Aus dem Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Christine Klein

# Pathophysiologie und Ausprägung des PINK1-assoziierten Morbus Parkinson – Erkenntnisse aus dem Tiermodell Drosophila melanogaster

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von

Claudia Böhm

aus Hannover

Lübeck 2020

- 1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christine Klein
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Timo Gemoll

Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2021 Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 02.11.2021 Promotionskommission der Sektion Medizin

# Inhalt

| 1. Einl | eitung 1   |  |  |
|---------|--|--|--|
| 1.1.    | Morbus Parkinson 1   |  |  |
| 1.2.    | Heriditärer Morbus Parkinson   |  |  |
| 1.3.    | Drosophila melanogaster als Tiermodell   |  |  |
| 1.4.    | Das PINK1-Gen und die Funktion des PINK1-Proteins  |  |  |
| 1.5.    | Phänotyp der <i>pink1</i> -mutierten Fliegen   |  |  |
| 1.6.    | Lipidstoffwechsel in <i>pink1</i> -mutierten Fliegen10   |  |  |
| 1.7.    | Reduzierte Penetranz der <i>pink1</i> -Mutation  |  |  |
| 1.8.    | Zielsetzung 14   |  |  |
| 2. Mat  | erial und Methoden15   |  |  |
| 2.1.    | Liste aller Materialien 15   |  |  |
| 2.2.    | Drosophila melanogaster als Tiermodell   |  |  |
| 2.3.    | Wirkstofftests an <i>pink1</i> -mutierten Fliegen  |  |  |
| 2.4.    | Test der Flugfähigkeit   |  |  |
| 2.5.    | ATP-Messungen  |  |  |
| 2.6.    | Proteinmessungen   |  |  |
| 2.7.    | Komplex I-Messungen  |  |  |
| 2.8.    | Western Blot 19  |  |  |
| 2.9.    | Auswertung   |  |  |
| 3. Erg  | ebnisse24  |  |  |
| 3.1.    | Inhibition des Ceramidstoffwechsel bessert pathologische Parameter in <i>pink1</i> -Fliegen 24 |  |  |
| 3.1.    | 1. Myriocin steigert die Aktivität von Komplex I   |  |  |
| 3.1.2   | 2. FTY720 hat keinen Einfluss auf pathologische Parameter                                      |  |  |
| 3.1.3   | 3. Miglustat zeigt keine messbare Wirksamkeit auf pathologische Parameter                      |  |  |
| 3.1.4   | Zoledronsäure verbessert verschiedene pathologische Parameter                                  |  |  |
| 3.1.    | 5. Senkung der Ceramide reduziert Expression der Superoxiddismutase-2                          |  |  |
| 3.1.    | 6. Sensitivitätsanalyse der ATP-Messungen34  |  |  |
| 3.1.    | 7. Einfluss der Ceramidsenkung auf die Kontrollfliegen   |  |  |
| 3.2.    | Identifikation protektiver Faktoren für die Ausprägung der pink1-Mutation                      |  |  |
| 4. Disl | kussion43  |  |  |
| 4.1.    | Der Ceramidstoffwechsel in <i>pink1</i> -Mutanten  |  |  |
| 4.2.    | Reduzierte Penetranz der <i>pink1</i> -Mutation  |  |  |
| 4.3.    | Schlussfolgerung und Ausblick  |  |  |
| 5. Zus  | 5. Zusammenfassung55   |  |  |
| 5.1.    | Summary  |  |  |
| 6. Lite | raturverzeichnis   |  |  |

| 7. | . Anh | ang  | 69 |
|----|-------|--|----|
|    | 7.1.  | Liste aller Geräte und Materialien   | 69 |
|    | 7.2.  | ATP-Ergebnisse der B9-Fliegen vor und nach der Mittelwertbereinigung         | 74 |
|    | 7.3.  | ATP-Ergebnisse der RV-Kontrollfliegen vor und nach der Mittelwertbereinigung | 80 |
|    | 7.4.  | Abbildungsverzeichnis  | 84 |
|    | 7.5.  | Tabellenverzeichnis  | 85 |
| 8  | . Dar | ksagung  | 86 |
| 9. | . Pub | likationsliste   | 87 |

# Abkürzungsverzeichnis

| °C                              | Grad Celsius  |
|---------------------------------|---|
| μg                              | Mikrogramm  |
| μl                              | Mikroliter  |
| μM                              | Mikromolar  |
| Abb.                            | Abbildung   |
| ADP                             | Adenosindiphosphat  |
| ANOVA                           | Analysis Of Variance  |
| ATP                             | Adenosintriphosphat   |
| BLAST                           | Basic Local Alignment Search Tool                                       |
| BSA                             | Bovines Serumalbumin  |
| Cl <sub>2</sub>                 | Chlorid   |
| COMT                            | Catechol-O-Methyltransferase  |
| DCFDA                           | 2',7' -Dichlorofluoreszin diacetat                                      |
| DMSO                            | Dimethylsulfoxid  |
| DNS                             | Desoxyribonukleinsäure  |
| DTNB                            | 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzol Säure)                                    |
| DTT                             | Dithiothreitol  |
| FADH <sub>2</sub>               | Flavin-Adenin-Dinukleotid   |
| FASN                            | Fettsäuresynthase   |
| g                               | Gramm   |
| GTP                             | Guanosintriphosphat-bindendes Protein                                   |
| h                               | Stunde  |
| Н                               | Wasserstoff   |
| HACE1                           | HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1 |
| HECT                            | Homologous to the E6AP carboxyl terminus                                |
| HPLC                            | high performance liquid chromatography                                  |
| iPSCs                           | induzierte pluripotente Stammzellen                                     |
| К                               | Kalium  |
| KCN                             | Kaliumcyanid  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumdihydrogenphosphat  |
| m                               | männlich  |
| MAO-B                           | Monoaminooxidase B  |

| MEF              | Mouse embryo fibroblasts                                       |
|------------------|--|
| Mg               | Magnesium  |
| min              | Minute   |
| ml               | Milliliter   |
| mM               | Millimolar   |
| MsrA             | Methioninsulfoxid-reduktase A                                  |
| M. Parkinson     | Morbus Parkinson   |
| NADH             | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid                                 |
| NADPH            | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat                        |
| Р                | Phosphat   |
| Parkin           | Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin                                |
| PARL             | presenilin-associated rhomboid-like protein                    |
| PINK1            | PTEN-induced putative kinase                                   |
| LOF              | Loss of function Mutation                                      |
| L-Dopa           | Levo-Dopa (Freiname), L-3,4-Dihydroxy-phenylalanin             |
| Ripa             | Radioimmuno-precipitation assay buffer (zur Proteinextraktion) |
| ROS              | Reactive Oxygen Species  |
| S                | Sekunden   |
| SOD <sub>2</sub> | Superoxiddismutase 2   |
| s. g.            | so genannten   |
| TIM/TOM          | Translocase of inner and outer membrane                        |
| u. a.            | und anderen  |
| uvm.             | und vieles mehr  |
| w                | weiblich   |
| z. B.            | zum Beispiel   |

Für die Nomenklatur ist weiterhin folgende Schreibweise von Bedeutung:

|         | Mensch | Fliege |
|---------|--------|--------|
| Gen     | PINK1  | pink1  |
| Protein | PINK1  | Pink1  |

# 1. Einleitung

## 1.1. Morbus Parkinson

Morbus Parkinson (M. Parkinson) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Demenz vom Alzheimer-Typ (Jellinger 2005). Die Erkrankung führt zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität und war im Jahr 2016 verantwortlich für 3.2 Millionen DALYs (disability adjusted life years). Die globale Krankheitslast, also die Zahl von Menschen mit M. Parkinson, stieg von 2.5 Millionen im Jahr 1990 auf 6.1 Millionen im Jahr 2016 (Ray Dorsey et al. 2018). Dieser Zuwachs ist zu einem großen Teil auf die wachsende Zahl älterer Menschen zurückzuführen, welche typischerweise an M. Parkinson erkranken. Ein Großteil der M. Parkinson-Fälle tritt im Alter sporadisch auf (auch idiopathisches Parkinson-Syndrom genannt), etwa 5-10% der Fälle werden durch einen Defekt in einem einzelnen Gen hervorgerufen (Deng et al. 2018). Sowohl bei der idiopathischen, als auch der genetischen Form kommt es in Folge einer, bisher nicht gänzlich verstandenen, mitochondrialen Dysfunktion zur vermehrten Entstehung freier Radikale (Chen et al. 2019). Es zeigen sich charakteristische neuronale Einschlüsse s.g. Lewy-Körperchen; zytoplasmatische Ablagerungen aus alpha-Synuclein, Neurofilamenten, Ubiquitin (Spillantini et al. 1997) und Lipidaggregaten (Shahmoradian et al. 2019). Histopathologisch lässt sich ein Untergang dopaminerger Neurone nachweisen, vorwiegend in einer Region des Mittelhirns: der pars compacta der substantia nigra (Hirsch et al. 1988; Jenner et al. 1996). Der Neurotransmitter Dopamin ist elementar für die Signalübertragung in den Basalganglien, welche bei der Initiation und Koordiation von Bewegungen eine große Rolle spielen. Sind etwa 50-70 % der dopaminergen Neurone zu Grunde gegangen (Barzilai et al. 2003), führt der Mangel an Dopamin zu den extrapyramidal-motorischen Leitsymptomen Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität (Gelb et al. 1999). In der Therapie dieser Symptome kommen vorrangig Levo-Dopa (L-Dopa), ein synthetisches Vorprodukt von Dopamin, Dopaminagonisten, Monoaminooxidase-B- (MAO-B-) Hemmer und Catechol-O-Methyltransferase- (COMT-) Hemmer zur Anwendung. Die wirksamste, wenn auch mit motorischen Komplikationen verbundene, Therapie mit L-Dopa ist durch die individuelle Ansprechbarkeit des Patienten begrenzt und wirkt ausschließlich symptomatisch: sie beschränkt sich auf die Zufuhr eines vermindert synthetisierten Stoffes (Barbeau 1969; Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2016).

Trotz jahrelanger Forschung an verschiedenen Organismen wurde die Pathogenese des M. Parkinson bis heute nicht gänzlich durchdrungen. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die zugrundeliegenden Ursachen der mitochondrialen Dysfunktion bei M. Parkinson aufzuklären, um perspektivisch eine ursächliche Behandlung zu ermöglichen. Ein umfassendes Verständnis dieser Erkankung ist insbesondere vor dem Hintergrund des demographischen Wandels von aussergewöhnlicher Bedeutung.

## 1.2. Heriditärer Morbus Parkinson

Den genetisch bedingten Formen des M. Parkinson können Mutationen in den so genannten PARK-Genen zu Grunde liegen. Viele dieser codieren für Proteine, welche eine entscheidende Rolle für die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien spielen. Dies unterstreicht die Schlüsselstellung der Mitochondrien in der Pathogenese des M. Parkinson (Grünewald et al. 2019). Einige Mutationen führen zur Ausprägung des so genannten "early-onset"-Parkinson. Dieser ist durch ein Erkrankungsalter vor dem 40. Lebensjahr charakterisiert (Puschmann 2013). Als Ursache für den "early-onset"-Parkinson sind autosomal rezessive Mutationen in folgenden PARK-Genen bekannt (Marras et al. 2016): PARK-Parkin (PARK2) (Kitada et al. 1998), PARK-PINK1 (PARK6) (Valente et al. 2004) und PARK-DJ-1 (PARK7) (Bonifati et al. 2003). Etwa 13 % der früh auftretenden Formen des M. Parkinson sind auf Mutationen in diesen drei Genen zurück zu führen (Kasten et al. 2018). Da die genetischen Formen dem sporadischen M. Parkinson klinisch sehr ähneln, können sie jedoch als Krankheitsmodell für die häufiger auftretenden Aufschluss Formen dienen und geben über die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen.

Diese Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit einer Form des M. Parkinson, welche durch ein mutiertes *PINK1*-Gen vererbt wird. Bis heute sind über 60 Mutationen im *PINK1*-Gen beschrieben worden. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 32 Jahren, die Erkrankung schreitet langsam fort und es zeigt sich ein gutes Ansprechen auf die Therapie mit L-Dopa (Kasten et al. 2018). Dem humanen *PINK1*-Gen entsprechend, wurde ein homologes Gen in der Fliegenart *Drosophila melanogaster (DM)* indentifiziert: *pink1*. Es liegt auf dem X-Chromosom, welches in der Fliege dem ersten Chromosom entspricht, und codiert für die ubiquitär exprimierte PTEN-induced putative kinase 1 (Park et al. 2006; Clark et al. 2006).

2

Das *PINK1*-Gen ist aufgrund seines bereits identifizierten homologen Gens im Tiermodell sowie des genau beschriebenen pathologischen Phänotyps besonders für weitere Forschung prädestiniert.

## 1.3. Drosophila melanogaster als Tiermodell

Viele der genannten Gene, so zum Beispiel PINK1, finden sich nicht nur im menschlichen Genom, sondern auch in dem hier verwendeten Tiermodell *DM*. Diese Fliegenart ist für die Erforschung genetischer Erkrankungen besonders geeignet, da sich für etwa 77 % aller getesteten "menschlichen Krankheitsgene" eine homologe Sequenz auf einem der vier Chromosomen der Fliege identifizieren lässt (Reiter et al. 2001). Zahlreiche Fliegenstämme mit genau beschriebenen Phänotypen sind als bewährte Krankheitsmodelle verfügbar (Pandey et al. 2011). Eine weibliche Fliege legt im Laufe ihres Lebens etwa 2000 Eier. Die Generationsdauer ist mit 10 Tagen im Vergleich zu anderen Tiermodellen kurz. Daher ist es möglich, eine große Anzahl an Fliegen gleichzeitig zu halten. Die physiologische Lebensdauer der Fliegen beträgt 6-10 Wochen (Jennings 2011).

Für die tägliche Arbeit mit *DM* stehen nützliche Werkzeuge zur Verfügung. So genannte "Balancer"-Chromosomen tragen Inversionen, also um 180° gedrehte Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Sie sind essentiell für den Erhalt der Stämme im Labor: tragen die Fliegen Mutationen, die sich homozygot tödlich oder heterozygot steril ausprägen, ermöglichen Balancer das Überleben bzw. die Vermehrung ohne Verlust der Mutation (Abbildung 1 (Abb.)) (Roote et al. 2013).



#### Abbildung 1: Die Funktion von Balancer-Chromosomen am Beispiel der pink1<sup>B9</sup>-Mutation

Die Darstellung zeigt vereinfachend nur das erste Chromosom, welches die pink1-Mutation trägt. Mithilfe von Balancern und an sie gekoppelte Marker ist es möglich, den Stamm zu erhalten und die Pink1-Mutation bei der Kreuzung von Generation zu Generation zu tragen. Durch die sich phänotypisch ausprägenden Marker kann man auf die genetische Ausstattung jeder Fliege schließen und die Mutation über mehrere Generationen hinweg verfolgen. Je nach Genotyp werden die Fliegen entweder zum Erhalt des Stammes weiter gekreuzt, für die Versuche genutzt oder verworfen. Je nach Vorliegen eines oder mehrerer Balancer-Chromosomen verändern die daran gekoppelten Marker den Phänotyp, z. B. durch unterschiedliche Augenfarben oder Flügelformen. So ist eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Genotypen rein äußerlich möglich (Roote et al. 2013). Das erleichtert die Sortierungen und Paarungen für die Züchtungen im Labor.

### 1.4. Das *PINK1*-Gen und die Funktion des PINK1-Proteins

Das Protein PINK1 wird durch das *PINK1*-Gen codiert und besteht aus zwei Domänen. Die eine enthält die Signalsequenz, die es zu den Mitochondrien lenkt (Valente et al. 2004). Dort wird PINK1 gespalten und über die Translokase der äusseren und Translokase der inneren Mitochondrienmembran (TIM/TOM-Komplex) in die Mitochondrien geleitet (Lazarou et al. 2012). Die andere Domäne ist eine Serin/Threonin-Kinase, die verschiedene Phosphorylierungsfunktionen in der Zelle übernimmt (Valente et al. 2004; Durcan et al. 2015).

PINK1 hat wichtige Aufgaben: Gemeinsam mit der Ubiquitin-Ligase Parkin kontrolliert es Integrität und Funktion der Mitochondrien und leitet, wenn nötig, die Degradierung, also den Abbau, geschädigter Mitochondrien ein (Park et al. 2006; Clark et al. 2006; Yang et al. 2006). Diese Qualitätskontrolle ist komplex, denn Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle für den Energiehaushalt, das zelluläre Gleichgewicht (Homöostase) und die Degradierung dysfunktionaler Proteine (Pilsl et al. 2012; Leites et al. 2018).

Sind die Mitochondrien intakt (Abb. 2A) und kann das Membranpotential aufrechterhalten werden, wird PINK1 in die Mitochondrien geleitet. Bei dem Eintritt durch den TIM/TOM-Komplex wird das ganzheitliche Protein von der Protease PARL (presenilin-associated rhomboid-like protein) in zwei Fragmente gespalten (Seok et al. 2010). Einige Fragmente bleiben in den Mitochondrien und sind dort als Kinasen in der inneren Mitochondrienmembran an verschiedenen Vorgängen beteiligt. Andere Fragmente werden wieder in das Zytosol exportiert. Dort werden sie entweder proteasomal degradiert oder binden an Parkin, um dessen Translokation in die Mitochondrien und damit den mitochondrialen Abbau zu unterdrücken. Die Konzentration des ganzheitlichen PINK1-Proteins im Zytosol ist bei Abwesenheit zellulären Stresses also niedrig (Okatsu et al. 2012; Fedorowicz et al. 2014).

4

Sind die Mitochondrien dagegen z. B. aufgrund vermehrten zellulären Stresses nicht intakt, so findet eine Depolarisation des Membranpotentials statt (Abb. 2B) (Geisler et al. 2010; Matsuda et al. 2010). Der für den Import von PINK1 notwendige Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran kann nicht aufrechterhalten werden. PINK1 wird nicht in die Mitochondrien transloziert und gespalten. Durch die Akkumulation des ganzheitlichen PINK1-Proteins an der äusseren Mitochondrienmembran wird dessen Autophosphorylierung eingeleitet (Seok et al. 2010; Okatsu et al. 2012). Darüber hinaus phosphoryliert PINK1 die Ubiquitinmoleküle am Serin-65 und auch das im Zytosol befindliche Parkin, wodurch dieses aktiviert und zu den Mitochondrien geleitet wird (Geisler et al. 2010; Lazarou et al. 2012; Okatsu et al. 2018). Das bis dahin inaktivierte Parkin überträgt Ubiguitinmoleküle auf diverse membranständige Proteine, inklusive sich selbst (Harper et al. 2018). Dadurch initiiert Parkin im Anschluss an seine PINK1abhängige Aktivierung den Untergang der defekten Mitochondrien per Autophagie (s.g. Mitophagie, Abb. 2C) (Lemasters 2005; Durcan et al. 2015). Dieser Vorgang stellt einen wirkungsvollen Kontrollmechanismus dar: geschädigte Mitochondrien werden erkannt und ihr Untergang eingeleitet, um die jeweilige Zelle zu schützen. Physiologisch nimmt Mitophagie im Alterungsprozess zu (Cornelissen et al. 2018).



#### Abbildung 2: Die Rolle von PINK1 im PINK1/Parkin-Signalweg

In Abwesenheit zellulären Stresses (A) wird PINK1 in die Mitochondrien geleitet und in zwei Fragmente gespalten. Das eine bleibt in der inneren Mitochondrienmembran und übernimmt Phosphorylierungsfunktionen in der Atmungskette. Das andere Fragment wird zurück in das Zytosol geschleust. Dort bindet es entweder proteasomal abgebaut oder bindet Parkin. In Anwesenheit zellulären Stresses (B) kann PINK1 nicht in die Mitochondrien importiert werden. Es akkumuliert in seiner ganzheitlichen Form an der äußeren Mitochondrienmembran und phosphoryliert dann Parkin, Ubiquitin und sich selbst. Parkin wird dadurch aktiviert, bindet an PINK1 und ubiquitiniert anschließend diverse membranständige Substrate. Diese Ubiquitinierung leitet die proteasomale Degradierung des dysfunktionalen Mitochondriums ein (C).

Dieser Kontrollmechanismus versagt, wenn eine Loss-of-function-(LOF-) Mutation in der Kinase-Domäne von PINK1 vorliegt (Valente et al. 2004; Park et al. 2006; Matsuda et al. 2010). Parkin wird in diesem Fall nicht rekrutiert, die dysfunktionalen Mitochondrien können nicht eliminiert werden und es entstehen freie Radikale wie Hyperoxidanionen, Hydroxylradikale und Hydrogenperoxid, welche die Zellen schädigen und deren Untergang herbeiführen (Greenamyre et al. 1999; Park et al. 2006). Das Enzym Superoxiddismutase-2 (SOD-2) dient der Entgiftung freier Radikale. Seine Expression wird bei Bedarf gesteigert (McCord et al. 1969; Jenner et al. 1996). Eine exogene Zufuhr ähnlich entgiftend wirkender Stoffe wird als therapeutische Option in Erwägung gezogen (Biosa et al. 2018).

Darüber hinaus ist PINK1 in einem Parkin-unabhängigen Signalweg wichtig für die effiziente Energiegewinnung durch eine funktionierende Atmungskette (Abbildung 3). Mithilfe von vier in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Atmungsketten-Komplexen (I-IV) und der ATP-Synthase wird hier der Großteil der für die zellulären Vorgänge benötigten Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) produziert. Elektronen, die bei der Verstoffwechselung von Zuckern und Fetten im Citratzyklus entstehen, können über zwei Wege in die Atmungskette geschleust werden: entweder von dem Elektronencarrier NADH auf den Komplex I oder -weniger effizient- von FADH<sub>2</sub> auf Komplex II (Saraste 1999; DiMauro et al. 2003; Spektrum.de).



#### Abbildung 3: Die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran

Die Elektronen von NADH werden über Komplex I, die von FADH<sub>2</sub> über Komplex II in die Atmungskette eingeschleust. Durch die Weitergabe der Elektronen in Redoxreaktionen entsteht Energie, welche von den Komplexen I, III, IV für den Transport von Protonen entgegen ihrem Gradienten in den Intermembranspalt genutzt wird. Bewegen sich die Protonen durch den Kanal der ATP-Synthase entlang ihres Gradienten zurück in den Matrixraum, wird wiederum Energie frei, die für die Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt wird. UQ = Ubiquinon. Modifiziert nach (Vos 2012)

In verschiedenen Organismen konnte gezeigt werden, dass PINK1 in den Mitochondrien die Untereinheit NdufA10 des Komplex I der Atmungskette phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist essenziell für die effiziente Funktionsweise des ersten Atmungskettenkomplexes. Bei *PINK1*-Mutanten findet

diese Phosphorylierung am Serin-250 nicht statt. Die Folge ist eine eingeschränkte reduzierende Wirkung des Komplex I auf Ubiquinon und es kann weniger ATP produziert werden (Morais et al. 2014). Dopaminerge Neuronen gehöhren aufgrund ihrer sehr verzweigten Axone zu den Zellen mit besonders hohem Energiebedarf. Das macht sie anfällig für einen Abfall der Energiebereitstellung, z. B. im Rahmen einer Parkinson-Erkankung (Ge et al. 2020).

Neuerdings wird PINK1 darüber hinaus auch eine immunmodulierende Funktion auf die mitochondriale Antigenpräsentation zugeschrieben, wehalb auch ein autoimmunes Geschehen als Teil der Pathophysiologie in Erwägung gezogen wird (Matheoud et al. 2019).

## 1.5. Phänotyp der *pink1*-mutierten Fliegen

Aufgrund der erwähnten Vorteile der genetischen Ähnlichkeit und verhältnismäßig einfachen Handhabung im Labor, stammen viele der relevanten Erkenntnisse zu genetisch bedingtem M. Parkinson aus dem Tiermodell *DM*. Insbesondere die drei Arbeitsgruppen Yang et al., Clark et al. und Park et al. legten im Jahr 2006 den Grundstein für das bisherige Verständnis der Erkrankung und sollten hier gesondert Erwähnung finden. Sie beschrieben verschiedene pathophysiologische und phänotypische Veränderungen der *pink1<sup>B9</sup>*-Mutanten (im Folgenden auch B9-Fliegen genannt).

Die Mutanten zeigen deutlich erniedriegte ATP-Level, eine verkürzte Lebenszeit sowie die Degeneration von Flugmuskulatur und dopaminergen Neuronen (Yang et al. 2006). Darüber hinaus konnte eine Sterilität der männlichen Fliegen, Defekte in der mitochondrialen Morphologie und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber verschiedenen Stressfaktoren festgestellt werden (Clark et al. 2006). Aus diesen Erkenntnissen folgte die Schlussfolgerung, dass der Bewegungsstörung ursächlich eine mitochondriale Dysfunktion zugrunde liegt und Pink1 in einem gemeinsamen Stoffwechselweg mit Parkin agiert, welcher für die mitochondriale Qualitätskontrolle verantwortlich ist (Park et al. 2006).

In Ergänzung mit weiteren Ergebnissen, lassen sich die erniedrigten ATP-Level auf die essenzielle Funktion von Pink1 für eine effiziente Atmungskette in den Mitochondrien zurückführen (Morais et al. 2009). Die Komplex I-Dysfunktion erklärt auch die erhöhte Sensitivität gegenüber Stress, da sie zu einer mitochondrialen Depolarisation führt (Morais et al. 2009). Da der Energiebedarf der Zellen in verschiedenen Geweben nicht gedeckt werden kann, kommt es zum Beispiel zur Degeneration der Flugmuskulatur und damit bei einem Großteil der Fliegen zum Verlust der Flugfähigkeit. Die in *pink1*-Mutanten fehlende mitochondriale Qualitätskontrolle erklärt die beschriebene fragmentierte und Morphologie der mitochondrialen Christae-Struktur die fehlerhafte Spermatogenese, welche zur Sterilität der Männchen führt. Neuere Studien beschreiben auch in DM die bei M. Parkinson-Patienten beobachteten Lern- und Gedächtnisveränderungen sowie einen veränderten zirkadianen Rhythmus mit erhöhter Tagesschläfrigkeit (Julienne et al. 2017; Doktor et al. 2018).

Die meisten dieser pathologischen Phänotypen, inklusive der erniedrigten Dopaminlevel, können durch den Einbau und die Überexpression des humanen PINK1 behoben werden. Dies spricht für eine funktionelle Konservierung von PINK1 im Laufe der Evolution und unterstreicht dessen Bedeutung (Clark et al. 2006; Park et al. 2006; Yang et al. 2006). Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere Manipulationen, welche über eine Steigerung der Effizienz der mitochondrialen Qualitätskontrolle oder der Atmungskette zu einer partiellen oder vollständigen Wiederherstellung des gesunden Phänotyps in DM führen: die Überexpression von Afadin 6, einem Protein was mit Parkin interagiert, sowie von Atg1 (AuTophaGy1), einer Serin/Threonin-Kinase mit Funktion in der Bildung von Autophagosomen, führen zur Wiederherstellung der mitochondrialen Qualitätskontrolle und somit zu einer Verbesserung der motorischen Defizite und der Lebensdauer pink1-mutierter Fliegen (Kawamata et al. 2008; Basil et al. Besserung ist ebenfalls bei gesteigerter Expression des 2017). Eine mitochondrialen Teilungsfaktors Drp1 (Poole et al. 2008; Ma et al. 2018) zu beobachten, oder wenn die Fliegen mit Resveratrol, einem Mitophagie-fördernden Bestandteil der Haut von Weintrauben, gefüttert werden (Wu et al. 2018). Die Expression der phosphomimetischen Komplex-I-Untereinheit NdufA10<sup>S250D</sup> stellt den physiologischen Phänotyp durch eine Steigerung der Atmungsketteneffizienz ebenso wieder her (Morais et al. 2014) wie die Expression der NADH-Dehydrogenase der Hefe, einem Äguivalent zu Komplex I (Vilain et al. 2012). Auch die Bestrahlung mit Infrarotlicht der Wellenlänge 808 nm (Vos 2013) oder die Zufuhr des Elektronencarriers Vitamin K2 (Vos et al. 2012) ermöglichen eine Wiederherstellung der Atmungsketteneffizienz in DM. Die Wirksamkeit einer

9

therapeutischen Vitamin K2-Substitution wird derzeit im Rahmen einer klinischen Studie des Lübecker Instituts für Neurogenetik untersucht. Darüber hinaus wurde bisher keiner dieser potenziellen therapeutsichen Ansätze erfolgreich an anderen Tiermodellen oder dem Menschen getestet.

Für *pink1*-mutierte Fliegen wurden also bereits mehrere genetische und pharmakologische Modifikationen beschrieben, die einen positiven Einfluss auf den pathologischen Phänotyp zeigen. Sie behandeln jedoch entweder singulär die mutationsbedingt gestörte Mitophagie oder die Insuffizienz der Atmungskette. Wie diese beiden Stoffwechselwege zusammen hängen bleibt zunächst unklar.

### 1.6. Lipidstoffwechsel in *pink1*-mutierten Fliegen

Neurodegenerative Prozesse können mit einer Veränderung der in Lipidhomöostase einhergehen (Hartmann et al. 2007). Lipiden wird auch in der Pathogenese des M. Parkinson eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Xicoy et al. 2019). Meine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Substitution des Fettes Cardiolipin in *pink1*-Mutanten ebenfalls zu einer Wiederherstellung des gesunden Phänotyps führt. Cardiolipin ist ein für die innere Mitochondrienmembran spezifisches Lipid und steigert die Übertragung der Elektronen von Komplex I auf Ubiquinon. Den gleichen Effekt erzielt die Hemmung der Fettsäuresynthase (FASN), in dessen Folge der Gehalt an Cardiolipin steigt (Vos et al. 2017).

Auch andere Lipide könnten eine Rolle spielen. So wurde im Blutplasma von Patienten mit M. Parkinson eine erhöhte Konzentrationen verschiedener Lipide, u. a. der s. g. Ceramide, festgestellt (Mielke et al. 2013). Diese Beobachtung bestätigte sich ebenso in postmortal untersuchtem Hirngewebe der Patienten (Abbott et al. 2014). Innerhalb der Gruppe der Lipide gewinnen insbesondere Ceramide in der Diskussion über die Pathophysiologie des M. Parkinson an Bedeutung. Unklar bleibt bisher, ob es sich bei den veränderten Ceramidkonzentrationen um eine Ursache oder Folge des M. Parkinson handelt (Plotegher et al. 2019). Neuerdings wird darüber nachgedacht, Ceramide als messbare Biomarker des M. Parkinson zu nutzen (Kurz et al. 2019).

Auch die Untersuchungen des Ceramidgehaltes im Zusammenhang mit dem *Pink1*-assoziierten M. Parkinson weisen Auffälligkeiten auf. So konnte in den Gehirnen von *Pink1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit zunehmendem Alter eine Steigerung des Ceramidgehaltes gezeigt werden (Torres-Odio et al. 2017). Wir konnten

nachweisen, dass auch in den Mitochondrien *Pink1*-mutierter embryonaler Mäusefibroblasten (MEF) einen signifikant erhöhter Gehalt an Ceramiden, insbesondere der Kettenlänge C16, vorliegt (Vos et al. 2017). Diese Erkenntnisse legen einen Zusammenhang zwischen dem Ceramidstoffwechsel und der *pink1*assoziierten mitochondrialen Dysfunktion nahe, welcher im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet werden soll. Aufgrund der evolutionären Konservierung von *PINK1* kann angenommen werden, dass die Ceramidlevel in *pink1*-mutierten Fliegen ebenfalls erhöht sind.

Ceramide können in unterschiedlicher Kettenlänge vorliegen. Manche sind Vorstufen von Sphingolipiden und spielen eine wichtige Rolle als Signalmoleküle und im Aufbau von Membranen (Kota et al. 2014; Castro et al. 2014; Plotegher et al. 2019). Die Kettenlänge C16 wird mit mitochondrialen Defekten in Verbindung gebracht: einer ineffizienten Energiegewinnung, einer gesteigerten Produktion freier Radikale, sowie einem reduzierten Membranpotential. Die Akkumulation von Ceramiden führt zu einer ceramid-induzierten Mitophagie (Kogot-Levin et al. 2014; Lin et al. 2018), gesteigerter Phagozytose sowie entzündlichen Prozessen und wird deshalb als eine Ursache der Neurodegeneration gehandelt (Plotegher et al. 2019).

Die Ceramidmoleküle werden über drei verschiedene Stoffwechselwege synthetisiert bzw. wiederverwertet (Abbildung 4:) (Kitatani et al. 2008).

#### Einleitung



#### Abbildung 4: Der Ceramidstoffwechsel

Ceramide entstehen über drei Stoffwechselwege: Über die Neusynthese aus den Edukten Palmitoyl-Coenzym A und Serin, über die Hydrolyse bestehenden Shingomyelins und über die Wiederverwertung von Sphingosin (modifiziert nach Melissa Vos).

Möglicherweise stellen Ceramide die gemeinsame Verbindung der in *pink1*-Mutanten beschriebenen Phänomene der defekten Mitophagie und reduzierten Atmungsketteneffizienz dar. In dieser Arbeit werden deshalb Wirkstoffe getestet, die verschiedene Enzyme des Ceramidstoffwechsels inhibieren. Dies könnte Aufschluss geben über einen möglichen Zusammenhang zwischen einem erhöhtem Ceramidgehalt und der mitochondrialen Dysfunktion in *pink1*-mutierten Fliegen.

# 1.7. Reduzierte Penetranz der *pink1-*Mutation

Im Rahmen der täglichen Laborarbeit konnten wir beobachten, dass auch unter den *pink1*-Mutanten Fliegen sind, die fliegen können. Der Anteil dieser trotz vorliegender Mutation flugfähigen Fliegen liegt bei etwa 10 %. Die *pink1*-Mutation führt also nicht in jedem Fall zu der Ausprägung des pathologischen Phänotyps. Dieses Phänomen nennt sich "reduzierte Penetranz". "Penetranz" beschreibt dabei den Anteil der Träger\*innen einer pathogenen Mutation, welcher klinische Symptome entwickelt (Finegold 2019). Im Falle der *pink1*-mutierten Fliegen bildet sich die Erkankung zu etwa 90 %, also einer sehr hohen, aber nicht vollständigen Penetranz aus.

Viele genetische Erkrankungen des Menschen, auch der genetische M. Parkinson, zeigen eine reduzierte Penetranz. Das heißt, die Erkrankung manifestiert sich entweder gar nicht oder mit deutlich verzögertem Erkrankungsalter. Dabei wird die Penetranz meist beeinflusst durch das Alter, die Umwelt, den jeweiligen Lebensstil und die weitere genetische Ausstattung (Cooper et al. 2013; Zanon et al. 2018).

Da die Umweltbedingungen der Laborfliegen untereinander vergleichbar sind, gehen wir davon aus, dass es vorrangig genetische Einflüsse sind, die zu der unterschiedlichen Penetranz führen. Ein Teil der Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Frage, welche protektiven genetischen Mechanismen diese 10 % der Fliegen vor der Ausprägung der Erkrankung schützen.

Durch die relativ neue Möglichkeit der schnellen und bezahlbaren DNA-Sequenzierung (next-generation-sequencing) wurde in den letzten Jahren auch in gesunden Menschen eine hohe Zahl an potenziell pathogenen Mutationen festgestellt. Die Identifikation und das Verständnis der Einflussfaktoren, welche Erkrankungsalter und Penetranz einer genetischen Erkrankung beeinflussen, hat also eine große Bedeutung für die Früherkennung und Prognostik. Es ist auch denkbar, dass so in Zukunft das Manifestationsalter einer genetischen Erkankung verzögert oder die Entwicklung der Krankheit gänzlich verhindert werden kann (Zanon et al. 2018).

13

Einleitung

## 1.8. Zielsetzung

Die Projekte dieser Arbeit beschäftigen sich beide mit der Mutation *pink1*, beleuchten jedoch verschiedene Aspekte. Einerseits werden die Folgen der Mutation auf molekulare Prozesse, insbesondere im Hinblick auf den Ceramidstoffwechsel, betrachtet. Andererseits scheint es genetische Faktoren zu geben, die Einfluss auf den Zeitpunkt der Manifestation und die Stärke der Ausprägung der Erkrankung haben. Anhand des Tiermodells *DM* sollen diese Mechanismen und Einflussfaktoren auf die Ausprägung der Erkrankung untersucht werden.

Den einzelnen Projekten liegen folgende Hypothesen und Zielsetzungen zu Grunde:

- **Hypothese 1:** Ein veränderter Ceramidstoffwechsel spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des durch Mutationen in *pink1* ausgelösten Phänotyps.
- Ziel 1: Erforschung des Zusammenhanges zwischen der durch die *pink1*-Mutation bedingten mitochondrialen Dysfunktion und dem Ceramidstoffwechsel mittels pharmakologischer Inhibition.
- Hypothese 2:Protektive genetische Faktoren führen dazu, dass nicht alle<br/>Organismen bei Vorliegen einer *pink1*-Mutation den<br/>pathologischen Phänotyp ausbilden.
- Ziel 2: Identifikation protektiver genetischer Faktoren, die zu einer reduzierten Penetranz des *pink1*-Phänotyps in *DM* führen.

Das Verständnis dieser Zusammenhänge und Einflussfaktoren ist Grundvorraussetzung dafür, die Diagnostik und Therapie des M. Parkinson in Zukunft optimieren zu können.

# 2. Material und Methoden

# 2.1. Liste aller Materialien

Eine Liste aller verwendeten Materialien sowie die Zusammensetzung von Medien, Lösungen und Puffern sind im Anhang (7.1) aufgeführt.

# 2.2. Drosophila melanogaster als Tiermodell

Die verwendeten Fliegen *w pink1<sup>RV</sup>* und *w pink1<sup>B9</sup>* wurden freundlicherweise von J. Park und J. Chung (Korea Advanced Institute of Science and Technology) (Park et al. 2006) zur Verfügung gestellt. Die Fliegen *w pink1<sup>B9</sup>* tragen die *pink1*-Mutation. Die Revertanten-Fliegen der Kontrollgruppe *w pink1<sup>RV</sup>* zeigen eine normale Flugfähigkeit und keine signifikant veränderte Anzahl dopaminerger Neurone im Vergleich zu Wildtyp-Fliegen (Park et al. 2006).

# 2.3. Wirkstofftests an *pink1*-mutierten Fliegen

Um die Ceramidlevel in *pink1*-Mutanten zu senken, wurden die Wirkstoffe Myriocin, Miglustat und Zoledronsäure getestet. Sie alle hemmen unterschiedliche Schritte des Ceramidstoffwechsels. Als Negativkontrolle wurde FTY720 genutzt, ein Derivat von Myriocin, welches nicht inhibitorisch wirksam ist (Napoli 2000).

Die Wirkstoffe wurden zunächst je nach Löslichkeit in Wasser oder Methanol gelöst und anschließend in verschiedenen Konzentrationen in das frisch zubereitete Fliegenfutter gemischt. Lösungsmittel und verwendete Konzentrationen finden sich in Tabelle 1:

| Wirkstoff     | Lösungsmittel | Konzentrationen   |
|---------------|---------------|---|
| Myriocin      | Methanol      | 1 μM, 3 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM                        |
| Miglustat     | Wasser        | 30 μM, 100 μM, 300 μM, 1 mM                             |
| Zoledronsäure | Wasser        | 30 $\mu M,$ 100 $\mu M,$ 300 $\mu M,$ 600 $\mu M,$ 1 mM |
| FTY720        | Wasser        | 3 μΜ, 10 μΜ, 30 μΜ, 100 μΜ, 300 μΜ                      |

Tabelle 1: Auflistung der getesteten Wirkstoffe, ihren Lösungsmitteln und Konzentrationen

Jeder Wirkstoff wurde in 6-8 Experimenten getestet. Je Experiment wurden für jede Konzentration 10 Röhrchen hergestellt - fünf für die Mutanten und fünf für die

Wildtyp-Kontrolle. In jedes Röhrchen wurden fünf 1-2 Tage alte Fliegen transferiert, nachdem sie auf ihre Flugfähigkeit getestet worden waren. Nach der Positionierung auf dem mit dem Wirkstoff versetzten Futter wurde alle 24 Stunden ein Flugtest durchgeführt. Nach drei und teils auch sieben Tagen erfolgten ATP- und Proteinmessungen. Aus einem Experiment (je 5 Fliegen pro Röhrchen) konnten 2 ATP-Messungen durchgeführt werden (2x 2 Fliegen für die Messung, 1 Fliege in Reserve). Die in 12-16 Messdurchläufen erhobenen ATP-Daten stammen also aus 6-8 experimentellen Ansätzen und sind an verschiedenen Tagen erhoben worden. Die Experimente streckten sich über etwa ein Jahr.

### 2.4. Test der Flugfähigkeit

Zur exakten Beschreibung des M. Parkinson-Phänotyps und zur Evaluation der Wirkstoffe wurde unter anderem die Flugfähigkeit erfasst. Hierfür wurden jeweils fünf Fliegen in ein großes, leeres Röhrchen transferiert. Dies blieb unverschlossen und wurde mit der Öffnung nach unten auf einen Tisch gestellt. Anschließend wurde gewartet, bis die Fliegen dem Licht entgegen nach oben liefen. Durch das dann folgende leichte Aufschlagen/Auftippen des Röhrchens auf den Tisch wurde ein Impuls zum Losfliegen gegeben. Konnte ein Tier fliegen, bekam es in der Wertung eine "1" zugesprochen. Fiel dagegen eine Fliege beim Auftippen einfach herunter auf den Tisch, bekam sie den Wert "0". Dazwischen gab es keine weiteren Abstufungen der Flugfähigkeit. Da gelegentlich eine Fliege entfloh oder vorzeitig starb, werden die Werte der Fliegen eines Röhrchens in relativen Zahlen ausgedrückt. Die Flugtests wurden täglich zu etwa derselben Tageszeit durchgeführt, um den Einfluss von Aktivitätsschwankungen im Tagesverlauf so gering wie möglich zu halten. Sie wurden mit denselben Fliegen durchgeführt, an denen später die ATP-Level nach 3 bzw. 7 Tagen gemessen wurden. Deshalb liegen für den Zeitraum 0-72 h mehr Ergebnisse aus Flugtests vor als für den Zeitraum 96-168 h (Abbildung 5:).



**Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der Flugtests und ATP-Messungen** Gezeigt wird der zeitliche Ablauf der Flugtests in Stunden. Die ATP-Messungen fanden nach 3 bzw. 7 Tagen statt und beendeten die jeweilige Versuchsreihe der Wirkstofftests.

# 2.5. ATP-Messungen

Um den ATP-Gehalt der Fliegen zu messen, wurden je zwei, vorher bei -20 °C eingefrorene und somit tote Fliegen, in 70 µl Guanidine-Puffer gegeben, zerkleinert und in Trockeneis und Ethanol schockgefroren. Es folgten 3 Minuten in kochendem Wasser und anschließend 5 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 g. Die ATP-Standardreihe wurde entsprechend des ATP Bioluminiscence Assay Kit CLS II (Roche) angefertigt, mit dem Luciferase-Mix versetzt und in Doppelbestimmung in eine weiße 96-Lochplatte (Greiner Bio-one) pipettiert. Aus jedem Eppendorf-Gefäß der Proben wurden 2 µl Überstand entnommen und in Doppelbestimmung mit 48 µl Luciferase-Mix versetzt. Im Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek) wurde anschließend der Luminiszenzgehalt der Proben bei der emittierten Wellenlänge 528 nm ausgelesen. Die Endpunktmessung erfolgte über eine Integrationszeit von 0,1 s. Um den jeweiligen ATP-Gehalt mit der Größe der Fliege in Relation zu setzen, wurde parallel zu den ATP-Messungen aus den gleichen Proben auch der Proteingehalt bestimmt.

# 2.6. Proteinmessungen

Für die Proteinbestimmungen wurden die gleichen Proben wie für die ATP-Messungen verwendet. Somit waren die ersten Aufbereitungsschritte bis einschließlich der Zentrifugation identisch mit denen der ATP-Messung. Die Standardreihe wurde entsprechend des Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit (ThermoFischer) angefertigt, in eine durchsichtige 96-Lochplatte (costar) pipettiert und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden für die Proteinmessungen jeweils 10 µl Probe in die Platte pipettiert und 70 µl AB-Mix aus dem Protein Kit hinzugegeben. Die Endpunkt-Absorptionsmessung im Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek) erfolgte bei der Wellenlänge 562 nm.

# 2.7. Komplex I-Messungen

Bestimmte Kettenlängen der Ceramide sind mit einer Inhibition der Atmungskette, insbesondere der Komplexe I und III, assoziiert (Di Paola et al. 2000; Kogot-Levin et al. 2014). Zur weiteren Evaluation der Wirkstoffentests wurde deshalb die Aktivität von Komplex I erhoben. Dafür wurden die *pink1*-Mutanten und die *RV*-Kontrollfliegen wie in Abschnitt 2.3 beschrieben für drei Tage auf den jeweiligen Wirkstoff gesetzt. Gewählt wurde dafür jeweils die Konzentration, die bis dahin in

den ATP-Messungen den größten Effekt gezeigt hatten. Nach drei Tagen erfolgte die Isolation der Mitochondrien nach bewährter Methode (Schwarze et al. 1998). Dafür wurden die Mutanten und Kontrollfliegen jeweils in einem Röhrchen zusammengeführt und mit Mitochondrienisolationpuffer versetzt. Anschließend wurden die Fliegen zerkleinert und für 5 Minuten bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand auf mehrere Eppendorf-Gefäße verteilt und nochmals für zehn Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das verbleibende Pellet wiederum im Mitochondrienisolationpuffer gelöst und nochmals für zehn Minuten zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde der Überstand noch einmal verworfen, das Pellet in dem Puffer gelöst und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen erfolgte zunächst eine Proteinmessung aller Proben. Je nach Proteinkonzentration wurden die Proben erneut mit Mitochondrienisolationpuffer verdünnt bzw. Proben gleicher Bedingung fusioniert. Um zu testen, ob die Mitochondrien -abgesehen von der ineffizienten Atmungskette- funktionstüchtig sind, wurde die Aktivität der Citratsynthase gemessen. Dafür wurde folgender Ansatz (Tabelle 2) je Probe in eine weiße 96-Lochplatte pippetiert:

| Menge  | Bezeichnung                           |
|--------|---------------------------------------|
| 161 µl | 0,1 M TrisHCl Puffer, pH= 8,1         |
| 4 μΙ   | 3 mM Acetyl Coenzym A                 |
| 20 µl  | 1 mM DTNB, gelöst in TrisHCl, pH= 8,1 |
| 2,4 µl | 4 % Triton X, gelöst in HPLC Wasser   |
| 3 μΙ   | Isolierte Mitochondrien               |

Tabelle 2: Ansatz für die Messung der Citratsynthase-Aktivität

Nach zwei-minütiger Stabilisation bei 37 °C wurden 10 µl Oxalsäure (10 mM Oxalsäure, gelöst in TrisHCI) hinzugegeben und die optische Dichte der Proben bei 412 nm Wellenlänge über einen Zeitraum von vier Minuten, im Abstand von 30 Sekunden im Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek) gemessen. Messbar wurde eine Zunahme der optischen Dichte im Verlauf der Zeit, da Oxalsäure als Elektronendonor agiert und somit das Substrat für Komplex I liefert.

Die Komplex I-Messung erfolgte nach bewährter Methode (De Paepe et al. 2006). Für sie wurde folgender Ansatz (Tabelle 3) in doppelter Ausführung vorbereitet:

| Menge | Bezeichnung   |
|-------|---|
| 50    | 0,1 M K-Phosphatpuffer:                                     |
|       | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH= 7,5, gelöst in Wasser |
| 50 µl | 1 % BSA, gelöst in HPLC Wasser                              |
| 10 µl | 0,1 M MgCl <sub>2</sub> , gelöst in HPLC Wasser             |
| 20 µl | 1 mM NADH, gelöst in HPLC Wasser                            |
| 4 μΙ  | 30 mM KCN, gelöst in HPLC Wasser                            |
| 54 µl | HPLC Wasser   |

Tabelle 3: Ansatz für die Messung der Komplex I-Aktivität

Dann wurde in je ein Loch der Doppelbestimmung 4 µl des Komplex I-Inhibitors Rotenone (5 mM Rotenone, gelöst in Dimethylsulfoxid), in das jeweils andere 4 µl der Negativkontrolle Dimethylsulfoxid (DMSO) gegeben. Nach Zugabe von 8 µl der isolierten Mitochondrien erfolgte eine ein-minütige Stabilisation bei 37 °C. Als Elektronenakzeptor wurden 2 µl Decylubiquinon (12,6 mM Decylubiquinon, gelöst in Ethanol) dazugegeben und es erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 340 nm über einen Zeitraum von zwei Minuten, im Abstand von 30 Sekunden. Abschließend wurde die Aktivität der Citratsynthase und des Komplex I über folgende Formel berechnet (Eigentler A. et al. 2012; Pollard et al. 2016):

Aktivität 
$$\left(\frac{\frac{nmol}{min}}{mg \ Protein}\right) = \frac{\Delta OD \ x \ 10^{9}}{E(M)x \ PK \ x \ PM}$$

OD = optische Dichte E(M) = Molarer Extinktionskoeffizient

PK = Proteinkonzentration PM = Probenmenge (µI)

Dabei beträgt der Molare Extinktionskoeffizient für die Citratsynthase  $E(M) = 13600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  und für den Komplex I  $E(M) = 6290 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## 2.8. Western Blot

In einem Western Blot können Proteine mithilfe bindender Antikörper nachgewiesen werden. Mit dieser Methode wurde der Gehalt des Enzyms SOD-2 unter verschiedenen Konditionen verglichen. Dafür wurden je Probe und Bedingung 5 Fliegen genutzt, welche 3 Tage lang auf dem Kontrollmedium bzw. Wirkstoff gehalten worden waren. Zunächst wurden 100 µl Ripa-Puffer auf die Fliegen gegeben, diese zerkleinert, 15 Minuten auf Eis gestellt, nochmals

zerkleinert und anschließend 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt, das Pellet verworfen. Es folgte eine Proteinmessung mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad im Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek). Die Probe wurde jeweils soweit mit Ripa-Puffer verdünnt, bis ein Volumen von 10 µl der Probenkonzentration von 10 µg entsprach. Dazu kamen je 1,5 µl Dithiothreitol (DTT) und 3,8 µl NuPAGE<sup>™</sup> LDS sample buffer [4x]. Anschließend wurde das NuPAGE<sup>™</sup> 4-12 % Bis-Tris-Gel mit den Proben und einer standardisierten Referenzleiter beladen. Anhand dieser kann nach der Auftrennung die Größe der in den Proben enthaltenen Proteine bestimmt werden. Die Auftrennung der Proteine begann bei 100 Volt für 10 min und wurde bei 150 Volt für eine Stunde fortgesetzt. Die anschließende Übertragung auf die Membran erfolgte bei 32 Volt für 60 min. Als ersten Antikörper wählte ich Anti-β-Actin in der Verdünnung 1:1000 und Anti-SOD<sub>2</sub> in der Verdünnung 1:500. Als zweite Antikörper wurden Anti-Mausund Anti-Hasen-Antikörper aus der Ziege jeweils in der Verdünnung 1:10.000 hinzugefügt. Abschließend wurden Enhancer und Stable Peroxid des Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate Kits hinzugegeben und der Blot in der Dunkelkammer entwickelt. Die Auswertung erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ. Der Gehalt an SOD-2 wird in Relation zum Beta-Actin-Gehalt dargestellt.

## 2.9. Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2013 und GraphPad Prism 5. Für alle Tests wurde das Signifikanzniveau  $\alpha$  mit  $\alpha$  <0,05 festgelegt. Die angegebenen p-Werte sind rein deskriptiv zu verstehen. Signifikanzlevel sind wie folgt angegeben: p < 0,05 als \*, p < 0,01 als \*\*, p < 0,001 als \*\*\*. Für die Wahl der korrekten statistischen Auswertung der ATP-Messungen habe ich mich bei Frau Prof. König (Institut für Biometrie und Statistik der Universität Lübeck) rückversichert.

#### ATP-Messungen:

Jede Messung wurde an einer Probe aus zwei Fliegen durchgeführt, jeder Punkt im Scatterplot ist also ein gemittelter Wert zweier Organismen (die Anzahl der Messpunkte jeder Gruppe sind in der Tabelle 4 aufgeführt, mit "Gruppe" sind im Folgenden alle Werte einer getesteten Konzentrationen gemeint). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der getesteten Gruppe mit dem Standardfehler des Mittelwertes. In jedem Wirkstofftest wurden zunächst die Werte der unbehandelten nicht-mutierten mit denen der unbehandelten mutierten Fliegen mittels nichtparametrischen Mann-Whitney U Test verglichen. Ob eine Wirksamkeit des jeweiligen Wirkstoffes vorliegt, wurde im nächsten Schritt aufgrund der kleinen, nicht normalverteilten Stichprobe und dem Vorliegen einer stetigen abhängigen Variable (ATP/Protein) sowie einer unabhängigen Variable (mit > 1 verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen) mit dem Kruskl-Wallis Tests analysiert (Harris et al. 2007; Bortz et al. 2008).

Den Scatterplots der ATP-Ergebnisse liegen teils verschiedene Anzahlen von Messpunkten (Tabelle 4) je Gruppe zugrunde (je gemittelte Werte zweier Fliegen). Sind die Zahlen innerhalb eines Experimentes nicht für alle Gruppen identisch, so liegt das daran, dass vereinzelt Werte (max. 2 pro Gruppe) als Ausreißer ausgeschlossen wurden (Tabelle 4). Als Ausreißer definiert wurden negative Messewerte, Werte gleich Null und Werte, welche > 400 % des im gleichen Durchlauf erhobenen ATP-Gehaltes der RV Kontrolle liegen. Für die 7-Tage-Experimente erfolgten aus Zeit- und Kostengründen meist nur Messungen für die vielversprechendsten Konzentrationen aus dem dreitägigen Experiment, es liegen also weniger Gruppen vor.

|                      | Erhobene   |           | Differenz =  |
|----------------------|------------|-----------|--------------|
|                      | Messpunkte | Ausreißer | abgebildete  |
| Experiment           | je Gruppe  | je Gruppe | Messpunkte   |
| Myriocin 3 Tage      | 8 bzw. 12* | Max. 1    | 8 bzw. 11-12 |
| Myriocin 7 Tage      | 12         | Max. 2    | 10-12        |
| FTY 3 Tage           | 12         | 0         | 12           |
| FTY 7 Tage           | 12         | 0         | 12           |
| Miglustat 3 Tage     | 12         | Max. 2    | 10-12        |
| Miglustat 7 Tage     | 12         | 0         | 12           |
| Zoledronsäure 3 Tage | 16         | 0         | 16           |
| Zoledronsäure 7 Tage | 8          | 0         | 8            |

Tabelle 4: Anzahl der ATP-Messungen je Experiment

\* In der Versuchsreihe wurden nur 8 Werte für die Konzentration 100  $\mu$ M gemessen, da diese erst später dazu genommen wurde. Für alle anderen Konzentrationen wurden 12 Messwerte erhoben.

Die Ergebnisse der Fliegen mit 7-tägiger Zoledronsäure-Behandlung waren nicht mit einem Kruskl-Wallis Test zu analysieren, weil in der Konzentration 1 mM etwa die Hälfte der Fliegen verstarb. Da es sich hier um eine Nachmessung der vielversprechendsten Konzentrationen aus dem 3-Tage-Test handelt, liegen sonst lediglich Daten der Konzentration 100  $\mu$ M vor; diese wurden in einem Mann-Whitney U Test mit der B9-Kontrolle verglichen. Auch bei der siebentägigen Behandlung mit Miglustat konnten mit der B9-Kontrolle und der Konzentration 100  $\mu$ M nur zwei Gruppen verglichen werden, weshalb ebenfalls der Mann-Whitney U Test gewählt wurde.

In den Abschnitten 3.1.1 bis 3.1.4 stelle ich die erhoben ATP-Daten zunächst so vor, wie es in der Literatur bisher zu finden war (Park et al. 2006; Yang et al. 2006; Clark et al. 2006). In Abschnitt 3.1.6. lege ich eine erweiterte Auswertung zur Sensitivitäsanalyse vor. Sie beinhaltet eine Mittelwertbereinigung nach dem *fixed effect model* (Snijder et al. 1999; Thompson et al. 2002; Borenstein et al. 2009). So kann die Streuung, welche durch tagesabhängige Messbedingungen entsteht, herausgerechnet werden. Dadurch werden die Messwerte über die gesamte Anzahl der Durchläufe vergleichbar.

#### Komplex I-Messungen:

Gezeigt ist der Mittelwert der jeweiligen Gruppe mit dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Ergebnisse der Komplex I-Messungen wurden mit dem t-Test analysiert. Die Stichprobengrößen sind Tabelle 5 zu entnehmen:

| Experiment    | Messpunkte je Gruppe RV | Messpunkte je Gruppe B9 |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| Kontrolle     | 6                       | 6                       |
| Myriocin      | 6                       | 5                       |
| FTY720        | 4                       | 5                       |
| Miglustat     | 6                       | 6                       |
| Zoledronsäure | 4                       | 5                       |

Tabelle 5: Anzahl der Komplex I-Messungen je Experiment

Die unterschiedlichen Anzahlen ergeben sich aus der Menge der isolierbaren Mitochondrien. Je nach Ausbeute konnten verschieden viele Messungen durchgeführt werden. Es gab keine Ausreißer.

#### Flugtests:

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den Grafiken der Flugfähigkeit keine Standardabweichungen gezeigt. Eine statistische Auswertung erfolgte nicht, da einige Fliegen im Verlauf starben und die für diese Bedingungen angebrachte 2way ANOVA mit fehlenden Werten nicht möglich ist.

#### Western Blot der Superoxiddismutase-2:

Die Proteinlevel der SOD-2 wurde nur in Fliegen bestimmt, welche mit den beiden vielversprechendsten Wirkstoffen (Myriocin und Zoledronsäure) behandelt wurden. Die Auswertung des *Western Blots* erfolgte mittels des Programms ImageJ. Die Intensitäten der Banden wurden ins Verhältnis zu dem ubiquitär exprimierten Protein beta-actin gesetzt (SOD<sub>2</sub>/beta-actin). Da nur die Ergebnisse eines *Western Blots* vorliegen, sind keine Standardabweichungen gezeigt.

# 3. Ergebnisse

Für ein weitergehendes Verständnis der Pathophysiologie und Ausprägung des M. Parkinson müssen die zu Grunde liegenden molekularen Pathomechanismen und genetischen Einflussfaktoren untersucht werden. Dazu können die im Folgenden dargestellten Ergebnisse aus dem Tiermodell *DM* mit einer Mutation im *pink1*-Gen einen Beitrag leisten.

# 3.1. Inhibition des Ceramidstoffwechsel bessert pathologische Parameter in *pink1*-Fliegen

Wie einleitend beschrieben, erhärtet sich aufgrund verschiedener Erkenntnisse der Verdacht eines Zusammenhanges zwischen dem Lipid-, genauer Ceramidstoffwechsel und der mitochondrialen Dysfunktion bei M. Parkinson (siehe 1.6.).

Um den Zusammenhang zwischen der *pink1*-Mutation und dem Ceramidgehalt weiter aufzuklären, wurden verschiedene Wirkstoffe getestet, welche in den Ceramidstoffwechsel eingreifen (Abb. 6). Damit soll der Frage nachgegangen werden, ob sich eine medikamenteninduzierte Senkung des Ceramidgehaltes positiv auf die pathologischen Parameter von *pink1*-Mutanten auswirkt.

Die Ergebnisse der verschiedenen getesteten Wirkstoffe werden im Folgenden einzeln abgehandelt.

#### Ergebnisse



#### Abbildung 6: Die Wirkstoffe hemmen verschiedene Stufen des Ceramidstoffwechsels

Drei der vier getesteten Wirkstoffe hemmen verschiedene Schritte der Ceramid-Synthese oder -Wiederverwertung. FTY720 ist eine synthetische Nachbildung von Myriocin, welche im Gegensatz zu Myriocin nicht die Serin-Palmitoyl-Transferase hemmt. Es wurde deshalb als Negativkontrolle benutzt, obwohl es als Sphingosin-1-Phosphatanalogon indirekt auch am Ceramidstoffwechsel beteiligt ist (modifiziert nach Melissa Vos).

#### 3.1.1. Myriocin steigert die Aktivität von Komplex I

Myriocin ist ein aus Pilzen gewonnenes, stark immunsuppressives Antibiotikum. Es hemmt das erste Enzym des de-novo Stoffwechselweges von Ceramiden: die Serin-Palmitoyl-Transferase (Abb. 6) (Miyake et al. 1995). Es ist nicht in der Humanmedizin zugelassen. In der Wissenschaft dient Myriocin der Reduktion von Sphingolipiden in Zellen oder Organismen (Miyake et al. 1995; Wadsworth et al. 2013). Die Ergebnisse der Behandlung mit Myriocin finden sich in Abb. 7.



#### Abbildung 7: Die Ergebnisse des Wirkstofftests von Myriocin

A: ATP-Level der Fliegen nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Myriocin. B: ATP-Level der Fliegen nach 7 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Myriocin. C: Komplex I-Aktivität in Relation zur Aktivität der Citratsynthase nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder auf 10  $\mu$ M Myriocin. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der RV Kontrolle gesetzt. Der t-Test zwischen der unbehandelten B9-Kontrolle und den behandelten B9-Fliegen ergab eine signifikante Steigerung der Aktivität (p = 0,0135\*). D: Gemittelte Flugfähigkeit im Zeitverlauf von 7 Tagen auf dem Kontrollmedium oder dem Wirkstoff Myriocin in verschieden Konzentrationen.

Die ATP-Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-mutierten und den mutierten Fliegen auf dem Kontrollmedium nach 3 (p = 0,1166, Abb. 7A) und nach 7 Tagen (p = 0,6009, Abb. 7B).

Nach drei Tagen auf dem Wirkstoff Myriocin konnte bei den mutierten Fliegen keine signifikante Steigerung der ATP-Level verzeichnet werden (p = 0,8766, Abb. 7A). Lediglich bei den Konzentrationen 1  $\mu$ M und 30  $\mu$ M war ein geringer Anstieg der ATP-Level in den Mutanten zu messen (Abb. 7A). Die nach einigen durchgeführten Messungen größte, wenn auch nicht signifikante Steigerung der

ATP-Level fand sich bei 10 μM. Diese Konzentration wurde deshalb für die Komplex I-Messung gewählt, auch wenn sie sich später nicht als wirksamste Konzentration für die Wiederherstellung physiologischer ATP-Werte erwies.

Auch die siebentägige Behandlung der mutierten Fliegen ergab keine signifikante Steigerung der ATP-Level (p = 0,8070, Abb. 7B). Der stärkste Effekt auf die Mutanten verschob sich auf die Konzentrationen 3 µM und 30 µM. Insgesamt zeigten die Fliegen nach sieben Tagen höhere ATP-Level, was auf einen größeren Effekt nach länger andauernder Behandlung hinweist. Die Therapie führte zu einer Steigerung der ATP-Level bis auf das physiologische Niveau.

Bei der Aktivitätsmessung des ersten Atmungskettenkomplexes zeigten die behandelten B9-Fliegen signifikant höhere Werte als die mutierten Fliegen auf dem Kontrollmedium (p =  $0,0135^*$ , Abb. 7C). Auch bei den RV-Fliegen ist eine nicht signifikante Steigerung der Komplex I-Aktivität messbar gewesen (Abb. 7C).

Die maximale Steigerung der Flugfähigkeit um ca. 10 % konnte unter der Behandlung mit 100 µM Myriocin beobachtet werden (Abb. 7D). Die Fliegen auf 300 µM Myriocin starben innerhalb eines Tages, weshalb weder Daten der Flugfähigkeit noch des ATP-Gehaltes vorliegen. Diese Konzentration scheint bereits toxische Wirkungen zu haben.

#### 3.1.2. FTY720 hat keinen Einfluss auf pathologische Parameter

Der Wirkstoff FTY720, auch Fingolimod genannt, ist eine synthetische Nachbildung von Myriocin. Diese hemmt im Gegensatz zu Myriocin aber nicht die Serin-Palmitoyl-Transferase (Napoli 2000). FTY720 wurde deshalb als Negativkontrolle genutzt.

FTY720 wird in vivo durch die Sphingosin-Kinase 2 zu Fingolimod-Phosphat aktiviert (Strader et al. 2011). Als Sphingosin-1-Phosphatanalogon wirkt es durch antagonistische Bindung an verschiedene Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren immunsuppressiv (Abb. 6) (Brinkmann 2002). Es vermindert den Austritt der Lymphozyten aus lymphatischem Gewebe (Napoli 2000; Strader et al. 2011). In der Humanmedizin ist Fingolimod unter dem Namen *Gilenya*® zur oralen Behandlung der schubförmig remittierenden Form der Multiplen Sklerose zugelassen (Arzneimittelkommision der deutschen Ärzteschaft 2011; Khatri 2016; European Medicines Agency 2018). Diese Therapie beruht in erster Linie auf der

27

Reduktion inflammatorisch schädigendender Lymphozyten (Matloubian et al. 2004).



Die Ergebnisse der Behandlung mit FTY720 finden sich in folgender Abb. 8.

Abbildung 8: Die Ergebnisse des Wirkstofftests der Negativkontrolle FTY720

A: ATP-Level der Fliegen nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes FTY720. B: ATP-Level der Fliegen nach 7 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes FTY720. C: Komplex I-Aktivität in Relation zur Aktivität der Citratsynthase nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder auf 10 μM FTY720. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der RV Kontrolle gesetzt. D: Gemittelte Flugfähigkeit im Zeitverlauf von 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder dem Wirkstoff FTY720 in verschieden Konzentrationen. Es wurden keine Daten der Flugfähigkeit nach siebentägiger Therapie erhoben.

Die gemessenen ATP-Level von RV- und B9-Fliegen auf dem Kontrollmedium zeigten sowohl nach drei (p = 0,3408, Abb. 8A) als auch nach sieben Tagen (p = 0,0606, Abb. 8B) keine signifikanten Unterschiede.

Der Wirkstoff FTY720 führte bei den Mutanten weder nach drei (p = 0,9898, Abb. 8A), noch nach sieben (p = 0,6573, Abb. 8B) Tagen zu einer signifikanten Änderung der ATP-Level. Die größte Steigerung der ATP-Level ließ sich bei der Konzentration von 300  $\mu$ M FTY720 beobachten (Abb. 8A, 8B).

Die Komplex I-Messung erfolgte für die Konzentration 10  $\mu$ M, da diese zum Zeitpunkt der Entscheidung in den vorläufigen Ergebnissen der ATP-Messungen den größten Effekt erwarten ließ. Der Unterschied der Komplex I-Aktivität zwischen B9-Fliegen auf dem Kontrollmedium bzw. 10  $\mu$ M FTY720 war nicht signifikant (Abb. 8C).

In den Flugtests ergab sich innerhalb von 72h ein positiver Trend für die Konzentrationen 3  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 300  $\mu$ M (Abb. 8D).

#### 3.1.3. Miglustat zeigt keine messbare Wirksamkeit auf pathologische Parameter

Miglustat ist ein reversibler Hemmstoff der Glucosylceramid-Synthase (Abb. 6) (Treiber et al. 2007). Er kann die Blut-Hirnschranke passieren und wird in der Therapie der vererbbaren, neurodegenerativen Niemann-Pick-Erkrankung Typ C sowie Morbus Gaucher Typ I eingesetzt (Patterson et al. 2007; Pastores et al. 2009). Beide Erkrankungen zählen zu den Iysosomalen Speicherkrankheiten. Bei ihnen kommt es zur Akkumulation von Sphingomyelin bzw. Glucocerebrosiden in verschiedenen Geweben. Miglustat verhindert diese Akkumulation und wirkt somit im Sinne einer Substratreduktion für die Rückreaktion zu Ceramid (Pastores et al. 2003). Die Konzentration von Glucosylceramid als Edukt der Cerebrosidase nimmt ab und das Reaktionsgleichgewicht verlagert sich weg von Ceramid, hin zu Glucosylceramid (Abb. 6). Sowohl in der Therapie der Niemann-Pick-Erkrankung als auch des Morbus Gaucher konnte eine deutliche Verbesserung der Symptome gezeigt werden (Elstein et al. 2004; Patterson et al. 2007).

Die Ergebnisse der Behandlung mit Miglustat sind in der folgenden Abb. 9 aufgeführt.



#### Abbildung 9: Die Ergebnisse des Wirkstofftests von Miglustat

A: ATP-Level der Fliegen nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Miglustat. B: ATP-Level der Fliegen nach 7 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Miglustat. C: Komplex I-Aktivität in Relation zur Aktivität der Citratsynthase nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder auf 1 mM Miglustat. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der RV Kontrolle gesetzt. D: Gemittelte Flugfähigkeit im Zeitverlauf von 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder der Flugfähigkeit in verschieden Konzentrationen. Es wurden nicht ausreichend Daten der Flugfähigkeit nach siebentägiger Behandlung erhoben.

Zwischen den ATP-Leveln der RV- und B9-Fliegen auf dem Kontrollmedium ergab sich nach 3 Tagen kein signifikanter Unterschied (p = 0,3787, Abb. 9A). Nach 7 Tagen auf dem Kontrollmedium lag dagegen ein signifikanter Unterschied vor ( $p = 0,0404^*$ , Abb. 9B).

Der Wirkstoff Miglustat führte zu einer leichten Steigerung der ATP-Level, diese war weder nach dreitägier Behandlung (p = 0,8725, Abb. 9A) noch nach siebentägiger Behandlung (p = 0,1939, Abb. 9B) signifikant.
Die Komplex I-Messung der B9-Fliegen ergab nach Behandlung mit 1000  $\mu$ M Miglustat eine nicht signifikant reduzierte Aktivität (Abb. 9C). Zum Zeitpunkt der Präparation der Fliegen für die Komplex I-Messung ließen die bis dahin durchgeführten ATP-Messungen den größten Effekt bei der Konzentration 1000  $\mu$ M erwarten.

Im Verlauf der 72 Stunden ließ sich keine Steigerung der Flugfähigkeit bei den mutierten Fliegen beobachten (Abb. 9D).

# 3.1.4.Zoledronsäure verbessert verschiedene pathologische Parameter

Der Wirkstoff Zoledronsäure zählt zu den Bisphosphonaten. Er hemmt die Osteoklasten und damit den Knochenabbau (Drake et al. 2008). Zoledronsäure ist unter den Namen Zometa® und Aclasta® in Europa zur Behandlung von tumorinduzierter Hyperkalziämie, (postmenopausaler) Osteoporose sowie Morbus Paget zugelassen (European Medicines Agency 2015). Nach neuen Erkenntnissen hemmt Zoledronsäure auch die Spingomyelinase (Roth et al. 2009) (Abb. 6). Die Ceramidlevel werden gesenkt, während die Sphingomyelinlevel steigen (Babenko et al. 2016).

Die Veränderungen der beobachteten Parameter nach Behandlung mit Zoledronsäure sind in Abb. 10 aufgeführt.



Abbildung 10: Die Ergebnisse des Wirkstofftest von Zoledronsäure

A: ATP-Level der Fliegen nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Zoledronsäure. B: ATP-Level der Fliegen nach 7 Tagen auf dem Kontrollmedium oder verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Zoledronsäure. C: Komplex I-Aktivität in Relation zur Aktivität der Citratsynthase nach 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder auf 100 µM Zoledronsäure. Die Messwerte wurden ins Verhältnis zu der RV Kontrolle gesetzt. D: Gemittelte Flugfähigkeit im Zeitverlauf von 3 Tagen auf dem Kontrollmedium oder dem Wirkstoff Zoledronsäure in verschieden Konzentrationen. Es wurden nicht ausreichend Daten der Flugfähigkeit für die siebentägige Behandlung erhoben.

Sowohl nach drei ( $p = 0,0249^*$ , Abb. 10A) als auch nach sieben Tagen ( $p = 0,0047^{**}$ , Abb. 10B) bestand ein signifikanter Unterschied im ATP-Gehalt der nicht-mutierten gegenüber den mutierten Fliegen auf dem Kontrollmedium.

Nach dreitägiger Behandlung kam es ab der Konzentration 100  $\mu$ M aufwärts zu einem Trend der Normalisierung der ATP-Level, wenn auch mit großer Streuungsbreite der Werte (Abb. 10A). Die Wirkung von Zoledronsäure auf die ATP-Level war nicht signifikant (p = 0,5169). Die größte Steigerung bestand zwischen B9-Fliegen auf dem Kontrollmedium und 1 mM Zoledronsäure. Da dies die höchste getestete Konzentration war, wäre es wünschenswert noch höhere Konzentrationen zu testen, um die Konzentration mit dem maximalen Effekt benennen zu können. Aus Zeitgründen wurden nur die beiden Konzentrationen 100  $\mu$ M und 1 mM für sieben Tage getestet (Abb. 10B), da diese nach den Ergebnissen des dreitägigen Tests den größten Effekt erwarten ließen. Jedoch starben im siebentägigen Test etwa die Hälfte der RV- sowie der mutierten Fliegen auf 1 mM Zoledronsäure. Dies ist vermutlich auf einen toxischen Effekt zurück zu führen. Höhere Konzentrationen würden also wahrscheinlich zu einem Überwiegen der Nebenwirkungen führen, nicht aber zu einer Steigerung der Wirksamkeit. Der Mann-Whitney U Test ergab für die Konzentration 100  $\mu$ M keine signifikante Wirksamkeit nach 7 Tagen (p = 0,5737).

Die Konzentration 100 µM zeigte zunächst die größte Wirksamkeit, weshalb diese für die Komplex I-Messung gewählt wurde. Es zeigte sich zwar ein Anstieg der Komplex I-Aktivität, dieser war jedoch nicht signifikant (Abb. 10C).

In den Flugtests ließ sich bei keiner der Konzentrationen eine eindeutige Veränderung beobachten (Abb. 10D).

### 3.1.5. Senkung der Ceramide reduziert Expression der Superoxiddismutase-2

Zusätzlich zu den Flugtests, ATP- und Komplex I-Messungen wurde auch der Gehalt der SOD-2 in den Fliegen betrachtet. Die SOD-2 ist ein Enzym, welches Hyperoxidanionen zu Wasserstoffperoxid entgiftet (McCord et al. 1969). Je nach Bedarf wird die Expression dieses Protein herauf- oder herabreguliert (siehe Abschnitt 1.4).

Aufgrund der Ergebnisse der ATP- und Komplex I-Messungen wurden die Wirkstoffe Myriocin und Zoledronsäure für eine erneute Behandlung der RV- und B9-Fliegen gewählt. Anschließend wurden die Expressionslevel der SOD-2 mit einem *Western Blot* bestimmt. Die Messung wurde nur einmal durchgeführt, weshalb es sich um vorläufige Ergebnisse handelt, die in weiteren Experimenten bestätigt werden müssen.



**Abbildung 11: Der Gehalt an Superoxiddismutase-2 in RV- und B9-Fliegen** Die Ergebnisse eines ersten Western Blots zeigen den Gehalt der SOD-2 in RV- und B9-Fliegen in Relation zum Gehalt an Beta-Actin. Die Fliegen wurden zuvor drei Tage auf Medien ohne Wirkstoff (Kontrolle), mit 10 μM Myriocin, 100 μM oder 1000 μM Zoledronsäure gehalten.

Der erste *Western Blot* zeigte das vorläufige Ergebnis eines deutlich erhöhten Gehaltes der SOD-2 in den *pink1*-Fliegen gegenüber der RV Kontrolle (Abb. 11). Die verschiedenen Therapien führten sowohl in den RV- als auch den B9-Fliegen zu einer Senkung des SOD-2-Gehaltes unter das physiologische Niveau. Die Reduktion nach der Behandlung mit Zoledronsäure erscheint dosisabhängig, da die Expression mit steigender Konzentration von Zoledronsäure abnimmt.

### 3.1.6. Sensitivitätsanalyse der ATP-Messungen

Wie in den Grafiken der Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.4 zu sehen, streuten die ATP-Messwerte sehr stark. Trägt man die im Anschluss an die Wirkstofftests erhobenen Messwerte über die Zeit bzw. die Durchläufe der Messungen auf, zeigen sich Schwankungen. Diese betreffen sowohl die Kontrollgruppen als auch die behandelten Gruppen aller Konzentrationen. In Abb. 12 wird eine solche Schwankung über die Zahl der Durchläufe beispielhaft anhand der Daten des dreitägigen Wirkstofftests von Zoledronsäure dargestellt.



Abbildung 12: Streuung der ATP-Rohwerte des dreitägigen Wirkstofftests von Zoledronsäure Ersichtlich wird eine große Streuung innerhalb einer Konzentration, weniger zwischen den verschiedenen Gruppen eines Durchlaufes. Die lineare Darstellung steht nicht für einen Verlauf, da in jedem Durchlauf neue Organismen getestet wurden. Sie dient ausschließlich der vereinfachten Differenzierung zwischen den verschiedenen Gruppen.

In den 16 Durchläufen zeigt sich eine Streuung um bis zu Faktor 10 innerhalb jeder einzelnen Gruppe, nicht so stark jedoch zwischen den verschiedenen Gruppen innerhalb eines Durchlaufes (Abb. 12). Die Messungen zogen sich über einen Zeitraum von etwa einem Jahr. Zunächst liegen die Messwerte der verschiedenen Gruppen nah beieinander, in den späteren Durchläufen steigt die Streuung auch zwischen den Gruppen an. Um die Werte der verschiedenen Gruppen aussagekräftig miteinander zu verglichen, können die Schwankungen über die Durchläufe mittels einer Mittelwertbereinigung minimiert werden. Dafür wird von jedem einzelnen Messpunkt der Mittelwert aller Gruppen des jeweiligen Durchlaufs subtrahiert. Folglich entsteht nach der Korrektur Abb. 13.



Abbildung 13: Bereinigte ATP-Messwerte des Wirkstofftests von Zoledronsäure Die Streuung einer Gruppe im Verlauf nimmt ab, die Streuung innerhalb eines Durchlaufes bleibt gleich und damit die Verhältnisse der verschiedenen Gruppen zueinander.

Bei der Mittelwertbereinigung werden die Verhältnisse zwischen den Gruppen nicht verändert, die Streuung innerhalb einer Konzentration nimmt aber ab, da die unterschiedlichen Versuchsbedingungen der Durchläufe herausgerechnet werden. Der Subtraktion geschuldet ergeben sich konsekutiv negative ATP-Werte. Diese werden über die Addition des unbedingten Mittelwertes aller Rohdaten eines Wirkstofftests auf jeden einzelnen Messpunkt wieder relativiert.

Im Vergleich zu den oben gezeigten ATP-Grafiken des Wirkstofftests von Zoledronsäure (Abb. 10A, B und Abb. 14A, B) entstehen nach der Korrektur des Datensatzes per Mittelwertbereinigung die in Abb. 14C, D gezeigten Graphen.



Abbildung 14: ATP-Werte des Wirkstofftests Zoledronsäure vor & nach Mittelwertbereinigung Die Grafiken auf der linken Seite zeigen die Rohdaten der ATP/Protein-Messung nach 3 (A) oder 7 (B) Tagen auf dem Kontrollmedium oder Zoledronsäure in verschiedenen Konzentrationen. Auf der rechten Seite sind die nach der Mittelwertbereinigung entstandenen ATP/Protein-Messpunkte ebenfalls nach 3 (C) und 7 (D) Tagen vergleichbar abgebildet.

Im Falle von Zoledronsäure zeigten sich bei der Analyse der bereinigten Daten folgende Ergebnisse:

Die ATP-Werte der B9-Fliegen auf dem Kontrollmedium waren gegenüber den RV-Fliegen auf Kontrollmedium sowohl nach 3 ( $p < 0,0001^{***}$ , Abb. 14C) als auch nach 7 Tagen ( $p = 0,0006^{***}$ , Abb. 14D) signifikant erniedrigt.

Nach dreitägiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffs Zoledronsäure ergab sich ein signifikanter Anstieg der ATP-Werte ( $p = 0,0002^{***}$ ,

Abb. 14C). Die siebentägige Behandlung mit 100  $\mu$ M zeigte dagegen keine signifikante Wirksamkeit (p = 0,2786, Abb. 14D).

Ähnliche Schwankungen über die Durchläufe waren auch bei den anderen getesteten Wirkstoffen zu sehen. Entscheidend ist dabei, dass sich nicht bei allen ein ansteigender Trend über die Durchläufe zeigte: mal finden sich hohe Werte in den ersten Durchläufen, mal in den mittleren und mal in den zuletzt erhobenen. Die Vergleiche zwischen den nicht-korrigierten und korrigierten Datensätzen der anderen Wirkstoffe finden sich im Anhang 7.2.

Die Ergebnisse der mittelwertbereinigten ATP-Daten sowie der Einfluss der verschiedenen Wirkstoffe auf die anderen pathologisch veränderten Parameter in *pink1*-Mutanten sind in folgender Tabelle vereinfacht zusammengefasst und werden in der Diskussion weitergehend eingeordnet.

| Wirkstoff     | ATP-Level | Komplex I-Aktivität | SOD2 | Flugfähigkeit |
|---------------|-----------|---------------------|------|---------------|
| Myriocin      | n.s.      | *个                  | norm | (↗)           |
| FTY720        | n.s.      | n.s.                | n.d. | (↗)           |
| Miglustat     | *个        | n.s.                | n.d. | =             |
| Zoledronsäure | ***个      | n.s.                | norm | =             |

**Tabelle 6: Einfluss der verschiedenen Wirkstoffe auf die erhobenen Parameter** Einfluss auf ATP-Level, Komplex I-Aktivität, Expression der SOD-2 und Flugfähigkeit in pink1-Mutanten (n.s. = nicht signifikant, n.d. = nicht definiert, norm = normalisiert). In der Zusammenschau stellen sich insbesondere Myriocin und Zoledronsäure als wirksam heraus.

### 3.1.7. Einfluss der Ceramidsenkung auf die Kontrollfliegen

Alle Wirkstoffe wurden parallel an den gesunden RV-Fliegen getestet. Die Ergebnisse der Komplex I-Messungen und Flugtests sind in den Abschnitten der jeweiligen Wirkstoffe (3.1.1. bis 3.1.4.) aufgeführt. Die Graphen der ATP-Messungen ohne und mit Mittelwertkorrektur sind im Anhang 7.3. zu finden.

Die ATP-Level der RV-Fliegen blieben von der Myriocin-Behandlung ohne und mit Mittelwertbereinigung unbeeinflusst (Abb. 22). Die Behandlung mit Miglustat führte ebenfalls zu keiner Veränderung der ATP-Werte (Abb. 24). Der Wirkstoff Zoledronsäure zeigte ohne Mittelwertbereinigung keine Wirksamkeit auf die ATP-Werte. Mit der Korrektur zeigte sich nach dreitägiger Behandlung eine signifikante dosisabhängige Wirksamkeit auf die ATP-Level der RV-Fliegen (p = 0,0310\*). Dies bestätigte sich nicht nach siebentägiger Behandlungsdauer (Abb. 25A, C). Die ATP-Werte der mit der Negativkontrolle FTY720 behandelten RV-Fliegen ergaben widersprüchliche Ergebnisse: vor Mittelwertbereinigung schien es keinen Effekt nach der dreitägigen, wohl aber eine dezente Abnahme nach der siebentägigen Behandlung ( $p = 0.0491^*$ ) zu geben. Nach der Mittelwertbereinigung zeigte sich dagegen ein positiver Effekt der dreitägigen ( $p = 0.0001^{**}$ ), nicht aber der siebentägigen Behandlung (Abb. 23).

# 3.2. Identifikation protektiver Faktoren für die Ausprägung der *pink1*-Mutation

Neben der molekularen Ebene sollte auch die genetische Ebene der *pink1*mutierten Fliegen betrachtet werden. Die täglichen Beobachtungen führten zu der Annahme, dass sich der Phänotyp mit einer reduzierten Penetranz ausprägt (siehe 1.7). Untermauert werden konnte dies mit einer Pilotstudie. Dafür wurden Fliegen des B9-Stammes gekreuzt, die der natürlichen genetischen Variabilität ihrer vier Chromosomen unterliegen. Anschließend wurden die *pink1*-mutierten männlichen Nachkommen selektiert und im Alter von 5 Tagen auf Flugfähigkeit und ATP-Gehalt getestet (Abb. 15).



Abbildung 15: Flugtests und ATP-Messungen weisen auf reduzierte Penetranz hin In der Pilotstudie wurden die pink1-mutierten männlichen Nachkommen dreier Elternpaare auf ihre Flugfähigkeit (A) und ihren ATP-Gehalt (B) getestet. Je Elternpaar wurden n= 7 Nachkommen getestet.

Fliegen ohne Mutation erreichen eine Flugfähigkeit von 100 %. Fliegen mit Mutation ließen dagegen erkennen, dass sich der Phänotyp je nach genetischer Variabilität des Elternpaares unterschiedlich stark ausprägt (Abb. 15).

Um das Phänomen der reduzierten Penetranz bei *pink1*-mutierten Fliegen weiter zu beschreiben und die Ursachen aufzuklären, wurde ein Kreuzungsschema entwickelt (Abb. 16).



Abbildung 16: Kreuzungsschema für die Züchtung pink-mutierter Versuchsfliegen Die für die Experimente gesuchten männlichen pink1-mutierten Fliegen tragen auf dem zweiten und dritten Chromosom nahezu dieselben Wildtyp-Allele, da in der dritten Generation nur je ein Männchen und ein Weibchen gekreuzt wurde, und nur das Weibchen die beiden Wildtyp-Chromosomen an die nächsten

Generationen weiter gibt.

Das Kreuzungsschema (Abb. 16) umfasst vier Generationen und soll Fliegen hervorbringen, welche die *pink1*-Mutation auf dem ersten Chromosom tragen und sich ansonsten nur durch natürliche Polymorphismen auf den anderen Chromosomen unterscheiden. Da die homozygoten *pink1*-Weibchen nicht lebensfähig und die heterozygoten Männchen steril sind, wurde Gebrauch von Balancer-Chromosomen und an sie gekoppelte Marker gemacht (siehe Abschnitt 1.3). Dadurch lassen sich heterozygote Weibchen erkennen und in weiteren Schritten wieder mit anderen Fliegen kreuzen. Um die Polymorphismen so gering wie möglich zu halten, wurden die *pink1*-Fliegen mit Fliegen gekreuzt, die auf den Chromosomen 2 und 3 ebenfalls Balancer tragen. Beabsichtigt war, im

letzten Schritt Fliegen mit identischen Wildtyp-Chromosomen 2 und 3 (von der Mutter in Generation 3 erworben) untereinander zu kreuzen, sodass die Nachkommen nur die beim crossing-over in der Meiose entstehenden genetischen Unterschiede tragen und sonst genetisch identisch sind. Bei diesem letzten Schritt werden die Nachkommen jedes Elternpaares voneinander separiert und auf ihre Flugfähigkeit getestet. Anschließend werden die Nachkommen des Elternpaares mit dem höchsten und dem niedrigsten Anteil an flugfähigen Fliegen selektiert. Dadurch lassen sich die einflussreichsten genetischen Unterschiede in der anschließenden DNS-Analyse darstellen. Per Next-Generation-Sequencing ist es dann ggf. möglich protektive genetische Faktoren zu identifizieren, die zur reduzierten Penetranz bei *pink1*-Fliegen führen.

Während der Kreuzung ergab sich die Schwierigkeit, dass die männlichen Fliegen der dritten Generation durch die artifiziellen Balancer-Chromosomen zu stark beeinträchtigt wurden, um weitere Nachkommen zu zeugen. Die Kreuzung stagnierte während dieses Schrittes und bis zum Ende meiner experimentellen Arbeitzeit ist es nicht gelungen, die benötigten Fliegen für den genetischen Screen heranzuzüchten. Es konnten somit im Rahmen dieser Arbeit keine protektiven genetischen Faktoren identifiziert werden.

Diskussion

# 4. Diskussion

Der Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung wächst weltweit. Damit einher geht ein Anstieg neurodegenerativer Erkrankungen wie M. Parkinson, weshalb ein tiefergehendes Verständnis seiner Pathogenese und derer Modifikatoren von großer Bedeutung ist. Dieser Arbeit liegen zwei Zielsetzungen zu Grunde (siehe Abschnitt 1.8.) welche am Beispiel einer genetisch bedingten Form des M. Parkinson anhand des Tiermodells *DM* mit *pink1*-Mutation untersucht wurden.

Die erste Zielsetzung beruht auf der Annahme eines veränderten Die Lipidstoffwechsels in *pink1*-Mutanten. kürzlich nachgewiesenen Lipidbestandteile der für M. Parkinson typischen Lewy-Körperchen sind ein weiterer Hinweis darauf, dass der Lipidstoffwechsel eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen könnte (Shahmoradian et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere der Ceramidstoffwechsel und dessen möglicher Zusammenhang mit der mitochondrialen Dysfunktion in pink1-Mutanten betrachtet. Dieser gerät auch in anderen Arbeitsgruppen der Parkinsonforschung zunehmend in den Fokus (Plotegher et al. 2019).

Die zweite Zielsetzung beruht auf der Beobachtung einer reduzierten Penetranz der *pink1*-Mutation. Es sollten protektive genetische Faktoren für die Ausprägung der Erkrankung in *DM* identifiziert werden.

# 4.1. Der Ceramidstoffwechsel in *pink1*-Mutanten

In vorherigen Experimenten konnten erhöhte Ceramidlevel in den Gehirnen *Pink1*mutierter Mäuse sowie in den Mitochondrien *Pink1*-mutierter MEF-Zellen nachgewiesen werden (Abschnitt 1.6.) (Torres-Odio et al. 2017; Vos et al. 2017). Aufgrund der funktionellen Konservierung von PINK1 in verschiedenen Spezies (Clark et al. 2006), können ebenfalls erhöhte Ceramidlevel in *pink1*-mutierten Fliegen angenommen werden. In der vorliegenden Arbeit geht es nun darum, durch pharmakologische Interventionen die Bedeutung der Ceramide für den in Abschnitt 1.5. beschriebenen pathologischen Phänotyp aufzuklären. Es gilt herauszufinden, ob und über welche Mechanismen eine Reduktion der Ceramidlevel zu einer Verbesserung des Phänotyps führen kann. Als Parameter für die Ausprägung des pathologischen Phänotyps wurden die in *pink1*-Mutanten

charakteristisch erniedrigten ATP-Level, die erniedrigte Komplex I-Aktivität, die erhöhte Konzentration freier Radikale sowie die verminderte Flugfähigkeit gewählt.

Bisher bleibt unklar, ob die erhöhten mitochondrialen Ceramidlevel durch eine gesteigerte Ceramidsynthese, einen verringerten Abbau oder eine Relokalisation in die Mitochondrien erklärt werden können. Auch wenn bisherige Experimente eine unveränderte Aktivität der in die Ceramidsynthese involvierten Enzyme zeigten, ließe sich die Annahme einer gesteigerten Ceramidsynthese mit den Erkenntnissen anderer Gruppen zum Zusammenhang von ROS-Gehalt und Ceramidsynthese begründen. In folgender Diskussion möchte ich eine mögliche Erklärung mit ihren wissenschaftlichen Hintergründen herleiten.

Fliegen mit *pink1*-Mutantion zeigen erhöhte ROS-Level. Die Mutation führt zu einem ineffizienten ersten Atmungskettenkomplex (Greenamyre et al. 1999; Park et al. 2006). Der Großteil der gemessenen ROS, wird ursächlich auf den Komplex I zurückgeführt (Blesa et al. 2015). Diese schädigen die Mitochondrien und steigern den Bedarf des Abbaus durch den Prozess der Mitophagie. Die SOD-2 dient der Entgiftung zellschädigender Radikale (McCord et al. 1969). Das Ergebnis des einfach durchgeführten *Western Blot*s weist darauf hin, dass das Proteinlevel der SOD-2 in den *pink1*-Mutanten deutlich erhöht ist (Abb. 11). Es ist anzunehmen, dass die Expression der SOD-2 zur Entgiftung der ROS hochreguliert wird. Die Ergebnisse der SOD-2-Expression unterstreichen somit den Nachweis erhöhter ROS-Level in *pink1*-Mutanten (Greenamyre et al. 1999; Park et al. 2006). Trotz der gesteigerten Expression der entgiftenden SOD-2, kann die erhöhte ROS-Entstehung in *pink1*-Mutanten also nicht ausgeglichen werden.

Die Produktion von Sphingolipiden wird durch verschiedene Stressstimuli angeregt (Bikman et al. 2011; Dany et al. 2015). Die vermehrte Entstehung von ROS, die erhöhte SOD2-Expression sowie die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien sind ein Hinweis für zellulären Stress (Clark et al. 2006; Gautier et al. 2008). Daher kann angenommen werden, dass aufgrund der *pink1*-Mutation solch ein Stimulus für die Produktion von Sphingolipiden existiert.

Darüber hinaus ist bekannt, dass der Pink1/Parkin-Signalweg zur Mitophagie in *pink1*-Mutanten gestört ist und die durch oxidativen Stress geschädigten Mitochondrien nicht adäquat abgebaut werden (Yang et al. 2006). Ceramide bestimmter Kettenlängen führen hingegen über eine erhöhte

Membranpermeabilität zu einer gesteigerten Autophagie und mitochondrialen Teilung (Bikman et al. 2011; Sentelle et al. 2012).

In Zusammenschau dieser Erkenntnisse wäre eine mögliche Erklärung der erhöhten mitochondrialen Ceramidlevel in *pink1*-Mutanten, dass diese eine kompensierende Funktion haben; den Selbstschutzmechanismus der Zelle bei mutationsbedingt geschädigter Atmungskette und dysfunktionaler Mitophagie aufrechtzuerhalten. Neuere Erkenntnisse meiner beiden nachfolgenden Doktorandinnen Lisa Frese und Julia Depperschmidt unterstützen diese Hypothese. Sie konnten zeigen, dass ein früher Faktor der Ceramid-vermittelten Mitophagie, LC3-II, in *pink1*-Mutanten erhöht ist. Es bleibt bisher allerdings ungeklärt, ob diese Form der Mitophagie auch über diesen frühen Schritt hinaus stattfindet.

Nach der Behandlung mit einigen der getesteten Wirkstoffe, konnte jedoch trotz der Hemmung der Ceramidsynthese eine Verbesserung von Parametern wie ATP-Gehalt, Komplex I-Aktivität und Expression der SOD-2 festgestellt werden (Abb. 7, 10, 14).

Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Ceramide nicht nur den mitochondrialen Abbau in Stresssituationen fördern, sondern ab einer bestimmten Konzentration auch die Atmungskette hemmen (Gudz et al. 1997; Zigdon et al. 2013; Kogot-Levin et al. 2014). Ihre Akkumulation in der inneren Mitochondrienmembran führt zu einem verringerten Fettsäureabbau (β-Oxidation) (Turpin et al. 2014; Raichur et al. 2014). Meine nachfolgende Doktorandin Lisa Frese konnte auch in *pink1*-Mutanten zeigen, dass die β-Oxidation ceramidbedingt reduziert ist und dies die verringerte Atmungskettenaktivität begründet. Durch die geringere Aktivität kommt es zu einer vermehrten Entstehung freier Radikale, die dann wiederum die Mitochondrien schädigen (García-Ruiz et al. 1997; Di Paola, Cocco, and Lorusso 2000). Sowohl die direkte Stimulation der β-Oxidation als auch die indirekte, über die Inhibition des Ceramidstoffwechsels, führen zu einer Steigerung der Atmungskettenaktivität. Diese neuen, bisher unpublizierten, Ergebnisse ergeben eine potenzielle therapeutische Option zur Aufhebung des pathologischen pink1-Phänotyps.

Eine Erklärung für erhöhte mitochondriale Ceramidlevel in *pink1*-Mutanten könnte also darin liegen, dass sie zu einer sinnvollen Steigerung der Ceramid-vermittelten

Mitophagie führen. Andererseits gibt es auch den Anhalt, dass die ceramidbedingt erniedriegte β-Oxidation die Insuffizienz der, durch die Mutation bereits vorgeschädigten, Atmungskette noch weiter verstärkt. Eine Erhöhung mitochondrialer Ceramidlevel, ob durch eine gesteigerte Synthese, verringerten Abbau oder Relokalisation, führt damit möglicherweise sogar zu einer Verstärkung des pathologischen Phänotyps. Es ist also anzunehmen, dass Ceramide in den *pink1*-Mutanten zu zwei ambivalenten Mechanismen führen. Unklar bleibt, in welchem Verhältnis die Mechanismen zueinanderstehen (Abb. 17).



#### Abbildung 17: Möglicher Erklärungsansatz für die Rolle des Lipidstoffwechsels in pink1-Fliegen

Die pink1-Mutation führt über verschiedene Mechanismen zu gesteigertem oxidativem Stress. Zellulärer Stress führt zu einem erhöhten Gehalt mitochondrialer Ceramide. Die Ceramid-vermittelte Mitophagie wird initiiert. Die Folgen der gesteigerten Initiation der Ceramid-vermittelten Mitophagie bleiben zunächst hypothetisch (gestrichelter Teil der Abb.), möglicherweise stellen sie eine Kompensation der mutationsbedingt eingeschränkten Pink1/Parkin-abhängigen Mitophagie dar (linker Teil der Abb.). Gleichzeitig verstärken Ceramide die Ineffizienz der durch die Mutation ohnehin schon vorgeschädigten Atmungskette und somit den pathologischen Phänotyp der pink1-Mutanten (rechter Teil der Abb.).

Der Phänotyp der *pink1*-Mutanten lässt annehmen, dass der hemmende Effekt der Ceramide auf die Atmungskette den möglicherweise protektiven Effekt auf die Mitophagie überwiegt. Deshalb finden sich trotz bzw. aufgrund der kompensativ erhöhten Ceramidlevel die beschriebenen pathologischen Parameter. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen genau das: eine pharmakologische Senkung der Ceramidlevel mildert die Ausprägung des *pink1*-Phänotyps (Abb. 7, 10, 14).

Die getesteten Wirkstoffe greifen alle in den Ceramidstoffwechsel ein (Abschnitt 3.1). Zwei von ihnen, Myriocin und Zoledronsäure, führen über eine Enzymhemmung im Ceramidstoffwechsel zu einer direkten Reduktion von Ceramid (Wadsworth et al. 2013; Babenko et al. 2016). Ein anderer Wirkstoff, Miglustat, könnte über die Verschiebung eines chemischen Gleichgewichtes indirekt ebenfalls zu einer Ceramidreduktion führen (Pastores et al. 2003). Der Wirkstoff FTY720 ist eine synthetische Nachbildung von Myriocin ohne dessen hemmende Wirkung und diente als Negativkontrolle (Napoli 2000). In den meisten Experimenten war für den Effekt auf die ATP-Level und Komplex I-Aktivität nur ein Trend zu beobachten. Für den Nachweis signifikanter Wirksamkeiten bedarf es weiterer Messungen. Die Ergebnisse nach gängiger Auswertung sind in Abschnitt dargestellt 3.1.1. bis 3.1.4. ausführlich und werden hier nochmals zusammenfassend eingeordnet:

Myriocin und Zoledronsäure führten zu einer Verbesserung des pathologischen Phänotyps auf molekularer Ebene. Beide steigerten sowohl die Komplex I-Aktivität als auch die ATP-Level. Im Western Blot zeigte sich ein geringeres Expressionslevel der SOD-2 (Abb. 11). Dies ist ein weiterer Indikator dafür, dass Myriocin und Zoledronsäure über eine Ceramidreduktion zu einer gesteigerten Atmungsketteneffizienz und damit zu einer reduzierten ROS-Produktion führt. Der Bedarf an der entgiftend wirkenden SOD-2 sinkt. Folglich wird ihre Expression herunter reguliert. Die Effekte von Myriocin und Zoledronsäure auf molekularer Ebene stützen den vermuteten Zusammenhang zwischen dem Ceramidstoffwechsel und dem pathologischen Phänotyp der pink1-Mutanten. Die reduzierte Flugfähigkeit als Indikator eines parkinsonoiden Phänotyps und sichtbarem motorischen Resultat der zellulären Prozesse ließ jedoch keine eindeutige Verbesserung erkennen.

Die Wirksamkeit des Wirkstoffs Miglustat auf den pathologischen *pink1*-Phänotyp bleibt unklar. Er führte zwar zu einer leichten Steigerung der ATP-Level, die Aktivität des Komplex I nahm unter der Behandlung mit 1 mM Miglustat jedoch ab. Möglicherweise wirkt diese Konzentration bereits toxisch (Abb. 9C). Interessant

wären hier weitere Komplex I-Messungen nach Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen des Wirkstoffes.

Die Negativkontrolle FTY720 zeigte keine Wirksamkeit auf die molekularen Charakteristika des pathologischen *pink1*-Phänotyps.

Insgesamt zeigten die ATP-Messungen aller Wirkstoffe eine starke Streuung im Verlauf der 12-16 Messdurchläufe (siehe Abschnitt 3.1.6.). Alle Messungen fanden nach der gleichen Methodik statt, die Streuung erklärt sich deshalb am wahrscheinlichsten durch Versuchsbedingungen wie Raumtemperatur (die Messungen streckten sich über Winter- und Sommermonate), Luftfeuchtigkeit oder Dauer der Einfrierzeit vor der Messung. Eine Sensitivitätsanalyse gibt Auskunft darüber, wie stark die Ergebnisse durch Änderungen (physikalischer) Eingangsparameter beeinflusst werden, also Auskunft über die Empfindlichkeit eines Messsystems (Marino et al. 2008; Zi 2011). Um den Einfluss der Eingangsparameter zu prüfen, wurde wie in Abschnitt 3.1.6. beschrieben eine Mittelwertkorrektur der Messdaten als Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Dadurch werden Effekte der Versuchsbedingungen herausgerechnet und die Messdaten untereinander besser vergleichbar. Je stärker sich die Ergebnisse vor und nach der Mittelwertbereinigung unterscheiden, desto größer ist die Empfindlichkeit des Messystems (Saltelli et al. 1999; Marino et al. 2008; Xu et al. 2011).

Nach der Mittelwertbereinigung konnten die beschriebenen erniedrigten ATP-Level der (unbehandelten) B9-Fliegen gegenüber den RV-Fliegen bei nahezu allen Messungen als signifikant bestätigt werden (Anhang 7.2.) (Clark et al. 2006). Im Vergleich zu den Ergebnissen vor der Mittelwertbereinigung konnte die Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit einiger Wirkstoffe bestätigt werden, bei anderen Wirkstoffen kam es dagegen zu divergenten Ergebnissen. Die Behandlung mit Myriocin zeigte nach der Mittelwertbereinigung ebenfalls ein Trend zur Normalisierung der ATP-Werte, dieser ist jedoch nicht signifikant (Abb. 19). Die ATP-Messungen Behandlung mit der Miglustat ergaben nach der Mittelwertbereinigung dagegen ein verändertes Bild. Die Auswertung zeigte einen deutlichen Trend der dreitägigen- und eine signifikante Wirksamkeit der siebentägigen Behandlungsdauer ( $p = 0.0166^*$ ) (Abb. 21). Die Ergebnisse des Wirkstoffs Zoledronsäure veränderten sich durch die Mittelwertbereinigung am stärksten, da die Rohdaten hier die größte Streuungsbreite aufwiesen. Nach der Mittelwertbereinigung zeigte sich eine signifikante Wirksamkeit für die dreitägige

Behandlung (p = 0,0002\*\*\*) (Abb. 14C, D) im Einklang mit dem erkennbaren Trend der im Abschnitt 3.1.4. dargestellten Auswertung vor der Mittelwertbereinigung (Abb. 10A, B). Die Unwirksamkeit der Negativkontrolle FTY720 bestätigte sich auch nach der Mittelwertbereinigung (Abb. 20).

Die Interpretation der mittelwertbereinigten ATP-Daten ergibt also ein leicht verändertes Bild zu der gängigen Auswertung: die Wirkstoffe Miglustat und Zoledronsäure zeigen die stärkste Wirksamkeit, Myriocin einen Trend im Sinne der Normalisierung der ATP-Werte auf das physiologische Niveau. Die Wirksamkeit von Miglustat auf die ATP-Werte erscheint eindeutig, spiegelt sich aber nicht in einer Steigerung der Komplex I-Aktivität wider- möglicherweise aufgrund einer zu hoch gewählten Wirkstoffkonzentration (Abb. 9C). Hier sind Nachmessungen mit niedrigeren Konzentrationen für eine abschließende Aussage notwendig.

In Zusammenschau aller erhobenen Parameter, allen voran der Komplex I-Aktivität, bestätigte die Sensitivitätsanalyse die bisherige Interpretation von Myriocin und Zoledronsäure als potenzielle Therapeutika, wirksam über die Hemmung von Enzymen des Ceramidstoffwechsels.

Eine Beobachtung legt jedoch den Verdacht nahe, dass eine starke Inhibition des Ceramidstoffwechsels auch schädliche Effekte haben könnte. Die stärkste Senkung der SOD2-Expression erfolgte bei 1 mM Zoledronsäure, der Konzentration, unter der etwa die Hälfte der Fliegen der Gruppe verstarb (Abb. 11, 14). Möglicherweise führen derart reduzierte Mengen freier Radikale also auch zu aesundheitlichen Einschränkungen. ROS sind in hoher Konzentration zellschädigend. In niedrigen und mittleren Konzentrationen haben sie jedoch physiologische Funktionen: sie sind ein wichtiges Signalmolekül und schützen vor pathogenen Noxen, indem sie eine zelluläre Antwort triggern (Dröge 2002; Valko et al. 2007). Es bleibt also unklar, ob die Fliegen auf 1 mM Zoledronsäure an toxischen Effekten oder an ihren, infolge der Therapie, erniedrigten ROS-Leveln starben.

Die Behandlung gesunder RV-Kontrollfliegen zeigte ebenfalls Effekte auf phänotypische Parameter. So führte die dreitägige Behandlung der gesunden Fliegen mit Zoledronsäure zu einer signifikanten Steigerung der ATP-Level über die physiologische Konzentration hinaus ( $p = 0,0310^*$ ) (Abb. 25B). Die übrigen Inhibitoren des Ceramidstoffwechsels zeigten keine eindeutige Wirkung auf die

ATP-Level. Die Komplex I-Aktivität stieg sowohl nach der Behandlung mit Myriocin als auch mit Zoledronsäure deutlich über das physiologische Niveau (Abb. 7C und 10C). Auch im *Western Blot* zeigte sich die Wirksamkeit dieser beiden Wirkstoffe auf die gesunden RV-Fliegen: der Gehalt der SOD-2 nahm durch die Behandlung ab (Abb. 11). Eine begrenzte Senkung der Ceramidlevel durch die Wirkstoffe Myriocin und Zoledronsäure scheint also auch in gesunden Fliegen zu einer effizienteren Atmungskette und damit zu weniger oxidativem Stress zu führen.

Als Resultat der Wirkstofftests lässt sich festhalten, dass der Ceramidstoffwechsel eine Verbindung zwischen Atmungsketteninsuffizienz und gestörter Mitophagie in *pink1*-Mutanten darstellt. **Hypothese 1** kann somit verifiziert werden. Das Ziel 1 wurde erreicht. Im Einklang mit den neusten Erkenntnissen der Wissenschaft, bestätigen die Ergebnisse die zentrale Bedeutung der mitochondrialen Dysfunktion für die Pathogenese des M. Parkinson und ergänzen diese um einen verbindenen Erklärungsansatz, den Ceramidstoffwechsel (Grünewald et al. 2019; Plotegher et al. 2019).

# 4.2. Reduzierte Penetranz der pink1-Mutation

Der Ausprägung der *pink1*-Mutation liegen verschiedene Einflüsse zu Grunde. So scheint es neben Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Umwelt auch auf genetischer Ebene Modifikatoren zu geben, welche die Ausprägung der Erkrankung beeinflussen und zum beobachteten Phänomen der reduzierten Penetranz führen (siehe Abschnitt 1.7.).

Um dieser Beobachtung weiter auf den Grund zu gehen, sollten mit dem in Abschnitt 3.2. beschriebenen Kreuzungsschema *pink1*-Fliegen gezüchtet werden, die sich genetisch sehr ähnlich sind. Durch eine genetische Sequenzierung, so der Plan, sollten genetische Faktoren identifiziert werden, die die Ausprägung der *pink1*-Mutation beeeinflussen. Das Kreuzungsschema mit zahlreichen artifiziellen Balancer-Chromosomen machte die Fliegen jedoch krank. Sie konnten keine Nachkommen hervorbringen und es kam nicht zum Erhalt der Versuchsfliegen.

Für die zukünftige Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein neues Kreuzungsschema entwickelt (Abb. 18).



Abbildung 18: Überarbeitetes Kreuzungsschema für die Züchtung der pink1-Versuchsfliegen Das neue Kreuzungsschema enthält keinen Schritt, in dem die Männchen fünf Balancer tragen und aufgrund dessen besonders krank werden. Eine weitere Besonderheit des neuen Schemas ist, dass in der dritten Generation Geschwisterpaare miteinander gekreuzt werden. Von den Nachkommen so eines Geschwisterpaares werden die pink1-Mutation tragende männliche Fliegen ohne Balancer ausgesucht. Diese tragen nur die Wildtypallele von dem Weibchen aus der zweiten Paarung und haben deshalb eine hohe genetische Ähnlichkeit untereinander.

Das neue Schema (Abb. 18) hat den Vorteil, dass die Männchen nicht auf jedem Chromosom zwei Balancer tragen, sondern auf Chromosom 2 und 3 jeweils auch ein Wildtyp-Allel. Es besteht die Hoffnung auf gesündere Fliegen und eine schnellere Vermehrung. Im Vergleich zu dem bisherigen Kreuzungsschema (Abb. 16) ist die genetische Variabilität der Versuchstiere allerdings etwas höher, da sie bis zu vier (und nicht nur zwei) unterschiedliche Wildtypallele auf den Chromosomen 2 und 3 tragen. Verläuft die Kreuzung erfolgreich, soll wie ursprünglich geplant verfahren werden: zunächst werden die Männchen für die Experimente auf ihre Flugfähigkeit getestet. Die flugfähigen Tiere werden anschließend mit den nicht-flugfähigen Tieren in Parametern wie ATP, Komplex I-Aktivität und auch in ihrer genetischen Sequenz verglichen.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei dem Erhalt der Versuchsfliegen, konnte das Ziel 2, die Identifikation protektiver genetischer Faktoren für die Ausprägung der *pink1*-Mutation, nicht erreicht werden. **Hypothese 2** kann zunächst nicht angenommen werden. Mit dem neuen Kreuzungsschema besteht jedoch die Hoffnung, in Zukunft derartige Faktoren identifizieren zu können.

### 4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Den Ergebnissen dieser Arbeit zur Folge spielt der Ceramidstoffwechsel als Verbindung zwischen Atmungsketteninsuffizienz und gestörter Mitophagie eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des M. Parkinson. Enzyme des Ceramidstoffwechsels könnten deshalb eine potenzielle Zielstruktur zukünftiger Parkinsontherapien darstellen. Zwei der getesteten Wirkstoffe, Myriocin und Zoledronsäure, führen als Inhibitoren der Ceramidproduktion zu einer deutlichen Verbesserung des pathologischen *pink1*-Phänotyps.

Myriocin ist in der Wissenschaft erprobt und Zoledronsäure sogar bereits für die Therapie anderer Erkrankungen zugelassen (Miyake et al. 1995; European Medicines Agency 2015). Diese Tatsache erleichtert zukünftige translationale Arbeiten und mögliche Therapieversuche an Patienten. Für eine abschließende Aussage über die Wirksamkeit von Myriocin und Zoledronsäure sind weitere Experimente mit größeren Stichproben und verlängerter Beobachtungsdauer nötig. Die pharmakologische Wirksamkeit zur Enzyminhibition könnte durch Erfassung der Expressionslevel der an der Synthese beteiligten Enzyme überprüft werden. Für eine Validierung der Wirksamkeit wäre eine direkte Bestimmung der mitochondrialen Ceramidkonzentrationen in *pink1*-Mutanten mittels Massenspektrometrie anzustreben. Sinnvoll wäre auch eine genaue Betrachtung der mitochondrialen Morphologie vor und nach der Therapie. Sollte die Ceramiderhöhung in der Lage sein, den defekten Pink1/Parkin-Stoffwechselweg der Mitophagie vollständig zu kompensieren, könnte die Ceramidinhibition zwar zu einer Steigerung der Atmungsketteneffizienz führen, jedoch auch zu einer erhöhten Anzahl geschädigter, nicht abgebauter Mitochondrien.

Die Wirksamkeit von Myriocin konnte zwischenzeitlich von meiner Betreuerin Frau Vos in Fibroblasten von Patienten mit homozygoter *PINK1*-Mutation bestätigt werden. Mein Kollege Jonas Rohr fand heraus, dass auch die genetische Inaktivierung des von Myriocin gehemmten Enzyms, der Serin-Palmitoyl-Transferase, codiert durch das Gen *lace*, zu einer Verbesserung des *pink1*-Phänotyps in *DM* führt. Neue Erkenntnisse meiner nachfolgenden Doktorandin Lisa Frese zeigen, dass auch eine genetische Inaktivierung der Ceramidsynthase von *DM* (codiert durch das Gen *schlank)*, mit konsekutiver Reduktion der Ceramidlevel (Bauer et al. 2009) zu einer Verbesserung der pathologischen

Parameter führt. Dies bestätigt die dargelegten Ergebnisse der pharmakologischen Inhibition des Ceramidstoffwechsels und die Annahme, die Wirksamkeit der Wirkstoffe sei auf die Senkung der Ceramidspiegel zurück zu führen.

Um den letztendlich wohl schädlichen Kompensationsmechanismus der Ceramiderhöhung in *pink1*-Mutanten zu durchbrechen, bieten sich für das Tiermodell also zum jetzigen Zeitpunkt drei therapeutische Möglichkeiten:

- I) die pharmakologische Ceramidsenkung,
- II) die genetische Inaktivierung verschiedener Enzyme der Ceramidsynthese,
- III) die Stimulation der ceramidbedingt gehemmten  $\beta$ -Oxidation.

Die Rolle des Ceramidstoffwechsels für die Pathogenese des M. Parkinson könnte für die Humanmedizin von hoher therapeutischer Relevanz sein. Es bleibt abzuwarten, ob sich die Wirksamkeit der Ceramidinhibition im Kontext translationaler Forschung verifizieren lässt.

Das ebenfalls in dieser Arbeit betrachtete Phänomen der reduzierten Penetranz lässt sich wahrscheinlich auf verschiedene Einflussfaktoren zurückführen. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit keine protektiven genetischen Faktoren identifiziert werden konnten, sollte dieser Fragestellung in Zukunft besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Gegen Ende meiner Arbeit wurde eine Studie publiziert, die neben Umweltfaktoren auch genetische Faktoren identifiziert, welche einen protektiven oder nachteiligen Einfluss auf die Penetranz der Erkrankung haben (Zanon et al. 2018). Diese gilt es zu bestätigen, zu widerlegen oder zu ergänzen. Ein Verständnis dieser Modifikatoren könnte es denkbar werden lassen, das Erkrankungsalter hinauszuzögern oder sogar die Manifestation des M. Parkinson zu verhindern.

Die beschriebenen Methoden zur Untersuchung der *pink1*-Mutation wurden im Rahmen dieser Arbeit auch für die Untersuchung einer erstmals 2017 beschriebenen, bisher nicht näher bezeichneten, neurodegenerativen Erkrankung angewendet. Ihr liegt ursächlich eine Mutation im menschlichen Gen *HACE1* zu Grunde (Hollstein et al. 2015). Ziel war die Identifikation eines homologen Gens in *DM*. Dafür wurden Fliegen mit einer LOF-Mutation in dem Gen mit der höchsten

sequenziellen Übereinstimmung zu *HACE1*, genannt *CG5604*, untersucht. Weder die Beobachtungen noch die Ergebnisse der ATP- und ROS-Messungen sind mit einer Mutation in Verbindung zu bringen, die -zumindest im Menschen- zu einer schwerwiegenden neurologischen Entwicklungsstörung führt. *CG5604* konnte somit nicht als homologes Gen zu *HACE1* bestätigt werden. Ziel bleibt es, ein *Drosophila*-Modell der neu entdeckten neurodegenerativen Erkrankung zu etablieren. Anhand dessen könnten Experimente zum grundlegenden Verständnis der *HACE1*-Mutation und ihren Folgen durchgeführt werden.

Nur ein detailliertes Verständnis neurodegenerativer Prozesse ermöglicht in Zukunft eine bessere Früherkennung und Therapie von Erkankungen wie M. Parkinson. Dies ist von großem Interesse für die betroffenen Patienten und gewinnt in Anbetracht alternder Gesellschaften zunehmend an Bedeutung. Die Erkenntnisse aus dem Tiermodell *DM* sind auf diesem Weg ein entscheidener Schritt (Aryal et al. 2019).

Zusammenfassung

# 5. Zusammenfassung

Bis heute ist die Pathophysiologie der dem Morbus Parkinson zu Grunde liegenden mitochondrialen Dysfunktion nicht hinreichend verstanden. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf einer genetisch bedingten, früh auftretenden Form des Morbus Parkinson. Diese wird durch Mutationen im *PINK1*-Gen verursacht. Da sich das klinische Bild der genetischen und der idiopathischen Form sehr ähneln, geht man von einer vergleichbaren Pathophysiologie aus. Im verwendeten Tiermodell *Drosophila melanogaster* manifestiert sich eine *pink1*-Mutation mit reduzierter Flugfähigkeit, insuffizienter Atmungskette sowie eingeschränktem Abbau von Mitochondrien (Mitophagie). Auf molekularer Ebene führt das zu einem reduzierten ATP-Gehalt und vermehrt freien Sauerstoffradikalen. Dieser zelluläre Stress induziert die Produktion von Ceramiden, da diese die Mitophagie kompensatorisch steigern. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Ceramide in der Pathophysiologie anhand des Tiermodells näher zu untersuchen.

Dafür wurden die *pink1*-Fliegen mit verschiedenen Inhibitoren des Ceramidstoffwechsels behandelt. Zwei der Wirkstoffe führten zu einer Besserung des pathologischen Phänotypes: Myriocin und Zoledronsäure steigerten Komplex I-Aktivität und ATP-Gehalt. Durch die effizientere Atmungskette entstanden weniger freie Radikale und die Expression der Radikal-entgiftenden Superoxiddismutase-2 sank. Eine mögliche Erklärung dafür basiert darauf, dass Ceramide nicht nur die Mitophagie fördern, sondern auch die Atmungskette hemmen. Tritt die stressbedingte Ceramiderhöhung im Sinne eines Kompensationsmechanismus in *pink1*-Mutanten auf, trifft dieser auf eine vorgeschädigte Atmungskette. Der pathologische Phänotyp wird zusätzlich verstärkt. Die pharmakologische Hemmung des Ceramidstoffwechsels reduziert die in *pink1*-Mutanten schädlichen Folgen der Ceramide und stellt somit einen neuen Ansatz in der Therapie dar.

Bei einigen Mutationsträger\*innen manifestiert sich die Erkankung nie oder sehr spät. Auch etwa 10 % der Fliegen sind trotz *pink1*-Mutation weiterhin flugfähig. Dieser reduzierten Penetranz liegen wahrscheinlich verschiedene, auch genetische, Einflüsse zu Grunde. Ein weiteres Ziel war deshalb die Identifikation protektiver genetischer Faktoren mittels *next-generation-sequencing*. Aufgrund von Schwierigkeiten in der vorgeschalteten Kreuzungsreihe konnten voerst keine Faktoren identifiziert werden. Ein neues Kreuzungsschema zur Verfolgung des formulierten Ziels wurde bereits entwickelt.

Zusammenfassung

## 5.1. Summary

To this day, the pathophysiology of the mitochondrial dysfunction underlying Parkinson's disease is not sufficiently understood. This work focuses on a genetically determined, early-onset form of Parkinson's disease. This is caused by mutations in the *PINK1* gene. Since the clinical picture of the genetic and idiopathic form is very similar, a comparable pathophysiology is assumed. In the animal model used here, *Drosophila melanogaster*, a *pink1* mutation manifests with a reduced flying ability, an insufficient respiratory chain and the limited degradation of mitochondria (mitophagy). At the molecular level, this leads to a reduced ATP content and increased free oxygen radicals. The present cellular stress induces the production of ceramides, as these increase mitophagy compensatory. One aim of the present work was to investigate the role of ceramides in pathophysiology using the animal model.

To do so, *pink1* flies were treated with various inhibitors of ceramide metabolism. Two of the substances led to an improvement of the pathological phenotype: myriocin and zoledronic acid increased the complex I activity and the ATP content. The more efficient respiratory chain resulted in fewer free radicals and the expression of the radical detoxifying superoxide dismutase-2 decreased. One possible explanation for this is that ceramides not only promote mitophagy but also inhibit the respiratory chain. If the stress-induced ceramide increase in the sense of a compensation mechanism occurs in *pink1* mutants, it encounters a previously damaged respiratory chain. The pathological phenotype is additionally enhanced. The pharmacological inhibition of the ceramide metabolism reduces the harmful effects of ceramides in *pink1* mutants and represents a new approach in therapy.

In some mutation carriers the disease never manifests itself or manifests very late. It can also be observed in *Drosophila melanogaster* that about 10 % are still able to fly despite the *pink1* mutation. This reduced penetrance is probably due to various influences, including genetic ones. A further aim was therefore the identification of protective genetic factors using *next-generation sequencing*. Due to difficulties in the upstream crossing series, no factors could be identified. A new crossing scheme has already been developed to pursue the formulated objective.

# 6. Literaturverzeichnis

- Abbott, S.K. et al. 2014. Altered ceramide acyl chain length and ceramide synthase gene expression in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 29(4): p.518–526.
- Aryal, B., & Lee, Y. 2019. Disease model organism for Parkinson disease: Drosophila melanogaster. *BMB Reports* 52(4): p.250–258.
- Arzneimittelkommision der deutschen Ärzteschaft. 2011. Gilenya ® (Fingolimod) Pharmakologie und klinische Studien. Available at: https://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/2011021-Gilenya.pdf [Accessed September 23, 2019].
- Babenko, N.A., Garkavenko, V. V., Storozhenko, G. V., & Timofiychuk, O.A. 2016.
  Role of acid sphingomyelinase in the age-dependent dysregulation of sphingolipids turnover in the tissues of rats. *General physiology and biophysics* 35(02): p.195–205.
- Barbeau, A. 1969. L-dopa therapy in Parkinson's disease: a critical review of nine years' experience. *Canadian Medical Association journal* 101(13): p.59–68.
- Barzilai, A., & Melamed, E. 2003. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine* 9(3): p.126–132.
- Basil, A.H. et al. 2017. AF-6 Protects Against Dopaminergic Dysfunction and Mitochondrial Abnormalities in Drosophila Models of Parkinson's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience* 11: p.241.
- Bauer, R. et al. 2009. Schlank, a member of the ceramide synthase family controls growth and body fat in Drosophila. *EMBO Journal* 28(23): p.3706–3716.
- Bikman, B.T., & Summers, S.A. 2011. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 121: p.4222– 430.
- Biosa, A. et al. 2018. Superoxide dismutating molecules rescue the toxic effects of PINK1 and parkin loss. *Human molecular genetics* 27(9): p.1618–1629.

- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V.R. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy* 9(July): p.91.
- Bonifati, V. et al. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299(5604): p.256–259.
- Borenstein, M., Hedges, L. V., Higgins, J.P.T., & Rothstein, H.R. 2009. Introduction to Meta-Analysis.
- Bortz, J., & Lienert, G.A. 2008. *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung :* Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben ; mit 97 Tabellen sowie zahlreichen Formeln. Springer.
- Brinkmann, V. 2002. The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277(24): p.21453– 21457.
- Castro, B., Prieto, M., & Silva, L. 2014. Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog Lipid Res.* 54:53-67.
- Chen, C., Turnbull, D.M., & Reeve, A.K. 2019. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease—Cause or Consequence? *Biology* 8(2): p.38.
- Clark, I.E. et al. 2006. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441(June): p.1162–1166.
- Cooper, D.N., Krawczak, M., Polychronakos, C., Tyler-Smith, C., & Kehrer-Sawatzki, H. 2013. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Human Genetics* 132(10): p.1077–1130.
- Cornelissen, T. et al. 2018. Deficiency of parkin and PINK1 impairs age-dependent mitophagy in Drosophila. *eLife* 7.
- Dany, M., & Ogretmen, B. 2015. Ceramide induced mitophagy and tumor suppression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853(10): p.2834–2845.

- Deng, H., Wang, P., & Jankovic, J. 2018. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews* 42: p.72–85.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 2016. DGN-Leitlinie: Idiopathisches Parkinson-Syndrom.
- DiMauro, S., & Schon, E.A. 2003. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *New England Journal of Medicine* 348(26): p.2656–2668.
- Doktor, B., Damulewicz, M., Krzeptowski, W., Bednarczyk, B., & Pyza, E.M. 2018.
  Effects of PINK1 mutation on synapses and behavior in the brain of
  Drosophila melanogaster. *Acta neurobiologiae experimentalis* 78(3): p.231–241.
- Drake, M.T., Clarke, B.L., & Khosla, S. 2008. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic proceedings* 83(9): p.1032–45.
- Dröge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82(1).
- Durcan, T.M., & Fon, E.A. 2015. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes & development* 29(10): p.989–99.
- Eigentler A. et al. 2012. Laboratory Protocol: Citrate Synthase A Mitochondrial Marker Enzyme.
- Elstein, D. et al. 2004. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, Nbutyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 27(6): p.757–766.
- European Medicines Agency. 2015. Zoledronic Acid: European public assessment reports. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zometa [Accessed July 7, 2019].
- European Medicines Agency. 2018. Gilenya. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medi cines/002202/human\_med\_001433.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 [Accessed July 7, 2019].

Fedorowicz, M.A. et al. 2014. Cytosolic cleaved PINK1 represses Parkin translocation to mitochondria and mitophagy. *EMBO reports* 15(1): p.86–93.

- Finegold, D. 2019. Factors Affecting Gene Expression. Merck Manual Professional Version. Available at: https://www.merckmanuals.com/professional/specialsubjects/general-principles-of-medical-genetics/factors-affecting-geneexpression?query=Inheritance of Single-Gene Disorders#v1123433 [Accessed January 4, 2020].
- García-Ruiz, C., Colell, A., Marí M, Morales, A., & Fernández-Checa, J. 1997.
  Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 272: p.11369–77.
- Gautier, C., Kitada, T., & Shen, J. 2008. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(113): p.64–69.
- Ge, P., Dawson, V.L., & Dawson, T.M. 2020. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration* 15(1): p.20.
- Geisler, S. et al. 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* 12: p.119–131.
- Gelb, D.J., Oliver, E., & Gilman, S. 1999. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of Neurology* 56(1): p.33–39.
- Greenamyre, J.T., Mackenzie, G., Peng, T.-I., & Stephans, S.E. 1999.
  Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Symp* 66: p.85–97.
- Grünewald, A., Kumar, K.R., & Sue, C.M. 2019. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 177: p.73–93.
- Gudz, T.I., Tserng, K.-Y., & Hoppel, C.L. 1997. Direct Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain Complex III by Cell-permeable Ceramide. *The Journal of*

Literaturverzeichnis

biological chemistry 272(24): p.154–158.

- Harper, J., Ordureau, A., & Heo, J.M. 2018. Building and decoding ubiquitin hains for mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(2): p.93–108.
- Harris, M., Taylor, G., & Taylor, J. 2007. *Startwissen Mathematik und Statistik : ein Crash-Kurs für Studierende der Biowissenschaften und Medizin*. Elsevier, Spektrum Akad. Verl.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J., & Grimm, M.O.W. 2007. Alzheimer's disease: the lipid connection. *Journal of Neurochemistry* 103(s1): p.159–170.
- Hirsch, E., Graybiel, A.M., & Agid, Y.A. 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334(6180): p.345–8.
- Hollstein, R. et al. 2015. HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome. *Journal of Medical Genetics*: p.jmedgenet-2015-103344.
- Jellinger. 2005. Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) eine aktuelle Übersicht. Journal für Neurologie Neurochirurgie und Psychiatrie 6(1): p.9–18.
- Jenner, P., & Olanow, C.W. 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47(6 Suppl 3): p.S161-70.
- Jennings, B.H. 2011. Drosophila a versatile model in biology & amp; medicine. Materials Today 14(5): p.190–195.
- Julienne, H., Buhl, E., Leslie, D.S., & Hodge, J.J.L. 2017. Drosophila PINK1 and parkin loss-of-function mutants display a range of non-motor Parkinson's disease phenotypes. *Neurobiology of disease* 104: p.15–23.
- Kasten, M. et al. 2018. Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review. *Movement Disorders* 33(5): p.730–741.
- Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. 2008. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for

autophagosome formation. *Molecular biology of the cell* 19(5): p.2039–2050.

- Khatri, B.O. 2016. Fingolimod in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: long-term experience and an update on the clinical evidence. *Therapeutic advances in neurological disorders* 9(2): p.130–47.
- Kitada, T. et al. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392(6676): p.605–608.
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., & Hannun, Y.A. 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular Signalling* 20(6): p.1010–1018.
- Kogot-Levin, A., & Saada, A. 2014. Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie* 100:88–94.
- Kota, V., & Hama, H. 2014. 2'-Hydroxy ceramide in membrane homeostasis and cell signaling. *Adv Biol Regul.* 54:223–30.
- Kurz, J., Parnham, M.J., Geisslinger, G., & Schiffmann, S. 2019. Ceramides as Novel Disease Biomarkers. *Trends in Molecular Medicine* 25(1): p.20–32.
- Lazarou, M., Jin, S.M., Kane, L.A., & Youle, R.J. 2012. Role of PINK1 Binding to the TOM Complex and Alternate Intracellular Membranes in Recruitment and Activation of the E3 Ligase Parkin. *Developmental Cell* 22(2): p.320–333.
- Leites, E.P., & Morais, V.A. 2018. Mitochondrial quality control pathways: PINK1 acts as a gatekeeper. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500(1): p.45–50.
- Lemasters, J.J. 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Research* 8(1): p.3–5.
- Lin, G. et al. 2018. Phospholipase PLA2G6, a Parkinsonism-Associated Gene, Affects Vps26 and Vps35, Retromer Function, and Ceramide Levels, Similar to α-Synuclein Gain. *Cell Metabolism* 28(4): p.605-618.e6.

Ma, P., Yun, J., Deng, H., & Guo, M. 2018. Atg1 mediated autophagy suppresses

tissue degeneration in *pink1/parkin* mutants by promoting mitochondrial fission in Drosophila E. L. F. Holzbaur (ed). *Molecular Biology of the Cell*: p.mbc.E18-04-0243.

- Marino, S., Hogue, I.B., Ray, C.J., & Kirschner, D.E. 2008. A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology. *Journal of theoretical biology* 254(1): p.178–96.
- Marras, C. et al. 2016. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Movement Disorders* 31(4): p.436–457.
- Matheoud, D. et al. 2019. Parkinson's disease related proteins PINK1 and Parkin are major regulators of the immune system. *The Journal of Immunology* 202(1 Supplement).
- Matloubian, M. et al. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427(6972): p.355–60.
- Matsuda, N. et al. 2010. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology* 189(2): p.211–21.
- McCord, J.M., & Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244(22): p.6049–55.
- Mielke, M.M. et al. 2013. Plasma Ceramide and Glucosylceramide Metabolism Is Altered in Sporadic Parkinson's Disease and Associated with Cognitive Impairment: A Pilot Study D. Blum (ed). *PLoS ONE* 8(9): p.e73094.
- Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., & Kawasaki, T. 1995. Serine Palmitoyltransferase Is the Primary Target of a Sphingosine-like Immunosuppressant, ISP-1/Myriocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 211(2): p.396–403.
- Morais, V.A. et al. 2009. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO molecular*

*medicine* 1(2): p.99–111.

Morais, V.A. et al. 2014. PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. *Science* 344(6180): p.203–207.

Napoli, K.L. 2000. The FTY720 story. *Therapeutic drug monitoring* 22(1): p.47–51.

- Okatsu, K. et al. 2012. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature Communications* 3.
- Okatsu, K. et al. 2018. Structural insights into ubiquitin phosphorylation by PINK1. *Scientific reports* 8(1): p.10382.
- De Paepe, B. et al. 2006. Diagnostic value of immunostaining in cultured skin fibroblasts from patients with oxidative phosphorylation defects. *Pediatric Research* 59(1): p.2–6.
- Pandey, U.B., & Nichols, C.D. 2011. Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews* 63(2): p.411–36.
- Di Paola, M., Cocco, T., & Lorusso, M. 2000. Ceramide Interaction with the Respiratory Chain of Heart Mitochondria. *Biochemistry* 22(66): p.60–68.
- Park, J. et al. 2006. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441(June): p.1157–1161.
- Pastores, G.M., & Barnett, N.L. 2003. Substrate reduction therapy: miglustat as a remedy for symptomatic patients with Gaucher disease type 1. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 12(2): p.273–281.
- Pastores, G.M., Giraldo, P., Chérin, P., & Mehta, A. 2009. Goal-oriented therapy with miglustat in Gaucher disease. *Current Medical Research and Opinion* 25(1): p.23–37.
- Patterson, M.C., Vecchio, D., Prady, H., Abel, L., & Wraith, J.E. 2007. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *The*

Literaturverzeichnis

Lancet Neurology 6(9): p.765–772.

- Pilsl, A., & Winklhofer, K.F. 2012. Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* 123(2): p.173–88.
- Plotegher, N., Bubacco, L., Greggio, E., & Civiero, L. 2019. Ceramides in Parkinson's Disease: From Recent Evidence to New Hypotheses. *Frontiers in Neuroscience* 13(APR): p.330.
- Pollard, A.K., Craig, E.L., & Chakrabarti, L. 2016. Mitochondrial complex 1 activity measured by spectrophotometry is reduced across all brain regions in ageing and more specifically in neurodegeneration. *PLoS ONE* 11(6).
- Poole, A.C. et al. 2008. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(5): p.1638–1643.
- Puschmann, A. 2013. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: Clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism and Related Disorders* 19(4): p.407–415.
- Raichur, S. et al. 2014. CerS2 Haploinsufficiency Inhibits β-Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 20(4): p.687–695.
- Ray Dorsey, E. et al. 2018. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 17(11): p.939–953.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome research* 11(6): p.1114–25.
- Roote, J., & Prokop, A. 2013. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for Drosophila genetics. *G3 (Bethesda, Md.)* 3(2): p.353–8.
- Roth, A.G. et al. 2009. Potent and Selective Inhibition of Acid Sphingomyelinase by Bisphosphonates. *Angewandte Chemie International Edition* 48(41):

Literaturverzeichnis

p.7560-7563.

- Saltelli, A., Tarantola, S., & Chan, K.P.-S. 1999. A Quantitative Model-Independent Method for Global Sensitivity Analysis of Model Output. *Technometrics* 41(1): p.39–56.
- Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science (New York, N.Y.)* 283(5407):
- Schwarze, S.R., Weindruch, R., & Aiken, J.M. 1998. Oxidative stress and aging reduce COX I RNA and cytochrome oxidase activity in Drosophila. *Free Radical Biology and Medicine* 25(6): p.740–747.
- Sentelle, R.D. et al. 2012. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nature Chemical Biology* 8(10): p.831–838.
- Seok, M.J. et al. 2010. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *Journal of cell biology* 191(5): p.933– 942.
- Shahmoradian, S.H. et al. 2019. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nature Neuroscience* 22(7): p.1099–1109.
- Snijder, T.A.B., & Bosker, R.J. 1999. *Multilevel Analysis*.
- Spektrum.de. Protonenmotorische Kraft. *Lexikon der Biologie*. Available at: https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/protonenmotorische-kraft/54308 [Accessed April 10, 2018].
- Spillantini, M.G. et al. 1997. α-synuclein in Lewy bodies [8]. *Nature* 388(6645): p.839–840.
- Strader, C.R., Pearce, C.J., & Oberlies, N.H. 2011. Fingolimod (FTY720): A Recently Approved Multiple Sclerosis Drug Based on a Fungal Secondary Metabolite. *Journal of Natural Products* 74(4): p.900–907.
- Thompson, S.G., & Higgins, J.P.T. 2002. How should meta-regression analyses be undertaken and interpreted? *Statistics in Medicine* 21(11): p.1559–1573.
- Torres-Odio, S. et al. 2017. Progression of pathology in PINK1-deficient mouse brain from splicing via ubiquitination, ER stress, and mitophagy changes to neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* 14(1): p.154–154.
- Treiber, A., Morand, O., & Clozel, M. 2007. The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. *Xenobiotica* 37(3): p.298–314.
- Turpin, S.M. et al. 2014. Obesity-Induced CerS6-Dependent C16:0 Ceramide Production Promotes Weight Gain and Glucose Intolerance. *Cell Metabolism* 20(4): p.678–686.
- Valente, E.M. et al. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)* 304(5674): p.1158–60.
- Valko, M. et al. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1): p.44–84.
- Vilain, S. et al. 2012. The yeast complex I equivalent NADH dehydrogenase rescues pink1 mutants. *PLoS genetics* 8(1): p.e1002456.
- Vos, M. 2012. Electron transport chain defects as a culprit in a Parkinson fly model. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
- Vos, M. et al. 2012. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science (New York, N.Y.)* 336(6086): p.1306–10.
- Vos, M. 2013. Near-Infrared 808 nm Light Boosts Complex IVDependent Respiration and Rescues a Parkinson-Related pink1 Model. *PloS one*.
- Vos, M. et al. 2017. Cardiolipin promotes electron transport between ubiquinone and complex I to rescue *PINK1* deficiency. *The Journal of Cell Biology*: p.jcb.201511044.
- Wadsworth, J.M. et al. 2013. The chemical basis of serine palmitoyltransferase inhibition by myriocin. *Journal of the American Chemical Society* 135(38): p.14276–85.

- Wu, Z., Wu, A., Dong, J., Sigears, A., & Lu, B. 2018. Grape skin extract improves muscle function and extends lifespan of a Drosophila model of Parkinson's disease through activation of mitophagy. *Experimental gerontology* 113: p.10– 17.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G.J.M. 2019. The Role of Lipids in Parkinson's Disease. *Cells* 8(1): p.27.
- Xu, C., & Gertner, G. 2011. Understanding and comparisons of different sampling approaches for the Fourier Amplitudes Sensitivity Test (FAST). *Computational statistics & data analysis* 55(1): p.184–198.
- Yang, Y. et al. 2006. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(28): p.10793– 10798.
- Zanon, A., Pramstaller, P.P., Hicks, A.A., & Pichler, I. 2018. Environmental and Genetic Variables Influencing Mitochondrial Health and Parkinson's Disease Penetrance. *Parkinson's disease* 2018: p.8684906.
- Zi, Z. 2011. Sensitivity analysis approaches applied to systems biology models. *IET Systems Biology* 5(6): p.336–346.
- Zigdon, H. et al. 2013. Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry* 288(7): p.4947–4956.

# 7. Anhang7.1. Liste aller Geräte und Materialien

### Geräte:

| Gerät                      | Bezeichnung                                | Hersteller                                |  |
|----------------------------|--|---|--|
| Mikroplatten-Leser         | Synergy HT Multi-Mode<br>Microplate Reader | BioTek,Winooski, USA                      |  |
| Zentrifuge                 | Centrifuge Heraeus Fresco 21               | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham, USA |  |
| Mikroskop                  | Mikroskop SMZ745                           | Nikon, Tokio, JPN                         |  |
| Mikroskoplampe             | KL1600 LED                                 | Schott, Mainz, DEU                        |  |
| elektronisches<br>Rührwerk | VOS 14                                     | VWR, Darmstadt, DEU                       |  |
| 25°C Inkubator             | Cooled Incubator MIR-254-PE                | Panasonic, Kadoma, Japan                  |  |
| Kochplatte                 | Kochplatte                                 | Rommelsbacher, Dinkelsbühl,<br>DEU        |  |
| Waage                      | EG 0,02g-420g                              | Kern & Sohn, Balingen, DEU                |  |
| Handmixer                  | Pellet Pestle Motor                        | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham, USA |  |
| Pippetierhilfe             | Integra Pipetboy 2                         | INTEGRA Biosciences Corp.,<br>Hudson, USA |  |
| Rotator                    | VWR Tube Rotator EU Plug                   | VWR, Darmstadt, DEU                       |  |
| -80°C Schrank              | Forma 88000 Series                         | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham, USA |  |
| Sicherheitswerkbank        | HERAsafe®                                  | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham, USA |  |
| Zellzähler                 | Countess® Automated Cell<br>Counter        | Life Technologies, Carlsbad,<br>USA       |  |
| Zentrifuge                 | Multifuge 1 S-R                            | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham, USA |  |
| Zentrifuge                 | Microfuge 22R                              | Beckman Coulter, Brea, USA                |  |
| Präzisionswaage            | Kern ACJ/ACS 80-4                          | Kern & Sohn, Balingen, DEU                |  |
| Kombi-Vortex-              | PC\/ 2400                                  | Grant-bio, Grant instruments,             |  |
| Zentrifuge                 | 1012400                                    | Cambridge, UK                             |  |
| Pipetten                   | 10, 20, 100, 200, 1000 ml                  | Eppendorf, Hamburg, DEU                   |  |
| Pipette                    | 5ml Abimed                                 | Labmate, New Jersey, USA                  |  |
| Pipettierhilfe             | Pipetus®                                   | Hirschmann,                               |  |

|                 |                | Neckartenzlingen, DEU    |
|-----------------|----------------|--------------------------|
| Pipettierhilfe  | accu-jet® pro  | Brand, Wertheim, DEU     |
| Schüttler       | Rotamax 120    | Heidolph, Schwabach, DEU |
| Spannungsquelle | PowerPac HC    | Bio-Rad, Hercules, USA   |
| Mikroskop       | Axiovert 200M  | Zeiss, Oberkochen, DEU   |
| Dispenser       | simplex 1-25ml | Vitlab, Grossostheim     |
|                 |                |                          |

Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Geräte

#### Software:

| Software          | Bezeichnung              | Hersteller                   |
|-------------------|--------------------------|------------------------------|
| Bildbearbeitungs- | ImageJ                   | NIH, Bethesda, USA           |
| programm          |                          |                              |
| Office-Packet     | Microsoft Office 2013    | Microsoft, Redmond, USA      |
| Statistikorogramm | GraphPad Prism Version 5 | GraphPad Software, La Jolla, |
| Claucinipiogramm  |                          | USA                          |

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Software

### Wirkstoffe:

| Handelsname   | Wirkstoff                      | Hersteller                    |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Myriocin      | Myriocin from Mycelia sterilia | Sigma-aldrich, St. Louis, USA |
| Miglustat     | N-Butyldesoxynojirimycin.HCL   | Enzo, Farmingdale, USA        |
| FTY720        | FTY720                         | Sigma-aldrich, St. Louis, USA |
| Zoledronsäure | Zoledronic Acid                | USP, Rockville, USA           |

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Wirkstoffe und deren Hersteller

### Verbrauchsmaterialien:

| Material        | Bezeichnung           | Hersteller                 |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|
| PCR-Gefäß       | Multiply®-Pro 0,5ml   | Sarstedt, Nümbrecht, DEU   |
|                 | Biosphere®            |                            |
| Pipettenspitzen | Biosphere®filtertips  | Sarstedt, Nümbrecht, DEU   |
| Pipettenspitzen | 1-5ml Makro II        | T.H. Geyer, Renningen, DEU |
| Reaktionsgefäß  | Röhrchen 15/50 ml     | Sarstedt, Nümbrecht, DEU   |
| Reaktionsgefäß  | SafeSeal Gefäß 2ml    | Sarstedt, Nümbrecht, DEU   |
| Reaktionsgefäß  | Biosphere® 0,5/1,5 ml | Sarstedt, Nümbrecht, DEU   |
| Serologische    | 5, 10, 25, 50 ml      | Sarstedt, Nümbrecht, DEU   |
| Pipetten        |                       |                            |

| Vakuumfilter      | rapid - Filtermax 250 ml/500 ml        | TPP®, Trasadingen, CHE       |
|-------------------|--|------------------------------|
| Zellkulturplatten | Cellstar® 6-/12-Well                   | Greiner Bio-One,             |
|                   |  | Kremsmünster, AUT            |
| Zellkulturplatten | TC-Platte 24-Well                      | Sarstedt, Nümbrecht, DEU     |
| Zellkulturflasche | TC-Flasche T175                        | Sarstedt, Nümbrecht, DEU     |
| Zellkulturplatten | Cell Culture Dish                      | Corning®, Corning, USA       |
|                   | 100mmx20mm Style                       |                              |
| Zellkulturplatten | 96-well Cell Culture Cluster           | Corning®, Corning, USA       |
| Microplatte       | 96-well, weiss, lumitrac               | greiner Bio-one,             |
|                   |  | Frickenhausen, DEU           |
| Microplatte       | 96-well, schwarz, µClear®              | greiner Bio-one,             |
|                   |  | Frickenhausen, DEU           |
| Watte             | Cotton balls 51-101/102                | Genesee Scientific, San      |
|                   |  | Diego, USA                   |
| Drosophila-Gefäße | 16/68ml                                | greiner Bio-one,             |
|                   |  | Frickenhausen, DEU           |
| Gel               | NuPAGE <sup>™</sup> 4-12% Bis-Tris-Gel | Novex® by Life Technologies, |
|                   |  | Carlsbad, USA                |

Tabelle 10: Auflistung der alltäglichen Verbrauchsmaterialien

### Zutaten des Fliegenfutters:

| Zutat                                      | Hersteller                       |
|--|----------------------------------|
| feine Speisestärke                         | Dr. Oetker, Bielefeld, DEU       |
| Bacto™Agar                                 | BD, Sparks, USA                  |
| Propionic Acid                             | Sigma-aldrich, St. Louis, USA    |
| Methyl-4-hydroxybenzoat                    | Sigma-aldrich, St. Louis, USA    |
| Dextrose                                   | Sigma-aldrich, St. Louis, USA    |
| Zuckerrohr Melasse                         | Rapunzel, Legau, DEU             |
| Backhefe                                   | gut&günstig, EDEKA, Hamburg, DEU |
| Ethanol                                    | J.T.Baker®, Center Valley, USA   |
| Tabelle 11: Die Zutaten des Fliegenfutters |                                  |

### Kits, Lösungen und Puffer:

| Name                                      | Hersteller                             |
|---|--|
| DC™ Protein Assay Kit                     | Bio-Rad, Hercules, USA                 |
| Pierce <sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

| DCFDA – Cellular Reactive Oxygen     | Abcam,Cambridge, UK                                     |
|--------------------------------------|---|
| Species Detection Assay Kit          |   |
| ATP Bioluminiscence Assay Kit CLS II | Roche,Rotkreuz, CHE                                     |
| Super Signal West Pico               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                  |
| Chemiluminiscence Substrate          |   |
| NuPage™® LDS Sample Buffer (4x)      | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham, USA |
| NuPage™® MES SDS Running Buffer      | Novex® by Life Technologies, Carlsbad,                  |
| (20x)                                | USA   |
| NuPage™® Transfer Buffer (20x)       | Novex® by Life Technologies, Carlsbad,                  |
|                                      | USA   |
| StemPro® Accutase®                   | Gibco® by Life Technologies, Carlsbad,                  |
| Zelldissoziationsreagenz             | USA   |
| Guanidin/ATP-Extraktionspuffer:      | HPLC Wasser, Tris [100mM], EDTA [4mM],                  |
|                                      | Guanidin-HCI [6M]                                       |
| Mitochondrial Isolation Buffer:      | Saccharose [250mM], Tris-HCI [100mM],                   |
|                                      | MgCl <sub>2</sub> [15mM], HPLC Wasser, pH=7,4,          |
|                                      | vakuumsterilisiert, 1 Tablette                          |
|                                      | Proteaseinhibitor je 10 ml Lösung                       |
| Ripa-Puffer:                         | Tris-Hcl [1M], NaCl [2M], NP-40 [10%],                  |
|                                      | DOC [10%], SDS [1%]                                     |
| TBS 10x:                             | 1L Aqua dest., 24,2g Tris [50mM], 90g                   |
|                                      | NaCI [150mM], Anpassung mit HCI [1M] bis                |
|                                      | pH=7,5  |
| TBS-T:                               | TBS [10x], HPLC Wasser, Tween 20                        |

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Kits, Lösungen und Puffer

### Chemikalien:

| Name                       | Hersteller                              |
|----------------------------|---|
| Dimethyl Sulfoxide         | Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA          |
| Methanol                   | J.T.Baker®, Center Valley, USA          |
| Ethanol 70%, vergällt      | CHEMSOLUTE® by T.H. Geyer,              |
|                            | Renningen, DEU                          |
| HPLC-Wasser Gradient Grade | J.T.Baker®, Center Valley, USA          |
| NuPage™® Antioxidant       | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, |
|                            | Waltham, USA                            |
| Tris                       | EMD Millipore, Billerica, USA           |

| Triton® X-100                   | AppliChem, Darmstadt, DEU      |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Tween 20                        | Bio-Rad, Hercules, USA         |
| Acetyl Coenzym A                | Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA |
| Decylubiquinone                 | Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA |
| Dithiothreitol (DTT)            | Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA |
| Proteaseinhibitor complete Mini | Roche Diagnostics GmbH         |
|                                 |                                |

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Chemikalien

### Antikörper:

| Antigen               | Wirtspezies | Verdünnung | Hersteller                               |
|-----------------------|-------------|------------|--|
| Primäre Antikörper    |             |            |  |
| Anti-β-Actin          | Maus IgG    | 1:1000     | Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA           |
| Anti-SOD <sub>2</sub> | Hase IgG    | 1:500      | Santa Cruz Biotechnology, Dallas,<br>USA |
| Sekundäre             |             |            |  |
| Antikörper            |             |            |  |
| Maus IgG              | Ziege       | 1:10.000   | Santa Cruz Biotechnology, Dallas,<br>USA |
| Hase IgG              | Ziege       | 1:10.000   | Santa Cruz Biotechnology, Dallas,<br>USA |

Tabelle 14: Angaben zu den verwendeten Antikörpern







Die Grafiken auf der linken Seite zeigen die Rohdaten der ATP/Protein-Messung nach 3 (A) oder 7 (B) Tagen. Auf der rechten Seite sind die nach der Mittelwertbereinigung entstandenen ATP/Protein-Messpunkte ebenfalls nach 3 (C) und 7 (D) Tagen vergleichbar abgebildet. Durch die Mittelwertbereinigung ergeben sich signifikante Unterschiede der ATP-Werte zwischen der RV- und der B9-Kontrolle nach 3 (p =0,0028\*\*) und 7 Tagen (p =0,0392\*). Der Wirkstoff führt zu keiner signifikanten ATP-Steigerung nach Mittelwertbereinigung. Genaue p-Werte sind folgender Tabelle 15 zu entnehmen.

|                        | Vor Mittelwertbereinigung | Nach Mittelwertbereinigung |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 3 Tage RV/B9-Kontrolle | p = 0,116                 | p = 0,0028**               |
| Mann-Whithney U        |                           |                            |
| 3 Tage Wirkstoff       | p = 0,8760                | p = 0,8259                 |
| Kruskl-Wallis Test     |                           |                            |
| 7 Tage RV/B9-Kontrolle | p = 0,6009                | p = 0,0392*                |
| Mann-Whithney U        |                           |                            |
| 7 Tage Wirkstoff       | p = 0,8070                | p = 0,4631                 |
| Kruskl-Wallis Test     |                           |                            |

Tabelle 15: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Myriocin



Abbildung 20: ATP-Werte des Wirkstofftests FTY720 vor & nach Mittelwertbereinigung Die Grafiken auf der linken Seite zeigen die Rohdaten der ATP/Protein-Messung nach 3 (A) oder 7 (B) Tagen auf dem Kontrollmedium oder FTY720. Auf der rechten Seite sind die nach der Mittelwertbereinigung entstandenen ATP/Protein-Messpunkte ebenfalls nach 3 (C) und 7 (D) Tagen vergleichbar abgebildet. Nach der Mittelwertbereinigung ergeben sich signifikante Unterschiede der ATP-Werte zwischen der RV- und der B9-Kontrolle nach 7 Tagen (p = 0,0009\*\*\*). Der Wirkstoff führt weder vor noch nach Mittelwertbereinigung zu einer signifikanten ATP-Steigerung. Genaue p-Werte sind folgender Tabelle 16 zu entnehmen.

|                        | Vor Mittelwertbereinigung | Nach Mittelwertbereinigung |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 3 Tage RV/B9-Kontrolle | n – 0 3408                | n – 0.0531                 |
| Mann-Whithney U        | p = 0,0400                | p = 0,000 i                |
| 3 Tage Wirkstoff       | p = 0.0808                | p = 0,0737                 |
| Kruskl-Wallis Test     | p = 0,9898                |                            |
| 7 Tage RV/B9-Kontrolle | p = 0,0606                | p = 0,0009***              |
| Mann-Whithney U        |                           |                            |
| 7 Tage Wirkstoff       | p = 0,6573                | p = 0,5335                 |
| Kruskl-Wallis Test     |                           |                            |

Tabelle 16: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests FTY720





|                        | Vor Mittelwertbereinigung | Nach Mittelwertbereinigung |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 3 Tage RV/B9-Kontrolle | n – 0 3787                | n – 0.0102*                |
| Mann-Whithney U        | p = 0,3787                | p = 0,0102                 |
| 3 Tage Wirkstoff       | n = 0.9725                | n = 0.2981                 |
| Kruskl-Wallis Test     | p = 0,8725                | p = 0,2001                 |
| 7 Tage RV/B9-Kontrolle | p = 0,0404*               | p = 0,0002***              |
| Mann-Whithney U        |                           |                            |
| 7 Tage Wirkstoff       | n 0.1020                  | n - 0.0166*                |
| Mann-Whithney U        | p = 0,1939                | p = 0,0100                 |

Tabelle 17: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Miglustat

# 7.3. ATP-Ergebnisse der RV-Kontrollfliegen vor und nach der Mittelwertbereinigung



Abbildung 22: ATP-Werte gesunder RV-Fliegen nach Testung des Wirkstoffes Myriocin Die Grafiken auf der linken Seite zeigen die Rohdaten der ATP/Protein-Messung nach 3 (A) oder 7 (B) Tagen auf dem Kontrollmedium oder Myriocin in verschiedenen Konzentrationen. Auf der rechten Seite sind die nach der Mittelwertbereinigung entstandenen ATP/Protein-Messpunkte ebenfalls nach 3 (C) und 7 (D) Tagen vergleichbar abgebildet. Genaue p-Werte sind folgender Tabelle 18 zu entnehmen.

|                    | Vor Mittelwertbereinigung | Nach Mittelwertbereinigung |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|
| 3 Tage Wirkstoff   | p = 0,5885                | p = 0,1815                 |
| Kruskl-Wallis Test |                           |                            |
| 7 Tage Wirkstoff   | p = 0,9288                | p = 0,8643                 |
| Kruskl-Wallis Test |                           |                            |

 Tabelle 18: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Myriocin an RV-Fliegen



Abbildung 23: ATP-Werte gesunder RV-Fliegen nach Testung des Wirkstoffes FTY720 Die Grafiken auf der linken Seite zeigen die Rohdaten der ATP/Protein-Messung nach 3 (A) oder 7 (B) Tagen auf dem Kontrollmedium oder FTY720 in verschiedenen Konzentrationen. Auf der rechten Seite sind die nach der Mittelwertbereinigung entstandenen ATP/Protein-Messpunkte ebenfalls nach 3 (C) und 7 (D) Tagen vergleichbar abgebildet. Nach dreitägiger Behandlung mit FTY720 zeigt sich ein dosisabhängiger, signifikanter Anstieg der ATP-Level (p = 0,0001\*\*\*). Die siebentägige Behandlung kann diese Wirkung nicht bestätigen. Genaue p-Werte sind folgender Tabelle 19 zu entnehmen.

|                    | Vor Mittelwertbereinigung | Nach Mittelwertbereinigung |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|
| 3 Tage Wirkstoff   | p = 0,8819                | p = 0,0001***              |
| Kruskl-Wallis Test |                           |                            |
| 7 Tage Wirkstoff   | p = 0,0491*               | p = 0,9994                 |
| Kruskl-Wallis Test |                           |                            |

Tabelle 19: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests FTY720 an RV-Fliegen





|                    | Vor Mittelwertbereinigung | Nach Mittelwertbereinigung |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|
| 3 Tage Wirkstoff   | p = 0,9244                | p = 0,1874                 |
| Kruskl-Wallis Test |                           |                            |
| 7 Tage Wirkstoff   | p = 0,6053                | p = 0,1467                 |
| Kruskl-Wallis Test |                           |                            |

Tabelle 20: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Miglustat an RV-Fliegen

Anhang





|                    | vor mittelwertbereinigung | Nach Mittelwertbereinigung |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|
| 3 Tage Wirkstoff   | p = 0,9781                | p = 0,0310*                |
| Kruskl-Wallis Test |                           |                            |
| 7 Tage Wirkstoff   | p = 0,8785                | p = 0,7984                 |
| Mann-Whitney-U     |                           |                            |

Tabelle 21: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Zoledronsäure an RV-Fliegen

### 7.4. Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 1: Die Funktion von Balancer-Chromosomen am Beispiel der <i>pink1</i> <sup>B9</sup> -Mutation | 3  |
|---|----|
| Abbildung 2: Die Rolle von PINK1 im PINK1/Parkin-Signalweg  | 6  |
| Abbildung 3: Die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran                                       | 7  |
| Abbildung 4: Der Ceramidstoffwechsel  | 12 |
| Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der Flugtests und ATP-Messungen  | 16 |
| Abbildung 6: Die Wirkstoffe hemmen verschiedene Stufen des Ceramidstoffwechsels                         | 25 |
| Abbildung 7: Die Ergebnisse des Wirkstofftests von Myriocin   | 26 |
| Abbildung 8: Die Ergebnisse des Wirkstofftests der Negativkontrolle FTY720                              | 28 |
| Abbildung 9: Die Ergebnisse des Wirkstofftests von Miglustat  | 30 |
| Abbildung 10: Die Ergebnisse des Wirkstofftest von Zoledronsäure  | 32 |
| Abbildung 11: Der Gehalt an Superoxiddismutase-2 in RV- und B9-Fliegen                                  | 34 |
| Abbildung 12: Streuung der ATP-Rohwerte des dreitägigen Wirkstofftests von Zoledronsäure                | 35 |
| Abbildung 13: Bereinigte ATP-Messwerte des Wirkstofftests von Zoledronsäure                             | 36 |
| Abbildung 14: ATP-Werte des Wirkstofftests Zoledronsäure vor & nach Mittelwertbereinigung               | 37 |
| Abbildung 15: Flugtests und ATP-Messungen weisen auf reduzierte Penetranz hin                           | 40 |
| Abbildung 16: Kreuzungsschema für die Züchtung pink-mutierter männlicher Versuchsfliegen                | 41 |
| Abbildung 17: Möglicher Erklärungsansatz für die Rolle des Lipidstoffwechsels in pink1-Fliegen .        | 46 |
| Abbildung 18: Überarbeitetes Kreuzungsschema für die Züchtung der pink1-Versuchsfliegen                 | 51 |
| Abbildung 19: ATP-Werte des Wirkstofftests Myriocin vor & nach Mittelwertbereinigung                    | 74 |
| Abbildung 20: ATP-Werte des Wirkstofftests FTY720 vor & nach Mittelwertbereinigung                      | 76 |
| Abbildung 21: ATP-Werte des Wirkstofftests Miglustat vor & nach Mittelwertbereinigung                   | 78 |
| Abbildung 22: ATP-Werte gesunder RV-Fliegen nach Testung des Wirkstoffes Myriocin                       | 80 |
| Abbildung 23: ATP-Werte gesunder RV-Fliegen nach Testung des Wirkstoffes FTY720                         | 81 |
| Abbildung 24: ATP-Werte gesunder RV-Fliegen nach Testung des Wirkstoffes Miglustat                      | 82 |
| Abbildung 25: ATP-Werte gesunder RV-Fliegen nach Testung des Wirkstoffes Zoledronsäure                  | 83 |

### 7.5. Tabellenverzeichnis

| Tabelle 1: Auflistung der getesteten Wirkstoffe, ihren Lösungsmitteln und Konzentrationen 1 | .5 |
|---|----|
| Tabelle 2: Ansatz für die Messung der Citratsynthase-Aktivität1                             | 8  |
| Tabelle 3: Ansatz für die Messung der Komplex I-Aktivität1                                  | 9  |
| Tabelle 4: Anzahl der ATP-Messungen je Experiment 2   | 1  |
| Tabelle 5: Anzahl der Komplex I-Messungen je Experiment 2                                   | 2  |
| Tabelle 6: Einfluss der verschiedenen Wirkstoffe auf die erhobenen Parameter                | 8  |
| Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Geräte7   | 0  |
| Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Software7   | 0  |
| Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Wirkstoffe und deren Hersteller                       | 0  |
| Tabelle 10: Auflistung der alltäglichen Verbrauchsmaterialien7                              | 1  |
| Tabelle 11: Die Zutaten des Fliegenfutters 7  | 1  |
| Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Kits, Lösungen und Puffer7                           | 2  |
| Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Chemikalien  | 3  |
| Tabelle 14: Angaben zu den verwendeten Antikörpern7   | 3  |
| Tabelle 15: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Myriocin                       | 5  |
| Tabelle 16: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests FTY7207                        | 7  |
| Tabelle 17: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Miglustat7                     | 9  |
| Tabelle 18: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Myriocin an RV-Fliegen         | 0  |
| Tabelle 19: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests FTY720 an RV-Fliegen           | 1  |
| Tabelle 20: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Miglustat an RV-Fliegen        | 2  |
| Tabelle 21: Auswertung der ATP-Ergebnisse des Wirkstofftests Zoledronsäure an RV-Fliegen8   | 3  |

### 8. Danksagung

Ich möchte meinen Dank aussprechen an...

... Frau Prof. Christine Klein für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in Ihrem Institut für Neurogenetik durchführen zu können. Ich danke auch für die Bereitstellung der zur Verfügung gestellten Geräte und Materialien.

... **Frau Melissa Vos**, meiner Betreuerin, für die Bereitstellung des Themas, die Einführung in die Arbeit mit Fliegen und ihre Begleitung.

... Frau Thora Lonau, Labortechnische Assistentin, für ihre ausdauernde und tatkräftige Hilfe und die verlässliche gegenseitige Unterstützung.

... alle MitarbeiterInnen des Instituts für Neurogenetik. Ich werde die Zeit im Labor in guter Erinnerung behalten und es war mir eine Freude, zeitweise ein Teil eures Teams zu sein.

... Frau Prof. Inke König für die ausführliche statistische Beratung.

... meine Familie und insbesondere meinen Eltern. Ich bin sehr dankbar für die früh von euch gelegten Grundsteine, die mir einen solchen Weg möglich gemacht haben. Eine derartige Unterstützung ist bei Weitem nicht selbstverständlich – ich weiß sie sehr zu schätzen. Von Beginn an begleitete mich **Svea** durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit. Ich wusste immer um dein offenes Ohr. Vielen Dank für die zahlreichen Gespräche und deine Geduld!

### 9. Publikationsliste

#### Publikationen:

## Cardiolipin promotes electron transport between ubiquinone and complex I to rescue *PINK1* deficiency

Melissa Vos, Ann Geens, Claudia Böhm, Liesbeth Deaulmerie, Jef Swerts, Matteo Rossi, Katleen Craessaerts, Elvira P. Leites, Philip Seibler, Aleksandar Rakovic, Thora Lohnau, Bart De Strooper, Sarah-Maria Fendt, Vanessa A. Morais, Christine Klein, Patrik Verstreken

J Cell Biol. 2017 Mar 6; 216(3): 695–708. doi: 10.1083/jcb.201511044 [IF: 8,7]

#### Ceramide links mitophagy and energy production in Parkinson's disease

Melissa Vos, Lisa Frese, Marija Dulovic-Mahlow, Julia Depperschmidt, Claudia Böhm, Jonas Rohr, Thora Lohnau, Christine Klein

Stand 16.01.2020: Eingereicht in Brain [IF: 11,1]

#### Postervorstellungen:

## "Identification and characterization of modifiers resulting in reduced penetrance in PINK1 deficiency"

Claudia Böhm, Christine Klein, Melissa Vos

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2017 in Leipzig