Fusion der inneren Mitochondrienmembranen durch die GTPase Opa1 unter Hydrolyse von GTP (Gao und Hu, 2021; Zemirli et al., 2018). Opa1 spielt auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Cristae-Struktur (Chen et al., 2016). Konfokalmikroskopische Zeitrafferaufnahmen embryonaler Wildtyp-Mausfibroblasten belegen eindrucksvoll die mitochondriale Dynamik: Während 20-minütiger Aufnahmen wurde bei den meisten Mitochondrien mindestens ein offensichtliches Fusions- oder Fissionsereignis beobachtet (Chen et al., 2003).

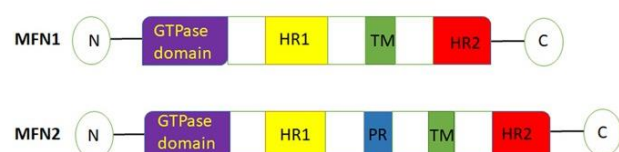
#### 2.2.4.2 *Die Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1*

Wie in Abschnitt 2.2.4.1 erwähnt, regulieren die Proteine Mfn1, Mfn2 und Opa1 die mitochondriale Fusion. Mfn1 und Mfn2 sind Transmembran-GTPasen, die in der OMM lokalisiert sind. Sie weisen eine Homologie bzw. Sequenzähnlichkeit von ca. 63% (Chandhok et al., 2018) bis 80% (Tilokani et al., 2018) auf und besitzen die gleichen relevanten funktionellen Domänen (Chandhok et al., 2018). Beide Mitofusine bestehen aus einer Amino-terminalen (N-terminalen) GTPase-Domäne, einer coiled-coil-Domäne (Heptad-Repeat, helikale Wiederholung, HR1), einer Transmembrandomäne, die die OMM umspannt und einer zweiten Carboxy-terminalen (C-terminalen) coiled-coil-Domäne (Heptad-Repeat, HR2). Das N-terminale Ende ragt ins Zytosol, das C-terminale in den IMS. Im Gegensatz zu Mfn1 verfügt Mfn2 zusätzlich noch über eine prolinreiche Domäne (PR) (Mattie et al., 2018; Giacomello und Scorrano, 2018) (siehe Abbildung 8).

**A**



**B**

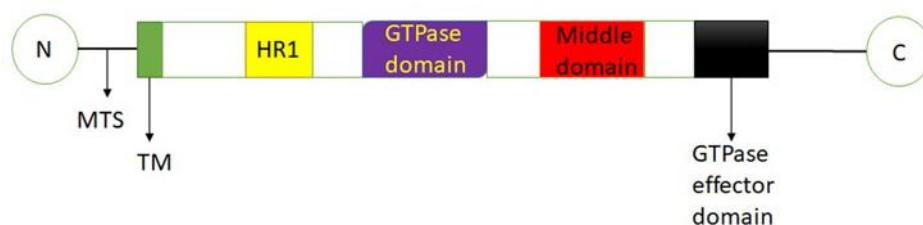


**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Mfn1 und Mfn2**

(A) Exemplarisch ist Mfn1 dargestellt; Mfn1 verfügt über eine cytosolische N-terminale (N-ter) GTPase-Domäne, eine coiled-coil Heptad-Repeat Domäne 1 (HR1) und eine prolinreiche (PR) Domäne. Die mitochondriale Außenmembran (OMM) umspannt das Transmembransegment. In den Intermembranraum (IMS) ragt die C-terminale (C-ter) zweite Heptad-Repeat Domäne 2 (HR2) (Giacomello und Scorrano, 2018). (B) Domänenstruktur von Mfn1 und Mfn2 mit N-terminaler (N) GTPase-Domäne, einer coiled-coil Heptad-Repeat Domäne 1 (HR1), einer prolinreichen (PR) Domäne, dem Transmembransegment (TM) und einer C-terminalen (C) zweiten Heptad-Repeat Domäne 2 (HR2) (Adebayo et al., 2021)

Mfn2 ist nicht nur in der äußeren Membran von Mitochondrien verankert, sondern auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Dort kann es an mitochondriales Mfn1 oder Mfn2 binden und somit die mitochondriale Kalziumaufnahme ermöglichen (Brito und Scorrano, 2008).

Opa1 ist eine weitere große GTPase und gehört zu den Dynamin-verwandten Proteinen, einer Unterfamilie der Dynamine (van der Bliek, 1999). Die Struktur von Opa1 (siehe Abbildung 9) umfasst eine Transmembrandomäne (TM), eine Coiled-Coil-Domäne (HR1), die vermutlich der Verbindung mit anderen Proteinen dient, sowie drei weitere Domänen: die GTPase-Domäne, die mittlere Domäne, die die GTPase-Aktivität reguliert, sowie die GTPase-Effektordomäne (Satoh et al., 2003). Die mittlere und GTPase-Effektordomäne regulieren die Zusammensetzung von Opa1 zu multimeren Komplexen (Gandre-Babbe und van der Bliek, Alexander M., 2008). Die mittlere Domäne scheint auch die GTPase-Aktivität zu regulieren (Satoh et al., 2003), während die GTPase-Domäne vermutlich die mechanische Kraft bereitstellt (Gandre-Babbe und van der Bliek, Alexander M., 2008). Die Opa1-Vorläuferproteine werden über eine mitochondriale Targeting Sequenz (MTS) in den IMS dirigiert (Del Dotto et al., 2017). Nach der Abspaltung der MTS entsteht die lange Opa1 Form (L-Isoform), die N-terminal mit ihrem Transmembransegment in der IMM verankert ist, der restliche und größere Teil des Proteins ragt in den IMS hinein (Olichon et al., 2002). Durch proteolytische Spaltung entstehen zusätzlich Kurzformen von Opa1 (S-Isoformen), bei denen das Transmembransegment fehlt, so dass sie nicht in der IMM verankert werden (Ishihara et al., 2006).

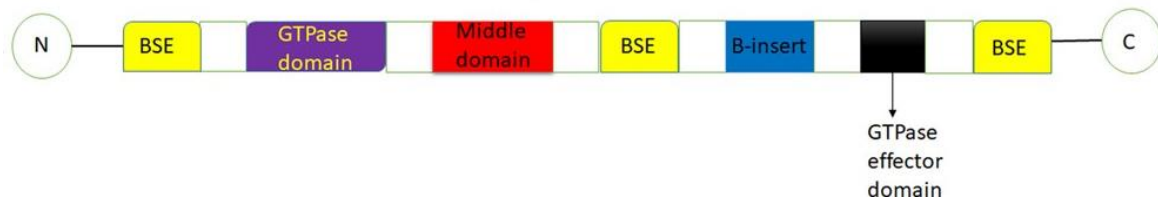
**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Opa1**

Domänenstruktur von Opa1 mit der Mitochondrien-Targeting-Sequenz (MTS, Mitochondriale Zielsequenz), dem N-terminalen (N) Transmembransegment (TM), der coiled-coil Heptad-Repeat Domäne 1 (HR1), der GTPase-Domäne, der mittleren Domäne und der C-terminalen (C) GTPase-Effektor-Domäne (Adebayo et al., 2021)

Im Grundzustand entstehen und akkumulieren konstitutiv zu etwa äquimolaren Anteilen L- und S-Formen (Anand et al., 2014). Für die Fusion sind entweder beide Formen erforderlich (Song et al., 2007) oder nur die L-Formen (Anand et al., 2014; Ishihara et al., 2006), letztere jedoch sind unverzichtbar. Das Gleichgewicht kann jedoch kippen: Kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) oder zur Induktion von Apoptose, werden die L-Formen vermehrt proteolytisch gespalten (Anand et al., 2014; Ishihara et al., 2006), es verbleiben die S-Formen, die eine Fusion verhindern. Somit reguliert das  $\Delta\psi_m$ , welches über die OXPHOS aufrechterhalten wird, die Fusion der IMM (Ishihara et al., 2006). Umgekehrt induzieren Apoptose und Verlust des  $\Delta\psi_m$  die proteolytische Spaltung von Opa1 (Griparic et al., 2007), was bedeuten könnte, dass die mitochondriale Fission durch die Inaktivierung von Opa1 ausgelöst wird (Griparic et al., 2007). Opa 1 wurde elektrophoretisch mit mehreren Molekulargewichten nachgewiesen, wobei im Gehirn die 92-kDa-Form dominierte (Olichon et al., 2002). Satoh et al. wiesen in Mitochondrien von HeLa-Zellen Opa1-Isoformen mit geschätzten 88 und 93 kDa nach (Satoh et al., 2003). Opa1 scheint im IMS auch teilweise mit Mfn1, nicht aber mit Mfn2 an der OMM zu interagieren, und Mfn1 scheint für die Fusion erforderlich zu sein, da Opa1 in Abwesenheit von Mfn1 diese nicht fördern kann (Cipolat et al., 2004). Neben der Beteiligung an der Fusion der IMM ist Opa1 auch (in die Cristae Struktur integriert) an der Aufrechterhaltung der Cristae-Struktur beteiligt (Olichon et al., 2003; Cogliati et al., 2013). Mutationen im Opa1-Gen verursachen eine autosomal-dominante Optikusatrophie (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Diese Form der Neuropathie führt zu einer Degeneration von Ganglienzellen in der Netzhaut mit Folge einer Sehnervatrophie und damit einhergehendem Visusverlust (Olichon et al., 2003).

#### 2.2.4.3 *Die Fissionsproteine DLP1, Mff, MiD49, MiD51 und Fis*

Die mitochondriale Teilung wird durch ein weiteres Mitglied der Dynaminfamilie durchgeführt, der zytosolischen GTPase DLP1 (*dynamamin-like protein 1*, Dynamamin-ähnliches Protein 1), das auch als Drp1 (*dynamamin related protein 1*, Dynamamin-verwandtes Protein 1) (Yoon et al., 1998) bezeichnet wird, in dieser Arbeit wird der erstgenannte Begriff verwendet. DLP1 ist hauptsächlich zytosolisch lokalisiert, während sich ein kleiner Teil in der Nähe zukünftiger Spaltstellen befindet (Smirnova et al., 2001). Die Proteine Mff, Fis1, MiD49 und MiD51, die an der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert sind, dienen der Rekrutierung und als Adapter (Otera et al., 2010; Losón et al., 2013; van der Bliek, Alexander M. et al., 2013).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von DLP1**

DLP1 (Dynamamin-ähnliches Protein 1) mit N- und C-terminalen BSE (Bündel-Signalelementen), einer GTPase-Domäne, einer mittleren Domäne, einer B-insert-Domäne und einer GTPase-Effektordomäne (Adebayo et al., 2021)

DLP1 besitzt, wie alle Dynamamine, eine hochkonservierte GTPase-Domäne, zwei helikale Regionen - die mittlere Domäne und die GTPase-Effektordomäne - sowie eine variable Region, die als Insert B bezeichnet wird (siehe Abbildung 10) (Labbé et al., 2014). Die Insert B Domäne dient der Bindung an Rezeptoren an der OMM (van der Blik, Alexander M. et al., 2013).

Bei Mff handelt es sich um ein vergleichsweise kleines, 342 Aminosäuren umfassendes Protein. Es besteht aus einer kurzen N-terminalen Wiederholung (Heptad Repeat), einer Coiled-Coil-Domäne und einem C-terminalen Transmembransegment, welches das Protein in der mitochondrialen Außenmembran verankert (van der Blik, Alexander M. et al., 2013; Gandre-Babbe und van der Blik, Alexander M., 2008; Labbé et al., 2014). Das Protein Fis1 ist 152 Aminosäuren lang (Labbé et al., 2014) und hat eine ähnliche Topologie wie Mff. Es ist ähnlich lokalisiert und wirkt auf dem gleichen Weg (Gandre-Babbe und van der Blik, Alexander M., 2008). Allerdings scheint Mff alleine zur Rekrutierung und als Adapter für DLP1 schon ausreichend zu sein (Otera et al., 2010). Die Adapterproteine MiD49/51 wirken mit Mff und Fis1 teilweise redundant, um die Fission über DLP1 zu vermitteln (Losón et al., 2013). Mff und Fis1 sind auch auf Peroxisomen vorhanden und vermitteln dort die DLP1-abhängige Fission (Gandre-Babbe und van der Blik, Alexander M., 2008).

### 2.2.5 Mitophagie

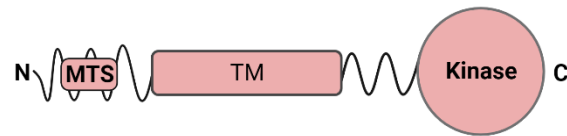
Neben der Biogenese und der mitochondrialen Dynamik ist die Mitophagie ein wichtiger Prozess zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase. Die Mitophagie ist eine selektive Form der Autophagie (Lemasters, 2005; Twig et al., 2008), ein sich aus dem griechischen ableitender Begriff, der „selbst essen“ bedeutet. Die Autophagie bezeichnet die Entfernung dysfunktionaler zellulärer Bestandteile und deren Zuführung zum lysosomalen Abbau (Mizushima und Levine, 2020). Je nach abzubauenen Fracht wird zwischen der Makroautophagie, auch Autophagie genannt, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelter Autophagie differenziert (Mizushima und Levine, 2020).

Die Mitophagie als selektive Form der Autophagie dient dem Abbau geschädigter, dysfunktionaler Mitochondrien (Twig et al., 2008; Palikaras et al., 2018; Lemasters, 2005). Dadurch wird eine intrazelluläre Akkumulation verhindert und Schäden aufgrund von dysfunktionalen Organellen vermieden (Palikaras et al., 2018). Abgetrennte Mitochondrien weisen entweder ein geringeres  $\Delta\psi_m$  auf (Twig et al., 2008; Chen et al., 2016) und können dies durch Fusion mit gesunden Mitochondrien wiedererlangen (Chen et al., 2016), oder sie haben ihr  $\Delta\psi_m$  verloren und werden dann der Mitophagie zugeführt (Chen et al., 2016). Dafür werden die geschädigten Organellen von Phagophoren konnektiert, welche zu Doppelmembran-Vesikeln, den Autophagosomen heranreifen. Diese verschmelzen dann mit Lysosomen zum Abbau der umhüllten Fracht (Bento et al., 2016). Die Mitophagie dient somit als Qualitätskontrolle zur Aufrechterhaltung der Zellgesundheit.

Es gibt verschiedene Stoffwechselfade der Mitophagie. Der am besten verstandene Weg ist die Ubiquitin vermittelte PINK1/Parkin-abhängige Mitophagie (Grünewald et al., 2019), die bisher hauptsächlich für die Beseitigung dysfunktionaler und ATP-defizitärer Mitochondrien verantwortlich zu sein scheint (Goiran et al., 2022; Xiao et al., 2022; Killackey et al., 2020) (siehe Abschnitt 2.2.5.2). Ein weiterer Weg zur Eliminierung von Mitochondrien ist die rezeptorvermittelte Mitophagie über BNIP3L/Nix. Dieser Prozess ist unter anderem an der Erythrozytenentwicklung beteiligt. Während der Retikulozytenreifung (Erythrozyten-Vorläufer) müssen überflüssige Mitochondrien aktiv entfernt werden, um funktionsfähige Erythrozyten zu ermöglichen (Schweers et al., 2007). Auch bei der Hypoxie kommt es zur Auslösung von Mitophagie durch BNIP: Unter Sauerstoffmangel ist die OXPHOS eingeschränkt und es kommt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$* , Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 $\alpha$ ), welcher die Mitophagie über BNIP3 und BNIP3L/Nix induziert (Bellot et al., 2009; Tracy et al., 2007).

#### 2.2.5.1 *Die Proteine PINK1 und Parkin*

Das Protein PINK1 (PTEN-induzierte Kinase 1) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und besteht aus 581 Aminosäuren (Trempe und Fon, 2013; Unoki und Nakamura, 2001). PINK1 besitzt eine N-Terminale mitochondriale Targeting-Sequenz (MTS), gefolgt von einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne (TM) und einer Serin/Threonin-Kinasedomäne, so wie eine C-terminale Region (Trempe und Fon, 2013) (siehe Abbildung 11).

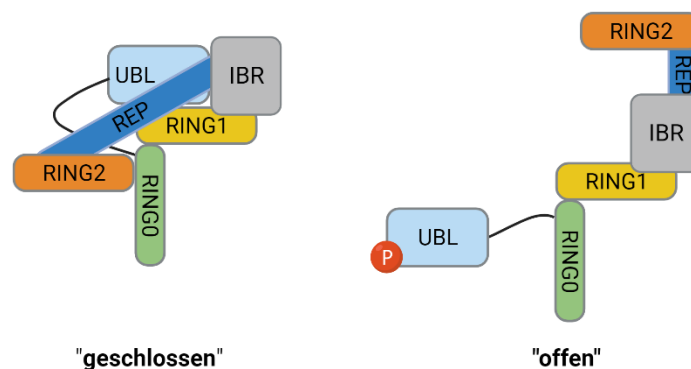


### Abbildung 11: Die Struktur von PINK1

PINK1 verfügt über eine N-terminale mitochondriale Targeting-Sequenz (MTS), gefolgt von einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne (TM) und einer Serin/Threonin-Kinasedomäne (Kinase), sowie eine C-terminale Region (C). Erstellt mit BioRender.com

PINK1 unterliegt im basalen Zustand einer konstitutiven intramitochondrialen Spaltung und liegt deshalb in unterschiedlichen Längen bzw. Molekulargewichten vor. Es gibt eine lange Vorläufer-Form mit ca. 60 kD und eine kurze Form mit ca. 50 kD, die auch als „reifes“ PINK1“ bezeichnet wird (Deas et al., 2011; Meissner et al., 2011) (siehe Abschnitt 2.2.5.2).

Das Protein Parkin ist eine RBR (*RING-Between-RING*, RING-zwischen-RING) E3-Ubiquitin-Ligase (Riley et al., 2013), die aus 465 Aminosäuren besteht. Seine Aufgabe als E3-Ubiquitin-Ligase ist es, die Übertragung von Ubiquitin (von einem E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym) an zytosolischen und OMM verankerten Proteinen zu katalysieren (Trempe und Fon, 2013; Cotton und Lechtenberg, 2020). Parkin besteht aus einer Ubiquitin-ähnlichen Domäne (UBL), dem Parkin-Repressorelement (REP) und vier RING-ähnlichen Domänen (RING0, RING1, IBR und RING2). Das Protein kann zwei verschiedene Konformationen einnehmen (siehe Abbildung 12):



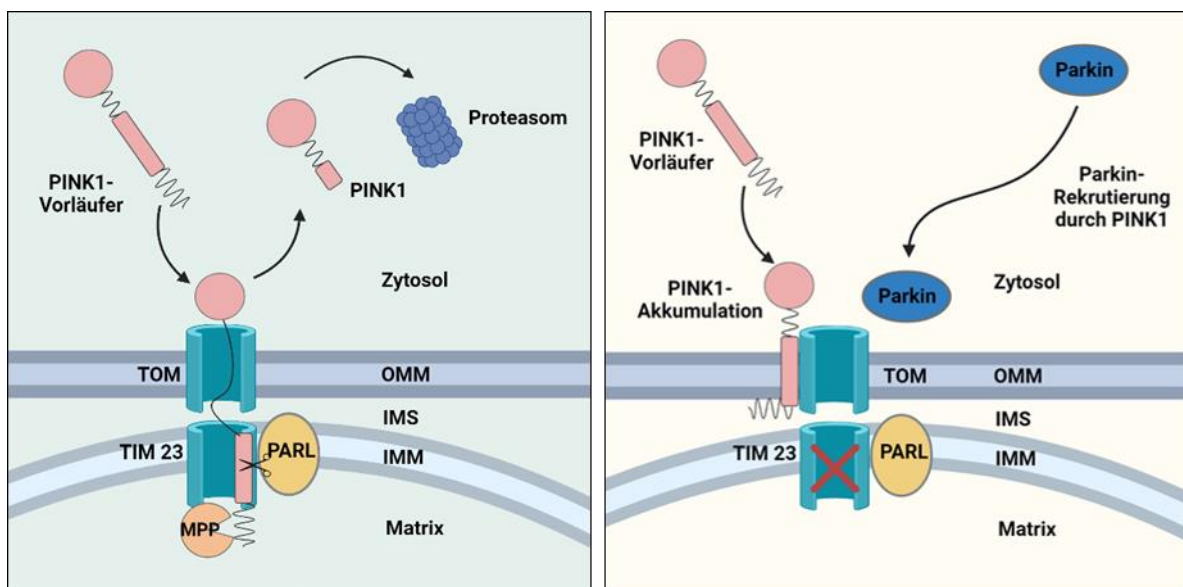
### Abbildung 12: Die Struktur von Parkin in geschlossenem und offenem Zustand

Parkin enthält eine N-terminale Ubiquitin-ähnliche (UBL) Domäne, ein Repressorelement (REP) und vier RING-ähnliche Domänen: RING0, RING1, IBR und RING2. Im Grundzustand ist die Konformation von Parkin geschlossen (links). Sobald Parkin aktiviert ist, wird seine Konformation geöffnet und die UBL-Domäne freigegeben (rechts). Erstellt mit BioRender.com

Im Grundzustand liegt Parkin „geschlossen“ vor, ist autoinhibiert und seine Ubiquitin-Ligase-Aktivität ist gehemmt (Cotton und Lechtenberg, 2020). Sobald Parkin durch Phosphorylierung aktiviert wird, wird die UBL-Domäne freigegeben, wodurch Parkin in den „offenen“ Zustand übergeht (Li et al., 2022) und die Ubiquitinierung katalysieren kann.

### 2.2.5.2 *Der Mechanismus der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie*

Unter basalen Bedingungen befindet sich Parkin im Zytosol, während PINK1 nach Passage durch die TOM- und TIM-Komplexe im Mitochondrium abgebaut wird (Goiran et al., 2022) (siehe Abbildung 13):



**Abbildung 13: PINK1-Abbau und Akkumulation**

(Links) PINK1 wird kontinuierlich als Vorläuferprotein in gesunde Mitochondrien importiert. Dort wird es durch das mitochondriale Membranpotential in den TIM-Komplex der Mitochondrien importiert. Die Peptidase MPP spaltet die mitochondriale Targeting-Sequenz und die Protease PARL spaltet die Transmembrandomäne von PINK1. Durch die PARL-Spaltung entsteht „reifes“ PINK1, das vom Ubiquitin-Proteasom abgebaut wird. (Rechts) Bei Depolarisierung der Mitochondrien oder Blockierung des Mitochondrienimports akkumuliert PINK1 an der äußeren Mitochondrienmembran und rekrutiert Parkin. Erstellt mit BioRender.com

Mitochondrien mit physiologischem  $\Delta\psi_m$  dirigieren kontinuierlich die Vorläuferform von PINK1 (63 kDa, lange Form) durch die MTS ans Mitochondrium und importieren sie über die Translokasen TOM und TIM23 (Lazarou et al., 2012). Die N-terminale MTS wird durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP, *mitochondrial processing peptidase*) gespalten, wodurch ein Zwischenprodukt mit einem Molekulargewicht von 60 kDa entsteht (Greene et al., 2012). Es folgt eine weitere Spaltung durch das Presenilin-assoziierte Rhomboid-ähnliche Protein (PARL, *Presenilin-associated rhomboid-like protein*), das die Transmembrandomäne, die die IMM

umspannt, durchtrennt (Deas et al., 2011; Meissner et al., 2011). Das aus der zweiten Spaltung resultierende „reife“ PINK1 (ca. 50 kDa, kurze Form) wird ins Zytoplasma freigesetzt (Deas et al., 2011; Meissner et al., 2011) und dem Ubiquitin-Proteasom-System zum Abbau zugeführt (Narendra et al., 2010). Aufgrund des kontinuierlichen Imports und Abbaus ist PINK1 in gesunden Mitochondrien in sehr geringen bis nicht nachweisbaren Mengen vorhanden (Narendra et al., 2010). Bei Depolarisation ist ein Import nicht mehr möglich. Stattdessen kommt es zur Akkumulation und Dimerisierung von unverarbeitetem PINK1 am TOM-Komplex an der OMM (Okatsu et al., 2013; Narendra et al., 2010; Lazarou et al., 2012). Durch Autophosphorylierung werden die PINK1-Dimere und damit ihre Ubiquitin-Kinaseaktivität aktiviert und Parkin rekrutiert (Narendra et al., 2008; Okatsu et al., 2013; Matsuda et al., 2010; Joselin et al., 2012). Aktiviertes PINK1 phosphoryliert dann Parkin an der Ubiquitin-ähnlichen Domäne (UBL) und aktiviert so dessen E3-Ligase-Aktivität (Kane et al., 2014; Kazlauskaitė et al., 2014). Aktiviertes PINK1 phosphoryliert auch Mfn1 und Mfn2 an der OMM, gefolgt von einer Ubiquitinierung durch Parkin (Chen und Dorn, 2013; Gegg et al., 2010; Pickrell und Youle, 2015), um damit eine weitere Fusion zu verhindern. Parkin polyubiquitiniert weitere Proteine an der OMM wie den spannungsabhängigen Anionenkanal 1 (VDAC1, *voltage dependent anionic channel 1*) (Geisler et al., 2010), der daraufhin durch PINK1 phosphoryliert wird. Dies dient als Signal für die autophagische Maschinerie und leitet die Mitophagie ein.

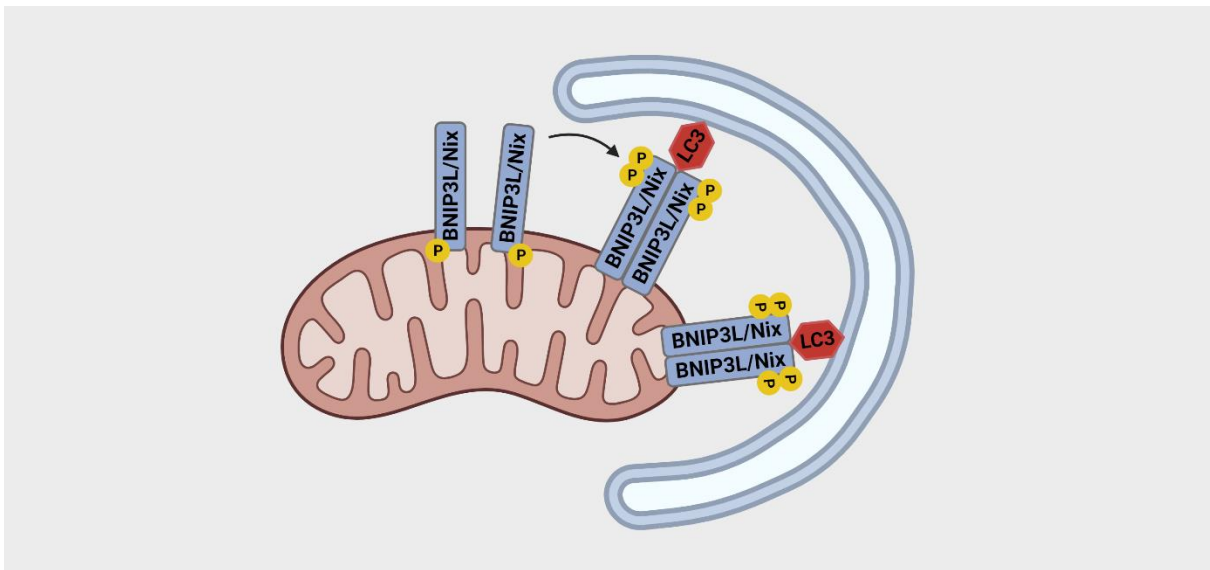
#### 2.2.5.3 Die Proteine BNIP3L/Nix und LC3

Das Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa-interagierende Protein 3 (BNIP3, *Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa-interacting Protein 3*) und das Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa-interagierende, ähnliche Protein 3 (BNIP3L, *Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa-interacting Protein 3-like*), auch bekannt als Nix, sind homologe Mitglieder der Proteine der B-Zell-Lymphom-2 (Bcl-2, *B-cell Lymphom-2*)-Familie (Matsushima et al., 1998). Sie werden konstitutiv auf der OMM exprimiert und wurden zunächst aufgrund ihrer proapoptischen Aktivitäten entdeckt (Imazu et al., 1999). BNIP3L/Nix verfügt über zwei LC3-interagierende Regionen (LIR), eine minimale essentielle Region (MER), eine Transmembran-Domäne (TM-Domäne) und eine Bcl-2-Homolog-3-Domäne (BH3-Domäne), die Apoptose induziert (Li et al., 2022). Die C-terminale LIR-Domäne interagiert mit LC3 (Novak et al., 2010), während die TM-Domäne BNIP3L in der OMM verankert.

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein 1A/1B-leichte Kette 3 (MAP1LC3, *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), kurz LC3 genannt, ist ein autophagosomal Membranverankertes Protein, an das der Mitophagie-Rezeptor BNIP oder sein Homolog BNIP3L/Nix bindet, um die Mitophagie zu stimulieren (Hanna et al., 2012).

#### 2.2.5.4 *Der Mechanismus der BNIP3L/Nix vermittelten Mitophagie*

Bei der BNIP3L/Nix-vermittelten Mitophagie interagiert der Mitophagie-Rezeptor BNIP3L/Nix an der OMM der Mitochondrien mit dem Membranprotein LC3 an den Phagophoren (Novak et al., 2010). Diese bilden sich zu Autophagosomen aus, die dann die umhüllten und beschädigten Mitochondrien zum Abbau an das Lysosom abgeben (Hanna et al., 2012; Bento et al., 2016). Die inaktive Form des BNIP3L/Nix-Rezeptors liegt als C-terminal phosphoryliertes Monomer vor (Marinković und Novak, 2021) (siehe Abbildung 14). Bei Induktion der Mitophagie wird der Rezeptor dephosphoryliert und es kommt zu einer Ausbildung von stabileren BNIP3L/Nix-Dimeren (Marinković et al., 2021). Die Dimere werden durch eine doppelte Phosphorylierung neben der LIR-Domäne aktiviert (Rogov et al., 2017). Die Dimerisierung und Phosphorylierung neben der LIR-Domäne sind für die Initiierung und Rekrutierung von Autophagosomen und für eine effizientere Mitophagie erforderlich (Marinković und Novak, 2021; Marinković et al., 2021). Über die C-terminale LIR-Domäne findet dann (Novak et al., 2010) die Bindung an LC3, welcher der zentrale Regulator der Mitophagie ist, statt (Novak et al., 2010).



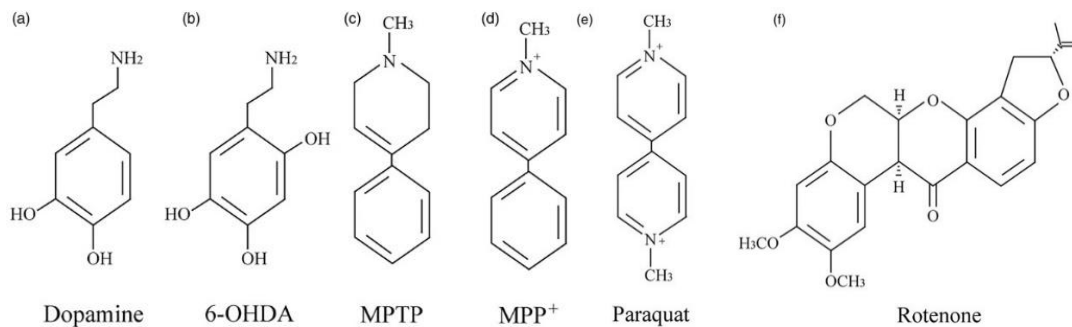
**Abbildung 14: BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie**

Bei der Induktion der BNIP3L/Nix-vermittelten Mitophagie werden phosphorylierte BNIP3L/Nix-Monomere zunächst am C-Terminus dephosphoryliert, um anschließend stabilere BNIP3L/Nix-Dimere zu bilden, die parallel dazu doppelt phosphoryliert werden, und an LC3-Rezeptoren an Phagophoren binden. Erstellt mit BioRender.com

## 2.3 Untersuchte Substanzen

In der Parkinson-Forschung werden einige Toxine eingesetzt, die in der Lage sind, die Parkinson-Pathologie nachzuahmen, indem sie dopaminerge Zellen *in vitro* und *in vivo* selektiv schädigen.

Beispiele hierfür sind Rotenon, 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), Paraquat und 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: Struktur von Dopamin und den wichtigsten Parkinsonmodell-Neurotoxinen**

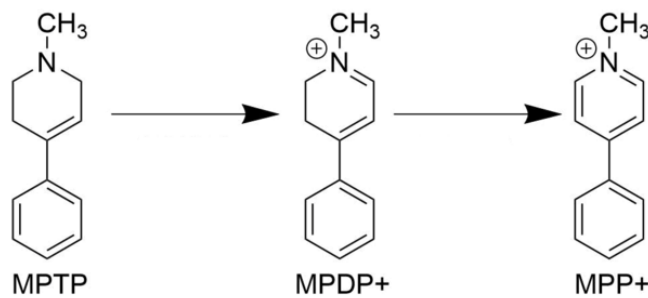
Die Strukturen von Dopamin, 6-OHDA (6-Hydroxydopamin), MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), MPP<sup>+</sup> (1-Methyl-4-phenylpyridinium), Paraquat und Rotenon sind gezeigt (Zeng et al., 2018)

Sie hemmen alle den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, weisen jedoch einige Unterschiede auf: 6-OHDA hat eine strukturelle Ähnlichkeit mit Dopamin, durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe ist es jedoch für dopaminerge Neuronen toxisch (Blesa et al., 2012). Es wird im Tiermodell bei Mäusen, Ratten, Katzen und Primaten verwendet. Da es nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, muss es direkt an die Zielregion verabreicht werden (Chia et al., 2020). Nach der Aufnahme über den Dopamintransporter (DAT) hemmt es vor allem die Aktivität des Komplex I in dopaminergen Neuronen (Glinka et al., 1996). Dies führt zu einer Degeneration der Neuronen und motorischen Dysfunktionen (Ungerstedt, 1968). Paraquat ist ein häufig verwendetes Herbizid und weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu MPP<sup>+</sup> auf (Bartlett et al., 2009). Es gibt widersprüchliche Studien darüber, ob Paraquat die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Bartlett et al., 2009). Im Gegensatz zu MPP<sup>+</sup> wird Paraquat nicht über den DAT aufgenommen, reichert sich auch nicht in Mitochondrien an und hemmt den mitochondrialen Komplex I auch nicht direkt (Richardson et al., 2005). Es wirkt vielmehr indirekt im Zytosol mit einer dortigen Produktion von ROS und einem indirekten Einfluss auf die Mitochondrienfunktion (Miller, 2007). Das Insektizid Rotenon hemmt im Tiermodell bei Ratten durch systemische Applikation nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke gezielt den Komplex I (Betarbet et al., 2000). Dies führt zu einer Degeneration dopaminerger Neurone in der *SNpc* mit Lewy-Körperchen-ähnlichen Einschlüssen und motorischer Dysfunktion (Betarbet et al., 2000). Im Gegensatz zu MPTP verursachen Paraquat und Rotenon eine Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein und Einschlüsse, die Lewy-Körperchen ähneln. Allerdings reproduzieren sie die Parkinson-assoziierte Wirkung weniger zuverlässig (Jackson-Lewis et al., 2012).

### 2.3.1 Das Toxin MPTP/MPP<sup>+</sup>

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde das Toxin 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) verwendet. Es handelt sich um das am besten charakterisierte Toxin-Modell (Beal, 2010). 1982 hat es erstmals in größerem Rahmen Aufmerksamkeit erregt. Der Neurologe William Langston aus Kalifornien und seine Kollegen stellten zunächst nicht erklärbare Parkinson-Symptome bei einem Anfang 40-jährigen Mann und im Verlauf bei sechs weiteren jungen Patienten aus Nordkalifornien fest (Langston, 2017; Langston et al., 1983). Diese Patienten wiesen praktisch alle motorischen Merkmale der typischen Parkinsonschen Krankheit auf, einschließlich asymmetrischer Befunde und Tremor (Ballard et al., 1985) und waren alle ausgeprägt L-Dopa responsiv (Langston et al., 1983). Die Gemeinsamkeit der Fälle war das Auftreten von Symptomen nach dem systemischem Konsum von „neuem“, synthetisch hergestelltem Heroin (Langston et al., 1983). Langston identifizierte als wahrscheinliche Ursache für die parkinsonogene Wirkung in den Heroinproben zunächst die Substanzen 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) und 1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy-piperidin (MPPP) (Langston et al., 1983). Später identifizierte er den Hauptmetaboliten 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) (Langston et al., 1984). Bereits 1979, drei Jahre vor der Entdeckung von Langston, gab es in der Literatur einen ähnlich beschriebenen Fall. Ein 23-jähriger Mann litt 18 Monate lang an Parkinsonismus, der durch den Missbrauch von selbst hergestelltem 4-Propyloxy-4-phenyl-N-methylpiperidin (PPMP) verursacht wurde. Dieses sollte zu einem opiatähnlichen Hochgefühl führen. Der Parkinsonismus sprach auf dopaminrezeptorstimulierende Medikamente an. Der junge Mann verstarb schließlich an einer Überdosis Drogen, darunter Kokain. Bei der Autopsie wurden histologisch Schädigungen dopaminergener Neuronen in der *Substantia nigra* sowie intrazytoplasmatische Lewy-Körperchen nachgewiesen (Davis et al., 1979). PPMP war bekannt dafür, potenter als Pethidin zu sein (Davis et al., 1979), dem ältesten vollsynthetischen Opioid. MPTP ist letztlich ein Abbauprodukt bei der Synthese von einem Pethidin-ähnlichen Narkotikum, das als Heroinersatz verwendet wird (Singer et al., 1986; Javitch et al., 1985).

MPTP ist eine lipophile Verbindung, die nach intravenöser Applikation über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangt, sie ist aber selbst nicht toxisch (Langston, 2017). Im Gehirn wird MPTP allerdings, vor allem durch die astrozytäre Monoaminoxidase B (MAO B) (Heikkila et al., 1984; Ransom et al., 1987) schnell in den toxischen Metaboliten 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) umgewandelt (Langston et al., 1984; Markey et al., 1984) (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: MPTP und seine Oxidationsprodukte MPDP<sup>+</sup> und MPP<sup>+</sup>**

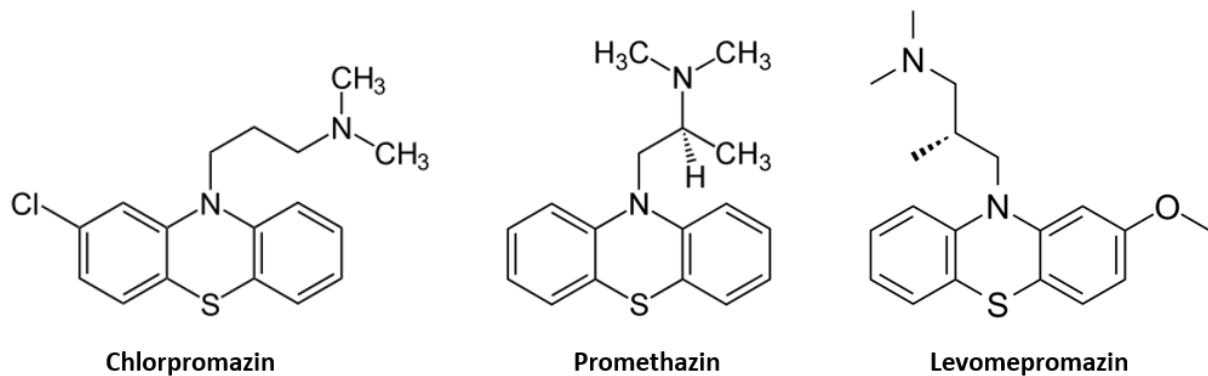
Vor allem MAO B katalysiert die Oxidation von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) zu 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP<sup>+</sup>), gefolgt von einer weiteren Oxidation zum vollaromatischen 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)

Astrozyten akkumulieren das toxische MPP<sup>+</sup> aber nicht, sondern setzen es frei. Aufgrund seiner hohen Affinität zum Dopamintransporter (DAT) der Neurone in der *SNpc* wird es dort selektiv aufgenommen (Shen et al., 1985; Javitch et al., 1985). Innerhalb der dopaminergen Neurone wird MPP<sup>+</sup> durch das  $\Delta\psi_m$  als treibende Kraft in den Mitochondrien aufkonzentriert und kann dort bis zu millimolare Konzentrationen erreichen (Ramsay et al., 1986a; Ramsay und Singer, 1986). Bei Erreichen toxischer Werte hemmt MPP<sup>+</sup> vor allem signifikant den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Ramsay et al., 1986b). Die Inhibition des Komplex I beeinträchtigt den Elektronentransport innerhalb der Atmungskette. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung von Elektronen aus den Eisen-Schwefel-Clustern, was zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988) und dem Risiko für die Entstehung von oxidativem Stress führt (Drechsel und Patel, 2008) (siehe Abschnitt 2.1.8.4). Außerdem wird die Synthese von ATP verringert (Ramsay et al., 1991; Di Monte et al., 1986). Mit einer verminderten ATP-Synthese geht wiederum ein Verlust des  $\Delta\psi_m$  einher (Blum et al., 2001). Dies kann neben den oxidativen Schäden zum Abbau von Mitochondrien und letztendlich zum Absterben von Neuronen führen (Prasertsuksri et al., 2023). Der Metabolit MPP<sup>+</sup> gilt als das eigentliche Parkinson-Toxin. Allerdings kann es nicht systemisch eingesetzt werden, da es die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann.

Aufgrund der selektiven Toxizität von MPP<sup>+</sup> für dopaminerge Neurone und seiner Auswirkungen auf die Atmungskette, die oxidativen Stress verursachen kann, ist es eindeutig an der Pathogenese einer MPP<sup>+</sup> induzierten Parkinson-Form beteiligt (Langston, 2017; Matsunaga et al., 1996; Ali et al., 1994). Und da MPP<sup>+</sup> beim Menschen sowie im Tiermodell bei Mäusen und Primaten einen Parkinson-ähnlichen Krankheitszustand hervorruft, der praktisch nicht von der Parkinsonschen Krankheit zu unterscheiden ist (Langston et al., 1983; Ballard et al., 1985), eignet es sich hervorragend als Modell und wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet.

### 2.3.2 Das Antioxidans Phenothiazin

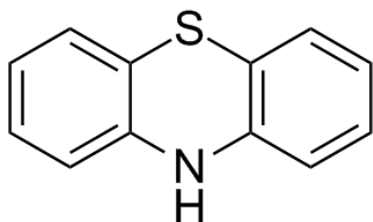
Phenothiazin (PHT) und seine Derivate sind vielseitige Verbindungen, die schon seit vielen Jahren in der Forschung und Medizin bekannt sind und eingesetzt werden. Nachgewiesen wurden unter anderem eine antihelminthische, antiallergische und antipsychotische Wirkung. Insbesondere aufgrund ihrer antipsychotischen Wirkung finden sie bis heute breite Anwendung in der Pharmakotherapie (Ohlow und Moosmann, 2011) (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17: Phenothiazin-Derivate**

Die chemischen Strukturen von Chlorpromazin, Promethazin und Levomepromazin

Im Unterschied zu den PHT-Derivaten besitzt die Leitsubstanz PHT (siehe Abbildung 18) keine antipsychotische Wirkung. In den letzten Jahren wurden vermehrt seine antioxidativen Eigenschaften beschrieben (Moosmann et al., 2001; Ohlow et al., 2017). Aufgrund seiner chemischen Struktur und lipophilen Eigenschaften kann PHT im Gegensatz zu dem ebenfalls kettenbrechenden Antioxidans Vitamin E leicht die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Tadros und Abdel Wahab, 1962). Daher eignet es sich grundsätzlich für die Anwendung bei neurodegenerativen Erkrankungen.



**Abbildung 18: Phenothiazin**

Die chemische Struktur von Phenothiazin

Bei PHT handelt es sich um ein kettenbrechendes Antioxidans, das die vor allem im Rahmen der Lipidoxidation an Membranen durch freie Radikale verursachte Kettenreaktion unterbricht. Seine

antioxidative Wirkung beruht primär auf der Anwesenheit einer unsubstituierten Stickstoff-Wasserstoff (NH)-Gruppe (Moosmann et al., 2001) (siehe Abbildung 18). Im Gegensatz dazu weisen die Stickstoff (N)-substituierten PHT-Derivate (siehe Abbildung 17) keine antioxidative Wirksamkeit auf (Mocko et al., 2010). Der Wirkmechanismus beruht auf einer Abspaltung von Wasserstoff am Stickstoff-Atom und Bindung des Radikals an PHT, dabei entsteht ein Mesomerie-stabilisiertes PHT und die Lipidperoxidationskettenreaktion wird unterbrochen. Der Vorteil von PHT liegt in seiner gegenüber anderen kettenbrechenden Antioxidanzien wie Vitamin E in einer 10-fach höheren Geschwindigkeit/Potenz und darin, dass es Blut-Hirn-Schrankengängig ist.

In primären neuronalen Zellkulturen und der permanenten Zelllinie SH-SY5Y zeigte PHT ausgeprägte antioxidative und neuroprotektive Eigenschaften in Rotenon- und MPP<sup>+</sup>-Parkinsonmodellen in niedriger nanomolarer Konzentration (Hajieva et al., 2009). In primären dopaminergen Neuronenkulturen von Ratten bewahrte PHT die neuronale Integrität und verbesserte signifikant das Zellüberleben (Tapias et al., 2019). In Mittelhirnschnitten der SN von Ratten konnte nachgewiesen werden, dass PHT signifikant vor oxidativen Schädigungen schützt und damit Neurotoxizität verhindert (Tapias et al., 2019). *In vivo* zeigten sich bei Ratten unter PHT verringerte Verhaltensdefizite und eine verlängerte Überlebensdauer nach Exposition mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon (Tapias et al., 2019). Ebenfalls *in vivo* konnte bei Wirbellosen unter PHT eine Verhinderung der Neurodegeneration beobachtet werden (Mocko et al., 2010).

In Anbetracht dessen, dass oxidativer Stress bei der Degeneration dopaminergener Neuronen eine bedeutende Rolle spielt, könnten kettenbrechende Antioxidanzien wie PHT, das bisher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* starke antioxidative Wirkung gezeigt hat, ein möglicherweise geeigneter prophylaktischer und therapeutischer Ansatz bei der Parkinsonschen Krankheit sein. Es liegen bislang jedoch nur wenige Arbeiten vor, daher bedarf es noch weiterer Untersuchungen, sowohl in *in vitro*- als auch *in vivo*-Modellen, insbesondere an Säugetieren und beim Menschen. In dieser Arbeit wurde PHT untersucht, um einen Beitrag zur weiteren Erforschung dieses vielversprechenden Antioxidans zu leisten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte und Hersteller**

Gerät	Hersteller
Amersham Bildgebungsgerät 600	GE Healthcare Life Sciences
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERACELL 240i	Thermo Scientific
Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific
Konfokal Mikroskop TCS ( <i>true confocal spinning</i> ) SP5	Leica
Kühl- und Gefrierschränke (4 °C/ -20 °C)	Liebherr
Mikroskop CKX31	Olympus
Mikroskop CKX41	Olympus
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss
Multiskan RC, Modell Nr. 351	Thermo Labsystems
pH-Meter, CG 820	Schott
Pipette research plus 0.5-10 µl	Eppendorf
Pipette 50 µl	Eppendorf
Pipette Gilson Pipetman Classic 2-20 µl	Thermo Scientific
Pipette Gilson Pipetman Classic 20-200 µl	Thermo Scientific
Pipette Gilson Pipetman Classic 100-1000 µl	Thermo Scientific
Pipettierhelfer, Pipetboy Accu-jet®pro	Brand
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph
PowerPac Basic	Bio-Rad
Sterilbänke	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf
Trans-Blot ®Turbo Transfer System	Bio-Rad
Ultraschallprozessor UP50H (Sonicator)	Hielscher
Vortexer	Heidolph-Elektro KG
Waage BL 6100	Sartorius
Wärmeschrank Typ BE 30	Memmert
Wasserbad 18 L, 462-0558	VWR

Zähler/Handzähler	IVO
Zählkammer, Neubauer	VWR
Zentrifuge Hereaus Fresko 17	Thermo Scientific
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Hereaus

### 3.1.2 Chemikalien

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien mit Bestellnummer und Bezugsquelle**

<b>Chemikalien</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Antibiotika-Antimykotikum (AB-AM) (100x)	15240062	Thermo Fisher Scientific
N6,2'-O-dibutyryl-Adenosin 3',5'-cyclisches Monophosphat (db-cAMP)	D0627-1G	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.2	Roth
Ethanol	85.033.360	VWR Chemicals
Fetales Kälberserum (FCS: <i>fetal calf serum</i> )	10270106	Thermo Fisher Scientific
Carbonyl cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP)	0453	Tocris
Dulbecco's modified eagle's medium/F12 (DMEM/F12)	12-719F	Lonza
Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF: <i>fibroblast growth factor</i> )	4114-TC	R&D Systems
Fibronectin Lösung	F1141-5MG	Sigma-Aldrich
Gliazellen abgeleiteter neurotropher Faktor (GDNF: <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> )	212-GD-010	R&D Systems
Glycerol	G9012	Sigma-Aldrich
1-Methyl-4-Phenylpyridinium Iodid (MPP <sup>+</sup> )	D048	Sigma-Aldrich
N-2 Supplement (100x)	17502048	Thermo Fisher Scientific
OmniPur® Acrylamid Bis-Acrylamid, 29:1, 40 % Lösung	1710-1L	Merck
Phenothiazin (PHT)	88580	Sigma-Aldrich
p-Phenylendiamin-dihydrochlorid	P1519	Sigma-Aldrich

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS: <i>Phosphate buffered saline</i> )	D8537	Sigma-Aldrich
Poly-L-Ornithin (PLO)	P3655	Sigma-Aldrich
Polyvinylalkohol	P8136	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	87128	Fluka
Trypanblau-Lösung (0.4 %)	93595	Sigma-Aldrich
0.5 % Trypsin-EDTA (10x)	15400054	Thermo Fisher Scientific
Wasserstoffperoxid (30 %)	H1009	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	4227.3	Roth
Rinder Serumalbumin (BSA: <i>bovine serum albumin</i> )	A7906	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	A3678	Sigma-Aldrich
Bisbenzimid H33258 Fluorochrom, Trihydrochlorid (DAPI)	382061	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	161-0404	BioRad
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4984.1	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	A2937	AppliChem
Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA)	3054.1	Roth
Salzsäure (37 %) (HCL: <i>hydrochloric acid</i> )	4625.1	Roth
Isopropanol	6752.2	Roth
Kalium Chlorid (KCl)	6781.3	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3904.1	Roth
Luminol	123072	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	A0830	AppliChem
Methanol	8388.1	Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	S8032	Sigma-Aldrich
Natrium Chlorid (NaCl)	3957.5	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS: <i>Sodium Dodecyl Sulfat</i> )	1610302	Bio-Rad
Natrium Hydroxid (NaOH)	6771.1	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	1610801	Bio-Rad
Paraformaldehyd (PFA)	818715	Merck
p-Cumarsäure	C9008	Sigma-Aldrich

Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	P0044	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	11873580001	Sigma-Aldrich
Roti®-Seal	6473.1	Roth
Sucrose	4661.2	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	4855.2	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid (TRIS-HCl)	9090.3	Roth
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich
Tween 20	9127.1	Roth

### 3.1.3 Materialien

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Materialien mit Bestellnummer und Bezugsquelle**

Material	Bestellnummer	Bezugsquelle
Aluminiumfolie	0954.1	Roth
Deckgläser (12 mm)	ECN 631-1577	VWR
Deckglas für Neubauer Zählkammer	L189.1	Roth
15 ml Cellstar Zentrifugenröhrchen	188271	Greiner Bio-One
50 ml Cellstar Zentrifugenröhrchen	227261	Greiner Bio-One
Graduierte Messpipetten 5 ml	AH39.1	Roth
Graduierte Messpipetten 10 ml	AH41.1	Roth
Graduierte Messpipetten 20 ml	AH42.1	Roth
Filterspitzen 10 µl	771288	Greiner Bio-One
Filterspitzen 20 µl	774288	Greiner Bio-One
Filterspitzen 200 µl	739288	Greiner Bio-One
Filterspitzen 1000 µl	740288	Greiner Bio-One
Objekträger, SuperFrost® plus	OTS	Hartenstein
Parafilm	PF10	Hartenstein
Pasteurpipetten kurz	PP06	Hartenstein
Pasteurpipetten lang	PP07	Hartenstein
Pipettierball	C530.1	Roth
Reaktionsgefäße 0.5 ml	RK05	Hartenstein
Reaktionsgefäße 1.5 ml	RK1G	Hartenstein

Reaktionsgefäße 2 ml	RK2G	Hartenstein
Zellkulturschalen (60 mm x 16 mm)	93060	TPP
Zellkulturschalen (96 mm x 21 mm)	93100	TPP
Zellkulturtestplatten (24-Well-Platten)	92024	TPP
Zellspachtel 195 mm	99010	TPP
Mini-PROTEAN® Abstandsplatten 1.0 mm	1653311	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® Glasplatten	1653308	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra Cell Gelgießstand mit 2 Befestigungsrahmen	1658050	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Gelgießstand-Dichtungsmatten	1653305	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® Kamm 10-Well, 1.0 mm	1653359	Bio-Rad
Proben-Einführhilfe	1653146	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Elektrophorese Kammer	1658003FC	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® Tetra Companion Laufmodul	1658038	Bio-Rad
Schaber/Gel-Auslöser für Mini-PROTEAN® System	1653320	Bio-Rad
Deckglaspinzette	PZ12	Hartenstein
Splitterpinzette	PZ04	Hartenstein
Vernichtungsbeutel	VB20	Hartenstein
Reaktionsgefäße 1.5 ml	S1615-5500	STARLAB
Tip one Filter Pipettenspitzen 10/20 µl	S1120-3710	STARLAB
Tip one Filter Pipettenspitzen 100 µl	S1123-1740	STARLAB
Tip one Filter Pipettenspitzen 200 µl	S1120-8710	STARLAB
Tip one Filter Pipettenspitzen 1000 µl	S1126-7710	STARLAB
Tip one Pipettenspitzen weiß 10 µl	S1111-3000	STARLAB
Tip one Pipettenspitzen gelb 200 µl	S1111-0006	STARLAB
Tip one Pipettenspitzen blau 1000 µl	S1111-6001	STARLAB
Pipettenspitzen 200 µl, rund	I1022-0000	STARLAB
96-Well Mikrotiterplatte	82.1581	Sarstedt
Einmal-Filterhalter 0.2 µm, steril	FI02	Hartenstein
Serologische Pipette 10 ml	607107	Greiner bio-one
Serologische Pipette 5 ml	606180	Greiner bio-one
Pasteurpipette Plastik 3 ml	PP05	Hartenstein

3.1.4 Weitere Materialien und Kits

**Tabelle 4: Liste der weiteren Materialien und Kits mit Bestellnummer und Bezugsquelle**

Material/Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
Immersionsöl 518F	444962-0000-000	Zeiss
Nährmedium Dulbecco's modified eagle's medium/F12 (DMEM)	12-719F	Lonza
PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter	26617	Thermo Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Kit: Pierce BCA Protein Assay Reagens A Pierce BCA Protein Assay Reagens B Albumin Standard Ampullen	23225	Thermo Scientific
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini 0.2 µm Nitrocellulose Transfer Kit: Trans-Blot® Turbo™ 1L 5x Transferpuffer Trans-Blot® Turbo™ 80 Transferstapel Trans-Blot® Turbo™ 40 Nitrocellulose Membranen	170-4270	Bio-Rad

3.1.5 Puffer und Lösungen

Standardpuffer, angesetzt:

*(pH-Werte wurden durch Adjustierung mit HCl und NaOH erreicht)*

**10x Phosphate buffered saline (PBS)**

NaCl	320 g
KCl	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	56.g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.6 g
H <sub>2</sub> O	4 l
pH	7.4

**1x PBS**

H <sub>2</sub> O	900 ml
10 x PBS	100 ml
pH	7.4

**1x PBS-tween (PBS-t)**

H <sub>2</sub> O	900 ml
10x PBS	100 ml
Tween 20	0.5 %
pH	7.4

**4x Trenngelbuffer (SDS-PAGE, Laemmli)**

TRIS	1.5 M
SDS	0.4 %
H <sub>2</sub> O	1 l
pH	8.8

**4x Sammelgelbuffer (SDS-PAGE, Laemmli)**

TRIS-HCl	0.6 M
SDS	0.4 %
H <sub>2</sub> O	1 l
pH	6.8

**5x Ladepuffer**

TRIS-HCl	750 mM
----------	--------

SDS	15 %
H <sub>2</sub> O	3.85 ml
Glycerol	3.85 ml
Bromphenolblau	0.1 %
2-Mercaptoethanol	2.5 ml
pH	6.8

**10x Laufpuffer (SDS-PAGE, Laemmli)**

Glycin	1.92 M
TRIS-HCl	97.3 mM
TRIS	152.7 mM
SDS	1 %
H <sub>2</sub> O	4 l
pH	8.3

**1x Laufpuffer**

10x Laufpuffer	100 ml
H <sub>2</sub> O	900 ml

**1x Transferpuffer Bio-Rad**

5x Transferpuffer	200 ml
H <sub>2</sub> O	600 ml
Ethanol	200 ml

**3x Lysepuffer**

TRIS-HCl	150 mM
----------	--------

Sucrose	30 %
EDTA	1.5 mM
EGTA	1.5 mM
pH	6.8

**1x Lysepuffer**

3x Lysepuffer	333 µl
SDS 20%	100 µl
10x Phosphatase-Inhibitor	100 µl
50x Protease-Inhibitor	20 µl
Milli Q-H <sub>2</sub> O	447 µl
pH	7.4

**Lösungen, angesetzt:**

**Ammoniumpersulfat (APS) 10%**

H <sub>2</sub> O	10 ml
APS	1 g

**Blockier- und Permeabilisierungslösung (IHC)**

1x PBS	699 µl
BSA 10%	300 µl
Triton X-100	1 µl

**Blockierlösung für Western Blots (WB)**

PBS-t	100 ml
Magermilchpulver	4 g

**BSA 10% (sterilfiltriert, bei 4 °C gelagert)**

PBS 50 ml

BSA 5 g

**MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XROS Vorratslösung (bei -20 °C gelagert)**

MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XROS 50 µg

DMSO 100 µl

**DAPI-Vorratslösung**

Methanol 100 ml

Bisbenzimidazole H33258 5 mg

**DAPI-Lösung**

PBS 999 µl

DAPI-Vorratslösung 1 µl

**Eindeckmedium (in 1 ml Spritzen bei -80 °C gelagert)**

PBS 7 ml

Glycerol 3 ml

Polyvinylalkohol 1 g (bei 60° in 1x PBS gelöst)

p-Phenylendiamin-dihydrochlorid 10 mg

pH 8

**Entwickler Chemilumineszenz-Lösung A (ECL-Lösung)**

0,1 M TRIS-HCl 100 ml

Luminol	25 mg
pH	7

**ECL-Lösung B**

p-Cumarsäure	11 mg
DMSO	10 ml

**Entwicklerlösung für Western Blots**

ECL Lösung A	1000 µl
ECL Lösung B	100 µl
Wasserstoffperoxid 30%	1 µl

**Lösung für primäre Antikörper (IHC)**

1x PBS	900 µl
BSA 10%	100 µl
Primäre Antikörper	siehe Tabelle 5

**Lösung für sekundäre Antikörper (IHC)**

1x PBS	900 µl
BSA 10%	100 µl
Sekundäre Antikörper	siehe Tabelle 6

**Lösung für primäre Antikörper (WB)**

PBS-t	10 ml
NaN <sub>3</sub> 10%	100 µl
Primäre Antikörper	siehe Tabelle 5

**Lösung für sekundäre Antikörper (WB)**

PBS-t	10 ml
Sekundäre Antikörper	siehe Tabelle 6

**Ponceau S-Lösung**

H <sub>2</sub> O	10 ml
CH <sub>3</sub> COOH	1 %
Ponceau S	0.075 %

**Paraformaldehyd (PFA) 4%**

H <sub>2</sub> O	100 ml
PFA	4 g

**0.4% Trypanblau-Lösung**

1 x PBS, steril	9 ml
0.4 % Trypanblau	1 ml

**Natriumdodecylsulfat (SDS) 20%**

H <sub>2</sub> O	50 ml
SDS	10 g

**10x Phosphatase-Inhibitor**

Phosphatase-Inhibitor Cocktail 3	1 Tablette
H <sub>2</sub> O	1 ml

**50x Protease-Inhibitor**

Protease-Inhibitor Cocktail	1 Tablette
H <sub>2</sub> O	1 ml

**Natriumazid 10%**

NaN <sub>3</sub>	1 g
H <sub>2</sub> O	10 ml

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primäre Antikörper

**Tabelle 5: Liste der verwendeten primären Antikörper mit Wirts Spezies, Bestellnummer, Bezugsquelle und Verdünnung**

<b>Antikörper gegen</b>	<b>Wirts Spezies</b>	<b>Verdünnung WB</b>	<b>Verdünnung IHC</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BNIP3L/Nix	Kaninchen	1:1000	1:200	12396	Cell Signaling
DLP-1	Maus	1:1000	1:200	611113	BD Transduction Laboratories
Histon H3	Maus	1:1000	-	14269	Cell Signaling
LC3	Maus	-	1:200	0260-100	NanoTools
MAP2	Meer- schweinchen	-	1:200	188004	Synaptic Systems
MFF XP	Kaninchen	1:1000	1:200	84580	Cell Signaling
MFN-1	Kaninchen	1:1000	1:200	14739	Cell Signaling
MFN-2	Kaninchen	1:1000	1:200	HPA 030554	Sigma-Aldrich
OPA-1	Maus	1:1000	-	612607	BD Transduction Laboratories
OPA-1	Kaninchen	-	1:200	67589	Cell Signaling
OXPHOS	Maus	1:1000	-	ab110411	Abcam

Parkin	Maus	1:1000	1:200	4211	Cell Signaling
PINK1	Kaninchen	1:1000	-	6946	Cell Signaling
PINK1	Maus	-	1:200	Cs-517353	Santa Cruz Biotechnology
P62	Meer- schweinchen	-	1:200	GP62-C	Progen
TIM23	Maus	1:1000	1:200	611223	BD Transduction Laboratories
TOM20	Kaninchen	1:1000	1:200	42406	Cell Signaling

### 3.1.6.2 Sekundäre Antikörper

**Tabelle 6: Liste der verwendeten sekundären Antikörper mit Wirts Spezies, Bestellnummer, Bezugsquelle und Verdünnung**

Antikörper gegen	Wirts Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IHC	Bestellnummer	Bezugsquelle
Cy 2 Meerschweinchen	Esel	-	1:400	706-225-148	Jackson Immuno Research
Cy 3 Kaninchen	Esel	-	1:400	711-165-152	Jackson Immuno Research
Cy 3 Kaninchen	Ziege	-	1:400	111-165-003-	Jackson Immuno Research
Cy 5 Maus	Esel	-	1:400	715-175-150	Jackson Immuno Research
Meerrettich-Peroxidase Maus (HRP: <i>horse radish peroxidase</i> )	Esel	1:10000	-	715-035-151	Jackson Immuno Research

HRP Kaninchen	Esel	1:10000	-	711-035-152	Jackson Immuno Research
---------------	------	---------	---	-------------	-------------------------

### 3.1.7 Farbstoff

**Tabelle 7: Verwendeter Farbstoff mit Bestellnummer, Bezugsquelle, Konzentration und Zielstruktur**

Fluorophor	Zielstruktur	Konzentration IHC	Bestellnummer	Bezugsquelle
MitoTracker Red CM-H <sub>2</sub> XROS	Mitochondrien	100 nM	M7513	Thermo Fisher Scientific

### 3.1.8 Zelllinie

**Tabelle 8: Verwendete Zelllinie mit Bezugsquelle**

Zelllinie	Bezugsquelle
Lund human mesencephalic (LUHMES) Zellen	Labor von Jochen Klucken

Als *in vitro* Modellsystem wurden LUHMES (**lund human mesencephalic**) Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um humane, durch Einbringung eines v-myc Onkogen Vektoren immortalisierte neuronale Stammzellen aus dem Mittelhirn (Schildknecht et al., 2013; Lotharius et al., 2002). Diese lassen sich innerhalb von 5-6 Tagen unter Zugabe von GDNF und cAMP in dopaminerge Neurone differenzieren (Schildknecht et al., 2013). LUHMES-Zellen gelten als besonders gut geeignet für *in-vitro* Experimente bei der Parkinsonschen Krankheit, da sie sich schnell gewinnen und leicht und kostengünstig reproduzieren lassen (Beliakov et al., 2023). Darüber hinaus handelt es sich um menschliche und rein dopaminerge Neurone, die biochemisch und morphologisch den primären Neuronen ähneln (Lotharius et al., 2005; Beliakov et al., 2023). Sie exprimieren neben dem vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) (Lotharius et al., 2002), einem integralen Membranprotein synaptischer Vesikel zum Transport von Monoaminen (Bernstein et al., 2014) den Dopamintransporter (DAT) sowie die Tyrosinhydroxylase (TH) (Lotharius et al., 2002), das Schlüsselenzym für die Biosynthese von Katecholaminen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Beschichtung von Zellkulturschalen und Deckgläsern

Die bei 37 °C angewärmten 6 cm Zellkulturschalen sowie die 12 mm Deckgläser in einer 24-Well-Platte wurden mit einer Lösung aus Poly-L-Ornithin (PLO), Fibronectin und sterilem MilliQ-H<sub>2</sub>O beschichtet (genaue Volumenangaben siehe Tabelle 9) (aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit der englische Begriff Well statt der deutschen Bezeichnung Mulde oder Vertiefung verwendet). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator mit 20 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid wurde die Lösung entfernt. Anschließend wurden die Wells jeweils dreimal mit der gleichen Menge sterilem MilliQ-H<sub>2</sub>O, wie bei der Beschichtung verwendet, gewaschen und luftgetrocknet. Die gesamten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 9: Liste mit Volumenangaben der verwendeten Komponenten pro Schale bzw. Deckglas**

Komponente	6 cm Schale	12 mm Deckglas in einer 24-Well-Platte
MilliQ-H <sub>2</sub> O	2.5 ml	500 µl
PLO (10 mg/ml)	12.5 µl	2.5 µl
Fibronectin (1 mg/ml)	2.5 µl	0.5 µl

#### 3.2.1.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung der LUHMES (**l**und **h**uman **m**esencephalic) Stammzellen (siehe Abschnitt 3.1.8) erfolgte in den zuvor beschichteten Zellkulturschalen (siehe Abschnitt 3.2.1.1) bei 37 °C aufgewärmtem Vorratsmedium, bestehend aus DMEM/F12-Medium, N-2 Supplement und AB-AB, ergänzt um FGF und FCS (siehe Volumenangaben Tabelle 10) im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C mit 20 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid.

**Tabelle 10: Liste der verwendeten Komponenten für Vorrats-, Proliferations- und Differenzierungsmedium**

Komponente	Vorratsmedium	Proliferationsmedium pro 6 cm Schale	Differenzierungsmedium pro 24-Well-Platte	Differenzierungsmedium pro Well in 24-Well-Platte
DMEM/F12	49 ml	3 ml	12 ml	500 µl
N-2 Supplement (100x)	500 µl			

<b>AB-AM</b>	500 µl			
<b>FGF (20µg/ml)</b>	-	6 µl	-	
<b>FCS</b>	-	6 µl	-	
<b>cAMP</b>	-	-	120 µl	
<b>Tetracyclin</b>	-	-	12 µl	
<b>GDNF</b>	-	-	1,2 µl	

Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Proliferationsmediums (siehe Tabelle 10). Wenn die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreichten, wurden sie passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Entfernung des alten Mediums mit je 500 µl Trypsin-EDTA und PBS für 3 min bei 37 °C, 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um sie vom Schalenboden abzulösen.

Trypsin sorgt bei adhären wachsenden Zellen für eine enzymatische Ablösung des Zellrasens vom Kulturgefäß.

Die Trypsinbehandlung wurde nach 3 min mit 150 µl FCS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit 1000 µl des auf 37 °C erwärmten Vorratsmediums vom Schalenboden gespült, in ein 15-ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und 4 min bei 1200 rpm und 25 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in frischem Proliferationsmedium (siehe Tabelle 10) resuspendiert. Schließlich wurde die Suspension im Verhältnis 1:5 auf neue, beschichtete 6 cm Zellkulturschalen ausgesät.

### 3.2.1.3 Zelldifferenzierung

Um die Zellen zu differenzieren, wurden sie gemäß Abschnitt 3.2.1.2 nach Entfernung des alten Mediums zum Ablösen vom Schalenboden einer Trypsinbehandlung für 3 min bei 37 °C im Inkubator bei 20 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> unterzogen. Anschließend wurde die enzymatische Behandlung mit 150 µl FCS gestoppt, der Zellrasen vom Schalenboden gespült und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl mit 50 µl Trypanblau (im Verhältnis 1:1) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die restliche Zellsuspension wurde 4 min bei 1200 rpm und 25 °C zentrifugiert.

Trypanblau ist ein Farbstoff, der selektiv nur in tote, membrandurchlässige Zellen eindringen kann, bei lebenden Zellen kann er aufgrund seiner Größe die intakte Membran nicht passieren. Tote Zellen erscheinen unter dem Mikroskop somit dunkelblau, lebende hell.

Die Zellanzahl im gesamten Volumen wurde durch Auszählen der lebenden Zellen innerhalb weniger Minuten nach dem Mischen der Zellsuspension mit Trypanblau mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Olympus-Mikroskop CKX31 und der folgenden Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Zellanzahl}}{\text{Gesamtvolumen}} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{0.2\mu\text{l}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 2 \times \text{Volumen Zellsuspension}$$

0.2  $\mu\text{l}$   $\cong$  2 diagonal gegenüberliegenden Quadraten der Zählkammer

Verdünnungsfaktor von Trypanblau = 2

Der Überstand im zentrifugierten 15-ml-Röhrchen wurde abpipettiert, das Pellet mit 1000  $\mu\text{l}$  Vorratsmedium resuspendiert und jeweils 70.000 Zellen/ $\text{cm}^2$  in der mit zuvor beschichteten Deckgläsern ausgestatteten 24-Well-Platte oder in beschichteten 6-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Als Differenzierungsmedium wurden auf 37 °C erwärmtes DMEM/F12, N2, AB-AM, cAMP, Tetracyclin und GDNF entsprechend Tabelle 10 hinzugefügt und die Zellen bei 37 °C, 20 %  $\text{O}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Tetracyclin bewirkt eine Ausschaltung der Proliferation und ermöglicht in Kombination mit GDNF und cAMP die Differenzierung in postmitotische dopaminerge Neurone.

Nach 72 Stunden wurde das Differenzierungsmedium gewechselt. Mit Wechsel des Mediums wurden die Substanzen für die jeweiligen Experimente entsprechend den Angaben aus Tabelle 11 hinzugefügt. Kontrollzellen wurden mit DMSO ergänzt. Die Inkubation der Zellen fand bei 37 °C, 20 %  $\text{O}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  entsprechend der in Tabelle 11 angegebenen Dauer statt.

**Tabelle 11: Liste der verwendeten Substanzen mit Angabe der Inkubationszeitdauer und finaler Konzentration**

Substanz	Finale Konzentration	Dauer
<b>1-Methyl-4-Phenypyridinium (MPP<sup>+</sup>)</b>	10 $\mu\text{M}$	48 Stunden
<b>Phenothiazin (PHT)</b>	20 nM	48 Stunden
<b>Carbonyl cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP)</b>	1 $\mu\text{M}$	48 Stunden

#### 3.2.1.4 Behandlung mit MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS

Für die Färbung von Mitochondrien mit dem speziellen Farbstoff MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS wurde eine Vorratslösung gemäß den Herstellerangaben hergestellt und von dieser 1000 nM in 500  $\mu\text{l}$  Vorratsmedium/Well pipettiert und 25 min bei 37 °C, 20 %  $\text{O}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Abschließend wurde unter dem Mikroskop CKX41 von Olympus kontrolliert, ob eine Rotfärbung der Zellen eingetreten war. Nach Abnahme der MitoTracker-Lösung wurden die Zellen einmal mit 500 $\mu\text{l}$ /Well DMEM/F12 gewaschen, bevor sie mit PFA fixiert wurden.

MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS ist ein reduzierter, nicht fluoreszierender Farbstoff, der erst bei Oxidation fluoresziert. Er diffundiert passiv durch die Plasmamembran lebender Zellen und reichert sich in Mitochondrien mit vorhandenem Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) an. Die Anreicherung erfolgt, weil aktive Mitochondrien oxidierbare Substrate nutzen, um einen elektrochemischen

Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran zu erzeugen, der wiederum zur ATP-Synthese genutzt wird.

#### 3.2.1.5 *Fixierung, Blockierung und Immunfärbung*

Um die Zellen in der 24-Well-Platte auf den Deckgläsern zu fixieren, wurde nach Ablauf der Behandlungsdauer (siehe Tabelle 11 im Abschnitt 3.2.1.3) das alte Medium entfernt und jeweils 500 µl einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lösung) pro Well pipettiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die PFA-Lösung entfernt und die Zellen insgesamt dreimal mit jeweils 500 µl PBS/Well und einer jeweiligen Einwirkdauer von 5 min gewaschen.

PFA wird verwendet, um Gewebe und Zellkulturen zu fixieren, indem Proteine und Nukleinsäuren quervernetzt werden. Dadurch bleiben die zelluläre Struktur und Morphologie weitgehend erhalten. Nach dem dritten Waschschrift wurde PBS entfernt und durch 200 µl/Well Blockier- und Permeabilisierungslösung ersetzt. Diese wurde 5 min bei 4 °C einwirken gelassen.

Das in der Blockier- und Permeabilisierungslösung enthaltene BSA sättigt unspezifische Antikörperbindungen an Oberflächen von Reaktionsgefäßen ab. Die Komponente Triton X-100 führt zur Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran und ermöglicht so den Zugang von Farbstoffen und Antikörpern zur Zelle bzw. zum Zellkern.

Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit jeweils 500 µl PBS/Well für 5 min gewaschen. Danach erfolgte die Behandlung mit 200 µl/Well primärer Antikörperlösung (siehe Abschnitt 3.1.5), welche über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Entfernung der primären Antikörperlösung dreimal mit 200 µl PBS/Well und einer Einwirkdauer von 5 min gewaschen. Anschließend wurden sie mit 200 µl sekundärer Antikörperlösung pro Well (siehe Abschnitt 3.1.5) behandelt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die sekundäre Antikörperlösung abgenommen und die Zellen wurden erneut dreimal mit 200 µl/Well PBS und jeweils 5-minütiger Einwirkdauer gewaschen. Beim nächsten Schritt wurden die Zellen mit 200 µl DAPI-Lösung pro Well behandelt. Die Einwirkzeit betrug 20 min und erfolgte im Dunkeln, gefolgt von zweimaligem Waschen mit jeweils 200 µl/Well PBS und einer Einwirkdauer von 5 min.

Bei DAPI handelt es sich um einen Farbstoff mit direkt fluoreszierender Eigenschaft, der an die DNA im Zellkern bindet.

Abschließend wurden die Deckgläser vorsichtig aus der 24-Well-Platte gehoben, überschüssige Flüssigkeit aufgesaugt und sie mit der beschichteten Seite möglichst luftblasenfrei auf den mit jeweils einem Tropfen Eindeckmedium vorbereiteten Objektträger gelegt. Das Eindeckmedium verhindert ein Ausbleichen der Fluoreszenz. Nach leichtem Andrücken wurde gegebenenfalls vorhandene überschüssige Flüssigkeit erneut aufgesaugt, das Eindeckmedium trocknen gelassen

und die Deckgläser am Rand final mit Roti-Seal auf dem Objektträger fixiert. Die getrockneten Objektträger wurden bis zur weiteren Analyse mit dem Konfokalmikroskop TCS SP5 von Leica bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.1.6 *Mikroskopie*

Von den Zellen auf den Objektträgern wurden unter Verwendung des Konfokalmikroskops TCS SP5 von Leica Bilder in 40- und 63-facher Vergrößerung sowie in 63-facher Vergrößerung mit 3,5-fachem Zoom aufgenommen. Die Laser wurden entsprechend der Exzitation der gekoppelten sekundären Antikörper ausgewählt, gemäß Herstellerangaben eingestellt und mit Pseudo Farben in grün, rot, cyan und gelb hinterlegt. Die aufgenommenen Bilder wurden im tif-Format abgespeichert und mit der Software ImageJ ausgewertet. Dafür wurde der mittlere Grauintensitätswert eines Bildes mit der Anzahl der Zellen, welche über die Zellkernfärbung DAPI ermittelt wurde, ins Verhältnis gesetzt.

### 3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.2.1 *Western Blots*

##### 3.2.2.1.1 Proteinisolierung

Für die Isolierung der Proteine aus den Zellen wurde nach der Behandlung (siehe Tabelle 11, Abschnitt 3.2.1.3) das alte Medium aus den 6 cm Zellkulturschalen entfernt und durch 200  $\mu\text{l}$  1x Lysepuffer ersetzt. Mit dem Zellspachtel wurden die Zellen vorsichtig vom Schalenboden geschabt und anschließend in ein auf Eis liegendes Reaktionsgefäß pipettiert. Ergänzend zur chemischen Lyse der Zellen mittels Lysepuffer wurde die Zellsuspension im Reaktionsgefäß jeweils 2 x für 10 s bei einer Amplitude von 70 mit dem Ultraschallprozessor UP50H mechanisch lysiert und damit die Proteine aus den Zellen freigelegt.

Die im Lysepuffer enthaltenen Protease- und Phosphatase-Inhibitoren dienen dem Schutz der Proteine vor Degradation während der Extraktion und Analyse. EDTA und EGTA chelatieren Metallionen, die als Co-Faktoren vieler Enzyme, unter anderem auch von Proteasen, fungieren. Durch die Chelatisierung der Co-Faktoren dieser Enzyme nimmt die Aktivität des Enzyms ab, da sie für die Reaktion nicht zur Verfügung stehen.

Bis zur Proteinquantifizierung wurden die Reaktionsgefäße bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### 3.2.2.1.2 Proteinquantifizierung

Die Messung der gesamten Proteinmenge erfolgte mit dem Bicichoninsäure-Test (BCA-Test), welcher auf 2 chemischen Reaktionen basiert: Zunächst bilden negativ geladene Proteine, die in

alkalische Lösung mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen gebracht werden, eine Peptidbindung mit den  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, wobei diese komplexiert und zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert werden (Smith et al., 1985). Diese Reaktion wird als Biuretreaktion bezeichnet. Als nächstes reagiert die Bicichoninsäure hochspezifisch mit den  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen und bildet einen Chelat-Komplex. Dieser weist bei 562 nm eine Absorption auf und kann somit photometrisch gemessen werden. Die durch die Reaktionen erzeugte violette Farbe nimmt über einen weiten Bereich steigender Proteinkonzentrationen proportional zu (Smith et al., 1985). Die Messung der Proteine erfolgte unter Verwendung des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits*. Zur Verwendung als Eichgerade wurde zunächst eine Konzentrationsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA-Standard, 2mg/ml) angesetzt, beginnend mit 2 mg/dl, mit sukzessiver Halbierung, und endend mit 0.03125 mg/ml. Anschließend wurden 2 µl jeder Konzentration dieser Reihe mit 200 µl des BCA Protein Reagenz A: B (im Verhältnis 50: 1) in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die zu messenden Proben wurden in zweifacher Ausführung ebenfalls mit jeweils 2 µl und 200 µl der BCA-Lösung A: B (Verhältnis 50: 1) in die Mikrotiterplatte pipettiert und diese für 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm im Auslesegerät Multiskan RC gemessen, und die Proteinmenge in den Proben mittels der von der Software (auf Basis der bekannten Proteinkonzentrationen) erzeugten Eichgerade ermittelt. Aus den beiden Probenwerten wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

#### 3.2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen ausschließlich nach ihrer Molekülgröße bzw. ihrem Molekulargewicht (Dalton), welches 1970 von Ulrich Karl Laemmli entwickelt und beschrieben wurde (Laemmli, 1970). Dabei wandern negativ geladene SDS-Proteinkomplexe im elektrischen Feld zur Anode und werden durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die verwendeten diskontinuierlichen Gele nach Laemmli bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel, und unterscheiden sich in ihrer Acrylamidkonzentration und dem pH-Wert. Der Acrylamidanteil bestimmt die unterschiedliche Porengröße. Je höher der Anteil, desto feinporiger ist das Gel. Im großporigen Sammelgel mit einem pH-Wert von 6.8 werden die Proteine zunächst gesammelt bzw. aufkonzentriert und bei Wechsel ins feinporigere Trenngel mit einem pH-Wert von 8.8 nach ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei wandern kleine Proteine im Gel weiter als große.

Je nach zu erwartender Molekülgröße wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 12-15% oder Gradientengele mit zwei hälftigen Anteilen (obere Hälfte 10 %, untere Hälfte 15 %) gegossen.

Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) sind Katalysatoren für die Polyacrylamidgel-Polymerisation.

**Tabelle 12: Liste der verwendeten Komponenten für die jeweiligen Trenngele (Angabe der Gele in %)**

Gel %	ddH <sub>2</sub> O	Trenngelpuffer	Acrylamid	TEMED	10% APS
10%	5 ml	2.5 ml	2.5 ml	10 µl	100 µl
12%	4.5 ml	2.5 ml	3 ml	10 µl	100 µl
15%	3.75 ml	2.5 ml	3.75 ml	10 µl	100 µl

**Tabelle 13: Liste der verwendeten Komponenten für die jeweiligen Sammelgele (Angabe der Gele in %)**

Gel	H <sub>2</sub> O	Sammelgelpuffer	Acrylamid	TEMED	10% APS
Sammelgel	6.5 ml	2.5 ml	0.75 ml	10 µl	100 µl

Das nach Anleitung (siehe Tabelle 12) angemischte Trenngel wurde zunächst in den Mini-PROTEAN Tetra Cell Gelgießstand zwischen zwei Glasplatten mit 1 mm Abstand gegossen. Um eine glatte Gelgrenze zu erreichen, wurde eine Schicht Isopropanol darüber gegossen. Nach Aushärtung des Trenngels wurde Isopropanol entfernt und der entsprechende Bereich zwischen den Glasplatten mit ddH<sub>2</sub>O ausgewaschen. Anschließend wurde das Sammelgel (siehe Tabelle 13) auf das ausgehärtete Trenngel gegossen. Der noch flüssige Gelbereich wurde mit einem Kamm für 10 Taschen versehen und das Gel aushärten gelassen.

Nach der Proteinquantifizierung wurde aus den ermittelten Konzentrationen ein angemessenes Volumen entnommen, in Reaktionsgefäße pipettiert und mit 1x Lysepuffer auf 20 µl aufgefüllt. Die Proben lagen dabei kontinuierlich auf Eis. Nach Zugabe von 4 µl 5x Ladepuffer und mit einem Gesamtvolumen von 24 µl wurden die Proben 5 min bei 95° C mit dem Thermomixer comfort erhitzt.

Durch das Erhitzen und durch die im 5x Ladepuffer enthaltenen Komponenten 2-Mercaptoethanol sowie Natrium-Dodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) werden die Proteine vollständig denaturiert. Darüber hinaus ummantelt SDS als anionisches Detergens mit seiner negativen Ladung die entfalteten Proteine so sehr, dass ihre Auftrennung ausschließlich auf ihrer Molekülgröße beruht. Glycerol sorgt für eine höhere Dichte und erleichtert damit das Einsinken der Probe in die Geltasche.

Im Anschluss wurden die Proben 1 min bei 700 g und Raumtemperatur zentrifugiert und danach wieder auf Eis gelagert. Die bereits gegossenen Gele wurden in das Laufmodul der MINI-Protean Tetra-Elektrophorese-Kammer eingespannt und jeweils 24 µl Probe in die vorgefertigten Geltaschen pipettiert. Eine der Taschen wurde mit dem vorgefärbten Proteinmarker *PageRuler™* beladen, um später eine genaue Größenbestimmung der Proteinbanden zu ermöglichen.

Danach wurde die Vorrichtung in einen mit 1x Laufpuffer befüllten Tank positioniert und an die

*PowerPac Basic*-Station angeschlossen. Nach einer Laufzeit von 30 min bei einer Spannung von 80 V und dem Übertritt der Proteine vom Sammel- ins Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Das im Ladepuffer zugesetzte Bromphenolblau diente hierbei als Marker für die Proteinlauffront, so dass die Apparatur ausgeschaltet werden konnte, sobald die blau gefärbte Proteinfront das Ende des Gels erreicht hatte.

#### 3.2.2.1.4 Western Blot

Als nächster Schritt erfolgte der Proteintransfer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (*blot* = Abklatsch; *Western Blotting* = Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran). Dazu wurden aus dem Kit *Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini* eine Nitrocellulosemembran und 2 Transferstapel in 1x Transferpuffer getränkt, und anschließend in der Schublade der *BioRad Transblot Turbo* Apparatur übereinandergeschichtet: Die Basis bildete ein Transferstapel, gefolgt von der Nitrocellulosemembran. Auf dieser wurde das Gel gebettet, unter Beachtung, dass zwischen Membran und Gel keine Luftblasen vorhanden sind, da diese die Proteinübertragung verhindern können. Der zweite Transferstapel bildete den Abschluss oberhalb des Gels. Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig aus der Schublade abgegossen und diese anschließend fest verschlossen für 30 min bei max. 25 V und konstanter Stromstärke von 2.5 A in der Apparatur laufen gelassen. Um zu überprüfen, ob der Proteintransfer erfolgreich war, wurde die Nitrocellulosemembran anschließend für 1 min bei Raumtemperatur in eine Ponceau S-Lösung getaucht.

Ponceau S färbt Proteine reversibel traubenkernrot an und ein erfolgreicher Proteintransfer ist daher durch sichtbar gefärbte Proteinbanden gekennzeichnet.

Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in PBS-t für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler Polymax 1040 von Heidolph gewaschen, um die Ponceau S-Lösung und ggf. vorhandene überschüssige Gelreste zu entfernen.

PBS-t enthält das nichtionische Detergens Tween 20, welches während des Waschschruttes zur Blockierung nichtspezifischer Bindungen und Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt wird. Es folgte eine weitere, gezielte Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit Milchpulver. Hierfür wurde die Nitrocellulosemembran 30 min lang mit 25 ml der Blockierlösung für Western Blots (siehe Abschnitt 3.1.5) auf dem Plattformschüttler inkubiert, und diese nach Entfernung 3x für jeweils 10 min mit PBS-t auf dem Schüttler gewaschen.

#### 3.2.2.1.5 Proteindetektion

Zur Detektion der Proteine wurde zunächst die Lösung für primäre Antikörper gemäß Tabelle 5 auf die Membran aufgebracht und diese über Nacht bei 4° C auf dem Plattformschüttler Duomax

1030 von Heidolph inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde die Membran mit PBS-t gewaschen (3x à 10 min) und anschließend die Lösung für sekundäre Antikörper eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler inkubiert.

Die sekundären Antikörper binden dabei an die primären Antikörper, welche wiederum die gesuchten Antigene sondieren.

Es erfolgte ein wiederholter 3-maliger Waschgang für je 10 min mit PBS-t, gefolgt von der Entwicklung der Nitrocellulosemembran mit der Entwicklerlösung für Western Blots (siehe Abschnitt 3.1.5). Dafür wurde 1000 µl ECL-Lösung A, 100 µl ECL-Lösung B und 1 µl 30 %-iges Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gemischt, gleichmäßig auf die Nitrocellulosemembran pipettiert und diese im Amersham Bildgebungsgerät 600 entwickelt.

Die ECL-Lösung A enthält Luminol, ein chemilumineszentes Substrat und die sekundären Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase (HRP, *horse raddish peroxidase*) gekoppelt. In Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert die HRP die Oxidation von Luminol und führt somit zu einer Anregung mit Lichtemission. Das emittierte Licht kann mit einer Kamera festgehalten werden. Die aufgenommenen Bilder wurden als tif-Dateien gespeichert. Die Nitrocellulosemembran wurde erneut 3x für je 10 min mit PBS-t gewaschen und konnte anschließend mit einem weiteren Antikörper inkubiert werden.

#### 3.2.2.1.6 Dichtemessung

Die Quantifizierung der Proteinbanden, die auf der Nitrocellulosemembran entwickelt wurden, erfolgte densitometrisch mittels der *Aida Image Analyzer* Software. Dabei wurde die Intensität der Proteinbanden über einen festgelegten Bereich ermittelt. Als Ladekontrolle dienten die jeweils auf derselben Blotmembran vorliegenden Proteinbanden von Histon H3.

#### 3.2.3 Statistische Auswertung

Die Western Blots wurden in dreifacher Ausführung, jeweils unabhängig voneinander, aus unterschiedlichen Zelllysaten angefertigt. Die immunhistochemischen Arbeiten wurden als biologische Replikate in mindestens zweifacher Ausführung durchgeführt. Für alle Daten dieser Arbeit wurde die einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, gefolgt vom Benjamini & Hochberg Post-hoc Test, und unter Verwendung der Software *GraphPad Prism Version 10.00*, La Jolla California USA, graphpad.com. Alle dargestellten Signifikanzen stammen von den Post-hoc Tests und sind wie folgt gekennzeichnet: Vergleiche von der Kontrollgruppe ausgehend als \*, Vergleiche von der MPP<sup>+</sup>/PHT-Gruppe ausgehend als #. Die Anzahl an \* bzw. # entspricht folgenden p-Werten: \*/# = p < 0.05, \*\*/## = p < 0.01, \*\*\*/### = p < 0.001. Für alle

zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Der Einfluss des Komplex-I-Inhibitors MPP<sup>+</sup> und des Antioxidans Phenothiazin auf die Morphologie der Mitochondrien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression zentraler Mitophagie-Regulatorproteine im humanen Zellmodell der Parkinsonschen Krankheit untersucht. Daten aus der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass es bei LUHMES-Zellen unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> zu einer epigenetisch induzierten Hochregulation der mitochondrialen Atmungskette kommt (Baeken, 2021). Es sollten nun die Konsequenzen dieser epigenetisch induzierten Hochregulation der mitochondrialen Atmungskette auf die Morphologie, Dynamik und die Induktion der Mitophagie untersucht werden. Als zelluläres Modell-System wurden ebenfalls LUHMES-Zellen verwendet, die aufgrund ihrer Eigenschaft als menschliche mesenzephal Stammzellen mit dopaminerg differenzierbarem Phänotyp besonders gut geeignet sind (Lotharius et al., 2005; Beliakov et al., 2023) (siehe Abschnitt 3.1.8). Sie ähneln morphologisch und biochemisch dopaminergen Neuronen (Lotharius et al., 2005; Beliakov et al., 2023). Neben dem vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) (Lotharius et al., 2002), einem integralen Membranprotein synaptischer Vesikel zum Transport von Monoaminen (Bernstein et al., 2014), exprimieren sie den Dopamintransporter (DAT) sowie die Tyrosinhydroxylase (TH) (Lotharius et al., 2002), das Schlüsselenzym für die Biosynthese von Katecholaminen. Als Parkinson-Toxin wurde 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) eingesetzt, ein Komplex-I-Inhibitor (siehe Abschnitt 2.3.1), der als Metabolit von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) *in vivo* Kardinalssymptome der Parkinsonschen Krankheit auslöst (Langston et al., 1983). Der Einsatz von MPP<sup>+</sup> gilt als eines der am besten erforschten Toxinmodelle (Beal, 2010), und hat sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in der Parkinson-Forschung etabliert (Smirnova et al., 2016; Beal, 2010). Darüber hinaus wurde die potenziell protektive Wirkung des Antioxidans Phenothiazin (siehe Abschnitt 2.3.2) untersucht.

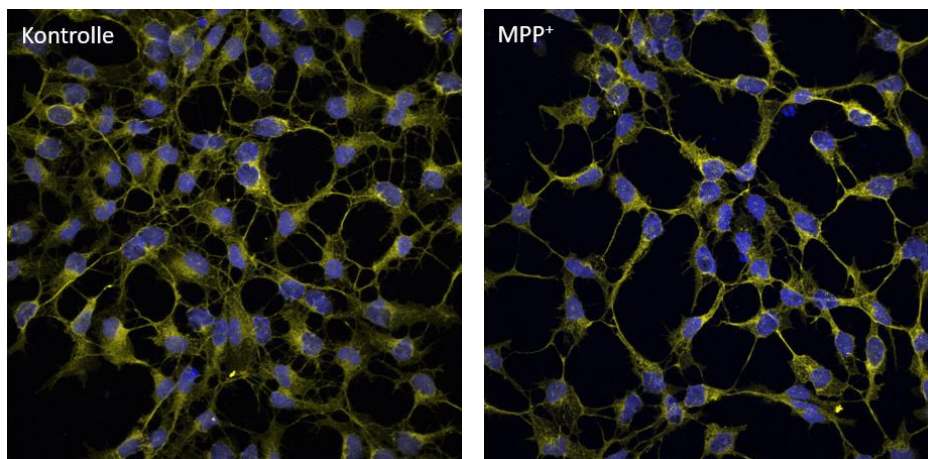
#### 4.1.1 Die Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> verändert die Morphologie der Mitochondrien

Um herauszufinden, ob die Inhibition des Komplex I durch MPP<sup>+</sup> Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien von LUHMES-Zellen hat, wurden immunhistochemische Aufnahmen angefertigt. Diese eignen sich zur morphologischen Analyse mittels Konfokalmikroskopie. Eine angemessene Konzentration des Parkinson-Toxins MPP<sup>+</sup>, welche subletale Effekte auf die LUHMES-Zellen und deren Aussehen hatte, wurde in der Dissertation von Dr. Marius Baeken etabliert (Baeken, 2021). Dabei erwies sich eine Konzentration von 10  $\mu$ M mit einer Inkubationszeit von 48 h für das chronische Parkinsonmodell als geeignet (Baeken, 2021) und wurde deshalb für diese Arbeit

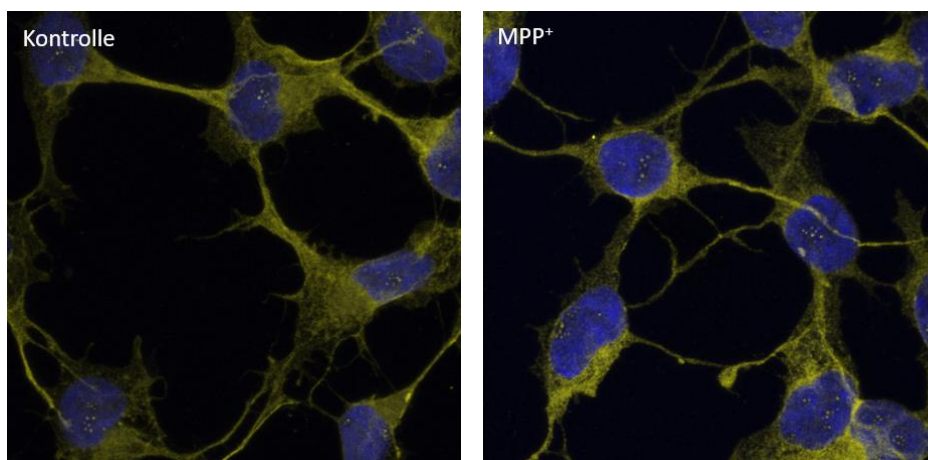
verwendet. Diese Konzentration wurde auch in anderen Arbeiten als angemessen befunden (Bruch et al., 2014; Kern et al., 2021).

Um sicherzustellen, dass unter einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> keine schädlichen Auswirkungen auf den Zellkern und die basalen Zellstrukturen auftreten, wurden immunhistochemische Färbungen des Zellkerns und des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2, *microtubule-associated protein 2*) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. MAP2 ist ein Zytoskelett-Protein, das hauptsächlich in Neuronen vorkommt, zahlreiche damit verbundene Funktionen hat (Sánchez et al., 2000) und sich als Markerprotein gut eignet.

**A**



**B**



**Abbildung 19: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Markerproteins MAP2**

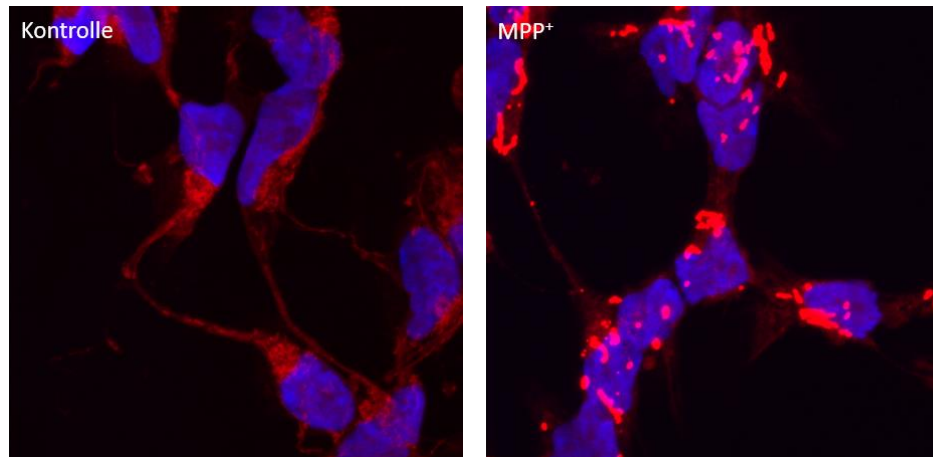
Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> behandelt und anschließend mit dem Marker für das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) und der Zellkernfärbung DAPI inkubiert. Mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica wurden Bilder von unbehandelten (Kontrolle) und mit MPP<sup>+</sup>-behandelten LUHMES-Zellen aufgenommen, die

(A) eine 63-fache Vergrößerung aufweisen sowie zusätzlich (B) einen 3,5-fachen Zoom. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens 2 biologischen Replikaten. Das Signal des Markers für MAP2 wurde in Gelb dargestellt, das der Zellkernfärbung DAPI in Blau.

In der unbehandelten Kontrollgruppe und in der Gruppe, die dem Toxin ausgesetzt wurde, präsentierten sich identische Morphologien der Zellkerne mit einer gleichmäßigen perinukleären und axonalen Verteilung des Zytoskelettproteins MAP2 und subjektiv optisch kongruenten Signalintensitäten (siehe Abbildung 19). Die Zellkerne hatten in beiden Gruppen eine runde bis elliptische Form und waren somit normal konfiguriert. Es konnten keine Hinweise auf apoptotische Zellkerne durch Zellkernfragmente festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass bei einer Konzentration von unter 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> die basalen Zellkomponenten nicht beeinträchtigt wurden.

Das Antioxidans Phenothiazin (PHT) sollte aufgrund seiner potenziell protektiven Wirkung ebenfalls in einer adäquaten Konzentration eingesetzt werden. In einer *in vitro* Studie mit primären mesenzephalen Neuronen von Ratten hat sich eine sehr niedrige Konzentration von 20 nM als optimal erwiesen (Hajieva et al., 2009) und wurde daher für diese Arbeit verwendet. Zur Visualisierung der Effekte von MPP<sup>+</sup> und PHT auf die Mitochondrien der LUHMES-Zellen wurde der Farbstoff MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS von Thermo Fisher benutzt. Es handelt sich hierbei um einen reduzierten, zunächst nicht fluoreszierenden Farbstoff, welcher erst bei Oxidation fluoresziert. Er diffundiert passiv durch die Plasmamembran lebender Zellen und reichert sich in Mitochondrien mit vorhandenem Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) an. Die Anreicherung erfolgt durch die Nutzung oxidierbarer Substrate in aktiven Mitochondrien. Die Oxidation führt zur Erzeugung eines leuchtend roten Fluoreszenzlichts, das eine morphologische Beurteilung von Mitochondrien, die ein  $\Delta\psi_m$  aufweisen, ermöglicht.

Unter der Behandlung mit MPP<sup>+</sup> präsentierte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine veränderte Morphologie der Mitochondrien: Ein Teil von ihnen stellte sich rundlich kondensiert und aggregiert dar (siehe Abbildung 20), während die Mitochondrien in der unbehandelten Kontrolle gleichmäßig perinukleär und axonal verteilt waren (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und der Mitochondrien**

Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> behandelt und anschließend mit dem mitochondrialen Markerfarbstoff MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS und der Zellkernfärbung DAPI inkubiert. Mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica wurden Bilder von unbehandelten (Kontrolle) und mit MPP<sup>+</sup>-behandelten LUHMES-Zellen in 63-facher Vergrößerung mit 3,5-fachem Zoom aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens 2 biologischen Replikaten. Das Signal des Farbstoffs MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS wurde in Rot dargestellt, das der Zellkernfärbung DAPI in Blau.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass es sich hierbei um vermehrt fragmentierte Mitochondrien handelt. Diese weisen eine kugel- und eiförmige Morphologie auf, im Gegensatz dazu sind fusionierte Mitochondrien langstreckig, tubulär und verzweigt (Chen et al., 2003). Ähnlich kondensierte und fragmentierte Mitochondrien wurden auch unter MPP<sup>+</sup>-Behandlung bei SH-SY5Y-Zellen mit dem Farbstoff MitoTracker Red beobachtet (Prasertsuksri et al., 2023; Jang et al., 2018).

Abgetrennte Mitochondrien weisen entweder ein geringeres  $\Delta\psi_m$  auf (Twig et al., 2008; Chen et al., 2016) und können dies wiedererlangen (Chen et al., 2016). Oder sie verlieren ihr  $\Delta\psi_m$  und werden dann der Mitophagie zugeführt (Chen et al., 2016). Die Anreicherung des MitoTracker-Farbstoffs in den kondensiert formierten Mitochondrien lässt also darauf schließen, dass noch ein, wenn auch verringertes  $\Delta\psi_m$  vorhanden ist.

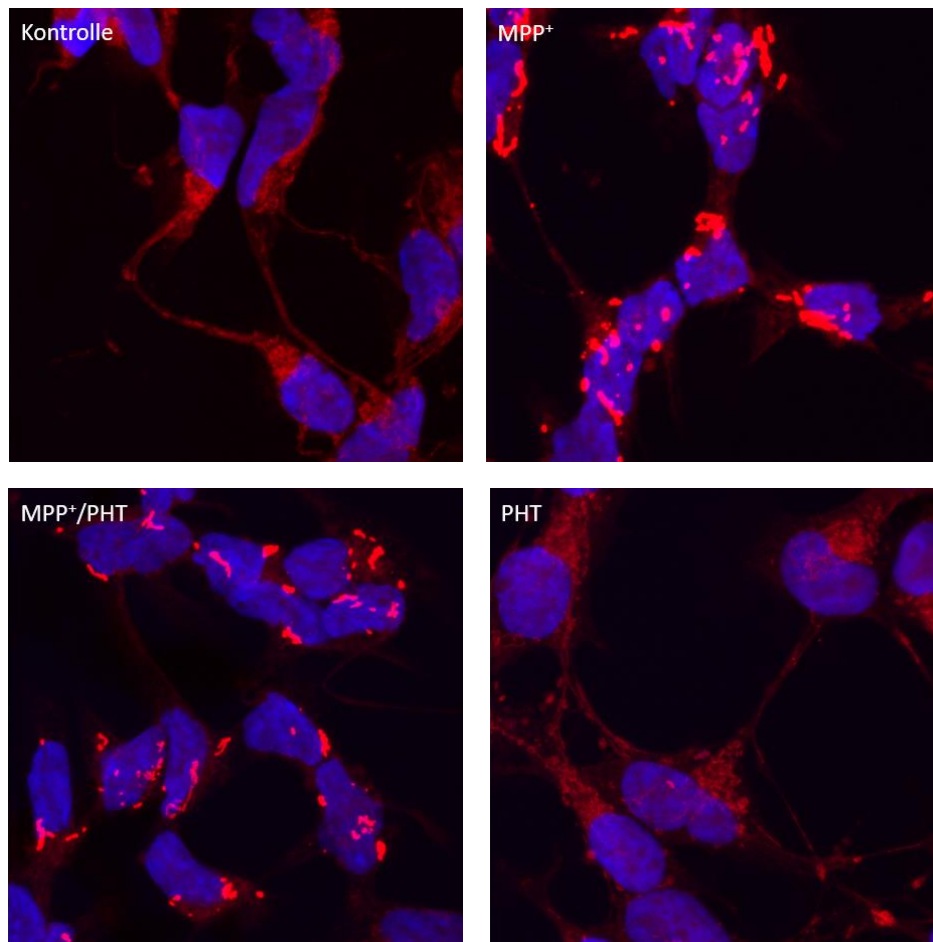
#### 4.1.2 Das Antioxidans Phenothiazin beeinflusst die durch MPP<sup>+</sup> induzierten morphologischen Veränderungen der Mitochondrien

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass unter Komplex-I-Inhibition mit MPP<sup>+</sup> eine veränderte Morphologie der Mitochondrien auftritt, die auf vermehrte Fissionsereignisse hinweist. Es gilt als gesichert, dass es unter Komplex-I-Inhibition mit MPP<sup>+</sup> zu oxidativem Stress kommt (Fathi et al., 2022; Krug et al., 2014). Dabei überwiegt der Anteil reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Verhältnis zu den sie eliminierenden Antioxidantien (Sayre et al., 2008). Dieses Redox-

Ungleichgewicht führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die häufig zur Abtrennung von beschädigten mitochondrialen Anteilen führt (Tilokani et al., 2018). Eine übermäßige Fission der Mitochondrien gilt wiederum als schädlich für Neuronen (Pörtl et al., 2012). Das Antioxidans Phenothiazin (PHT) könnte diesen Effekt mildern und das Ausmaß an fissionierten Mitochondrien reduzieren. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden immunhistochemische Aufnahmen mit PHT angefertigt.

PHT und seine Derivate haben sich in der klinischen Praxis unter anderem als wirksame Antihistaminika und Antipsychotika bewährt, ebenso auch jahrzehntelang als Anthelminthikum (Ohlow und Moosmann, 2011). Darüber hinaus hat sich in verschiedenen *in vitro* und auch *in vivo* Studien mit *Caenorhabditis-elegans* gezeigt, dass PHT ein potentes Antioxidans ist (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010; Moosmann et al., 2001; Ohlow et al., 2017).

Unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT wiesen die LUHMES-Zellen eine weniger stark ausgeprägte Kondensation und Aggregation der Mitochondrien auf (siehe Abbildung 21). Die unter MPP<sup>+</sup> optisch sichtbaren kugel- und eiförmigen Formationen waren unter additiver Gabe von PHT deutlich rückläufig. Stattdessen zeigten sich teilweise nur noch zarte, fadenförmige Formationen (siehe Abbildung 21), was auf einen revertierenden Effekt von PHT hinweist. Und es bedeutet, wenn oxidativer Stress als Folge der Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> zu einer gesteigerten Abtrennung beschädigter mitochondrialer Anteile führt, wirkt PHT hier antioxidativ und reduziert den oxidativen Stress. Dadurch wird eine vermehrte Fragmentierung verhindert und PHT erweist sich somit als mitochondrienprotektiv.



**Abbildung 21: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und Mitochondrien nach Behandlung mit MPP<sup>+</sup> und PHT**

Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend mit dem mitochondrialen Markerfarbstoff MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS sowie der Zellkernfärbung DAPI inkubiert. Mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica wurden Bilder in 63-facher Vergrößerung mit 3,5-fachem Zoom aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens 2 biologischen Replikaten. Das Signal des Farbstoffs MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS wurde in Rot dargestellt, das der Zellkernfärbung DAPI in Blau.

Des Weiteren scheint es so, als ob PHT allein schon einen protektiven Effekt auf die Mitochondrien haben könnte, da die Signalintensität des MitoTracker-Farbstoffs in den Zellen, die ausschließlich mit PHT behandelt wurden, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle optisch subjektiv etwas höher erschien. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Kultivierung der empfindlichen LUHMES-Zellen unter 20 % Sauerstoff eine leicht toxische Wirkung haben könnte, die PHT ausgleichend zu beeinflussen vermag.

## **4.2 Der Einfluss des Komplex-I-Inhibitors MPP<sup>+</sup> und des Antioxidans Phenothiazin auf die oxidative Phosphorylierung**

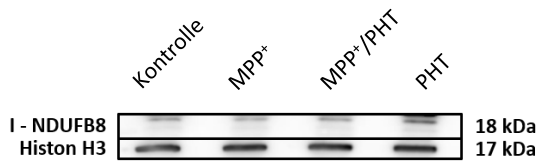
Die bisherigen Ergebnisse zeigten morphologische Veränderungen der Mitochondrien unter MPP<sup>+</sup> sowie einen deutlich sichtbaren revertierenden Effekt auf diese durch PHT. Da die Morphologie der Mitochondrien eng an ihre Funktionen gekoppelt ist (Nunnari und Suomalainen, 2012; Wai und Langer, 2016), zu denen neben der Erzeugung und Kontrolle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auch die Produktion von ATP durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) gehört (Wai und Langer, 2016; Vafai und Mootha, 2012), wurde letztere im nächsten Schritt genauer untersucht.

Um aus der Energie von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten durch oxidative Phosphorylierung ATP zu generieren, verfügen Mitochondrien über eine Proteinmaschinerie, die aus fünf Komplexen (I-V) besteht. Insgesamt setzen sich diese aus ca. 90 Untereinheiten zusammen, von denen 13 mitochondrial und die restlichen nukleär DNA-kodiert sind (Vafai und Mootha, 2012). In der mitochondrialen Matrix werden durch Enzyme des Citratzyklus Elektronenträger in Form von NADH und FADH<sub>2</sub> generiert (Nunnari und Suomalainen, 2012). Diese übertragen Elektronen auf die an der Innenmembran lokalisierten Elektronentransportkette (ETC), welche aus den Komplexen I-IV besteht (Nunnari und Suomalainen, 2012). Innerhalb der ETC fallen die Elektronen von höheren auf niedrigere Energieniveaus, und die dabei an den Komplexen I, II und IV freigesetzte Energie wird genutzt, um Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum (IMS) zu pumpen (Nunnari und Suomalainen, 2012; Vafai und Mootha, 2012). Der dadurch entstehende Protonengradient wird wiederum genutzt, um über die ATP-Synthase (Komplex V) die Phosphorylierung von ADP zu ATP zu katalysieren (Okuno et al., 2011).

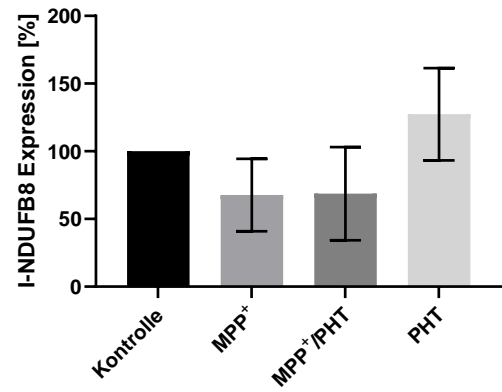
### **4.2.1 MPP<sup>+</sup> beeinflusst die mitochondriale Atmungskette**

Störungen des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette sind bei der Parkinsonschen Krankheit bekannt (Schapira et al., 1990) und MPP<sup>+</sup> verursacht vor allem eine Komplex-I-Inhibition (Ramsay et al., 1986b) mit dem phänotypischen Bild einer Parkinsonschen Krankheit (Langston, 2017; Langston et al., 1983). Um herauszufinden, ob es unter Exposition von MPP<sup>+</sup> zu Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette, insbesondere des Komplex I kommt, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Der hierfür verwendete Antikörper-Cocktail (ab110411) von Abcam enthält fünf Antikörper, jeweils einen gegen eine spezifische Untereinheit der fünf Komplexe. Wenn die Komplexe nicht korrekt assembliert sind, werden diese Untereinheiten instabil und es können nachfolgende quantitative Veränderungen, die auf einen Funktionsverlust hinweisen, detektiert werden.

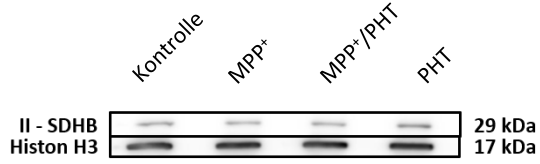
**A**



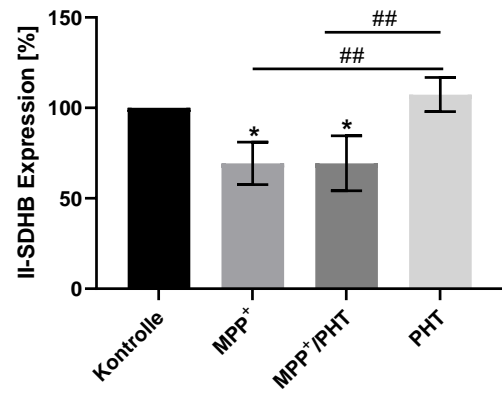
**B**



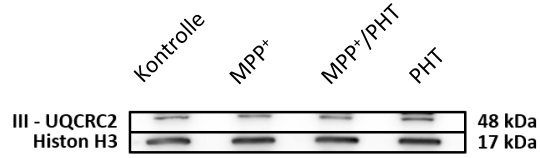
**C**



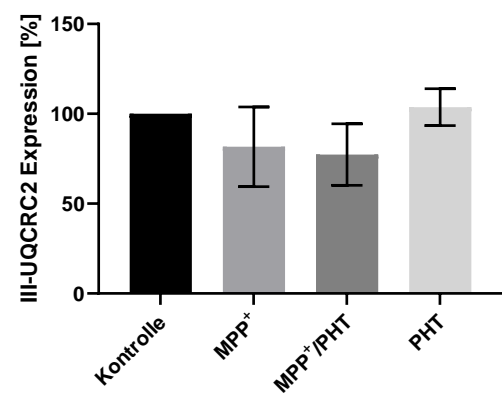
**D**



**E**

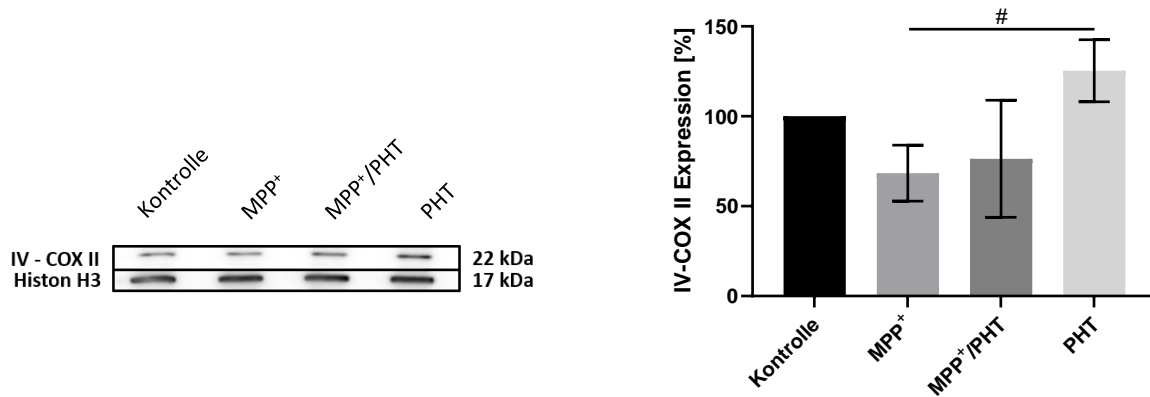


**F**



**G**

**H**



### Abbildung 22: Western-Blot-Analysen von Untereinheiten der Komplexe I-IV der mitochondrialen Atmungskette unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin

(A, C, E, G) Repräsentative Western Blots der Untereinheiten der Komplexe I-IV der mitochondrialen Atmungskette und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen für die Komplexe I-IV graphisch dargestellt (B, D, F, H). Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*/# =  $p < 0.05$ , \*\*/## =  $p < 0.01$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Für die Untereinheit NDUFB8 der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) (siehe Abbildung 22, A und B) war der Proteinspiegel unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert, wenn auch nicht signifikant.

Auch für die Untereinheit SDHB der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) (siehe Abbildung 22, C und D) zeigte sich eine Reduktion des Proteinspiegels unter MPP<sup>+</sup>, hier interessanterweise signifikant mit  $p < 0.05$ .

Die Proteinspiegel der Untereinheiten UQCRC2 der Cytochrom-Reduktase (Komplex III) und COX II der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) (siehe Abbildung 22, E bis H) waren unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ähnlich wie bei Komplex I reduziert, jedoch auch hier, wie bei Komplex I, nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter MPP<sup>+</sup> die Proteinspiegel der Untereinheiten für die Komplexe I-IV im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle tendenziell reduziert waren, für Komplex II war diese Reduktion signifikant. Dies deutet auf Funktionsverluste der Komplexe hin. Teilweise korrelieren diese Ergebnisse mit den Daten der Arbeit von Baeken: Hier zeigte sich epigenetisch koinzidierend auf transkriptioneller Ebene bei LUHMES-Zellen unter 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> eine signifikante Hochregulation der kernkodierten Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V, allerdings nicht der mitochondrial kodierten Untereinheiten (Baeken, 2021). Die vermutlich epigenetisch induzierte transkriptionelle Hochregulation könnte als Kompensation für die in

dieser Arbeit festgestellte Reduktion der Proteinspiegel der Komplexe I, III und IV erfolgen. Dies könnte dem Ausgleich der verminderten ATP-Synthese dienen. Es bleibt jedoch zunächst unklar, warum der Komplex II auf Proteinebene signifikant reduziert wird (Baeken, 2021), aber keine transkriptionelle Hochregulation stattfindet

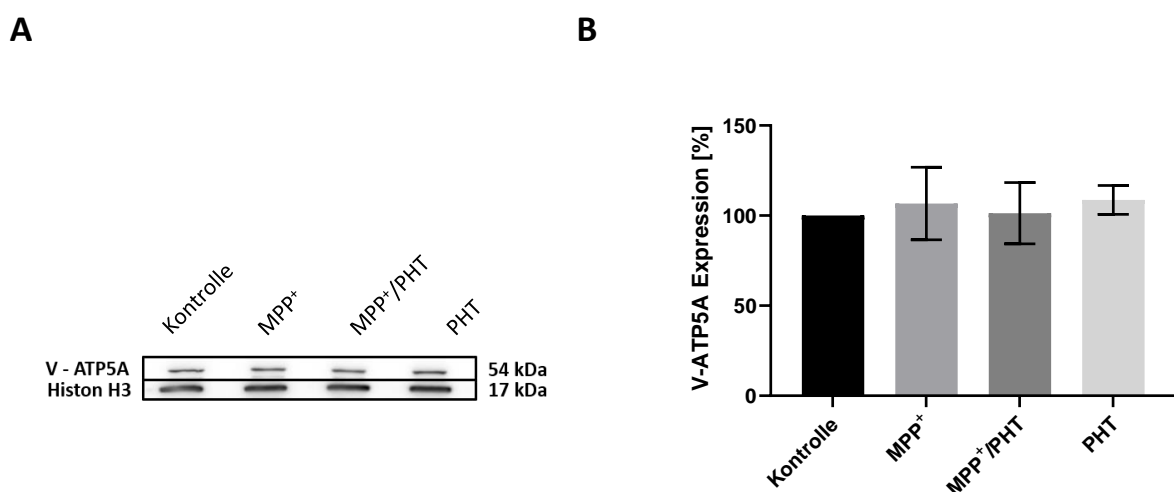
Eine mögliche Erklärung für die überraschenderweise nicht signifikante Reduktion von Komplex I unter MPP<sup>+</sup> könnte durch die recht hohe Standardabweichung bedingt sein, die für den signifikant reduzierten Komplex II geringer ausfiel.

Die OXPHOS ist neben der ATP-Synthase auch für die Aufrechterhaltung des  $\Delta\psi_m$  und damit dem Überleben der Mitochondrien und Zellen von grundlegender Bedeutung (Wilkins et al., 2013). Eine unzureichende Assemblierung der Komplexe könnte zu einer Beeinträchtigung des  $\Delta\psi_m$  führen, was zu vermehrter Abtrennung geschädigter Anteile führen könnte. Dies könnte wiederum die morphologischen Veränderungen erklären (siehe Abschnitt 4.1.1).

#### 4.2.2 Die ATP-Synthase ist unter MPP<sup>+</sup> unverändert

Die Aufgabe der ATP-Synthase (Komplex V) besteht darin, die Synthese von ATP aus ADP zu katalysieren, somit ist sie nicht mehr Teil der Elektronentransport- bzw. Atmungskette. Morphologisch unterscheidet sie sich von allen anderen Komplexen, da sie an der Spitze der Cristae lokalisiert ist (Strauss et al., 2008).

Die Untereinheit ATP5A der ATP-Synthase (Komplex V) war unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur Kontrolle quantitativ nahezu unverändert (siehe Abbildung 23). MPP<sup>+</sup> scheint hier also keinen Einfluss auf die Assemblierung und damit auf die Funktion dieses Komplexes zu nehmen.



**Abbildung 23: Western-Blot-Analyse der Untereinheit von Komplex V unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin**

(A) Repräsentative Western Blots der Untereinheit ATP5A des Komplexes V der mitochondrialen Atmungskette und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte

LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen für den Komplex V graphisch dargestellt (B). Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

#### 4.2.3 Die Komplexe I-V der Mitochondrien bleiben unter Phenothiazin unverändert

Die Western-Blot-Ergebnisse zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter MPP<sup>+</sup> reduzierte Proteinspiegel spezifischer Untereinheiten der Komplexe I–IV, wobei die Reduktion für Komplex II signifikant war. Der Komplex V hingegen zeigte keine signifikanten Veränderungen unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> auf.

In der MPP<sup>+</sup>/PHT-Gruppe erwies sich PHT bei keinem der Komplexe I-IV als Modulator der durch MPP<sup>+</sup>-induzierten Veränderungen (siehe Abbildung 22 B, D, F, H). PHT erzielte also keinen revertierenden und damit protektiven Effekt auf die Proteinspiegel der Untereinheiten. Zusammenfassend hat die additive Gabe von PHT keinen Effekt auf die durch MPP<sup>+</sup> vermittelte Wirkung auf die Funktion der Komplexe I–IV.

Darüber hinaus zeigte PHT auch keinen Effekt auf die Proteinspiegel von Komplex V.

### 4.3 Der Einfluss von MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin auf die Proteinspiegel von TOM20 und TIM23

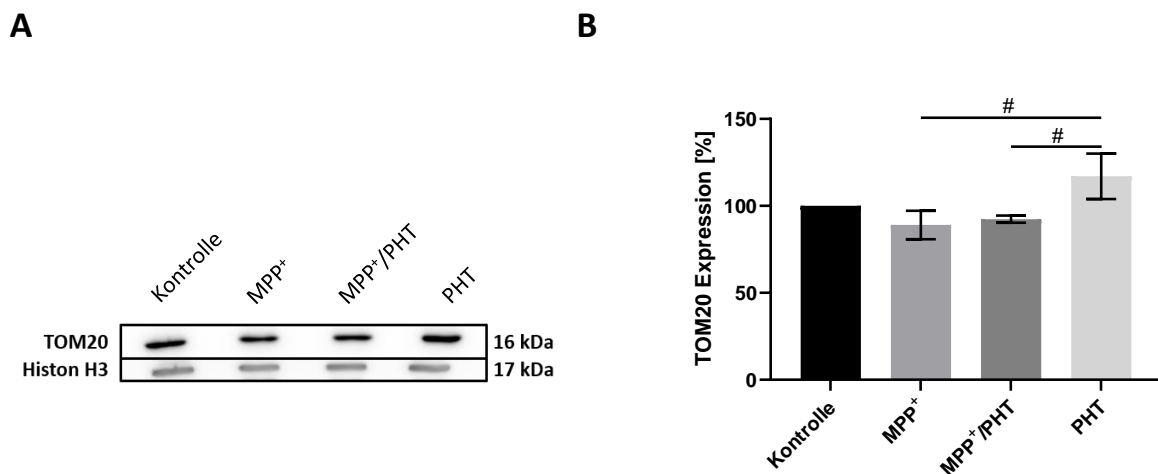
Da die Mitochondrien nur einen kleinen Anteil Proteine selbst synthetisieren können, ist für ihre Biogenese und Funktion der Import von Vorläuferproteinen, die im Zytoplasma synthetisiert werden, erforderlich. Mitochondrien enthalten mehr als 1000 Proteine, die über die Translokasen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran (TOM- und TIM-Komplexe) aus dem Zytoplasma importiert werden (Becker et al., 2019). Für die Passage durch die Außenmembran werden die Vorläuferproteine von den Präsequenzrezeptoren TOM20 oder TOM70 konnektiert und gelangen dann über eine Pore, die hauptsächlich von TOM40 gebildet wird, in den IMS (Rosario et al., 2019). Anschließend werden die Vorläuferproteine durch verschiedene Proteintranslokasen weiter sortiert (Becker et al., 2019). Die Präsequenztranslokase der inneren Membran TIM23 ist dabei für die Sortierung der Vorläuferproteine in die IMM oder in die Matrix zuständig.

Da die Translokasen der äußeren und inneren Membran für die Funktion der Mitochondrien von zentraler Bedeutung sind, wurden die Auswirkungen von MPP<sup>+</sup> und PHT auf den

Präsequenzrezeptor TOM20 und die Präsequenztranslokase TIM23 mittels Western-Blot-Analysen und anschließender quantitativer Bestimmung ermittelt.

#### 4.3.1 Die Effekte der Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> auf die Proteinspiegel von TOM20 und TIM23

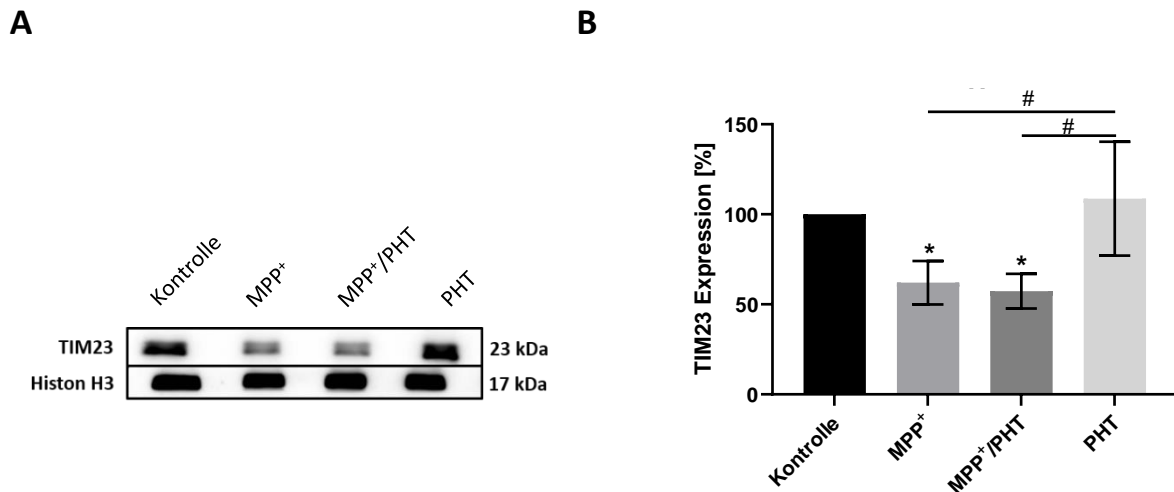
Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, führte die Behandlung mit MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur Kontrolle zu einer Abnahme des TOM20-Proteinspiegels, allerdings ist dieses Ergebnis nicht signifikant.



**Abbildung 24: Western-Blot-Analyse des Proteins TOM20 unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phentiazin**

(A) Repräsentative Western Blots der Translokase der äußeren Mitochondrien Membran TOM20 und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von TOM20 graphisch dargestellt (B). Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*/# =  $p < 0.05$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Der leicht reduzierte Proteinspiegel von TOM20 unter MPP<sup>+</sup> deutet auf eine Beeinträchtigung des Transportsystems an der OMM hin. Daher wurde im nächsten Schritt die Translokase der IMM TIM23 untersucht. Der Proteintransport über TIM23 wird durch das  $\Delta\psi_m$  gesteuert und ist daher von diesem abhängig (Becker et al., 2019). Das  $\Delta\psi_m$  über der IMM wird wiederum durch die OXPHOS erzeugt (Mitchell, 1961). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich unter MPP<sup>+</sup> ein um ca. 40 %, und mit  $p < 0.05$  signifikant reduzierter Proteinspiegel von TIM23 (siehe Abbildung 25).

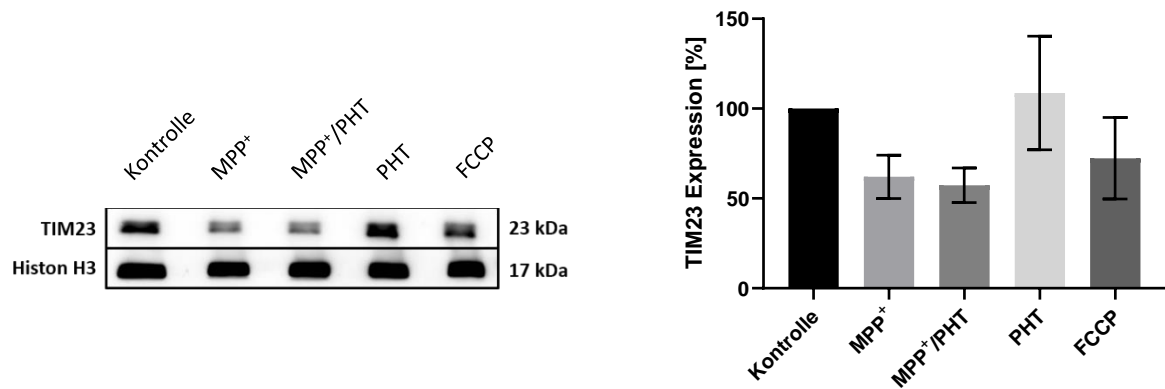


**Abbildung 25: Western-Blot-Analyse des Proteins TIM23 unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin**

(A) Repräsentative Western Blots der Translokase der inneren Mitochondrien Membran TIM23 und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von TIM23 graphisch dargestellt (B). Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*/# =  $p < 0.05$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Der Entkoppler FCCP (1  $\mu\text{M}$ ) wurde hinzugefügt, um das  $\Delta\psi_m$  zu reduzieren. FCCP ist ein Protonophor und induziert eine „nicht-oxidative“ (Baeken, 2021) dosisabhängige Verminderung des Protonengradienten. Die Protonen werden nicht mehr koordiniert, sondern an der ATP-Synthase vorbei durch die Zellmembranen geschleust. Dadurch wird der Protonengradient vermindert, die ATP-Synthase gestört und das  $\Delta\psi_m$  reduziert (Terada, 1990; Bertholet et al., 2022).

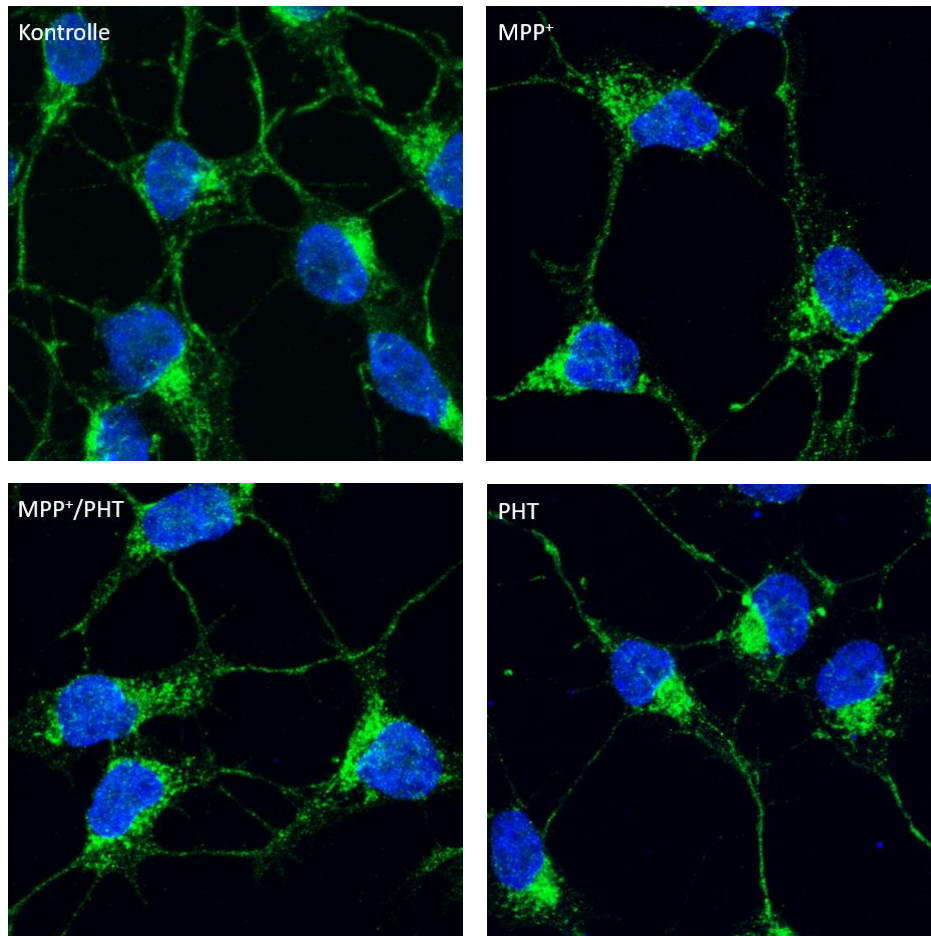
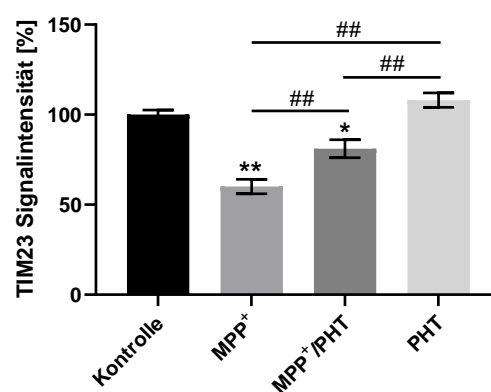
Auch unter FCCP war eine tendenzielle Abnahme von TIM23 zu beobachten, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie unter MPP<sup>+</sup> und nicht signifikant (siehe Abbildung 26). Die Reduktion des  $\Delta\psi_m$  unter FCCP geht also mit einem tendenziellen Verlust von TIM23 einher. Der tendenzielle Verlust von TIM23 unter FCCP und der signifikant reduzierte Proteinspiegel von TIM23 unter MPP<sup>+</sup> könnte auf eine verminderte ATP-Synthase durch die Komplex-I-Inhibition zurückzuführen sein, die zu einem verminderten  $\Delta\psi_m$  führt. Da der Proteinimport über TIM23 vom  $\Delta\psi_m$  abhängig ist, könnte ein vermindertes  $\Delta\psi_m$  mit einem reduzierten mitochondrialen Import einhergehen.



**Abbildung 26: Western-Blot-Analyse des Proteins TIM23 unter Exposition mit MPP<sup>+</sup>, Phenothiazin und dem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette FCCP**

(A) Repräsentative Western Blots der Translokase der inneren Mitochondrien Membran TIM23 und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>, 20 nM PHT und 1  $\mu$ M FCCP behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von TIM23 graphisch dargestellt (B). Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse wurden immunhistochemische Aufnahmen angefertigt. Auch hier wurde unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur Kontrolle eine ca. 40 %ige und mit  $p < 0.01$  signifikante Abnahme von TIM23 beobachtet (siehe Abbildung 27 B). Diese ist auch subjektiv visuell als morphologisch ausgedünntes Signal von TIM23 unter MPP<sup>+</sup> deutlich erkennbar (siehe Abbildung 27 A).

**A****B****Abbildung 27: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Proteins TIM23**

(A) Differenzierte LUHMES-Zellen wurden 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend mit dem Marker für die Translokase der inneren Mitochondrien Membran TIM23 (dargestellt in Grün) und der Zellkernfärbung DAPI (dargestellt in Blau) inkubiert. Mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica wurden Bilder in 63-facher Vergrößerung mit 3,5-fachem Zoom aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens 2 biologischen Replikaten. (B) Nach Auswertung der Aufnahmen mit der Software ImageJ (dafür wurde der mittlere Grauintensitätswert eines Bildes auf die Anzahl der Zellen normiert), wurden die Signalintensitäten als Korrelate der

Proteinmengen von TIM23 prozentual graphisch dargestellt. Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*/# =  $p < 0.05$ , \*\*/## =  $p < 0.01$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Die signifikante Reduktion der Proteinspiegel von TIM23 im Vergleich zu TOM20 unter MPP<sup>+</sup> deutet auf eine deutliche Beeinträchtigung des Transportsystems an der IMM hin und kann möglicherweise durch die Abhängigkeit von der OXPHOS und dem  $\Delta\psi_m$  erklärt werden, auf die MPP<sup>+</sup> einen beeinträchtigenden Einfluss haben könnte.

### 4.3.2 Der Einfluss von Phenothiazin auf den MPP<sup>+</sup> vermittelten Effekt auf die Proteinspiegel von TOM20 und TIM23

Die gleichzeitige Gabe von MPP<sup>+</sup> und PHT hatte keinen Effekt auf den unter MPP<sup>+</sup> leicht reduzierten Proteinspiegel von TOM20 (siehe Abbildung 24).

Auf die signifikante Abnahme von TIM23 unter MPP<sup>+</sup> zeigte sich jedoch bei gleichzeitiger Gabe von PHT bei den immunhistochemischen Aufnahmen ein signifikanter Effekt von PHT mit  $p < 0.01$  (siehe Abbildung 27). Bei den Western Blots ergab sich kein Unterschied (siehe Abbildung 26).

Aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften könnte PHT hier die durch MPP<sup>+</sup> ausgelöste Komplex-I-Inhibition und den damit möglicherweise einhergehenden oxidativen Stress partiell kompensieren und damit die OXPHOS-Funktion, das  $\Delta\psi_m$  und schlussendlich auch die daran gekoppelte Funktion von TIM23 stabilisieren. Des Weiteren fiel auf, dass unter alleiniger Exposition mit PHT sowohl die TOM20- als auch die TIM23-Proteinspiegel tendenziell etwas höher als in der Kontrolle ausfielen, übereinstimmend mit den Ergebnissen der MitoTracker-Färbung (siehe Abschnitt 4.1.2). Möglicherweise hatten die Kultivierungsbedingungen mit 20 % Sauerstoff einen negativen Einfluss auf die Translokasen der LUHMES-Zellen haben, der durch PHT positiv moduliert werden konnte.

## 4.4 Der Einfluss von MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin auf die mitochondriale Dynamik

Die mitochondriale Dynamik ist durch zwei unterschiedliche Prozesse gekennzeichnet: Fission (Fragmentierung) und Fusion (Verschmelzung). Fusion ermöglicht die Verbindung von Mitochondrien, um unter anderem durch Austausch und Durchmischung geschädigter Inhalte, wie beispielsweise mutierter DNA, kompensatorisch die Mitochondrienfunktion aufrechtzuerhalten (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012; Chen et al., 2007). Fission führt

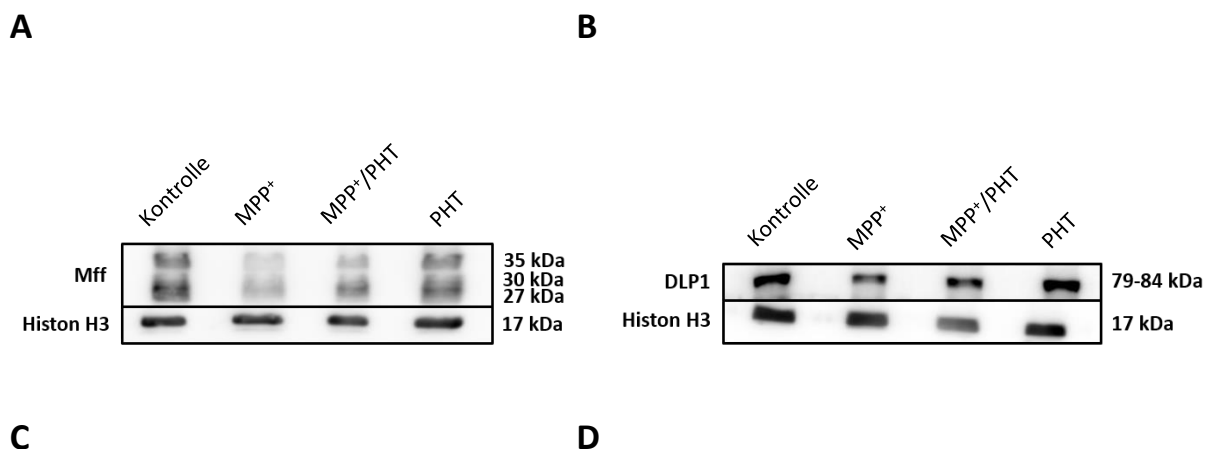
zur Teilung und somit zu einer ausreichenden Anzahl von Mitochondrien (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012), ist aber auch für die Abtrennung geschädigter mitochondrialer Anteile unerlässlich (Kraus et al., 2021). Durch ein an die jeweilige Stoffwechselsituation angepasstes Verhältnis von Fusion und Fission wird die mitochondriale Homöostase aufrechterhalten (van der Bliek, Alexander M. et al., 2013) und damit die Funktion der Zelle gewährleistet.

Nach den morphologischen Analysen (siehe Abschnitt 4.1), die eine erhöhte Fragmentierung der Mitochondrien unter MPP<sup>+</sup> sowie eine deutliche Abschwächung dieses Effekts unter gleichzeitiger Gabe von PHT aufgezeigt haben, wurden im nächsten Schritt einzelne Fissions- und Fusionsproteine genauer untersucht.

#### 4.4.1 Die Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> führt zu reduzierten Proteinspiegeln von Mff und DLP1

Das hauptsächlich zytosolisch lokalisierte Protein DLP1 aus der Dynaminfamilie wird zur Fission aus dem Zytosol ans Mitochondrium rekrutiert (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012). Dort umschließt es den abzutrennenden Teil spiralförmig und durchtrennt beim Zusammenziehen sowohl die äußere als in der Regel auch die innere Mitochondrienmembran (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012; van der Bliek, Alexander M. et al., 2013).

Bei Mff handelt es sich um ein relativ kleines Protein, das in der mitochondrialen Außenmembran verankert ist und als DLP1-Rezeptor fungiert (van der Bliek, Alexander M. et al., 2013; Otera et al., 2010). Um herauszufinden, ob die morphologisch fragmentiert erscheinenden Mitochondrien (siehe Abschnitt 4.1.1) auch zu einer quantitativen Veränderung der einzelnen Fissionsproteine führen, wurden zunächst Western-Blot-Analysen durchgeführt.





**Abbildung 28: Western-Blot-Analysen der Proteine Mff und DLP1 unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenthoiazin**

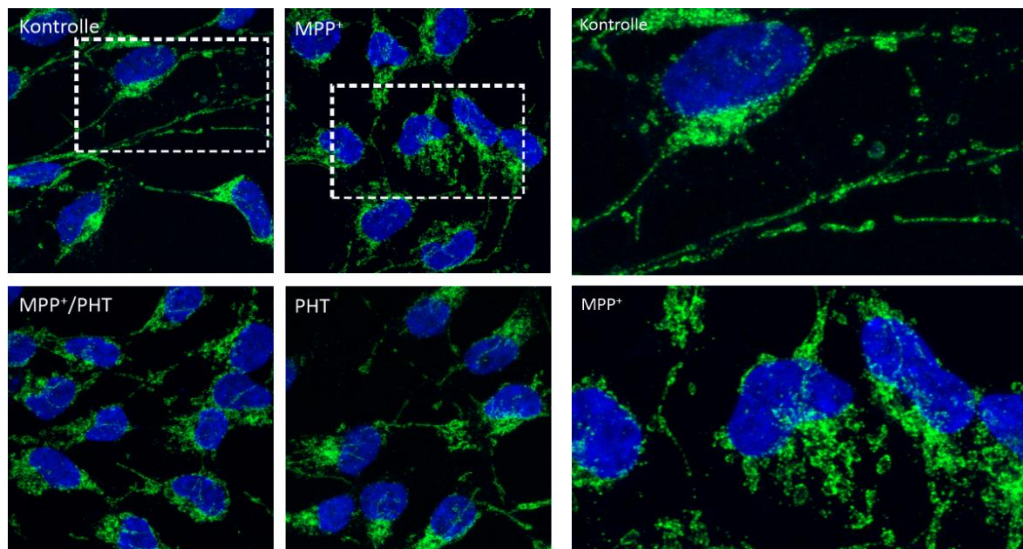
Repräsentative Western Blots der Fissionsproteine Mff (A) und DLP1 (B) und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Bei den unterschiedlichen Banden für Mff handelt es sich um Isoformen. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von Mff (C) und DLP1 (D) graphisch dargestellt. Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*/# =  $p < 0,05$ , \*\*/## =  $p < 0,01$ , \*\*\*/### =  $p < 0,001$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Unter MPP<sup>+</sup> wurde eine signifikante Reduktion des Proteinspiegels von Mff um mehr als 50 % und mit  $p < 0,001$  beobachtet (siehe Abbildung 28). Der Proteinspiegel von DLP1 war im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls reduziert, jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 28). Der signifikante Verlust des mitochondrial verankerten Membranproteins Mff könnte darauf hindeuten, dass es aufgrund der Schädigung der Mitochondrien durch MPP<sup>+</sup> zu vermehrten Fissionsereignissen mit anschließender Mitophagie kommt.

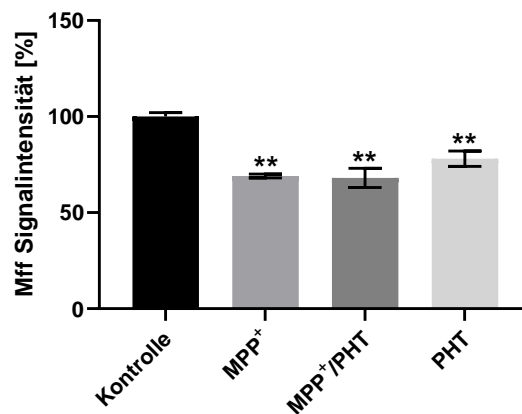
Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur morphologischen Beurteilung wurden immunhistochemische Aufnahmen angefertigt.

**A**

**B**



C



### Abbildung 29: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Fissionsproteins Mff

(A, B) Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend mit dem mitochondrialen Fissionsmarker Mff (dargestellt in Grün) und der Zellkernfärbung DAPI (dargestellt in Blau) inkubiert. (A) Mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica wurden Bilder in 63-facher Vergrößerung mit 3,5-fachem Zoom aufgenommen, unter (B) wurden Ausschnitte daraus angefertigt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens 2 biologischen Replikaten. (C) Nach Auswertung der Aufnahmen mit der Software ImageJ (dafür wurde der mittlere Grauintensitätswert eines Bildes auf die Anzahl der Zellen normiert), wurden die Signalintensitäten als Korrelate der Proteinnengen von Mff prozentual graphisch dargestellt. Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*\*/# =  $p < 0.01$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Auch hier zeigte sich für Mff ein signifikant reduzierter Proteinspiegel mit  $p < 0.01$  (siehe Abbildung 29), was das Ergebnis der Western-Blot-Analyse (siehe Abbildung 28) bestätigt. Auffällig war auch die unter MPP<sup>+</sup> deutlich aufgelockerte und fragmentiert anmutende Morphologie, die in Abbildung 29 A gezeigt und in Abbildung 29 B ausschnittsweise vergrößert wurde.

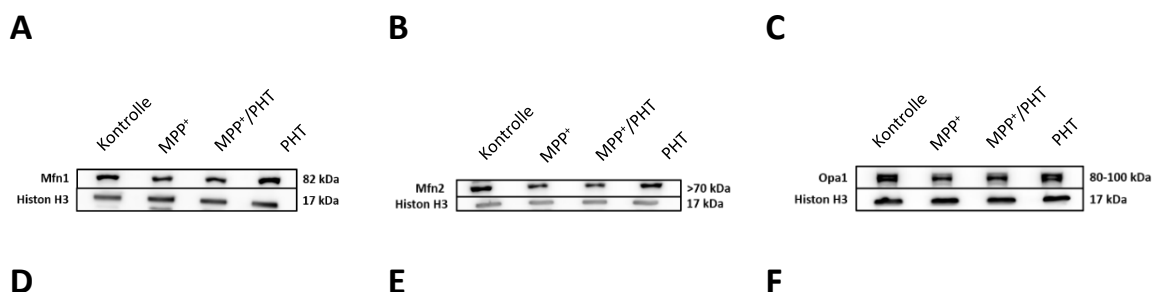
#### 4.4.2 Der Einfluss von Phenothiazin auf die Fissionsproteine Mfn und DLP1

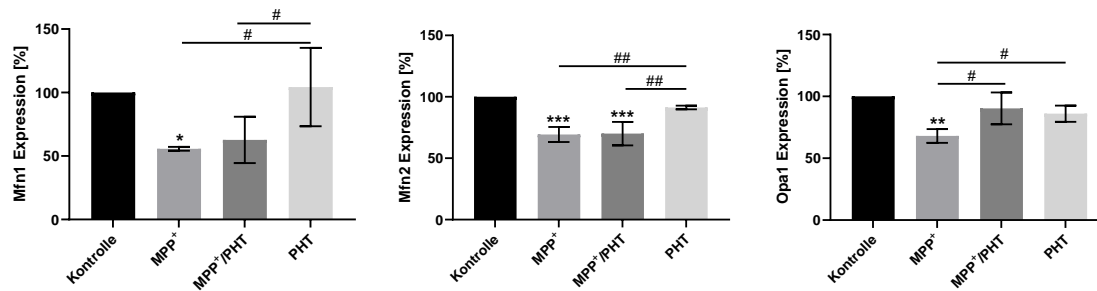
Wie den Abbildungen 28 und 29 zu entnehmen ist, zeigten die Western-Blot- und immunhistochemischen Analysen von Mfn unter MPP<sup>+</sup>/PHT einen tendenziell sehr geringen und nicht signifikanten Anstieg der Proteinspiegel im Vergleich zu MPP<sup>+</sup>. Dies deutet darauf hin, dass PHT möglicherweise einen geringen revertierenden Einfluss auf die Wirkung von MPP<sup>+</sup> haben könnte. Bei DLP1 waren die Proteinspiegel bei den Western Blots von MPP<sup>+</sup>/PHT im Vergleich zu MPP<sup>+</sup> tendenziell erhöht, aber nicht signifikant.

#### 4.4.3 Die Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> verändert die Proteinspiegel von Mfn1, Mfn2 und Opa1

Um herauszufinden, ob es neben den teilweise signifikant reduzierten Proteinspiegeln der Fissionsproteine unter MPP<sup>+</sup> auch Veränderungen in der Fusionsmaschinerie gibt, wurden deren Proteine diese genauer analysiert. Mfn1 und Mfn2 sind Proteine der Dynamin-Familie, die an der Außenmembran der Mitochondrien verankert sind und Homologe bei Säugetieren darstellen (van der Bliek, Alexander M. et al., 2013; Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012). Sie vermitteln die Fusion zwischen den mitochondrialen Außenmembranen. Opa1, ein weiteres Dynaminprotein, das hauptsächlich an der IMM (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012), aber auch im IMS lokalisiert ist (Chen et al., 2016), vermittelt deren Fusion (Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012). Laut Chen et al. spielt Opa1 auch eine Rolle bei der Fission und hält die Cristae-Struktur aufrecht (Chen et al., 2016).

Um auch hier quantitative Informationen über die jeweiligen Fusionsproteine zu gewinnen, wurden zunächst Western-Blot-Analysen durchgeführt.





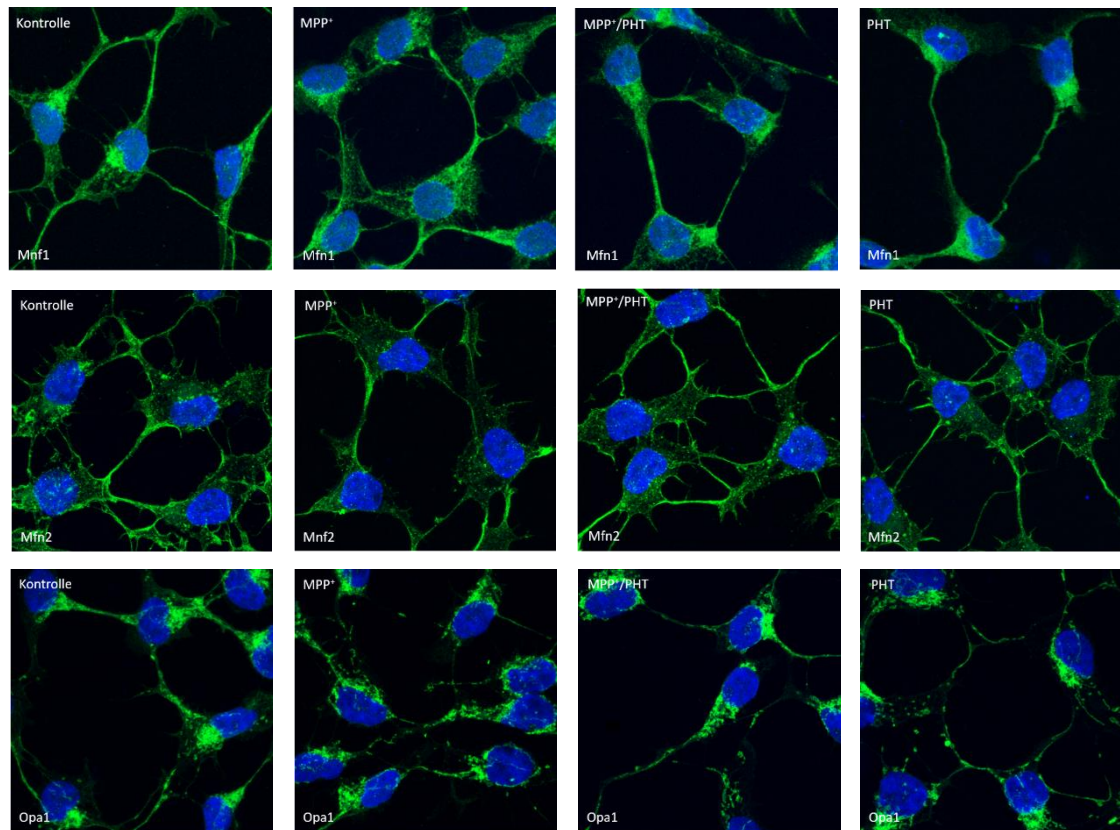
**Abbildung 30: Western-Blot-Analysen der Proteine Mfn1, Mfn2 und Opa1 unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin**

Repräsentative Western Blots der Fusionsproteine Mfn1 (A), Mfn2 (B) und Opa1 (C) und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von Mfn1 (D), Mfn2 (E) und Opa1 (F) graphisch dargestellt. Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*/# =  $p < 0.05$ , \*\*/## =  $p < 0.01$ , \*\*\*/### =  $p < 0.001$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

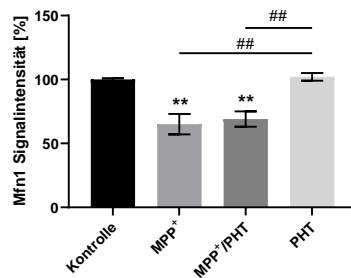
MPP<sup>+</sup> führte bei allen drei Fusionsproteinen zu einer signifikanten Abnahme der Proteinspiegel (siehe Abbildung 30). Für Mfn1 ergab sich eine Reduktion um ca. 50 % mit  $p < 0.05$ , für Mfn2 um ca. 30 % mit  $p < 0.001$  und für Opa1 ebenfalls um ca. 30 % mit  $p < 0.01$ . Möglicherweise wurden Mitochondrien unter MPP<sup>+</sup>-Behandlung durch oxidativen Stress geschädigt, fragmentiert und anschließend der Mitophagie zugeführt.

Diese Ergebnisse wurden mittels immunhistochemischer Aufnahmen überprüft.

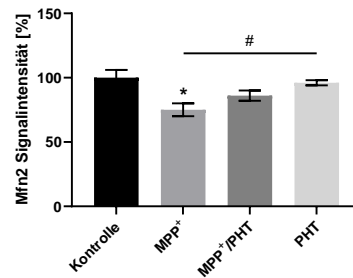
## A



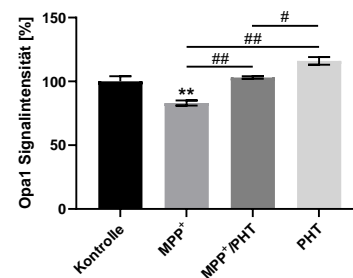
**B**



**C**



**D**



**Abbildung 31: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und der Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1**

(A) Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend mit den mitochondrialen Fusionsmarkern Mfn1, Mfn2 und Opa1 (dargestellt in Grün) und der Zellkernfärbung DAPI (dargestellt in Blau) inkubiert. Mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica wurden Bilder in 63-facher Vergrößerung mit 3,5-fachem Zoom aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens 2 biologischen Replikaten. (B, C, D) Nach Auswertung der Aufnahmen mit der Software ImageJ (dafür wurde der mittlere Grauintensitätswert eines Bildes auf die Anzahl der Zellen normiert), wurden die Signalintensitäten als Korrelate der Proteinnengen von Mfn1 (B), Mfn2 (C) und Opa1 (D) prozentual graphisch dargestellt. Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*/# =  $p < 0.05$ , \*\*/## =  $p < 0.01$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Auch hier zeigten sich unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur Kontrolle bei allen drei Fusionsproteinen signifikant reduzierte Proteinspiegel (siehe Abbildung 31). Analog zu den Western Blots war Mfn1 am stärksten betroffen, mit einer Abnahme von ca. 35 % und  $p < 0.01$ , gefolgt von Mfn2 mit ca. 25 % und  $p < 0.05$  sowie Opa1 mit ca. 20 % und  $p < 0.01$ . MPP<sup>+</sup> führte also sowohl bei den Fissions- als auch bei den Fusionsproteinen zu signifikant reduzierten Proteinspiegeln. Dies könnte auf geschädigte Mitochondrien, die anschließend fragmentiert und der Elimination durch Induktion der Mitophagie zugeführt wurden, hinweisen.

#### 4.4.4 Der Einfluss von Phenothiazin auf die Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1

Die Western-Blot-Analysen ergaben für Mfn1 und Mfn2 unter MPP<sup>+</sup> mit gleichzeitiger PHT-Behandlung im Vergleich zu MPP<sup>+</sup> diskret, jedoch nicht signifikant erhöhte Proteinspiegel, für Opa1 ein mit  $p < 0.05$  signifikant erhöhten Proteinspiegel (siehe Abbildung 30).

Bei den immunhistochemischen Aufnahmen ergab sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 31). Auch hier zeigten sich für Mfn1 und Mfn2 tendenziell höhere Proteinspiegel unter MPP<sup>+</sup>/PHT als unter reiner MPP<sup>+</sup>-Behandlung, jedoch nur für Opa1 zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit  $p < 0.01$ . Insbesondere für Opa1 ist der Einfluss von PHT deutlich. Somit hat PHT möglicherweise einen leicht reversiblen Einfluss auf die Wirkung von MPP<sup>+</sup> auf Mfn1 und Mfn2 und einen signifikanten Einfluss auf Opa1.

## 4.5 Die Wirkung von MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin auf die Induktion der Mitophagie

In dieser Arbeit wurde anhand der morphologischen Ergebnisse gezeigt, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer verstärkten Fragmentierung von Mitochondrien kommt (siehe Abschnitt 4.1.1). Abgetrennte Mitochondrien weisen entweder ein geringeres  $\Delta\psi_m$  auf (Twig et al., 2008; Chen et al., 2016) und können dieses wiedererlangen (Chen et al., 2016), oder sie verlieren ihr  $\Delta\psi_m$  und werden dann der Mitophagie zugeführt (Chen et al., 2016).

Mitophagie ist eine selektive Form der Autophagie. Sie dient der Qualitätskontrolle der Zelle, indem sie die Entfernung geschädigter und depolarisierter Mitochondrien vermittelt (Tolkovsky, 2009), um die von ihnen ausgehende Toxizität zu reduzieren (Goiran et al., 2022) und damit die Zellgesundheit zu gewährleisten (Archer, 2013). Depolarisierte Mitochondrien werden dabei in Autophagosomen den Lysosomen zur Elimination zugeführt (Tolkovsky, 2009).

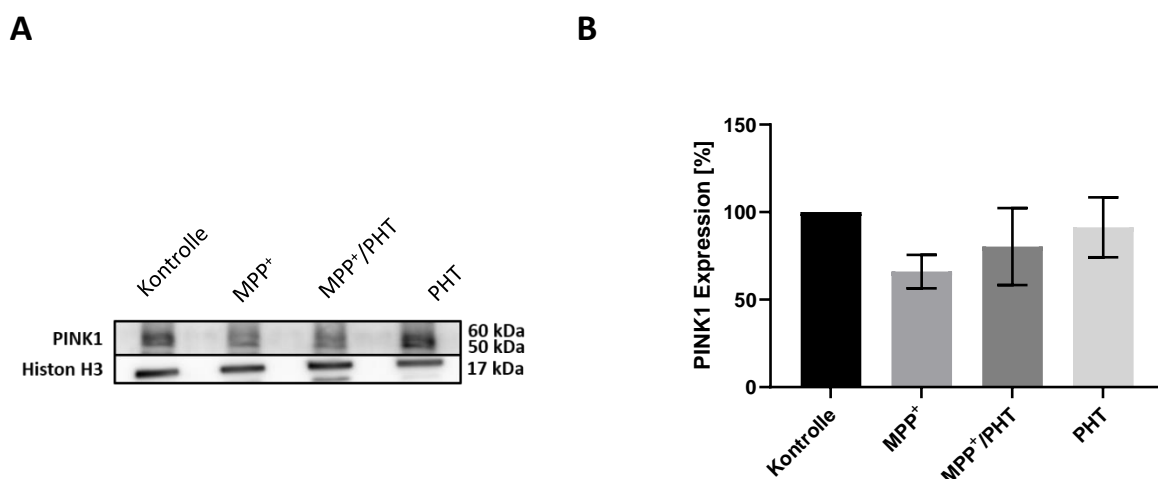
Es gibt verschiedene Stoffwechselfade der Mitophagie. Die PINK1/Parkin-abhängige Mitophagie ist am besten verstanden (Grünewald et al., 2019) und scheint bislang hauptsächlich für die Elimination depolarisierter Mitochondrien verantwortlich zu sein (Goiran et al., 2022). Unter

basalen Bedingungen befindet sich Parkin im Zytosol, während die PTEN-induzierte Kinase 1 (PINK1) nach Passage der TOM- und TIM-Komplexe degradiert wird (Goiran et al., 2022). Die Degradation findet jedoch nicht bei depolarisierten Mitochondrien statt. Hier kommt es zu einer Akkumulation von PINK1 an der OMM (Narendra et al., 2010), gefolgt von der Rekrutierung und Phosphorylierung der zytosolischen E3-Ubiquitin-Ligase Parkin (Narendra et al., 2008), um die Mitophagie zu induzieren (siehe Abschnitt 1.2.5)

Da bei den bisherigen Experimenten die Proteinspiegel der einzelnen membranverankerten Fusions- und Fissionsproteine unter MPP<sup>+</sup> alle signifikant erniedrigt vorgelegen haben, möglicherweise als Hinweis auf den Verlust geschädigter Mitochondrien durch induzierte Mitophagie, wurden als nächstes dessen primäre Akteure PINK1 und Parkin untersucht.

#### 4.5.1 MPP<sup>+</sup> beeinflusst die Proteinspiegel von PINK1 und Parkin

Unter Exposition von MPP<sup>+</sup> würde eine induzierte PINK1/Parkin-abhängige Mitophagie mit Akkumulation von PINK1 quantitativ erhöhte Proteinspiegel erwarten lassen. So verhielt es sich in einer Arbeit mit SH-SY5Y Zellen, bei der der Komplex-I-Inhibitor Rotenon zu einem signifikanten Anstieg von PINK1 auf Proteinebene führte (Kromm, 2020). Um dies in den LUHMES-Zellen zu überprüfen, wurden zunächst Western-Blot-Analysen mit dem Mitophagie-initiiierenden Protein PINK1 durchgeführt. Jedoch zeigte sich hier ein überraschenderweise gegenteiliger Effekt: Unter MPP<sup>+</sup> waren die Proteinspiegel von PINK1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle tendenziell (um ca. 30 %), wenn auch nicht signifikant, erniedrigt (siehe Abbildung 32).



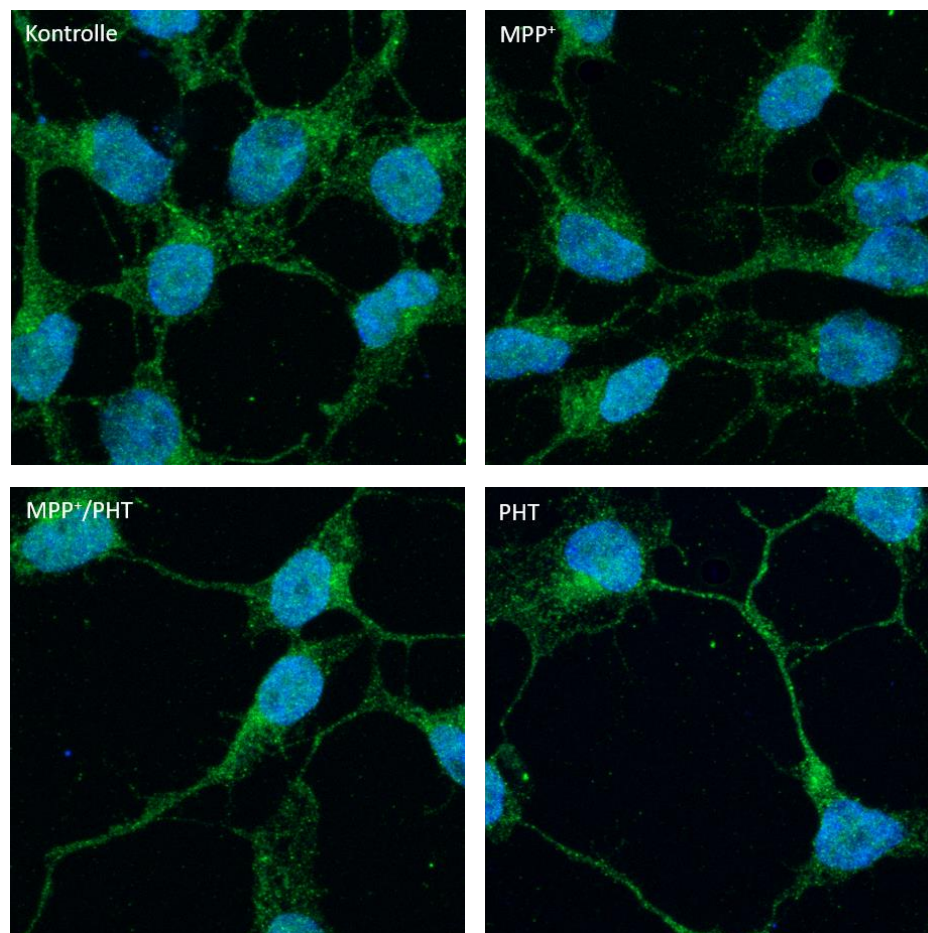
**Abbildung 32: Western-Blot-Analyse des Proteins PINK1 unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin**

(A) Repräsentative Western Blots des Proteins PINK1 und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Bei den unterschiedlichen Banden für Mff handelt es sich um Isoformen.

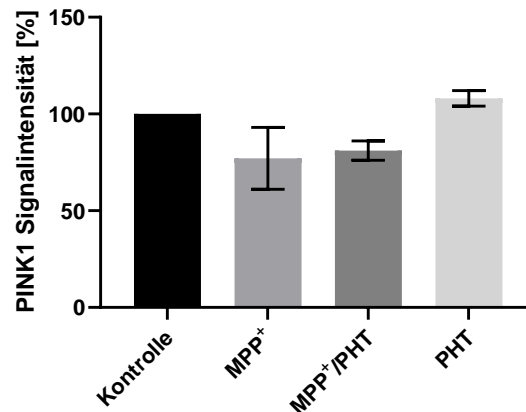
Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von PINK1 graphisch dargestellt (B). Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Auch die immunhistochemischen Aufnahmen, die zur weiteren Bestätigung dieses Ergebnisses durchgeführt wurden, ergaben ein ähnliches Bild mit einem tendenziell reduzierten PINK1-Proteinspiegel unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 33).

**A**



**B**



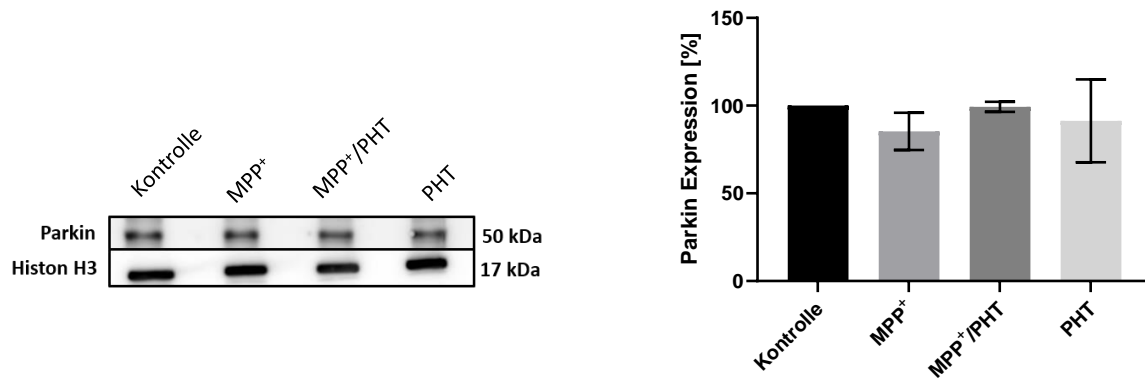
### Abbildung 33: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Zellkerne und des Proteins PINK1

(A) Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend mit dem Antikörper für PINK1 (dargestellt in Grün) und der Zellkernfärbung DAPI (dargestellt in Blau) inkubiert. Mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica wurden Bilder in 63-facher Vergrößerung mit 3,5-fachem Zoom aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus mindestens 2 biologischen Replikaten. (B) Nach Auswertung der Aufnahmen mit der Software ImageJ (dafür wurde der mittlere Grauintensitätswert eines Bildes auf die Anzahl der Zellen normiert), wurden die Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von PINK1 prozentual graphisch dargestellt. Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Anschließend wurde die zytosolische Ligase Parkin untersucht und zur Quantifizierung ebenfalls Western-Blot-Analysen durchgeführt. Parkin wird durch PINK1 an die OMM rekrutiert (Narendra et al., 2008) und durch Phosphorylierung seines Ubiquitinrests aktiviert (Koyano et al., 2014). Das durch PINK1 aktivierte Parkin ubiquitiniert seinerseits Proteine der OMM, zu denen auch die Fusionsproteine Mfn1 und Mfn2 gehören (Tanaka et al., 2010). Dadurch werden diese abgebaut und eine Fusion geschädigter Mitochondrien verhindert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte Parkin unter MPP<sup>+</sup> einen leicht, aber nicht signifikant erniedrigten Proteinspiegel auf (siehe Abbildung 34).

**A**

**B**



**Abbildung 34: Western-Blot-Analyse des Proteins Parkin unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin**

(A) Repräsentative Western Blots des Proteins Parkin und der dazugehörigen Ladekontrolle Histone H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histone H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von Parkin graphisch dargestellt (B). Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Der wider Erwarten nicht erhöhte Proteinspiegel von PINK1 unter MPP<sup>+</sup> als Ausdruck einer PINK1-Akkumulation könnte darauf hindeuten, dass in LUHMES-Zellen keine PINK1/Parkin-abhängige Mitophagie stattfindet, sondern ein anderer Stoffwechselweg eingeschlagen wird. Die Abnahme des PINK1-Proteinspiegels und die ebenfalls geringe und nicht signifikante Abnahme von Parkin unterstützen diese Hypothese.

#### 4.5.2 Der Effekt von Phenothiazin auf die durch MPP<sup>+</sup> veränderten Proteinspiegel von PINK1 und Parkin

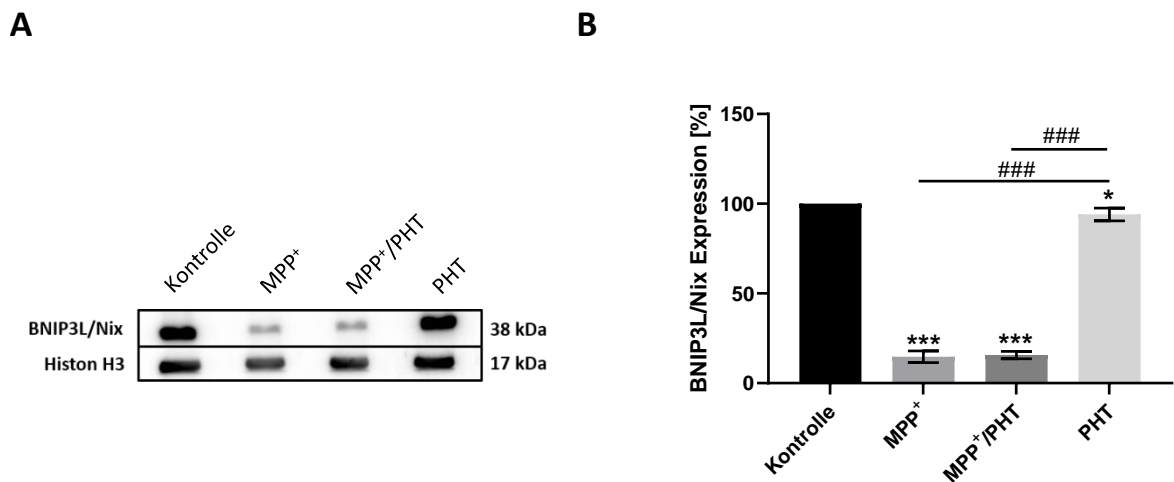
Die gleichzeitige Gabe von MPP<sup>+</sup> und PHT führte sowohl bei den Western-Blot- als auch bei den immunhistochemischen-Analysen bei PINK1 und Parkin zu tendenziell erhöhten Proteinspiegeln im Vergleich zur alleinigen Gabe von MPP<sup>+</sup> (siehe Abbildung 32–34). Allerdings waren diese Ergebnisse nicht signifikant. Möglicherweise moduliert PHT hier also die durch MPP<sup>+</sup> reduzierten PINK1- und Parkin-Spiegel.

#### 4.5.3 MPP<sup>+</sup> verändert die Proteinspiegel des Autophagieproteins BNIP3L/Nix

Neben der PINK1/Parkin-abhängigen Mitophagie ermöglicht die Rezeptor-vermittelte Mitophagie durch BNIP3L/Nix in Säugetieren eine direkte Bindung zwischen BINP3L/Nix an der OMM und LC3 auf Phagophoren (Novak et al., 2010). Diese sind Vorstufen von Autophagosomen,

welche die umhüllten Mitochondrien dann zur Degradation ans Lysosom weitergeben (Dolgacheva et al., 2022). BNIP3L/Nix und FUNCD1 sind Mitophagie-Rezeptoren, die an der OMM lokalisiert sind. Bei mitochondrialem Stress werden sie phosphoryliert oder dephosphoryliert, um eine Interaktion mit LC3 zu ermöglichen und die Mitophagie auszulösen (Chen et al., 2016). Es ist noch unklar, wie genau der mitochondriale Stress detektiert wird und die Mitophagie induziert wird (Chen et al., 2016).

Da die signifikant reduzierten PINK1- und Parkin-Spiegel unter MPP<sup>+</sup> nicht auf eine Induktion der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie hindeuteten, wurde im nächsten Schritt der Mitophagie-Rezeptor BNIP3L/Nix mittels Western Blot analysiert. Dieser Rezeptor wurde bisher noch nicht auf Proteinebene in LUHMES-Zellen unter MPP<sup>+</sup>-Exposition untersucht. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Verlust von BNIP3L/Nix von ca. 80 % unter MPP<sup>+</sup> mit  $p < 0,001$  (siehe Abbildung 35). Dieses überraschend eindeutige Ergebnis deutet darauf hin, dass BNIP3L/Nix als membranverankertes Rezeptorprotein der Mitochondrien im Rahmen der Mitophagie mit abgebaut wird. Dies könnte sich in den ausgeprägten Proteinverlusten widerspiegeln.



### Abbildung 35: Western-Blot-Analyse des Proteins BNIP3L/Nix unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin

(A) Repräsentative Western Blots des Autophagie Proteins BNIP3L/Nix und der dazugehörigen Ladekontrolle Histon H3 mit jeweiliger Darstellung der Größe der kDa-Banden. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> und 20 nM PHT behandelt und anschließend die Lysate von 3 unabhängigen Experimenten dem Western-Blot-Verfahren zugeführt. Nach densitometrischer Auswertung der Blots und Normierung auf die Ladekontrolle Histon H3 wurden die prozentualen Signalintensitäten als Korrelate der Proteinmengen von BNIP3L/Nix graphisch dargestellt (B). Vergleiche, die von der Kontrollgruppe ausgingen, wurden mit \*, Vergleiche, die von der MPP<sup>+</sup>-behandelten Gruppe ausgingen, mit # gekennzeichnet. Die Anzahl an \* bzw. # entsprach folgenden p-Werten: \*\*\*/### =  $p < 0,001$ . Für alle zusammengefassten Daten wurde der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

#### 4.5.4 Phenothiazin hat keinen Effekt auf die Proteinspiegel von BNIP3L/Nix

Wie der Abbildung 35 zu entnehmen ist, ist der Proteinspiegel von MPP<sup>+</sup>/PHT nahezu identisch mit dem von MPP<sup>+</sup>. PHT hat somit keinen revertierenden Einfluss auf den durch MPP<sup>+</sup> verursachten hochsignifikant reduzierten Proteinspiegel von BNIP3L/Nix.

## 5 Diskussion

Die Parkinsonsche Krankheit ist eine progrediente neurodegenerative Erkrankung, die durch den Untergang dopaminerger Neurone in der *SNpc* gekennzeichnet ist (Forno, 1996; Schnabel, 2010). Die Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, mit steigender Prävalenz (Feigin et al., 2017). Seit ihrer Erstbeschreibung vor mehr als 200 Jahren gilt sie bis heute als unheilbar. Lediglich eine symptomatische pharmakologische Therapie ist möglich, die jedoch weder den Krankheitsverlauf beeinflussen noch die im Laufe der Zeit progrediente Symptomatik aufhalten kann (Sardi et al., 2018; Dolgacheva et al., 2022).

Eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit spielen die Mitochondrien. Als Nachweis dafür dienen einerseits monogene Mutationen in Proteinen, die die Mitochondrienfunktion beeinträchtigen und zum klinischen Bild der Parkinsonschen Krankheit führen (Polymeropoulos et al., 1997; Zimprich et al., 2004; Kitada et al., 1998; Valente et al., 2004). Darüber hinaus ergaben post mortale Analysen von Parkinson-Patienten eine nachweisbar signifikante Reduktion des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette und damit einen weiteren Beleg für die Bedeutung der Mitochondrien (Schapira et al., 1990). Auch Toxine, wie 6-OHDA, Rotenon oder MPTP/MPP<sup>+</sup> beeinflussen spezifisch die Funktion der Mitochondrien, indem sie unter anderem den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette hemmen (Ramsay et al., 1986b; Glinka et al., 1996; Betarbet et al., 2000). Insbesondere das Toxin MPTP/MPP<sup>+</sup> verursacht beim Menschen eine nahezu identisch ausgeprägte Parkinson-Symptomatik (Langston et al., 1983; Langston et al., 1984). Eine Inhibition des Komplex I führt zu einer vermehrten Produktion von ROS (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988) und erhöht das Risiko für oxidativen Stress (Drechsel und Patel, 2008). Dies ist vermutlich eine wesentliche und kausale Komponente in der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit (siehe Abschnitt 2.1.8.4).

Auf der Suche nach neuen Erkenntnissen, einem besseren Verständnis und möglichen therapeutischen Ansätzen für die Parkinsonsche Krankheit ist die epigenetische Regulation zunehmend in den Fokus gerückt. Die Epigenetik ist eine relativ junge Disziplin der Genetik, die vor allem in den letzten beiden Jahrzehnten zunehmendes Interesse der Forschung geweckt hat. Der aus dem Griechischen stammende Begriff „epi“ beschreibt sie als „über“ der Genetik stehend. Die DNA einer jeder Zelle enthält Gene, die abgelesen werden können und nach deren Bauplan über eine RNA ein Protein synthetisiert werden kann. Die Gene sind unveränderlich, aber über chemische Modifikationen der DNA und Histone, die für die Regulation der Genaktivität zuständig sind, kann Einfluss auf deren Aktivitätszustand genommen werden (van Heesbeen und Smidt, 2019; Deans und Maggert, 2015). Bei stabilem Genotyp ist der Phänotyp daher variabel (Deans und Maggert, 2015). Epigenetische Modifikationen können die Aktivierung oder Stummschaltung von Genen regulieren und damit die Proteinsynthese beeinflussen.

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinsonschen Krankheit wurden epigenetische Regulationen z. B. im Rahmen des  $\alpha$ -Synuclein-Stoffwechsels beobachtet, die nahelegen, dass sie zu einer verminderten Akkumulation pathologischer Aggregate führen und somit kompensatorischer Natur sind (van Heesbeen et al., 2013). In einer Arbeit von Dr. M. Baeken wurde festgestellt, dass es unter Exposition mit dem Komplex-I-Inhibitor MPP<sup>+</sup> zu einer mit epigenetischen Veränderungen koinzidierenden Hochregulation mitochondrialer Atmungskettenkomplexe kommt (Baeken, 2021). Die Aktivität der Atmungskette ist Voraussetzung für die Synthese des Energieträgers ATP. Eine verstärkte Aktivierung der Synthese von Atmungskettenkomplexen aufgrund epigenetischer Regulation könnte dazu dienen, ATP-Defizite infolge der Inhibition zu kompensieren. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Konsequenzen dieser unter MPP<sup>+</sup>-Exposition in LUHMES-Zellen festgestellten epigenetisch induzierten Hochregulation der mitochondrialen Atmungskette zu untersuchen. Ein besonderes Interesse galt hierbei der mitochondrialen Morphologie, Dynamik und Elimination von Mitochondrien im humanen Zellmodell der Parkinsonschen Krankheit.

Da oxidativer Stress eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit spielt, könnte die Entwicklung von prophylaktisch und therapeutisch einsetzbaren Antioxidantien ein erfolgversprechender Ansatz und Durchbruch in der Therapie chronisch erkrankter Parkinson-Patienten sein. Eine vielversprechende Substanz in diesem Zusammenhang ist Phenothiazin (PHT). PHT hat sich bisher in präklinischen Studien sowohl in *in vitro* als auch *in vivo* als potentes Antioxidans erwiesen (Hajieva et al., 2009; Mocko et al., 2010; Moosmann et al., 2001; Ohlow et al., 2017; Tapias et al., 2019). In dieser Arbeit soll ein Beitrag dazu geleistet werden, die Eigenschaften von PHT weiter zu erforschen, in der Hoffnung, dem Antioxidans als Pharmakon den Weg in die Klinik zu ebnen.

Um die Wirksamkeit eines neuroprotektiven Antioxidans zu untersuchen, ist ein zelluläres System wertvoll, das die meisten Aspekte der Neurodegeneration widerspiegelt. Dafür bieten LUHMES-Zellen gegenüber anderen Zelllinien einige Vorteile, auch wenn sie bisher noch nicht in größerem Umfang in der Parkinson-Forschung oder Pharmakoentwicklung eingesetzt wurden. Zum einen handelt es sich um menschliche Zellen, die sich daher hervorragend für die Analyse menschlicher Krankheiten eignen. Zum anderen sind sie, wie die Parkinsonsche Krankheit, mesenzephalen Ursprungs und weisen nach der Differenzierung dopaminerge Eigenschaften auf. Außerdem ermöglichen sie eine einfache und schnelle Reproduktion postmitotisch differenzierter Zellen.

## **5.1 MPP<sup>+</sup> und Phenothiazin beeinflussen die Morphologie der Mitochondrien**

Mitochondrien weisen keine statische, sondern eine dynamische Morphologie auf. Diese Morphologie passt sich an die jeweilige Stoffwechselsituation an und unterliegt den Ereignissen der Fusion (Verschmelzung) und Fission (Fragmentierung) (Wai und Langer, 2016). Die Fusion ermöglicht unter anderem die Vermischung und den Austausch von Inhalten, wie mitochondrialer DNA (Chen et al., 2007; Youle und van der Bliek, Alexander M., 2012). Die Fission dient unter anderem dazu, beschädigte und dysfunktionale mitochondriale Anteile abzutrennen (Kraus et al., 2021). Die Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette durch das Toxin MPP<sup>+</sup> führt zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988), was mit einem erhöhten Risiko für oxidativen Stress einhergeht (Drechsel und Patel, 2008). Auch bei Parkinson-Patienten konnte postmortal eine Inhibition des Komplex I festgestellt werden (Schapira et al., 1990; Franco-Iborra et al., 2018; Prasertsuksri et al., 2023). ROS können die mitochondriale Integrität beeinträchtigen und zu oxidativen Schäden an mitochondrialer DNA und Fettsäuren der Membranen führen, wie in postmortalen Analysen der *SNpc* von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden konnte (Dexter et al., 1989a; Bender et al., 2006).

Es wurde angenommen, dass aufgrund der Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> eine vermehrte Bildung von ROS in den Mitochondrien der LUHMES-Zellen stattfinden wird. Dies könnte zu Schädigungen führen, die mit einer Abtrennung geschädigter mitochondrialer Anteile einhergeht. Um dies zu untersuchen und zu visualisieren, wurden immunhistochemische Aufnahmen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des mitochondrialen membranabhängigen Farbstoffs MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XROS angefertigt. Tatsächlich zeigten die mit dem Farbstoff angefärbten Mitochondrien unter MPP<sup>+</sup> visuell eine deutlich veränderte Morphologie: Die Mitochondrien stellten sich kugel- und eiförmig aggregiert dar, was mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen fragmentierter Mitochondrien übereinstimmt (Chen et al., 2003; Tilokani et al., 2018; Archer, 2013; Chen et al., 2005). Im Gegensatz dazu werden vermehrt fusionierte Mitochondrien als langstreckig tubulär und verzweigt beschrieben (Chen et al., 2003; Tilokani et al., 2018; Archer, 2013). Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtung sehr ähnlich kondensierter und fragmentierter Mitochondrien in SH-SY5Y-Zellen bestätigt, einer Neuroblastom-Zelllinie, die ebenfalls unter MPP<sup>+</sup>-Exposition mit dem MitoTracker Red Farbstoff untersucht wurde (Prasertsuksri et al., 2023; Jang et al., 2018). Da die erstmals beobachtete Darstellung morphologisch veränderter Mitochondrien unter MPP<sup>+</sup> in LUHMES-Zellen mit der Präsentation fragmentierter Mitochondrien übereinstimmt, und diese Beobachtungen auch in

anderen Arbeiten unter MPP<sup>+</sup>-Behandlung gemacht wurden (Prasertsuksri et al., 2023; Jang et al., 2018), kann davon ausgegangen werden, dass es sich um fragmentierte Mitochondrien handelt.

Da die Anreicherung des MitoTracker Red Farbstoffs  $\Delta\psi_m$ -abhängig erfolgt, ist anzunehmen, dass dies bei den fragmentierten Mitochondrien zum Zeitpunkt der Färbung noch vorhanden war. Eine Arbeit von Twig et al. illustrierte eindrucksvoll den zeitlichen Verlauf des Verlusts des  $\Delta\psi_m$  fragmentierter Mitochondrien: Je geringer das  $\Delta\psi_m$ , desto schwächer die Färbung, und umso zeitlich näher waren die Mitochondrien vor Induktion der Mitophagie (Twig et al., 2008), dem selektiven Abbau von Mitochondrien. Bei den vorliegenden Analysen in dieser Arbeit lässt sich aufgrund einer fehlenden Färbung über einen zeitlichen Verlauf nicht differenzieren, zu welchem genauen Zeitpunkt sich die fragmentierten Mitochondrien in Bezug auf die Induktion der Mitophagie genau befinden. Eine vermehrte Mitochondrienfragmentierung unter MPP<sup>+</sup> als Folge einer erhöhten mitochondrialen Schädigung mit nachfolgender Elimination ist jedoch eine logische Konsequenz im Sinne der Erhaltung eines gesunden mitochondrialen Netzwerks.

Für PHT wurde angenommen, dass es aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften als Radikalfänger einen reduzierenden Einfluss auf den durch die Komplex-I-Inhibition verursachten oxidativen Stress (Drechsel und Patel, 2008) nehmen könnte. Das würde bedeuten, dass es durch das Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies zu weniger mitochondrialen Schäden und damit auch zu weniger Fissionsereignissen kommen könnte. Die immunhistochemischen Aufnahmen bestätigten dies und zeigten unter MPP<sup>+</sup>/PHT visuell deutlich weniger sichtbar fragmentierte, teilweise nur noch zarte, fadenförmige Mitochondrienaggregate im Vergleich zu MPP<sup>+</sup>. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte nachgewiesen werden, dass PHT in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* von Ratten signifikant vor Schäden durch oxidativen Stress schützt (Tapias et al., 2019).

## 5.2 MPP<sup>+</sup> hemmt die oxidative Phosphorylierung

Bei Parkinson-Patienten werden häufig Störungen der Atmungskette festgestellt. Insbesondere wurde eine signifikant reduzierte Aktivität und damit eine eingeschränkte Funktion des Komplex I beobachtet (Schapira et al., 1990; Franco-Iborra et al., 2018; Zhang et al., 2005; Prasertsuksri et al., 2023). Das Toxin MPP<sup>+</sup> kann das klinische Bild der Parkinsonschen Krankheit widerspiegeln, indem es vor allem den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette hemmt (Ramsay et al., 1986b). Folglich kommt es zu einer beeinträchtigten oxidativen Phosphorylierung mit verminderter ATP-Synthese (Ramsay et al., 1991; Di Monte et al., 1986) und einer erhöhten Freisetzung von Elektronen mit ansteigender ROS-Produktion (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988).

Um zu überprüfen, ob eine Beeinträchtigung der Funktion des Komplexes I in LUHMES-Zellen unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> nachgewiesen werden kann und welche Auswirkungen MPP<sup>+</sup> auf die anderen Komplexe hat, wurden katalytische Untereinheiten der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette mittels Western-Blot-Analyse eingehend untersucht. Wenn die Komplexe nicht korrekt assembliert sind, werden die Untereinheiten instabil und nachfolgende quantitative Veränderungen, die auf einen Funktionsverlust hinweisen, können detektiert werden. Unter MPP<sup>+</sup> zeigte sich für die Untereinheiten der Komplexe I, II und IV ein Trend zu reduzierten Proteinspiegeln und damit zu einem tendenziellen Funktionsverlust im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Allerdings war der Verlust von Komplex I unter MPP<sup>+</sup> nicht wie erwartet, signifikant, dafür aber der Verlust für Komplex II. Die ATP-Synthase (Komplex V) zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen. Wie sind diese Ergebnisse zu erklären

Auffallend waren zunächst die durchweg relativ hohen Standardabweichungen der Western Blot Analysen für alle Untereinheiten des Komplexes. Diese könnten methodisch bedingt sein. Die Western-Blot-Analyse für die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette stellt eine besondere Herausforderung dar und ist stör anfällig. Zum einen bestehen die Komplexe aus insgesamt ca. 90 Untereinheiten, wodurch die Gefahr einer partiellen Dissoziation während der Elektrophorese besteht (Calvaruso et al., 2008). Dies könnte bei Unterschieden zwischen den einzelnen Wiederholungen der Experimente die große Streuung der Ergebnisse erklären. Ausserdem scheinen die Komplexe nicht getrennt vorzuliegen, sondern in sogenannten Superkomplexen strukturiert zu sein (Calvaruso et al., 2008), was ihre Auftrennung erschweren könnte. Für eine optimale Auftrennung der Komplexe ist außerdem die Verwendung eines Gradientengels erforderlich (Calvaruso et al., 2008). Letzteres wurde zwar verwendet, die aufgeführten Punkte zeigen jedoch, wie störungs- und fehleranfällig die Western-Blot-Methode für die Untereinheiten der OXPHOS-Komplexe ist.

Die wider Erwarten nicht signifikante Reduktion von Komplex I und die signifikante Reduktion von Komplex II könnten daher auf die Stör anfälligkeit der Methode zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde *in vitro* eine signifikante Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> nachgewiesen (Ramsay et al., 1986b). Analysen von post mortalen Schnitten von Parkinson-Patienten bestätigten dies und zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen signifikant reduzierte Proteinspiegel in Western-Blot-Analysen der *SNpc* von bzw. der Untereinheit NDUFS3 von Komplex I (Franco-Iborra et al., 2018; Schapira et al., 1990; Prasertsuksri et al., 2023).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass postmortale Analysen von Gehirnschnitten eine hervorragende Möglichkeit bieten, das Verständnis der Pathologie zu fördern, allerdings weisen sie auch Grenzen auf: Aufgrund der Herausforderung, Hirngewebe aus bestimmten Regionen zu gewinnen, ist die Anzahl der Proben oft begrenzt. Ausserdem kann die postmortale Verzögerung bis zum Beginn der Probenentnahme und -verarbeitung die Qualität von ggf. unterschiedlich empfindlichen

Proteinen und Geweben beeinträchtigen (Ferrer et al., 2008). Diese Faktoren können die Ergebnisse beeinflussen und eine korrekte Interpretation erschweren. Darüber hinaus erheben postmortale Untersuchungen einen Endpunkt (Franco-Iborra et al., 2018) nach Jahren bis Jahrzehnten der Erkrankung. Hier könnte die Dauer der Erkrankung das Ergebnis mit beeinflusst haben, so dass die Ergebnisse von *in vitro* Studien davon abweichen könnten.

Die tendenziell verringerten Proteinspiegel der Komplexe I, III und IV korrelierten jedoch annähernd mit den auf transkriptioneller Ebene in LUHMES-Zellen erhobenen Daten. Hierbei koinzidierten epigenetische Veränderungen mit der signifikanten Hochregulation nukleär kodierter Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V unter MPP<sup>+</sup>, die mitochondrial kodierten Komplexe I-V waren alle herunterreguliert (Baeken, 2021). Die Initiierung der Transkription führt zur Proteinbiosynthese. Die transkriptionelle Hochregulation der nukleär kodierten Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V könnte kompensatorisch aufgrund eines eingeschränkten Imports und/oder eines erhöhten Bedarfs an kernkodierten Proteinen bei Schädigung oder ATP-Mangel erfolgen. Der Komplex I besteht beispielsweise aus insgesamt 45 Proteinuntereinheiten (Stroud et al., 2016), von denen nur sieben durch mitochondriale DNA kodiert werden. Die restlichen Untereinheiten sind durch nukleäre DNA kodiert (Greenamyre et al., 2001) und es bedarf eines mitochondrialen Imports-der zytosolisch synthetisierten Proteine.

Dass die ATP-Synthase (Komplex V) unter MPP<sup>+</sup> keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle zeigte, könnte daran liegen, dass sie nicht Teil der Atmungskette ist und morphologisch separat lokalisiert ist (Strauss et al., 2008). Daher ist sie möglicherweise auch nicht direkt von einer MPP<sup>+</sup>-Interaktion betroffen. Allerdings würde eine eingeschränkte Atmungskette aufgrund reduzierter Anzahl Untereinheiten der Komplexe I-IV eine insgesamt verminderte ATP-Produktion erwarten lassen. Reduzierte ATP-Spiegel unter MPP<sup>+</sup>-Behandlung wurden in isolierten Mitochondrien von Mäusen und Hepatozyten (Mizuno et al., 1987; Di Monte et al., 1986) sowie bei Parkinson-Patienten (Hattingen et al., 2009) bestätigt. Es ist daher naheliegend, dass dies auch für LUHMES-Zellen gilt, müsste aber in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass MPP<sup>+</sup> in LUHMES-Zellen den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette hemmt, auch wenn dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit nur als tendenzielle Reduktion gezeigt werden konnte, was möglicherweise auf die störanfällige Methodik zurückzuführen ist. Der signifikant reduzierte Komplex II sowie die tendenziell reduzierten Komplexe III und IV weisen auf eine eingeschränkte Funktion der Atmungskette hin. Diese Ergebnisse spiegeln sich teilweise in post-mortem Analysen und der mit epigenetischen Veränderungen koinzidierenden transkriptionellen Hochregulation kernkodierter Untereinheiten der Atmungskette wider. Neben der verminderten ATP-Synthese könnte auch die unzureichende Assemblierung der Komplexe zu einer Beeinträchtigung des  $\Delta\psi_m$  führen, mit der Folge einer vermehrten Abtrennung depolarisierter Mitochondrienanteile. Darüber hinaus führt

die Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup>, wie bereits erwähnt, zu einer erhöhten ROS-Produktion (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988), was das Risiko für oxidativen Stress erhöht (Drechsel und Patel, 2008) und zu mitochondrialen Schädigungen führen kann. Geschädigte Mitochondrien werden abgetrennt (Kraus et al., 2021), was sich in den in dieser Arbeit gezeigten morphologischen Veränderungen unter dem MitoTracker Farbstoff widerspiegelt.

PHT hatte keinen Effekt auf die Untereinheiten der Komplexe. Die Proteinspiegel wiesen keine signifikanten Unterschiede unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zu MPP<sup>+</sup>/PHT auf, allerdings waren auch diese mit großen Standardabweichungen behaftet. Dies könnte einerseits bedeuten, dass PHT keinen protektiven Einfluss hat. Dies wurde auch auf transkriptioneller Ebene für die Komplexe I und II bestätigt, hier zeigte sich unter MPP<sup>+</sup>/PHT keine Herunterregulierung der nukleären und mitochondrial kodierten Komplexe I und II im Sinne eines verminderten Bedarfs an kernkodierten Untereinheiten (Baeken, 2021). Andererseits könnte ein eventuell doch vorhandener Effekt durch die bereits erwähnte Fehleranfälligkeit der Gelelektrophorese verschleiert sein.

### **5.3 Der mitochondriale Proteinimport wird durch MPP<sup>+</sup> beeinflusst**

Eng mit der Funktion der Mitochondrien verbunden ist der Proteinimport. Da Mitochondrien nur einen geringen Anteil an Proteinen selbst synthetisieren können, ist der Import von im Zytoplasma synthetisierten Vorläuferproteinen für ihre Biogenese und Funktion unerlässlich. Die Passage der Vorläuferproteine aus dem Zytosol in das Innere der Mitochondrien wird hauptsächlich durch die Translokasen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran TOM20 und TIM23 gewährleistet (Neupert und Herrmann, 2007).

Unter Behandlung mit MPP<sup>+</sup> zeigte TOM20 in Western-Blot-Analysen im Vergleich zur Kontrolle eine tendenzielle, aber nicht signifikante Abnahme des Proteinspiegels. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Proteinimport an der OMM durch das Toxin beeinträchtigt wird. *In vitro* Analysen der dopaminergen Neuroblastom-Zelllinie BE(2)-M17 zeigten nach MPP<sup>+</sup>-Behandlung in Western-Blot-Analysen dosisabhängig sowohl erhöhte als auch signifikant erniedrigte Proteinspiegel von TOM20 (Franco-Iborra et al., 2018). Bei dieser Zelllinie und den LUHMES-Zellen handelt es sich jeweils um dopaminerge Zellen, wobei Neuroblastomzellen als Tumorzellen einen veränderten Metabolismus aufweisen und Unterschiede in der Dosierung von MPP<sup>+</sup> bei verschiedenen Zelllinien einen direkten Vergleich erschweren. Post mortale Western-Blot-Analysen von Parkinson-Patienten ergaben ebenfalls signifikant erniedrigte TOM20-Proteinspiegel im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe (Franco-Iborra et al., 2018). Einschränkend ist hier zu berücksichtigen, dass es sich bei den post mortalen Analysen um die Erhebung zu einem Endpunkt handelt (Franco-Iborra et al., 2018), die Dauer der Erkrankung

könnte hier das Ergebnis mit beeinflusst haben. So ist es durchaus denkbar, dass sich unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> lediglich ein Trend zur Reduktion von TOM20 zeigt.

Eine mögliche Ursache für die tendenziell erniedrigten TOM20-Spiegel könnte in dem Einfluss von  $\alpha$ -Synuclein begründet sein, das nachweislich eine Rolle in der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit spielt. Eine signifikante Interaktion zwischen TOM20 und  $\alpha$ -Synuclein konnte *in vivo* in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* von Ratten, die mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Ratten nachgewiesen werden (Di Maio et al., 2016). Weiterhin konnte gezeigt werden dass es aufgrund dieser Interaktion zu einem signifikant reduzierten Proteinimport kommt (Di Maio et al., 2016). Diese Ergebnisse konnten auch in Experimenten ohne Parkinson Toxin bei alleiniger Überexpression von menschlichem  $\alpha$ -Synuclein bestätigt werden (Di Maio et al., 2016). Auch in SH-SY5Y Zellen konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synuclein-Oligomere, nicht aber Monomere zu einem signifikant reduzierten Proteinimport führen (Di Maio et al., 2016). Interessanterweise zeigten Proteomanalysen von differenzierten LUHMES-Zellen einen moderat erhöhten Gehalt an  $\alpha$ -Synuclein im Vergleich zu undifferenzierten LUHMES-Zellen (Tüshaus et al., 2021). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass in LUHMES-Zellen eine Interaktion zwischen leicht überexprimiertem oder oligomerisiertem  $\alpha$ -Synuclein und TOM20 bestehen könnte, die den Proteinimport an der OMM tendenziell blockiert. Dies könnte möglicherweise die reduzierten Proteinspiegel von TOM20 erklären.

Für TIM23 wurde sowohl in Western-Blot- als auch in immunhistochemischen Analysen ein signifikant reduzierter Verlust unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> festgestellt. Diese Ergebnisse konnten auch *in vitro* in Western-Blot-Analysen der dopaminergen Neuroblastomzelllinie BE(2)-M17 nach MPP<sup>+</sup>-Behandlung (Franco-Iborra et al., 2018) und auch in post mortem Western-Blot-Analysen von Parkinson-Patienten im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe gezeigt werden (Franco-Iborra et al., 2018). Dies könnte bedeuten, dass es neben dem tendenziell beeinträchtigten Proteinimport über der OMM auch zu einem verminderten Proteinimport an der IMM kommen könnte. Franco-Iborra et al. konnten dies bestätigen und zeigen, dass es unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> in der dopaminergen Neuroblastomzelllinie BE(2)-M17 nicht nur zu einem signifikant reduzierten TIM-23 Spiegel kommt, sondern dass dies auch zu einem signifikant reduzierten Proteinimport an der IMM führt (Franco-Iborra et al., 2018).

Ein Grund für die signifikante Reduktion des TIM23-Spiegels könnte mit dem  $\Delta\psi_m$  zusammenhängen. Im Vergleich zur OMM ist der Transport an der inneren Membran und die Funktion der TIM-Komplexe vom  $\Delta\psi_m$  abhängig (Becker et al., 2019; Rehling et al., 2004). Das  $\Delta\psi_m$  über der IMM wird wiederum durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) erzeugt (Mitchell, 1961). Ein Verlust des  $\Delta\psi_m$  könnte daher mit einem Funktionsverlust von TIM23 einhergehen, was zu einer verminderten Expression des Proteins führen könnte. Ein verminderter TIM-23-

Spiegel, der zu einem reduzierten Proteinimport führt, geht wiederum mit einer Unterversorgung der Organellen mit mitochondrialen Proteinen einher, die z.B. für die Synthese der einzelnen Untereinheiten der Komplexe benötigt werden. Als Folgen könnten weitere Funktionseinbußen der Komplexe mit weiterem Verlust des  $\Delta\psi_m$  auftreten, die in der Induktion von Mitophagie zum Abbau des dysfunktionalen Mitochondriums enden könnten.

TIM23 wurde auch mit dem Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung Carbonyl cyanid 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) behandelt. Die Exposition der Zellen mit FCCP führt dosisabhängig zu einer Depolarisation bzw. Reduktion des  $\Delta\psi_m$ . Dabei werden die Protonen unter Ausschluss der ATP-Synthase direkt über die IMM in die Matrix transferiert (Terada, 1990; Bertholet et al., 2022).

Bei Verwendung des mitochondrialen Entkopplers FCCP in einer Dosis von 1  $\mu\text{M}$  zeigten die Western Blots tendenziell reduzierte TIM23-Spiegel, die jedoch im Vergleich zu den TIM23-Spiegeln unter MPP<sup>+</sup> weniger stark reduziert und nicht signifikant waren. Dies bedeutet, dass die Entkopplung der OXPHOS mit FCCP tendenziell zu einer Reduktion von TIM23 führt, jedoch etwas weniger ausgeprägt als unter Exposition mit MPP<sup>+</sup>. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Abhängigkeit der ROS-Produktion, des  $\Delta\psi_m$  und der Aktivität der Atmungsketten-Komplexe, insbesondere des Komplexes I voneinander begründet sein (Votyakova und Reynolds, 2001). Eine Inhibition des Komplex I, wie sie unter MPP<sup>+</sup> auftritt, führt zu einer Beeinträchtigung der Atmungskette, was zu einem Verlust des  $\Delta\psi_m$  führen könnte, was wiederum den davon abhängigen Proteinimport über TIM23 beeinträchtigen könnte. Im Gegensatz dazu, wenn die Abnahme des  $\Delta\psi_m$  durch den nicht-oxidativen Entkoppler FCCP verursacht wird, könnte dies zu einer reduzierten ROS-Rate und damit zu einem weniger ausgeprägten Verlust des  $\Delta\psi_m$  im Vergleich zu MPP<sup>+</sup> führen. Dies wiederum könnte erklären, warum TIM23 unter FCCP weniger stark reduziert zu sein scheint als unter MPP<sup>+</sup>. Der entscheidende Unterschied zwischen MPP<sup>+</sup> und FCCP liegt also in ROS begründet. Diese Analyse unterstreicht einmal mehr die zentrale Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies, ihrer Effekte und die Notwendigkeit der Etablierung protektiv wirkender Antioxidantien.

PHT zeigte in den Western-Blot-Analysen keinen Effekt auf die unter MPP<sup>+</sup> tendenziell reduzierten TOM20-Proteinspiegel. Das bedeutet, dass ein tendenziell verminderter Proteinimport an der OMM durch Phenothiazin nicht verbessert oder gar aufgehoben wird. Dies bestätigte sich auch in der mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon und 20nM PHT behandelten Zelllinie SH-SY5Y, in der PHT keinen Einfluss auf TOM20 hatte (Kromm, 2020).

Die signifikante Abnahme von TIM23 unter MPP<sup>+</sup> zeigte bei gleichzeitiger Gabe von PHT in Western-Blot-Analysen keinen Unterschied, in Übereinstimmung mit dem Western-Blot-Ergebnis aus einem Zellmodell mit SH-SY5Y-Zellen mit 20nM Phenothiazin (Kromm, 2020). Die immunhistochemischen Aufnahmen zeigten jedoch einen signifikanten Einfluss von PHT.

Möglicherweise könnte PHT einen stabilisierenden Effekt auf das  $\Delta\psi_m$  haben, und somit die davon abhängige Funktion und damit die Expression von TIM23 aufrechterhalten.

PHT könnte aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften den durch MPP<sup>+</sup> induzierten oxidativen Stress teilweise kompensieren und damit die OXPHOS-Funktion, das  $\Delta\psi_m$  und letztlich auch die daran gekoppelte Funktion von TIM23 stabilisieren.

#### **5.4 Reduzierte Fissions- und Fusionsproteine unter MPP<sup>+</sup> deuten auf eine Induktion der Mitophagie hin**

Auf morphologischer Ebene wurde nach MPP<sup>+</sup>-Exposition eine Zunahme fragmentierter Mitochondrien und damit vermehrter Fissionsereignisse beobachtet. Fragmentierte Mitochondrien weisen entweder ein geringeres  $\Delta\psi_m$  auf (Twig et al., 2008; Chen et al., 2016) und können dieses wiedererlangen (Chen et al., 2016). Oder sie verlieren ihr  $\Delta\psi_m$  und werden dann der Mitophagie zugeführt (Chen et al., 2016). Bei den mit dem MitoTracker Farbstoff angereicherten fragmentierten Mitochondrien ist davon auszugehen, dass noch ein, wenn auch reduziertes  $\Delta\psi_m$  vorhanden ist. Dieses könnte potenziell wiedergewonnen werden oder endgültig verloren gehen. Darüber hinaus ist es möglich, dass bereits fragmentierte Mitochondrien mit verlorenem  $\Delta\psi_m$  entweder der Mitophagie zugeführt wurden oder noch vorhanden sind, aber nicht mit dem  $\Delta\psi_m$ -abhängigen MitoTracker-Farbstoff angefärbt werden konnten. Um herauszufinden, ob sich die Fragmentierung und eine mögliche Induktion der Mitophagie auch auf Proteinebene manifestiert, wurden die beiden hauptsächlich daran beteiligten Proteine Mff und DLP1 analysiert. Es wurde angenommen, dass für das mitochondrial membranverankerte Fissionsprotein Mff (van der Bliek, Alexander M. et al., 2013; Otera et al., 2010) bei Induktion der Mitophagie ein Verlust als Korrelat der Elimination auftreten würde. Übereinstimmend zeigte sich sowohl bei in den Western-Blot-Analysen als auch in der konfokalen Immunfluoreszenz unter MPP<sup>+</sup> ein signifikanter Verlust von Mff im Vergleich zur Kontrolle.

Für das zytosolische Fissionsprotein DLP1, das nach der Durchtrennung von Mitochondrien im Zytosol verbleibt, wurde dagegen keine Veränderung unter MPP<sup>+</sup> erwartet. Allenfalls könnte es bei verstärkter Induktion der Fission bei erhöhtem Bedarf von DLP1 zu einer Hochregulation des Fissionsproteins kommen. In den Western-Blot-Analysen und der konfokalen Immunfluoreszenz zeigte sich unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Veränderung der DLP1-Spiegel, lediglich eine tendenzielle Reduktion. Dies könnte zum einen daran liegen, dass das zytosolische DLP1 konstant reguliert bleibt. Andererseits könnte aber die Fission auch nicht so stark von DLP1 abhängig sein, wie bisher angenommen. Burman et al. konnten zeigen, dass auch in Abwesenheit von DLP1 in DLP1-Knockout-Zellen Mitophagie stattfindet (Burman et al., 2017)

und damit auch eine ihr vorangehende mitochondriale Fission. Dies könnte erklären, warum unter MPP<sup>+</sup> keine signifikante Veränderung des DLP1-Spiegels im Vergleich zu unbehandelten Neuronen auftritt.

Als nächstes wurde der Einfluss von PHT auf die Fissionsproteine untersucht. Die Western-Blot- und immunhistochemischen Analysen zeigten hier eine Tendenz zu einer sehr geringen, nicht signifikanten Erhöhung der Mff-Proteinspiegel in der MPP<sup>+</sup>/PHT-Gruppe im Vergleich zur MPP<sup>+</sup>-Gruppe. Für DLP1 zeigte sich in den Western Blots in der MPP<sup>+</sup>/PHT-Gruppe ebenfalls ein Trend zu höheren Spiegeln im Vergleich zur MPP<sup>+</sup>-Gruppe, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PHT tendenziell Schwankungen der Spiegel der mitochondrialen Fissionsproteine unter MPP<sup>+</sup> entgegenwirkt.

Da das signifikant reduzierte Fissionsprotein Mff auf einen Verlust durch Induktion der Mitophagie hinweist, stellte sich die Frage, wie sich die Fusionsproteine unter MPP<sup>+</sup> verhalten würden. Da Mfn1, Mfn2 und Opa1 allesamt mitochondrial verankerte Proteine der OMM und IMM sind (Chandhok et al., 2018), wurde erwartet, dass bei Induktion der Mitophagie als Korrelat der Elimination hier reduzierte Proteinspiegel vorliegen würden. Tatsächlich führte MPP<sup>+</sup> bei allen drei Fusionsproteinen, sowohl bei den Western-Blot-Analysen als auch in der konfokalen Immunfluoreszenz, zu einer signifikanten Abnahme der Proteinspiegel. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in Mittelhirnschnitten von Ratten, in denen der Komplex-I-Inhibitor Rotenon das Signal der Fusionsproteine Opa1 und Mfn2 signifikant reduzierte (Tapias et al., 2019). Auch in SH-SY5Y-Zellen konnten unter MPP<sup>+</sup>-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte Mfn1, Mfn2 und Opa1-Wester-Blot-Spiegel nachgewiesen werden (Gai et al., 2019).

Eine Erklärung für die Abnahme der Proteine könnte die Abhängigkeit der Fusionsmaschinerie vom  $\Delta\psi_m$  sein. Insbesondere die Fusion an der inneren Membran über Opa1 ist vom  $\Delta\psi_m$  abhängig (Mishra et al., 2014). Bei Verlust des  $\Delta\psi_m$  kommt die Fusionsmaschinerie zum Erliegen, stattdessen kommt es zur Induktion der Fission mit schneller ( $\leq 4$  h), DLP1-vermittelter Fragmentierung der Mitochondrien (Legros et al., 2002). Twig et al. konnten zeigen, dass nicht fusionierende Mitochondrien ein nachweisbar vermindertes  $\Delta\psi_m$  und verminderte Spiegel des Fusionsproteins Opa1 aufweisen (Twig et al., 2008). Dies deutet also darauf hin, dass der signifikante Verlust von Opa1, wie in den Western-Blot und in der konfokalen Immunfluoreszenz gezeigt, mit dem Verlust des  $\Delta\psi_m$  korreliert. In Übereinstimmung damit konnten Chen et al. zeigen, dass als Reaktion auf mitochondrialen Stress Opa1 gespalten oder sogar abgebaut wird und somit die für die Mitophagie notwendige mitochondriale Spaltung fördert (Chen et al., 2016). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Verlust von Fusionsproteinen mit einer Abnahme des  $\Delta\psi_m$  einhergeht bzw. darauf beruht, was wiederum zu einer erhöhten Fission und zur Induktion von Mitophagie führt. Eine verstärkte Induktion der Mitophagie und damit des Abbaus von

Mitochondrien könnte wiederum die verminderten Spiegel des membranverankerten Fissionsproteins Mff erklären.

Sowohl die Western-Blot-Analysen als auch die konfokale Immunfluoreszenz von Mfn1, Mfn2 und Opa1 zeigten bei MPP<sup>+</sup> und gleichzeitig mit PHT behandelten Zellen im Vergleich zu MPP<sup>+</sup> einen tendenziell diskret erhöhten Proteinspiegel für Mfn1 und Mfn2, und einen signifikant erhöhten für Opa1. Insbesondere für Opa1 ist der Einfluss von PHT deutlich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verabreichung von PHT einen leicht reversiblen Einfluss auf die Wirkung von MPP<sup>+</sup> auf Mfn1 und Mfn2 und einen signifikanten Einfluss auf Opa1 hat. Der signifikante Effekt von PHT auf Opa1 konnte übereinstimmend auch an nigralen Neuronen von Ratten mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon gezeigt werden (Tapias et al., 2019). PHT ist also in der Lage, den MPP<sup>+</sup>-induzierten Verlust von Mfn1 und Mfn2 tendenziell und den von Opa1 signifikant entgegen zu wirken. Da die Fusion der inneren Membran von der OXPHOS abhängt (Mishra et al., 2014), deutet dies darauf hin, dass PHT diese stabilisieren und somit die mitochondriale Funktion verbessern und das Ausmaß an Fission minimieren könnte.

## 5.5 Die Induktion der Mitophagie unter MPP<sup>+</sup>

### 5.5.1 MPP<sup>+</sup> induziert keine PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie

Die Rolle von PINK1 und Parkin bei der Mitophagie wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen. Die meisten dieser Erkenntnisse beruhen jedoch auf *in vitro* Experimenten mit exogener PINK1-Expression oder PINK1-Überexpression, und es gibt bisher keine *in vivo* Nachweise in Tiermodellen der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie (Han et al., 2023). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass MPP<sup>+</sup> die mitochondriale Atmungskette hemmt, was mit einem verminderten Proteinimport sowohl an der äußeren als auch an der inneren Membran der Mitochondrien verbunden ist. Der beeinträchtigte Proteinimport geht mit einer eingeschränkten Mitochondrienfunktion einher. Darüber hinaus führt die Inhibition der Atmungskette zu einer vermehrten Bildung von ROS (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988), was mit dem Risiko von oxidativem Stress verbunden ist (Drechsel und Patel, 2008). Anhaltend hohe ROS-Konzentrationen können wiederum zu mitochondrialen Schäden führen (Brieger et al., 2012; Wiseman und Halliwell, 1996). Darüber hinaus wird die ATP-Synthese reduziert (Ramsay et al., 1991; Di Monte et al., 1986). Eine verminderte ATP-Synthese geht wiederum mit einem Verlust des  $\Delta\psi_m$  einher (Blum et al., 2001). Depolarisierte Mitochondrien, d.h. Mitochondrien mit einem vermindertem  $\Delta\psi_m$  und Mitochondrien, die ihr  $\Delta\psi_m$  verloren haben, haben wiederum, wie bereits erwähnt, Schwierigkeiten, Proteine zu importieren, so dass letztlich ein Teufelskreis entsteht.

Dysfunktionale bzw. depolarisierte Mitochondrien werden entfernt (Narendra et al., 2008). Dafür werden sie fragmentiert, wie die in dieser Arbeit beobachteten morphologischen Veränderungen gezeigt haben. Die reduzierten Proteinspiegel sowohl der membranverankerten Fusions- als auch der Fissionsproteine deuteten auf eine Elimination durch Induktion der Mitophagie hin. Da die PINK1/Parkin-abhängige Mitophagie als am besten verstanden und untersucht gilt, wurde als nächster Schritt untersucht, ob diese auch in den LUHMES-Zellen unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> auftritt.

Die bisherigen Erkenntnisse in Studien und Arbeiten beruhen darauf, dass es durch depolarisierte und dysfunktionale Mitochondrien zu einer Akkumulation von PINK1 an der OMM depolarisierter Mitochondrien kommt, was die Voraussetzung für die PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie ist (Narendra et al., 2010; Twig et al., 2008). Gekoppelt ist die PINK1-Akkumulation mit einer Rekrutierung und Phosphorylierung der zytosolischen E3-Ubiquitin-Ligase Parkin (Narendra et al., 2008).

Bei depolarisierten Mitochondrien würde man nach Exposition mit MPP<sup>+</sup> eine Induktion der PINK1/Parkin-abhängigen Mitophagie mit Akkumulation von PINK1 und damit quantitativ erhöhten Proteinspiegeln erwarten. In LUHMES-Zellen zeigte sich jedoch überraschenderweise ein gegenteiliger Effekt: Unter MPP<sup>+</sup> zeigten die Proteinspiegel der Western Blots und der konfokalen Immunfluoreszenz von PINK1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen Trend zur Abnahme, wenn auch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigten Arbeiten mit SH-SY5Y-Zellen unter dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon sowie MPP<sup>+</sup> einen signifikanten Anstieg von PINK1 auf Proteinebene (Kromm, 2020; Gai et al., 2019). Obwohl sich die Zelllinien und die Wirkungsweise der Toxine unterscheiden, unterstützt dieses Ergebnis die erwartete Akkumulation von PINK1 unter Exposition mit MPP<sup>+</sup> bei PINK1/Parkin-vermittelter Mitophagie. Eine Akkumulation von PINK1 wurde auch in HeLa-Zellen unter Exposition mit dem Entkoppler CCCP, der zu einem Verlust des Membranpotentials und einer Depolarisation der Mitochondrien führt, und unter Exposition mit dem indirekten Komplex-I-Inhibitor Paraquat beobachtet (Narendra et al., 2010). Umgekehrt konnte in einer Arbeit von Dagda et al. gezeigt werden, dass reduziertes PINK1 in SH-SY5Y-Zellen mit mitochondrialer Fragmentierung und erhöhter Mitophagie assoziiert ist (Dagda et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass bei den in dieser Arbeit unter MPP<sup>+</sup> tendenziell reduzierten PINK1-Proteinspiegeln Fragmentierung und erhöhte Mitophagie auftreten könnten, der PINK1/Parkin-abhängige Signalweg aber möglicherweise nicht aktiviert wird. Andererseits könnte die Aktivierung eines alternativen Signalwegs zur Hemmung von PINK1 und Parkin unter MPP<sup>+</sup> und damit zu unveränderten oder sogar tendenziell reduzierten Spiegeln im Vergleich zur Kontrolle führen.

Für das zytosolische Parkin ergaben die Western-Blot-Analysen unter MPP<sup>+</sup> ebenfalls eine tendenzielle, aber nicht signifikante Abnahme des Proteinspiegels im Vergleich zur Kontrolle. Die

Aktivität von Parkin scheint also ebenso wie die von PINK1 nicht erhöht, sondern tendenziell verringert zu sein. Da also weder PINK1 noch Parkin unter MPP<sup>+</sup> im Vergleich zur Kontrolle konstante oder erhöhte Proteinspiegel als Korrelat einer verstärkten Aktivierung und Akkumulation zeigten, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass in LUHMES-Zellen unter MPP<sup>+</sup>-Exposition möglicherweise ein anderer Signalweg aktiviert wird. Gleichzeitig könnte die Aktivierung eines alternativen Signalweges zu einer Hemmung von PINK1 und Parkin führen und damit die tendenzielle Reduktion erklären. Die gleichzeitige Verabreichung von MPP<sup>+</sup> und PHT führte sowohl bei den Western Blots als auch bei den immunhistochemischen Analysen zu tendenziell höheren Proteinspiegeln von PINK1 und Parkin im Vergleich zur alleinigen Verabreichung von MPP<sup>+</sup>, allerdings waren diese Ergebnisse nicht signifikant. PHT könnte also die durch MPP<sup>+</sup> reduzierten PINK1- und Parkin-Spiegel modulieren und diskret beeinflussen.

### 5.5.2 MPP<sup>+</sup> könnte die BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie induzieren

Da in der vorliegenden Arbeit keine überzeugenden Hinweise für eine PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie beobachtet werden konnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass in LUHMES-Zellen möglicherweise ein anderer Signalweg eingeschlagen wird. Als Alternative ist die BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie ein Weg, der in Mitochondrien eingeschlagen werden könnte. Dieser Weg spielt eine Rolle bei der Entfernung von Mitochondrien im Rahmen der Erythrozytenentwicklung. Während der Reifung der Retikulozyten (Erythrozytenvorläufer) müssen überflüssige Mitochondrien aktiv entfernt werden, um funktionsfähige Erythrozyten zu ermöglichen (Schweers et al., 2007). Möglicherweise spielt dieser Stoffwechselfad auch bei der Eliminierung fragmentierter Mitochondrien im Parkinson-Modell eine Rolle. BNIP3L/Nix ist ein mitochondrial membranverankertes Rezeptorprotein, das nach Aktivierung mit LC3 auf Phagophoren, den Vorläufern von Autophagosomen, interagiert (Novak et al., 2010). Bei Induktion der Mitophagie wird der Rezeptor dephosphoryliert und es kommt zu einer Ausbildung stabilerer BNIP3L/Nix-Dimere (Marinković et al., 2021). Die Dimere werden durch eine doppelte Phosphorylierung neben der LIR-Domäne aktiviert (Rogov et al., 2017). Die Dimerisierung und Phosphorylierung neben der LIR-Domäne ist für die Initiierung und Rekrutierung von Autophagosomen und für eine effizientere Mitophagie notwendig (Marinković und Novak, 2021; Marinković et al., 2021). Über die C-terminale LIR-Domäne erfolgt dann die Bindung an LC3 (Novak et al., 2010).

Bei der Induktion dieses Signalweges wird erwartet, dass der Abbau geschädigter Mitochondrien zu einer Reduktion des mitochondrial membranverankerten Rezeptorproteins BNIP3L/Nix führt. Tatsächlich zeigte sich unter MPP<sup>+</sup> ein hochsignifikanter Verlust von BNIP3L/Nix. Dieses überraschende und zugleich eindeutige Ergebnis deutet darauf hin, dass in LUHMES-Zellen unter MPP<sup>+</sup> die BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie aktiviert werden könnte und im Rahmen dieses

Signalweges das membranverankerte Rezeptorprotein der Mitochondrien degradiert wird, was sich in den ausgeprägten Proteinverlusten widerspiegelt. Die erstmals in LUHMES-Zellen gemachte Beobachtung unter MPP<sup>+</sup> steht damit einerseits im Einklang mit der Vorstellung, dass Mitophagie grundsätzlich ein Weg ist, um geschädigte Mitochondrien abzutrennen und anschließend abzubauen, um ein gesundes Netzwerk zu erhalten. Andererseits deutet das Ergebnis darauf hin, dass es unter MPP<sup>+</sup> zu einer erhöhten Mitophagie kommt, die auf vermehrten Fissionsereignissen beruht, was wiederum als schädlich für die Neuronen angesehen wird. (Pörtl et al., 2012).

Darüber hinaus deutet das Ergebnis darauf hin, dass in LUHMES-Zellen nicht die PINK1/Parkin-vermittelte Mitophagie, sondern die BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie aktiviert zu sein scheint.

Die Proteinspiegel von BNIP3L/Nix blieben in der MPP<sup>+</sup>/PHT-Gruppe im Vergleich zu MPP<sup>+</sup> unverändert. Dies bedeutet, dass PHT keinen Einfluss auf die signifikante Reduktion von BNIP3L/Nix unter MPP<sup>+</sup> und damit auf die möglicherweise durch BNIP3L/Nix vermittelte Mitophagie hat. Dies wiederum ist plausibel, da irreversibel geschädigte Mitochondrien oder mitochondriale Anteile durch Mitophagie abgebaut werden sollten, um eine gesunde zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten.

Zukünftige Experimente sind notwendig, um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren. Mögliche Analysen wären hier die Überprüfung von BNIP3L/Nix unter Exposition mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin sowie die Bestimmung von LC3-Spiegeln als Korrelat zu Phagophoren, den Vorläufern der mitochondrienabbauenden Autophagosomen (Hanna et al., 2012).

## 5.6 Ausblick

Die bisherigen Ergebnisse lassen noch Fragen offen, die in Zukunft weiter untersucht werden müssen. Diese umfassen, aufbauend auf den erhobenen Daten für die Proteinspiegel der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette, weitergehende Messungen der Aktivitäten der einzelnen Komplexe, insbesondere des ATP-Spiegels unter MPP<sup>+</sup> und die Untersuchung eines potentiellen Effektes unter PHT. Darüber hinaus ist eine Verifizierung der hochsignifikanten Ergebnisse für BNIP3L/Nix unter MPP<sup>+</sup> und MPP<sup>+</sup>/PHT notwendig. Messungen mit den Adapterproteinen für BNIP3L/Nix LC3 und p62 sowie die Überprüfung der Daten für BNIP3L/Nix unter An- und Abwesenheit eines Autophagie-Inhibitors könnten vertiefte Belege für die Induktion einer rezeptorvermittelten Mitophagie unter BNIP3L/Nix in LUHMES-Zellen liefern.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Die Auswirkungen der Komplex-I-Inhibition auf die Morphologie, Dynamik und die Elimination von Mitochondrien

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konsequenzen der MPP<sup>+</sup>-Exposition auf die Morphologie, Dynamik und die Elimination von Mitochondrien bzw. auf die Expression zentraler Mitophagie-Regulatorproteine bei der Parkinsonschen Krankheit, einer chronischen und progredienten neurodegenerativen Erkrankung, im humanen Zellmodell erforscht. Mitochondrien sind bei der Parkinsonschen Krankheit stark betroffen, da unter anderem mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress eine Rolle in der Pathogenese der Krankheit spielen. Mitochondriale Dysfunktion geht mit epigenetischen Veränderungen einher, die mit einer erhöhten Expression zellkernkodierter Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette verbunden sind. Da dies möglicherweise ein kompensatorischer Mechanismus der Neurone ist, die mitochondriale Funktion zu verbessern und aufrecht zu erhalten, sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen einer Inhibition der mitochondrialen Atmungskette auf die mitochondriale Morphologie, Dynamik und Elimination der Mitochondrien untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Effekte von Phenothiazin auf diese Prozesse untersucht werden.

Es zeigten sich unter Exposition mit 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> und dem MitoTracker Red Farbstoff morphologische Veränderungen in den untersuchten LUHMES-Zellen, die mit einer erhöhten Fragmentierung von Mitochondrien vereinbar sind. Diese Ergebnisse ähnelten denen, die von Prasertsuksri et al. und Jang et al. beschrieben wurden (Prasertsuksri et al., 2023; Jang et al., 2018). Weiterhin zeigte sich, dass MPP<sup>+</sup> als bekannter Komplex-I-Inhibitor in LUHMES-Zellen nicht zu einer kompletten Inhibition des Komplex I führte. Eine Komplex-I-Inhibition führt generell zu einer erhöhten ROS-Produktion (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988), beeinträchtigt die oxidative Phosphorylierung und involviert eine verminderte ATP-Synthese (Ramsay et al., 1991; Di Monte et al., 1986). Mit einer verminderten ATP-Synthese geht wiederum ein Verlust des  $\Delta\psi_m$  einher (Blum et al., 2001). Dies hat Konsequenzen auf verschiedene Stoffwechselfade bzw. Funktionen der Mitochondrien.

Die Proteinimportmaschinerie betreffend zeigte sich, dass MPP<sup>+</sup> zu einer signifikanten Reduktion des TIM23-Proteinspiegels führte. Da der Proteinimport an der IMM vom  $\Delta\psi_m$  abhängig ist (Becker et al., 2019), deutet der signifikant reduzierte TIM23-Proteinspiegel auf eine mögliche Co-Regulation von  $\Delta\psi_m$  und TIM23 hin. Reduzierte TIM23-Spiegel sind bekanntermaßen mit einem beeinträchtigten Proteinimport an der IMM verbunden (Franco-Iborra et al., 2018).

Als Konsequenzen der MPP<sup>+</sup>-Behandlung auf die mitochondriale Dynamik zeigten sich signifikant reduzierte Proteinspiegel für das membrangebundene mitochondriale Fissionsprotein Mff und

die ebenfalls membrangebundenen Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und Opa1, was auf einen Verlust dieser Proteine durch Induktion der Mitophagie hindeutet. Das zytosolische Fissionsprotein DLP1 hingegen war unter MPP<sup>+</sup> kaum verändert, was damit erklärt werden könnte, dass es entweder konstant reguliert wird oder eine geringere Rolle bei der Fission spielt als bisher angenommen. Dies zeigen auch Ergebnisse aus Knockout-Mäusen, in denen es trotz DLP1-Mangel zu Mitophagie kam (Burman et al., 2017).

Die Untersuchung des sehr gut bekannten PINK1/Parkin-abhängigen Mitophagieweges zeigte überraschenderweise und entgegen der Erwartung keine erhöhten PINK1-Proteinspiegel als Korrelat einer Aktivierung dieses Signalweges, sondern einen tendenziell erniedrigten Proteinspiegel. Auch das zytosolische Parkin war tendenziell vermindert. Möglicherweise könnte es durch Aktivierung eines alternativen Signalwegs zu einer Indifferenz von PINK1 und Parkin auf MPP<sup>+</sup> kommen. Daher wurde der BNIP3L/Nix-vermittelte Mitophagie-Signalweg ebenfalls untersucht. Hier zeigte sich ein hochsignifikantes Ergebnis mit stark reduzierten Proteinspiegeln unter MPP<sup>+</sup>, was vermuten lässt, dass in LUHMES-Zellen unter MPP<sup>+</sup> nicht der PINK1/Parkin-Signalweg, sondern der rezeptorvermittelte BNIP3L/Nix-Signalweg aktiviert wird. Eine Induktion der Mitophagie unter MPP<sup>+</sup> führt somit einerseits zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, indem dysfunktionale und geschädigte Mitochondrien eliminiert werden, andererseits kann eine gesteigerte Mitophagie durch vermehrte Fissionsereignisse mit einem solchen Verlust an Mitochondrien verbunden sein, dass es zu einer Störung des mitochondrialen Stoffwechsels kommt (Jin et al., 2018; Pörtl et al., 2012).

Es bedarf zukünftiger weiterer Untersuchungen, um insbesondere die hier erhaltenen Ergebnisse der BNIP3L/Nix-vermittelten Mitophagie zu untermauern und weiter zu erforschen.

## 6.2 Die Rolle der ROS in der Mitophagie

In dieser Arbeit wurde auch die antioxidative Wirkung von Phenothiazin (PHT) auf die MPP<sup>+</sup>-induzierte Modulation der mitochondrialen Morphologie, Dynamik und Mitophagie analysiert. Dabei konnte mit einer niedrigen nanomolaren Konzentration von 20 nM gezeigt werden, dass PHT auf die morphologischen Veränderungen unter MPP<sup>+</sup> einen ausgeprägten und deutlich sichtbar revertierenden Effekt hat. Da die Komplex-I-Inhibition durch MPP<sup>+</sup> einerseits mit einer erhöhten ROS-Produktion (Kitamura et al., 1998; Rossetti et al., 1988) und dem Risiko für oxidativen Stress einhergeht (Drechsel und Patel, 2008), in dessen Folge Mitochondrien geschädigt werden, andererseits mit einer Beeinträchtigung der OXPHOS und dem Risiko für den Verlust des  $\Delta\psi_m$  mit Depolarisation, benötigt das Mitochondrium eine homöostatische Antwort. Die selektive Abtrennung geschädigter Anteile mit noch vorhandenem  $\Delta\psi_m$  konnte gezeigt werden. PHT lieferte durch seinen deutlich mindernden Effekt auf die Fragmentierung den

Nachweis, dass es vor oxidativer Schädigung schützen und die mitochondriale Integrität zu erhalten vermag. Diese Ergebnisse ähnelten denen von PHT *in vivo*, das in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra eine antioxidative Wirkung zeigte und signifikant vor Schäden durch oxidativen Stress schützen konnte (Tapias et al., 2019).

Für die Fissionsproteine Mff und DLP1, die Fusionsproteine Mfn1 und Mfn2 sowie die Mitophagieproteine PINK1 und Parkin konnten allenfalls mild schützende Wirkungen von PHT beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant waren. Dies impliziert, dass die Mito-Fission und Mito-Fusion hier im wesentlichen ROS-unabhängig induziert wurden. Für die Translokase der inneren Mitochondrienmembran TIM23 und das Fusionsprotein der inneren Mitochondrienmembran Opa1, deren beide Funktionen vom  $\Delta\psi_m$  über der inneren Mitochondrienmembran abhängen, konnten die unter MPP<sup>+</sup> signifikant reduzierten Proteinspiegel durch die Gabe von PHT signifikant erhöht werden. PHT zeigte also einen signifikanten Effekt und war möglicherweise in der Lage, das  $\Delta\psi_m$  zu schützen. Diese Ergebnisse koinzidieren durchaus mit *in vivo*-Neuronen, in denen PHT die Komplex-I-Aktivität stabilisieren (Tapias et al., 2019) und zur Aufrechterhaltung des  $\Delta\psi_m$  beitragen konnte.

## 7 Literaturverzeichnis

Adebayo, Mary; Singh, Seema; Singh, Ajay Pratap; Dasgupta, Santanu. Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 35(6): e21620 (2021).

Ahlskog, J. E.; Muentner, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement Disorders*. 16(3): 448–458 (2001).

Alessi, Dario R.; Sammler, Esther. LRRK2 kinase in Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*. 360(6384): 36–37 (2018).

Alexander, C.; Votruba, M.; Pesch, U. E.; Thiselton, D. L.; Mayer, S.; Moore, A. et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature genetics*. 26(2): 211–215 (2000).

Alexander, Garrett E. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in clinical neuroscience*. 6(3): 259–280 (2004).

Ali, S. F.; David, S. N.; Newport, G. D.; Cadet, J. L.; Slikker, W. MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine levels. *Synapse (New York, N.Y.)*. 18(1): 27–34 (1994).

Anand, Ruchika; Wai, Timothy; Baker, Michael J.; Kladt, Nikolay; Schauss, Astrid C.; Rugarli, Elena; Langer, Thomas. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of cell biology*. 204(6): 919–929 (2014).

Annesley, Sarah J.; Fisher, Paul R. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 8(7) (2019).

Archer, Stephen L. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *The New England journal of medicine*. 369(23): 2236–2251 (2013).

Ardail, D.; Privat, J. P.; Egret-Charlier, M.; Levrat, C.; Lerme, F.; Louisot, P. (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *Journal of Biological Chemistry*. 265(31): 18797–18802.

Armstrong, Melissa J.; Okun, Michael S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*. 323(6): 548–560 (2020).

Ascherio, Alberto; Schwarzschild, Michael A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet. Neurology*. 15(12): 1257–1272 (2016).

Babcock, G. T. How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(23): 12971–12973 (1999).

Baeken, Marius Wilhelm. Epigenetic remodeling through a mitochondrial redox signal in an experimental model of Parkinson's disease = Epigenetische Restrukturierungen durch ein Redox-Signal mitochondrialen Ursprungs in einem experimentellen Modell der Parkinson'schen Krankheit. *Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Dissertation* (2021).

Balestrino, R.; Schapira, A. H. V. Parkinson disease. *European journal of neurology*. 27(1): 27–42 (2020).

Ballard, P. A.; Tetrud, J. W.; Langston, J. W. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*. 35(7): 949–956 (1985).

Bartlett, Rachel M.; Holden, James E.; Nickles, R. Jerome; Murali, Dhanabalan; Barbee, David L.; Barnhart, Todd E. et al. Paraquat is excluded by the blood brain barrier in rhesus macaque: An in vivo pet study. *Brain research*. 1259: 74–79 (2009).

Beal, M. Flint. Parkinson's disease: a model dilemma. *Nature*. 466(7310): S8-10 (2010).

Becker, Thomas; Song, Jiyao; Pfanner, Nikolaus. Versatility of Preprotein Transfer from the Cytosol to Mitochondria. *Trends in cell biology*. 29(7): 534–548 (2019).

Becker, Thomas; Vögtle, F-Nora; Stojanovski, Diana; Meisinger, Chris. Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1777(7-8): 557–563 (2008).

Beilina, Alexandra; Cookson, Mark R. Genes associated with Parkinson's disease: regulation of autophagy and beyond. *Journal of neurochemistry*. 139 Suppl 1(Suppl 1): 91–107 (2016).

Beliakov, Sergei V.; Blokhin, Victor; Surkov, Sergey A.; Ugrumov, Michael V. LUHMES Cells: Phenotype Refinement and Development of an MPP+-Based Test System for Screening Antiparkinsonian Drugs. *International journal of molecular sciences*. 24(1) (2023).

Bellot, Grégory; Garcia-Medina, Raquel; Gounon, Pierre; Chiche, Johanna; Roux, Danièle; Pouysségur, Jacques; Mazure, Nathalie M. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology*. 29(10): 2570–2581 (2009).

Bender, Andreas; Krishnan, Kim J.; Morris, Christopher M.; Taylor, Geoffrey A.; Reeve, Amy K.; Perry, Robert H. et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics*. 38(5): 515–517 (2006).

Bento, Carla F.; Renna, Maurizio; Ghislat, Ghita; Puri, Claudia; Ashkenazi, Avraham; Vicinanza, Mariella et al. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry*. 85: 685–713 (2016).

Bernstein, Alison I.; Stout, Kristen A.; Miller, Gary W. The vesicular monoamine transporter 2: an underexplored pharmacological target. *Neurochemistry international*. 73: 89–97 (2014).

Bertholet, Ambre M.; Natale, Andrew M.; Bisignano, Paola; Suzuki, Junji; Fedorenko, Andriy; Hamilton, James et al. Mitochondrial uncouplers induce proton leak by activating AAC and UCP1. *Nature*. 606(7912): 180–187 (2022).

Betarbet, R.; Sherer, T. B.; MacKenzie, G.; Garcia-Osuna, M.; Panov, A. V.; Greenamyre, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience*. 3(12): 1301–1306 (2000).

Betarbet, Ranjita; Sherer, Todd B.; Di Monte, Donato A.; Greenamyre, J. Timothy. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 12(4): 499–510 (2002).

Birkmayer, W.; Hornykiewicz, O. The L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) effect in Parkinson's syndrome in man: On the pathogenesis and treatment of Parkinson akinesia. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten, vereinigt mit Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*. 203: 560–574 (1962).

Blesa, Javier; Phani, Sudarshan; Jackson-Lewis, Vernice; Przedborski, Serge. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012: 845618 (2012).

Bloem, Bastiaan R.; Okun, Michael S.; Klein, Christine. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*. 397(10291): 2284–2303 (2021).

Blum, D.; Torch, S.; Lambeng, N.; Nissou, M.; Benabid, A. L.; Sadoul, R.; Verna, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 65(2): 135–172 (2001).

Bolam, J. Paul; Pissadaki, Eleftheria K. Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Movement Disorders*. 27(12): 1478–1483 (2012).

Bonifati, Vincenzo; Rizzu, Patrizia; van Baren, Marijke J.; Schaap, Onno; Breedveld, Guido J.; Krieger, Elmar et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science (New York, N.Y.)*. 299(5604): 256–259 (2003).

Braak, Heiko; Del Tredici, Kelly; Rüb, Udo; Vos, Rob A. I. de; Jansen Steur, Ernst N. H.; Braak, Eva. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 24(2): 197–211 (2003).

Brichta, Lars; Greengard, Paul; Flajolet, Marc. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends in neurosciences*. 36(9): 543–554 (2013).

Bridi, Jessika C.; Hirth, Frank. Mechanisms of  $\alpha$ -Synuclein Induced Synaptopathy in Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience*. 12: 80 (2018).

Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller, F. J.; Krause, K-H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*. 142: w13659 (2012).

Brito, Olga Martins de; Scorrano, Luca. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456(7222): 605–610 (2008).

Brochard, Vanessa; Combadière, Béhazine; Prigent, Annick; Laouar, Yasmina; Perrin, Aline; Beray-Berthet, Virginie et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(1): 182–192 (2009).

Bruch, Julius; Xu, Hong; Andrade, Anderson de; Höglinger, Günter. Mitochondrial complex 1 inhibition increases 4-repeat isoform tau by SRSF2 upregulation. *PLOS ONE*. 9(11): e113070 (2014).

Burman, Jonathon L.; Pickles, Sarah; Wang, Chunxin; Sekine, Shiori; Vargas, Jose Norberto S.; Zhang, Zhe et al. Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *The Journal of cell biology*. 216(10): 3231–3247 (2017).

Burré, Jacqueline. The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein. *Journal of Parkinson's disease*. 5(4): 699–713 (2015).

Burré, Jacqueline; Sharma, Manu; Tsetsenis, Theodoros; Buchman, Vladimir; Etherton, Mark R.; Südhof, Thomas C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*. 329(5999): 1663–1667 (2010).

Calabresi, Paolo; Mechelli, Alessandro; Natale, Giuseppina; Volpicelli-Daley, Laura; Di Lazzaro, Giulia; Ghiglieri, Veronica. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death & Disease*. 14(3): 176 (2023).

Calvaruso, Maria Antonietta; Smeitink, Jan; Nijtmans, Leo. Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods (San Diego, Calif.)*. 46(4): 281–287 (2008).

Chandhok, Gursimran; Lazarou, Michael; Neumann, Brent. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 93(2): 933–949 (2018).

Chaudhuri, K. Ray; Healy, Daniel G.; Schapira, Anthony H. V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet. Neurology*. 5(3): 235–245 (2006).

Chen, Hsiuchen; Chomyn, Anne; Chan, David C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry*. 280(28): 26185–26192 (2005).

Chen, Hsiuchen; Detmer, Scott A.; Ewald, Andrew J.; Griffin, Erik E.; Fraser, Scott E.; Chan, David C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology*. 160(2): 189–200 (2003).

Chen, Hsiuchen; McCaffery, J. Michael; Chan, David C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*. 130(3): 548–562 (2007).

Chen, Ming; Chen, Ziheng; Wang, Yueying; Tan, Zheng; Zhu, Chongzhuo; Li, Yanjun et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy*. 12(4): 689–702 (2016).

Chen, Yun; Dorn, Gerald W. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science (New York, N.Y.)*. 340(6131): 471–475 (2013).

Cheng, Hsiao-Chun; Ulane, Christina M.; Burke, Robert E. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Annals of Neurology*. 67(6): 715–725 (2010).

Chia, Shyh Jenn; Tan, Eng-King; Chao, Yin-Xia. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*. 21(7) (2020).

Chinta, Shankar J.; Andersen, Julie K. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1780(11): 1362–1367 (2008).

Chinta, Shankar J.; Mallajosyula, Jyothi K.; Rane, Anand; Andersen, Julie K. Mitochondrial  $\alpha$ -synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience letters*. 486(3): 235–239 (2010).

Cipolat, Sara; Brito, Olga Martins de; Dal Zilio, Barbara; Scorrano, Luca. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(45): 15927–15932 (2004).

Cogliati, Sara; Frezza, Christian; Soriano, Maria Eugenia; Varanita, Tatiana; Quintana-Cabrera, Ruben; Corrado, Mauro et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*. 155(1): 160–171 (2013).

Cotton, Thomas R.; Lechtenberg, Bernhard C. Chain reactions: molecular mechanisms of RBR ubiquitin ligases. *Biochemical Society transactions*. 48(4): 1737–1750 (2020).

Dagda, Ruben K.; Cherra, Salvatore J.; Kulich, Scott M.; Tandon, Anurag; Park, David; Chu, Charleen T. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*. 284(20): 13843–13855 (2009).

Davis, G. C.; Williams, A. C.; Markey, S. P.; Ebert, M. H.; Caine, E. D.; Reichert, C. M.; Kopin, I. J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry research*. 1(3): 249–254 (1979).

Deans, Carrie; Maggert, Keith A. What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*. 199(4): 887–896 (2015).

Deas, Emma; Plun-Favreau, Helene; Gandhi, Sonia; Desmond, Howard; Kjaer, Svend; Loh, Samantha H. Y. et al. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Human molecular genetics*. 20(5): 867–879 (2011).

Del Dotto, Valentina; Mishra, Prashant; Vidoni, Sara; Fogazza, Mario; Maresca, Alessandra; Caporali, Leonardo et al. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell reports*. 19(12): 2557–2571 (2017).

Delettre, C.; Lenaers, G.; Griffoin, J. M.; Gigarel, N.; Lorenzo, C.; Belenguer, P. et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature genetics*. 26(2): 207–210 (2000).

Deng, Hao; Wang, Peng; Jankovic, Joseph. The genetics of Parkinson disease. *Ageing research reviews*. 42: 72–85 (2018).

Deuschl, Günther; Antonini, Angelo; Costa, Joao; Śmiłowska, Katarzyna; Berg, Daniela; Corvol, Jean-Christophe et al. European Academy of Neurology/Movement Disorder Society-European Section Guideline on the Treatment of Parkinson's Disease: I. Invasive Therapies. *Movement Disorders*. 37(7): 1360–1374 (2022).

Deuschländer, A. B.; Ross, O. A.; Dickson, D. W.; Wszolek, Z. K. Atypical parkinsonian syndromes: a general neurologist's perspective. *European journal of neurology*. 25(1): 41–58 (2017).

Devi, Latha; Raghavendran, Vijayendran; Prabhu, Badanavalu M.; Avadhani, Narayan G.; Anandatheerthavarada, Hindupur K. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*. 283(14): 9089–9100 (2008).

Dexter, D. T.; Carter, C. J.; Wells, F. R.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Lees, A. et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 52(2): 381–389 (1989a).

Dexter, D. T.; Wells, F. R.; Lees, A. J.; Agid, F.; Agid, Y.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 52(6): 1830–1836 (1989b).

Di Maio, Roberto; Barrett, Paul J.; Hoffman, Eric K.; Barrett, Caitlyn W.; Zharikov, Alevtina; Borah, Anupom et al.  $\alpha$ -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*. 8(342): 342ra78 (2016).

Di Monte, D.; Jewell, S. A.; Ekström, G.; Sandy, M. S.; Smith, M. T. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 137(1): 310–315 (1986).

Di Monte, Donato A.; Lavasani, Mitra; Manning-Bog, Amy B. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 23(4-5): 487–502 (2002).

Dolgacheva, Lyudmila P.; Zinchenko, Valery P.; Goncharov, Nikolay V. Molecular and Cellular Interactions in Pathogenesis of Sporadic Parkinson Disease. *International journal of molecular sciences*. 23(21) (2022).

Dong-Chen, Xu; Yong, Chen; Yang, Xu; Chen-Yu, ShenTu; Li-Hua, Peng. Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal transduction and targeted therapy*. 8(1): 73 (2023).

Double, K. L.; Ben-Shachar, D.; Youdim, M. B. H.; Zecca, L.; Riederer, P.; Gerlach, M. Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicology and teratology*. 24(5): 621–628 (2002).

Double, K. L.; Gerlach, M.; Youdim, M. B.; Riederer, P. Impaired iron homeostasis in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*.(60): 37–58 (2000).

Drechsel, Derek A.; Patel, Manisha. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine*. 44(11): 1873–1886 (2008).

Eiden, L. E. The vesicular neurotransmitter transporters: current perspectives and future prospects. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 14(15): 2396–2400 (2000).

Espay, Alberto J.; Morgante, Francesca; Merola, Aristide; Fasano, Alfonso; Marsili, Luca; Fox, Susan H. et al. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: Current and evolving concepts. *Annals of Neurology*. 84(6): 797–811 (2018).

Fahn, Stanley. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 991: 1–14 (2003).

Fahn, Stanley. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 30(1): 4–18 (2015).

Fathi, Mobina; Vakili, Kimia; Yaghoobpoor, Shirin; Qadirifard, Mohammad Sadegh; Kosari, Mohammadreza; Naghsh, Navid et al. Pre-clinical Studies Identifying Molecular Pathways of Neuroinflammation in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Frontiers in aging neuroscience*. 14: 855776 (2022).

Fearnley, J. M.; Lees, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain : a journal of neurology*. 114 (Pt 5): 2283–2301 (1991).

Feigin, Valery L; Abajobir, Amanuel Alemu; Abate, Kalkidan Hassen; Abd-Allah, Foad Abd-Allah. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Neurology*. 16(11): 877–897 (2017).

Ferreira, Sara A.; Romero-Ramos, Marina. Microglia Response During Parkinson's Disease: Alpha-Synuclein Intervention. *Frontiers in cellular neuroscience*. 12: 247 (2018).

Ferrer, Isidre; Martinez, Anna; Boluda, Susana; Parchi, Piero; Barrachina, Marta. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell and tissue banking*. 9(3): 181–194 (2008).

Forno, L. S. Neuropathology of Parkinson's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 55(3): 259–272 (1996).

Fox, Susan H.; Katzenschlager, Regina; Lim, Shen-Yang; Barton, Brandon; Bie, Rob M. A. de; Seppi, Klaus et al. International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 33(8): 1248–1266 (2018).

Franco-Iborra, Sandra; Cuadros, Thais; Parent, Annabelle; Romero-Gimenez, Jordi; Vila, Miquel; Perier, Celine. Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell Death & Disease*. 9(11): 1122 (2018).

Gai, Cong; Feng, Wan-Di; Qiang, Tian-Yao; Ma, Hao-Jie; Chai, Yuan; Zhang, Shu-Jing et al. Da-Bu-Yin-Wan and Qian-Zheng-San Ameliorate Mitochondrial Dynamics in the Parkinson's Disease Cell Model Induced by MPP. *Frontiers in pharmacology*. 10: 372 (2019).

Gandre-Babbe, Shilpa; van der Blik, Alexander M. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*. 19(6): 2402–2412 (2008).

Gao, Fei; Yang, Jia; Wang, Dongdong; Li, Chao; Fu, Yi; Wang, Huaishan et al. Mitophagy in Parkinson's Disease: Pathogenic and Therapeutic Implications. *Frontiers in neurology*. 8: 527 (2017).

Gao, Song; Hu, Junjie. Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out. *Trends in cell biology*. 31(1): 62–74 (2021).

Gegg, Matthew E.; Cooper, J. Mark; Chau, Kai-Yin; Rojo, Manuel; Schapira, Anthony H. V.; Taanman, Jan-Willem. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human molecular genetics*. 19(24): 4861–4870 (2010).

Geisler, Sven; Holmström, Kira M.; Skujat, Diana; Fiesel, Fabienne C.; Rothfuss, Oliver C.; Kahle, Philipp J.; Springer, Wolfdieter. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology*. 12(2): 119–131 (2010).

Geissler, Andreas; Chacinska, Agnieszka; Truscott, Kaye N.; Wiedemann, Nils; Brandner, Katrin; Sickmann, Albert et al. The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*. 111(4): 507–518 (2002).

Gelb, D. J.; Oliver, E.; Gilman, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of neurology*. 56(1): 33–39 (1999).

Giacomello, Marta; Pyakurel, Aswin; Glytsou, Christina; Scorrano, Luca. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 21(4): 204–224 (2020).

Giacomello, Marta; Scorrano, Luca. The INs and OUTs of mitofusins. *The Journal of cell biology*. 217(2): 439–440 (2018).

Gibb, W. R. Dementia and Parkinson's disease. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 154: 596–614 (1989).

Glass, Christopher K.; Saijo, Kaoru; Winner, Beate; Marchetto, Maria Carolina; Gage, Fred H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140(6): 918–934 (2010).

Glinka, Y.; Tipton, K. F.; Youdim, M. B. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *Journal of neurochemistry*. 66(5): 2004–2010 (1996).

Goiran, Thomas; Eldeeb, Mohamed A.; Zorca, Cornelia E.; Fon, Edward A. Hallmarks and Molecular Tools for the Study of Mitophagy in Parkinson's Disease. *Cells*. 11(13) (2022).

González-Rodríguez, Patricia; Zampese, Enrico; Stout, Kristen A.; Guzman, Jaime N.; Ilijic, Ema; Yang, Ben et al. Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature*. 599(7886): 650–656 (2021).

Greenamyre, J. T.; Sherer, T. B.; Betarbet, R.; Panov, A. V. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB life*. 52(3-5): 135–141 (2001).

Greene, Andrew W.; Grenier, Karl; Aguilera, Miguel A.; Muise, Stephanie; Farazifard, Rasoul; Haque, M. Emdadul et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Reports*. 13(4): 378–385 (2012).

Griparic, Lorena; Kanazawa, Takayuki; van der Bliek, Alexander M. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *The Journal of cell biology*. 178(5): 757–764 (2007).

Grünewald, Anne; Kumar, Kishore R.; Sue, Carolyn M. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 177: 73–93 (2019).

Gu, Z.; Nakamura, T.; Yao, D.; Shi, Z-Q; Lipton, S. A. Nitrosative and oxidative stress links dysfunctional ubiquitination to Parkinson's disease. *Cell death and differentiation*. 12(9): 1202–1204 (2005).

Guadagnolo, Daniele; Piane, Maria; Torrisi, Maria Rosaria; Pizzuti, Antonio; Petrucci, Simona. Genotype-Phenotype Correlations in Monogenic Parkinson Disease: A Review on Clinical and Molecular Findings. *Frontiers in neurology*. 12: 648588 (2021).

Guo, Jun Tang; Chen, An Qi; Kong, Qi; Zhu, Hua; Ma, Chun Mei; Qin, Chuan. Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in alpha-synuclein stably transfected SH-SY5Y cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 28(1): 35–47 (2008).

Gwinn-Hardy, Katrina. Genetics of parkinsonism. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 17(4): 645–656 (2002).

Hajieva, Parvana; Mocko, Justyna B.; Moosmann, Bernd; Behl, Christian. Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*. 110(1): 118–132 (2009).

Halliwell, Barry. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in biochemical sciences*. 31(9): 509–515 (2006).

Hamilton, R. L. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 10(3): 378–384 (2000).

Han, Rui; Liu, Yanting; Li, Shihua; Li, Xiao-Jiang; Yang, Weili. PINK1-PRKN mediated mitophagy: differences between in vitro and in vivo models. *Autophagy*. 19(5): 1396–1405 (2023).

Hanna, Rita A.; Quinsay, Melissa N.; Orogo, Amabel M.; Giang, Kayla; Rikka, Shivaji; Gustafsson, Åsa B. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *The Journal of biological chemistry*. 287(23): 19094–19104 (2012).

Hardy, John; Cookson, Mark R.; Singleton, Andrew. Genes and parkinsonism. *The Lancet. Neurology*. 2(4): 221–228 (2003).

Hartog Jager, W. A. den; Bethlem, J. The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 23(4): 283–290 (1960).

Hattingen, Elke; Magerkurth, Jörg; Pilatus, Ulrich; Mozer, Anne; Seifried, Carola; Steinmetz, Helmuth et al. Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. 132(Pt 12): 3285–3297 (2009).

Hauser, Robert A.; Hsu, Ann; Kell, Sherron; Espay, Alberto J.; Sethi, Kapil; Stacy, Mark et al. Extended-release carbidopa-levodopa (IPX066) compared with immediate-release carbidopa-levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations: a phase 3 randomised, double-blind trial. *The Lancet. Neurology*. 12(4): 346–356 (2013).

Hawkes, C. H.; Shephard, B. C.; Daniel, S. E. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 62(5): 436–446 (1997).

Heikkila, R. E.; Manzino, L.; Cabbat, F. S.; Duvoisin, R. C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*. 311(5985): 467–469 (1984).

Hirsch, Etienne C.; Hunot, Stéphane. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet. Neurology*. 8(4): 382–397 (2009).

Höglinger, G.; Trenkwalder, C.; et al. (2023). Parkinson-Krankheit, S2k-Leitlinie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Neurologie.. *Dissertation*. Online verfügbar unter [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien).

- Höllerhage, Matthias. Secondary parkinsonism due to drugs, vascular lesions, tumors, trauma, and other insults. *International review of neurobiology*. 149: 377–418 (2019).
- Hornykiewicz, Oleh. L-DOPA. *Journal of Parkinson's disease*. 7(s1): S3-S10 (2017).
- Horvath, Susanne E.; Daum, Günther. Lipids of mitochondria. *Progress in lipid research*. 52(4): 590–614 (2013).
- Houtkooper, R. H.; Vaz, F. M. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 65(16): 2493–2506 (2008).
- Hrycay, Eugene G.; Bandiera, Stelvio M. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*. 74: 35–84 (2015).
- Husemann, Jens; Loike, John D.; Anankov, Roman; Febbraio, Maria; Silverstein, Samuel C. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*. 40(2): 195–205 (2002).
- Imazu, T.; Shimizu, S.; Tagami, S.; Matsushima, M.; Nakamura, Y.; Miki, T. et al. Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene*. 18(32): 4523–4529 (1999).
- Ishihara, Naotada; Eura, Yuka; Mihara, Katsuyoshi. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of cell science*. 117(Pt 26): 6535–6546 (2004).
- Ishihara, Naotada; Fujita, Yuu; Oka, Toshihiko; Mihara, Katsuyoshi. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO Journal*. 25(13): 2966–2977 (2006).
- Iuga, C.; Campero, A.; Vivier-Bunge, A. Antioxidant vs. prooxidant action of phenothiazine in a biological environment in the presence of hydroxyl and hydroperoxyl radicals: a quantum chemistry study. *RSC Adv*. 5(19): 14678–14689 (2015).
- Jackson-Lewis, Vernice; Blesa, Javier; Przedborski, Serge. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 18 Suppl 1: S183-5 (2012).
- Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Goedert, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Letters*. 345(1): 27–32 (1994).
- Jang, Yongchul; Kwon, Insu; Song, Wankeun; Cosio-Lima, Ludmila M.; Taylor, Scott; Lee, Youngil. Modulation of mitochondrial phenotypes by endurance exercise contributes to neuroprotection against a MPTP-induced animal model of PD. *Life sciences*. 209: 455–465 (2018).
- Jankovic, Joseph; Tan, Eng King. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 91(8): 795–808 (2020).

Javitch, J. A.; D'Amato, R. J.; Strittmatter, S. M.; Snyder, S. H. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82(7): 2173–2177 (1985).

Jellinger, K.; Kienzl, E.; Rumpelmair, G.; Riederer, P.; Stachelberger, H.; Ben-Shachar, D.; Youdim, M. B. Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. *Journal of neurochemistry*. 59(3): 1168–1171 (1992).

Jellinger, Kurt A. Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease-dementia: current concepts and controversies. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 125(4): 615–650 (2018).

Jenner, P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences*. 24(5): 245–247 (2001).

Jin, Qinhuo; Li, Ruibing; Hu, Nan; Xin, Ting; Zhu, Pingjun; Hu, Shunying et al. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways. *Redox biology*. 14: 576–587 (2018).

Joselin, Alvin P.; Hewitt, Sarah J.; Callaghan, Steve M.; Kim, Raymond H.; Chung, Young-Hwa; Mak, Tak W. et al. ROS-dependent regulation of Parkin and DJ-1 localization during oxidative stress in neurons. *Human molecular genetics*. 21(22): 4888–4903 (2012).

Juárez Olguín, Hugo; Calderón Guzmán, David; Hernández García, Ernestina; Barragán Mejía, Gerardo. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016: 9730467 (2016).

Kalia, Lorraine V.; Lang, Anthony E. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*. 386(9996): 896–912 (2015).

Kane, Lesley A.; Lazarou, Michael; Fogel, Adam I.; Li, Yan; Yamano, Koji; Sarraf, Shireen A. et al. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *The Journal of cell biology*. 205(2): 143–153 (2014).

Karpenko, M. N.; Vasilishina, A. A.; Gromova, E. A.; Muruzheva, Z. M.; Miliukhina, I. V.; Bernadotte, A. Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease. *Cellular immunology*. 327: 77–82 (2018).

Kazlauskaitė, Agnė; Kondapalli, Chandana; Gourlay, Robert; Campbell, David G.; Ritorto, Maria Stella; Hofmann, Kay et al. Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *The Biochemical journal*. 460(1): 127–139 (2014).

Keeney, Paula M.; Xie, Jing; Capaldi, Roderick A.; Bennett, James P. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26(19): 5256–5264 (2006).

Kern, Fabian; Krammes, Lena; Danz, Karin; Diener, Caroline; Kehl, Tim; Küchler, Oliver et al. Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools. *Nucleic Acids Research*. 49(1): 127–144 (2021).

Killackey, Samuel A.; Philpott, Dana J.; Girardin, Stephen E. Mitophagy pathways in health and disease. *The Journal of cell biology*. 219(11) (2020).

Kitada, T.; Asakawa, S.; Hattori, N.; Matsumine, H.; Yamamura, Y.; Minoshima, S. et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 392(6676): 605–608 (1998).

Kitamura, Yoshihisa; Kosaka, Tadashi; Kakimura, Jun-Ichi; Matsuoka, Yasuji; Kohno, Yasuko; Nomura, Yasuyuki; Taniguchi, Takashi. 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): 1046–1054 (1998).

Koyano, Fumika; Okatsu, Kei; Kosako, Hidetaka; Tamura, Yasushi; Go, Etsu; Kimura, Mayumi et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*. 510(7503): 162–166 (2014).

Kraus, Felix; Roy, Krishnendu; Pucadyil, Thomas J.; Ryan, Michael T. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature*. 590(7844): 57–66 (2021).

Kromm, Tanja. Mitochondriale Dysfunktion in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit und der protektive Einfluss von Phenothiazin. *Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Dissertation* (2020).

Krug, A. K.; Gutbier, S.; Zhao, L.; Pörtl, D.; Kullmann, C.; Ivanova, V. et al. Transcriptional and metabolic adaptation of human neurons to the mitochondrial toxicant MPP(+). *Cell Death & Disease*. 5(5): e1222 (2014).

Kühlbrandt, Werner. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology*. 13: 89 (2015).

Labbé, Katherine; Murley, Andrew; Nunnari, Jodi. Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 30: 357–391 (2014).

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680–685 (1970).

Langston, J. W.; Ballard, P.; Tetrud, J. W.; Irwin, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*. 219(4587): 979–980 (1983).

- Langston, J. W.; Irwin, I.; Langston, E. B.; Forno, L. S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neuroscience letters*. 48(1): 87–92 (1984).
- Langston, J. William. The MPTP Story. *Journal of Parkinson's disease*. 7(s1): S11-S19 (2017).
- Lazarou, Michael; Jin, Seok Min; Kane, Lesley A.; Youle, Richard J. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Developmental cell*. 22(2): 320–333 (2012).
- Lee, Jason E.; Westrate, Laura M.; Wu, Haoxi; Page, Cynthia; Voeltz, Gia K. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature*. 540(7631): 139–143 (2016).
- Legros, Frédéric; Lombès, Anne; Frachon, Paule; Rojo, Manuel. Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusin<sup>5</sup>. *Molecular biology of the cell*. 13(12): 4343–4354 (2002).
- Lemasters, John J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research*. 8(1): 3–5 (2005).
- Lertxundi, Unax; Isla, Arantxazu; Solinis, Maria Angeles; Domingo-Echaburu, Saioa; Hernandez, Rafael; Peral-Aguirregoitia, Javier; Medrano, Juan. Anticholinergic burden in Parkinson's disease inpatients. *European journal of clinical pharmacology*. 71(10): 1271–1277 (2015).
- Levin, Johannes; Kurz, Alexander; Arzberger, Thomas; Giese, Armin; Höglinger, Günter U. The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Deutsches Arzteblatt international*. 113(5): 61–69 (2016).
- Li, Anqi; Gao, Meng; Liu, Bilin; Qin, Yuan; Chen, Lei; Liu, Hanyu et al. Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Cell Death & Disease*. 13(5): 444 (2022).
- Li, Wen-Wei; Yang, Ru; Guo, Jing-Chun; Ren, Hui-Min; Zha, Xi-Liang; Cheng, Jie-Shi; Cai, Ding-Fang. Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport*. 18(15): 1543–1546 (2007).
- Lin, Michael T.; Beal, M. Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 443(7113): 787–795 (2006).
- Losón, Oliver C.; Song, Zhiyin; Chen, Hsiuchen; Chan, David C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*. 24(5): 659–667 (2013).
- Lotharius, Julie; Barg, Sebastian; Wiekop, Pia; Lundberg, Cecilia; Raymon, Heather K.; Brundin, Patrik. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *The Journal of biological chemistry*. 277(41): 38884–38894 (2002).

Lotharius, Julie; Brundin, Patrik. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nature reviews. Neuroscience*. 3(12): 932–942 (2002).

Lotharius, Julie; Falsig, Jeppe; van Beek, Johan; Payne, Sarah; Dringen, Ralf; Brundin, Patrik; Leist, Marcel. Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25(27): 6329–6342 (2005).

Lücking, C. B.; Dürr, A.; Bonifati, V.; Vaughan, J.; Michele, G. de; Gasser, T. et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *The New England journal of medicine*. 342(21): 1560–1567 (2000).

Ludtmann, Marthe H. R.; Angelova, Plamena R.; Horrocks, Mathew H.; Choi, Minee L.; Rodrigues, Margarida; Baev, Artyom Y. et al.  $\alpha$ -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nat Commun*. 9(1): 2293 (2018).

Ludtmann, Marthe H. R.; Angelova, Plamena R.; Ninkina, Natalia N.; Gandhi, Sonia; Buchman, Vladimir L.; Abramov, Andrey Y. Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase. *The Journal of Neuroscience*. 36(41): 10510–10521 (2016).

Marinković, Mija; Novak, Ivana. A brief overview of BNIP3L/NIX receptor-mediated mitophagy. *FEBS open bio*. 11(12): 3230–3236 (2021).

Marinković, Mija; Šprung, Matilda; Novak, Ivana. Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery. *Autophagy*. 17(5): 1232–1243 (2021).

Markey, S. P.; Johannessen, J. N.; Chiueh, C. C.; Burns, R. S.; Herkenham, M. A. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*. 311(5985): 464–467 (1984).

Maroteaux, L.; Campanelli, J. T.; Scheller, R. H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of Neuroscience*. 8(8): 2804–2815 (1988).

Marras, C.; Beck, J. C.; Bower, J. H.; Roberts, E.; Ritz, B.; Ross, G. W. et al. Prevalence of Parkinson's disease across North America. *NPJ Parkinson's disease*. 4: 21 (2018).

Martin, Ian; Kim, Jungwoo Wren; Dawson, Valina L.; Dawson, Ted M. LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 131(5): 554–565 (2014).

Matés, J. M.; Pérez-Gómez, C.; Núñez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 32(8): 595–603 (1999).

Matsuda, Noriyuki; Sato, Shigeto; Shiba, Kahori; Okatsu, Kei; Saisho, Keiko; Gautier, Clement A. et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology*. 189(2): 211–221 (2010).

Matsuda, Wakoto; Furuta, Takahiro; Nakamura, Kouichi C.; Hioki, Hiroyuki; Fujiyama, Fumino; Arai, Ryohachi; Kaneko, Takeshi. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *The Journal of Neuroscience*. 29(2): 444–453 (2009).

Matsumine, H.; Saito, M.; Shimoda-Matsubayashi, S.; Tanaka, H.; Ishikawa, A.; Nakagawa-Hattori, Y. et al. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *American Journal of Human Genetics*. 60(3): 588–596.

Matsunaga, M.; Shirane, Y.; Aiuchi, T.; Nakamura, Y.; Nakaya, K. Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and ATP content in synaptosomes. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 19(1): 29–33 (1996).

Matsushima, Mieko; Fujiwara, Tsutomu; Takahashi, Ei-ichi; Minaguchi, Takeo; Eguchi, Yutaka; Tsujimoto, Yoshihide et al. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosom. Cancer*. 21(3): 230–235 (1998).

Mattie, Sevan; Riemer, Jan; Wideman, Jeremy G.; McBride, Heidi M. A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of cell biology*. 217(2): 507–515 (2018).

McNaught, Kevin St P.; Olanow, C. Warren. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. 53 Suppl 3: S73-84; discussion S84-6 (2003).

Mehra, Surabhi; Sahay, Shruti; Maji, Samir K.  $\alpha$ -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*. 1867(10): 890–908 (2019).

Meissner, Cathrin; Lorenz, Holger; Weihofen, Andreas; Selkoe, Dennis J.; Lemberg, Marius K. The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *Journal of neurochemistry*. 117(5): 856–867 (2011).

Miller, Gary Wright. Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 100(1): 1–2 (2007).

Mishra, Prashant; Carelli, Valerio; Manfredi, Giovanni; Chan, David C. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*. 19(4): 630–641 (2014).

Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191: 144–148 (1961).

Mizuno, Y.; Suzuki, K.; Sone, N.; Saitoh, T. Inhibition of ATP synthesis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in isolated mitochondria from mouse brains. *Neuroscience letters*. 81(1-2): 204–208 (1987).

Mizushima, Noboru; Levine, Beth. Autophagy in Human Diseases. *The New England journal of medicine*. 383(16): 1564–1576 (2020).

Mocko, Justyna B.; Kern, Andreas; Moosmann, Bernd; Behl, Christian; Hajieva, Parvana. Phenothiazines interfere with dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 40(1): 120–129 (2010).

Moosmann, B.; Skutella, T.; Beyer, K.; Behl, C. Protective activity of aromatic amines and imines against oxidative nerve cell death. *Biological chemistry*. 382(11): 1601–1612 (2001).

Muller, Florian L.; Liu, Yuhong; van Remmen, Holly. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 279(47): 49064–49073 (2004).

Mulvihill, Kevin G. Presynaptic regulation of dopamine release: Role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochemistry international*. 122: 94–105 (2019).

Nagatsu, T.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. (1964). TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS. *Journal of Biological Chemistry*. 239: 2910–2917.

Nagatsu, Toshiharu; Nakashima, Akira; Watanabe, Hirohisa; Ito, Shosuke; Wakamatsu, Kazumasa. Neuromelanin in Parkinson's Disease: Tyrosine Hydroxylase and Tyrosinase. *International journal of molecular sciences*. 23(8) (2022).

Nagatsua, Toshiharu; Sawadab, Makoto. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism & related disorders*. 15 Suppl 1: S3-8 (2009).

Nakamura, Ken; Nemani, Venu M.; Azarbal, Farnaz; Skibinski, Gaia; Levy, Jon M.; Egami, Kiyoshi et al. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry*. 286(23): 20710–20726 (2011).

Narendra, Derek; Tanaka, Atsushi; Suen, Der-Fen; Youle, Richard J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. 183(5): 795–803 (2008).

Narendra, Derek P.; Jin, Seok Min; Tanaka, Atsushi; Suen, Der-Fen; Gautier, Clement A.; Shen, Jie et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology*. 8(1): e1000298 (2010).

- Navarro, Ana; Boveris, Alberto; Báñez, Manuel J.; Sánchez-Pino, María Jesús; Gómez, Carmen; Muntané, Gerard; Ferrer, Isidro. Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free radical biology & medicine*. 46(12): 1574–1580 (2009).
- Neupert, Walter; Herrmann, Johannes M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*. 76: 723–749 (2007).
- Nimmerjahn, Axel; Kirchhoff, Frank; Helmchen, Fritjof. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*. 308(5726): 1314–1318 (2005).
- Novak, Ivana; Kirkin, Vladimir; McEwan, David G.; Zhang, Ji; Wild, Philipp; Rozenknop, Alexis et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Reports*. 11(1): 45–51 (2010).
- Noyce, Alastair J.; Bestwick, Jonathan P.; Silveira-Moriyama, Laura; Hawkes, Christopher H.; Giovannoni, Gavin; Lees, Andrew J.; Schrag, Anette. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Annals of Neurology*. 72(6): 893–901 (2012).
- Nunnari, Jodi; Suomalainen, Anu. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 148(6): 1145–1159 (2012).
- Ohama, E.; Ikuta, F. Parkinson's disease: distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. *Acta neuropathologica*. 34(4): 311–319 (1976).
- Ohlow, Maike J.; Moosmann, Bernd. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug discovery today*. 16(3-4): 119–131 (2011).
- Ohlow, Maike J.; Sohre, Selina; Granold, Matthias; Schreckenberger, Mathias; Moosmann, Bernd. Why Have Clinical Trials of Antioxidants to Prevent Neurodegeneration Failed? - A Cellular Investigation of Novel Phenothiazine-Type Antioxidants Reveals Competing Objectives for Pharmaceutical Neuroprotection. *Pharmaceutical research*. 34(2): 378–393 (2017).
- Okatsu, Kei; Uno, Midori; Koyano, Fumika; Go, Etsu; Kimura, Mayumi; Oka, Toshihiko et al. A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *The Journal of biological chemistry*. 288(51): 36372–36384 (2013).
- Okuno, Daichi; Iino, Ryota; Noji, Hiroyuki. Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *Journal of biochemistry*. 149(6): 655–664 (2011).
- Olichon, Aurélien; Baricault, Laurent; Gas, Nicole; Guillou, Emmanuelle; Valette, Annie; Belenguer, Pascale; Lenaers, Guy. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 278(10): 7743–7746 (2003).

Olichon, Aurélien; Emorine, Laurent J.; Descoins, Eric; Pelloquin, Laetitia; Bricchese, Laetitia; Gas, Nicole et al. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters*. 523(1-3): 171–176 (2002).

Otera, Hidenori; Wang, Chunxin; Cleland, Megan M.; Setoguchi, Kiyoko; Yokota, Sadaki; Youle, Richard J.; Mihara, Katsuyoshi. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 191(6): 1141–1158 (2010).

Pacelli, Consiglia; Giguère, Nicolas; Bourque, Marie-Josée; Lévesque, Martin; Slack, Ruth S.; Trudeau, Louis-Éric. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current biology : CB*. 25(18): 2349–2360 (2015).

Pahwa, Rajesh; Lyons, Kelly E.; Hauser, Robert A.; Fahn, Stanley; Jankovic, Joseph; Pourcher, Emmanuelle et al. Randomized trial of IPX066, carbidopa/levodopa extended release, in early Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 20(2): 142–148 (2014).

Palikaras, Konstantinos; Lionaki, Eirini; Tavernarakis, Nektarios. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature cell biology*. 20(9): 1013–1022 (2018).

Parkinson, James. An essay on the shaking palsy. London (1817).

Pernas, Lena; Scorrano, Luca. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual review of physiology*. 78: 505–531 (2016).

Pfanner, Nikolaus; Warscheid, Bettina; Wiedemann, Nils. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 20(5): 267–284 (2019).

Pickrell, Alicia M.; Youle, Richard J. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*. 85(2): 257–273 (2015).

Pletjushkina, O. Yu; Lyamzaev, K. G.; Popova, E. N.; Nepryakhina, O. K.; Ivanova, O. Yu; Domnina, L. V. et al. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochimica et biophysica acta*. 1757(5-6): 518–524 (2006).

Plotegher, N.; Gratton, E.; Bubacco, L. Number and Brightness analysis of alpha-synuclein oligomerization and the associated mitochondrial morphology alterations in live cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1840(6): 2014–2024 (2014).

Pörtl, Dominik; Schildknecht, Stefan; Karreman, Christiaan; Leist, Marcel. Uncoupling of ATP-depletion and cell death in human dopaminergic neurons. *Neurotoxicology*. 33(4): 769–779 (2012).

- Polymeropoulos, M. H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S. E.; Dehejia, A.; Dutra, A. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*. 276(5321): 2045–2047 (1997).
- Postuma, Ronald B.; Berg, Daniela; Stern, Matthew; Poewe, Werner; Olanow, C. Warren; Oertel, Wolfgang et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 30(12): 1591–1601 (2015).
- Prasertsuksri, Prachayaporn; Kraokaew, Pichnaree; Pranweerapaiboon, Kanta; Sobhon, Prasert; Chaithirayanon, Kulathida. Neuroprotection of Andrographolide against Neurotoxin MPP+-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells via Activating Mitophagy, Autophagy, and Antioxidant Activities. *International journal of molecular sciences*. 24(10) (2023).
- Ramsay, R. R.; Dadgar, J.; Trevor, A.; Singer, T. P. Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life sciences*. 39(7): 581–588 (1986a).
- Ramsay, R. R.; Krueger, M. J.; Youngster, S. K.; Gluck, M. R.; Casida, J. E.; Singer, T. P. Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase. *Journal of neurochemistry*. 56(4): 1184–1190 (1991).
- Ramsay, R. R.; Salach, J. I.; Singer, T. P. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD+-linked substrates by MPP+. *Biochemical and biophysical research communications*. 134(2): 743–748 (1986b).
- Ramsay, R. R.; Singer, T. P. (1986). Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 261(17): 7585–7587.
- Raninga, Prahlad V.; Di Trapani, Giovanna; Tonissen, Kathryn F. The Multifaceted Roles of DJ-1 as an Antioxidant. *Advances in experimental medicine and biology*. 1037: 67–87 (2017).
- Ransom, B. R.; Kunis, D. M.; Irwin, I.; Langston, J. W. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neuroscience letters*. 75(3): 323–328 (1987).
- Rehling, Peter; Brandner, Katrin; Pfanner, Nikolaus. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5(7): 519–530 (2004).
- Richardson, Jason R.; Quan, Yu; Sherer, Todd B.; Greenamyre, J. Timothy; Miller, Gary W. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 88(1): 193–201 (2005).

Riederer, P.; Sofic, E.; Rausch, W. D.; Schmidt, B.; Reynolds, G. P.; Jellinger, K.; Youdim, M. B. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *Journal of neurochemistry*. 52(2): 515–520 (1989).

Riley, B. E.; Loughheed, J. C.; Callaway, K.; Velasquez, M.; Brecht, E.; Nguyen, L. et al. Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat Commun*. 4: 1982 (2013).

Rocha, Emily M.; Miranda, Briana de; Sanders, Laurie H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 109(Pt B): 249–257 (2018).

Rogov, Vladimir V.; Suzuki, Hironori; Marinković, Mija; Lang, Verena; Kato, Ryuichi; Kawasaki, Masato et al. Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Scientific Reports*. 7(1): 1131 (2017).

Ronzitti, Giuseppe; Bucci, Giovanna; Emanuele, Marco; Leo, Damiana; Sotnikova, Tatyana D.; Mus, Liudmila V. et al. Exogenous  $\alpha$ -synuclein decreases raft partitioning of Cav2.2 channels inducing dopamine release. *The Journal of Neuroscience*. 34(32): 10603–10615 (2014).

Roosen, Dorien A.; Cookson, Mark R. LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. *Molecular Neurodegeneration*. 11(1): 73 (2016).

Rosario, Fredrick J.; Gupta, Madhulika B.; Myatt, Leslie; Powell, Theresa L.; Glenn, Jeremy P.; Cox, Laura; Jansson, Thomas. Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Promotes the Expression of Genes Encoding Electron Transport Chain Proteins and Stimulates Oxidative Phosphorylation in Primary Human Trophoblast Cells by Regulating Mitochondrial Biogenesis. *Scientific Reports*. 9(1): 246 (2019).

Rossetti, Z. L.; Sotgiu, A.; Sharp, D. E.; Hadjiconstantinou, M.; Neff, N. H. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. *Biochemical pharmacology*. 37(23): 4573–4574 (1988).

Sánchez, C.; Díaz-Nido, J.; Avila, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Progress in neurobiology*. 61(2): 133–168 (2000).

Sanders, Laurie H.; Timothy Greenamyre, J. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free radical biology & medicine*. 62: 111–120 (2013).

Sardi, S. Pablo; Cedarbaum, Jesse M.; Brundin, Patrik. Targeted Therapies for Parkinson's Disease: From Genetics to the Clinic. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 33(5): 684–696 (2018).

- Satoh, Masaaki; Hamamoto, Toshiro; Seo, Norimasa; Kagawa, Yasuo; Endo, Hitoshi. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications*. 300(2): 482–493 (2003).
- Sauerbier, Anna; Jenner, Peter; Todorova, Antoniya; Chaudhuri, K. Ray. Non motor subtypes and Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 22: S41-S46 (2016).
- Sayre, Lawrence M.; Perry, George; Smith, Mark A. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical research in toxicology*. 21(1): 172–188 (2008).
- Schapira, A. H.; Cooper, J. M.; Dexter, D.; Clark, J. B.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 54(3): 823–827 (1990).
- Schapira, Anthony H. V.; Chaudhuri, K. Ray; Jenner, Peter. Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 18(7): 435–450 (2017).
- Schildknecht, Stefan; Karreman, Christiaan; Pörtl, Dominik; Efrémova, Liudmila; Kullmann, Cornelius; Gutbier, Simon et al. Generation of genetically-modified human differentiated cells for toxicological tests and the study of neurodegenerative diseases. *ALTEX*. 30(4): 427–444 (2013).
- Schnabel, Jim. Secrets of the shaking palsy. *Nature*. 466(7310): S2-5 (2010).
- Schweers, Rachel L.; Zhang, Ji; Randall, Mindy S.; Loyd, Melanie R.; Li, Weimin; Dorsey, Frank C. et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(49): 19500–19505 (2007).
- Shen, R. S.; Abell, C. W.; Gessner, W.; Brossi, A. Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP<sup>+</sup>. *FEBS Letters*. 189(2): 225–230 (1985).
- Shiota, Takuya; Imai, Kenichiro; Qiu, Jian; Hewitt, Victoria L.; Tan, Khershing; Shen, Hsin-Hui et al. Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science (New York, N.Y.)*. 349(6255): 1544–1548 (2015).
- Sian, J.; Dexter, D. T.; Lees, A. J.; Daniel, S.; Agid, Y.; Javoy-Agid, F. et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of Neurology*. 36(3): 348–355 (1994).
- Simbeni, R.; Pon, L.; Zinser, E.; Paltauf, F.; Daum, G. (1991). Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*. 266(16): 10047–10049.
- Simon, David K.; Tanner, Caroline M.; Brundin, Patrik. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in geriatric medicine*. 36(1): 1–12 (2020).

Singer, T. P.; Salach, J. I.; Castagnoli, N.; Trevor, A. Interactions of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine with monoamine oxidases. *The Biochemical journal*. 235(3): 785–789 (1986).

Singleton, A. B.; Farrer, M.; Johnson, J.; Singleton, A.; Hague, S.; Kachergus, J. et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*. 302(5646): 841 (2003).

Singleton, Andrew B.; Farrer, Matthew J.; Bonifati, Vincenzo. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 28(1): 14–23 (2013).

Smirnova, E.; Griparic, L.; Shurland, D. L.; van der Bliek, A. M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*. 12(8): 2245–2256 (2001).

Smirnova, L.; Harris, G.; Delp, J.; Valadares, M.; Pamies, D.; Hogberg, H. T. et al. A LUHMES 3D dopaminergic neuronal model for neurotoxicity testing allowing long-term exposure and cellular resilience analysis. *Archives of toxicology*. 90(11): 2725–2743 (2016).

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 150(1): 76–85 (1985).

Sofic, E.; Lange, K. W.; Jellinger, K.; Riederer, P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 142(2): 128–130 (1992).

Sofic, E.; Riederer, P.; Heinsen, H.; Beckmann, H.; Reynolds, G. P.; Hebenstreit, G.; Youdim, M. B. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *Journal of neural transmission*. 74(3): 199–205 (1988).

Song, Zhiyin; Chen, Hsiuchen; Fiket, Maja; Alexander, Christiane; Chan, David C. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of cell biology*. 178(5): 749–755 (2007).

Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 388(6645): 839–840 (1997).

Starkov, Anatoly A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1147: 37–52 (2008).

St-Pierre, Julie; Buckingham, Julie A.; Roebuck, Stephen J.; Brand, Martin D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*. 277(47): 44784–44790 (2002).

Strauss, Mike; Hofhaus, Götz; Schröder, Rasmus R.; Kühlbrandt, Werner. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *The EMBO Journal*. 27(7): 1154–1160 (2008).

Stroud, David A.; Surgenor, Elliot E.; Formosa, Luke E.; Reljic, Boris; Frazier, Ann E.; Dibley, Marris G. et al. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*. 538(7623): 123–126 (2016).

Subramaniam, Sudhakar Raja; Chesselet, Marie-Francoise. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 106-107: 17–32 (2013).

Tadros, F.; Abdel Wahab, F. The site of action of phenothiazine S35 in the central nervous system. *The Journal of mental science*. 108: 816–821 (1962).

Taipa, Ricardo; Pinho, João; Melo-Pires, Manuel. Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias. *Frontiers in neurology*. 3: 68 (2012).

Takahashi, H.; Wakabayashi, K. The cellular pathology of Parkinson's disease. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 21(4): 315–322 (2001).

Tanaka, Atsushi; Cleland, Megan M.; Xu, Shan; Narendra, Derek P.; Suen, Der-Fen; Karbowski, Mariusz; Youle, Richard J. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of cell biology*. 191(7): 1367–1380 (2010).

Tapias, Victor; McCoy, Jennifer L.; Greenamyre, J. Timothy. Phenothiazine normalizes the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, maintains mitochondrial integrity and protects the nigrostriatal dopamine system in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. *Redox biology*. 24: 101164 (2019).

Terada, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental health perspectives*. 87: 213–218 (1990).

Tilokani, Lisa; Nagashima, Shun; Paupe, Vincent; Prudent, Julien. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*. 62(3): 341–360 (2018).

Todorova, Antoniya; Jenner, Peter; Ray Chaudhuri, K. Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected. *Practical neurology*. 14(5): 310–322 (2014).

Tolkovsky, Aviva M. Mitophagy. *Biochimica et biophysica acta*. 1793(9): 1508–1515 (2009).

Tondera, Daniel; Grandemange, Stéphanie; Jourdain, Alexis; Karbowski, Mariusz; Mattenberger, Yves; Herzig, Sébastien et al. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *The EMBO Journal*. 28(11): 1589–1600 (2009).

Tracy, Kristin; Dibling, Benjamin C.; Spike, Benjamin T.; Knabb, James R.; Schumacker, Paul; Macleod, Kay F. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Molecular and cellular biology*. 27(17): 6229–6242 (2007).

Trempe, Jean-François; Fon, Edward A. Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. *Frontiers in neurology*. 4: 38 (2013).

- Tüshaus, Johanna; Kataka, Evans Sioma; Zaucha, Jan; Frishman, Dmitrij; Müller, Stephan A.; Lichtenthaler, Stefan F. Neuronal Differentiation of LUHMES Cells Induces Substantial Changes of the Proteome. *Proteomics*. 21(1): e2000174 (2021).
- Twig, Gilad; Elorza, Alvaro; Molina, Anthony J. A.; Mohamed, Hibo; Wikstrom, Jakob D.; Walzer, Gil et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO Journal*. 27(2): 433–446 (2008).
- Ungerstedt, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European journal of pharmacology*. 5(1): 107–110 (1968).
- Unoki, M.; Nakamura, Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*. 20(33): 4457–4465 (2001).
- Vafai, Scott B.; Mootha, Vamsi K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*. 491(7424): 374–383 (2012).
- Valente, Enza Maria; Abou-Sleiman, Patrick M.; Caputo, Viviana; Muqit, Miratul M. K.; Harvey, Kirsten; Gispert, Suzana et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)*. 304(5674): 1158–1160 (2004).
- van der Blik, A. M. Functional diversity in the dynamin family. *Trends in cell biology*. 9(3): 96–102 (1999).
- van der Blik, Alexander M.; Shen, Qinfang; Kawajiri, Sumihiro. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5(6) (2013).
- van Heesbeen, H. J.; Smidt, Marten P. Entanglement of Genetics and Epigenetics in Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience*. 13: 277 (2019).
- van Heesbeen, Hendrikus J.; Mesman, Simone; Veenliet, Jesse V.; Smidt, Marten P. Epigenetic mechanisms in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Development (Cambridge, England)*. 140(6): 1159–1169 (2013).
- Vaughan, J. R.; Davis, M. B.; Wood, N. W. Genetics of Parkinsonism: a review. *Ann Human Genet*. 65(2): 111–126 (2001).
- Verschuur, Constant V. M.; Suwijn, Sven R.; Boel, Judith A.; Post, Bart; Bloem, Bas R.; van Hilten, Johannes J. et al. Randomized Delayed-Start Trial of Levodopa in Parkinson's Disease. *The New England journal of medicine*. 380(4): 315–324 (2019).
- Vogel, Frank; Bornhövd, Carsten; Neupert, Walter; Reichert, Andreas S. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology*. 175(2): 237–247 (2006).

- Votyakova, T. V.; Reynolds, I. J. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Journal of neurochemistry*. 79(2): 266–277 (2001).
- Wai, Timothy; Langer, Thomas. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 27(2): 105–117 (2016).
- Wakabayashi, Koichi; Tanji, Kunikazu; Odagiri, Saori; Miki, Yasuo; Mori, Fumiaki; Takahashi, Hitoshi. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*. 47(2): 495–508 (2013).
- Wang, Qinqin; Liu, Yingjun; Zhou, Jiawei. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational neurodegeneration*. 4: 19 (2015).
- Wiedemann, Nils; Pfanner, Nikolaus. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annual Review of Biochemistry*. 86: 685–714 (2017).
- Wilkins, Verena; Kohl, Wladislaw; Busch, Karin. Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *Journal of cell science*. 126(Pt 1): 103–116 (2013).
- Winner, Beate; Jappelli, Roberto; Maji, Samir K.; Desplats, Paula A.; Boyer, Leah; Aigner, Stefan et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(10): 4194–4199 (2011).
- Wiseman, H.; Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal*. 313 (Pt 1)(Pt 1): 17–29 (1996).
- Wong, Yvette C.; Luk, Kelvin; Purtell, Kerry; Burke Nanni, Samuel; Stoessl, A. Jon; Trudeau, Louis-Eric et al. Neuronal vulnerability in Parkinson disease: Should the focus be on axons and synaptic terminals? *Movement Disorders*. 34(10): 1406–1422 (2019).
- Xiao, Bin; Kuruvilla, Joshua; Tan, Eng-King. Mitophagy and reactive oxygen species interplay in Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's disease*. 8(1): 135 (2022).
- Xilouri, Maria; Brekk, Oystein Rod; Stefanis, Leonidas.  $\alpha$ -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular neurobiology*. 47(2): 537–551 (2013).
- Yaffe, Dana; Forrest, Lucy R.; Schuldiner, Shimon. The ins and outs of vesicular monoamine transporters. *The Journal of General Physiology*. 150(5): 671–682 (2018).
- Yan, Michael H.; Wang, Xinglong; Zhu, Xiongwei. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free radical biology & medicine*. 62: 90–101 (2013).

Yoon, Y.; Pitts, K. R.; Dahan, S.; McNiven, M. A. A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 140(4): 779–793 (1998).

Youle, Richard J.; van der Blik, Alexander M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*. 337(6098): 1062–1065 (2012).

Zemirli, Naima; Morel, Etienne; Molino, Diana. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *International journal of molecular sciences*. 19(2) (2018).

Zhang, J.; Perry, G.; Smith, M. A.; Robertson, D.; Olson, S. J.; Graham, D. G.; Montine, T. J. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *The American journal of pathology*. 154(5): 1423–1429 (1999).

Zhang, Wei; Wang, Tongguang; Pei, Zhong; Miller, David S.; Wu, Xuefei; Block, Michelle L. et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 19(6): 533–542 (2005).

Zimprich, Alexander; Biskup, Saskia; Leitner, Petra; Lichtner, Peter; Farrer, Matthew; Lincoln, Sarah et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 44(4): 601–607 (2004).

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während des Studiums und bei der Erstellung der Dissertation begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Parvana Hajieva und Herrn Prof. Bernd Moosmann. Danke für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung bei der Durchführung und Umsetzung der Arbeit. Danke für die vielen Gespräche, und dass Sie meine Arbeit durch Ihre Unterstützung und Ihre Gedanken geprägt haben.

Besonders danken möchte ich auch [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] für die Einarbeitung im Labor und die Begleitung durch viele produktive Gespräche und Anregungen. Ich danke dem gesamten Team des Instituts der AG Behl und der AG Moosmann, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei [REDACTED] für die Einweisung in das Konfokalmikroskop und die geduldige Beantwortung meiner Fragen bedanken.

Meiner lieben Familie und meinen lieben Freunden, insbesondere [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED], danke ich für eure Ermutigung, euer Verständnis und eure Unterstützung während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation. Und nicht zuletzt möchte ich dem danken, dem aller Dank und alle Ehre gebührt, meinem Gott und Schöpfer.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf