

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

Einfluss genetisch gesenkter Ceramid-Spiegel
durch Einführung der *lace*^δ-Mutation auf den
pink1-Phänotyp von *Drosophila melanogaster*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Jonas Laurin Rohr
aus Göttingen

Lübeck 2025

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. Christine Klein
Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz
2. Berichterstatter*in: PD Dr. med. Anne Offermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.04.2026

-Promotionskommission der Sektion-Medizin-

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
1.1	Das Parkinson-Syndrom	11
1.2	Die mitochondriale Dysfunktion und das Parkinson-Syndrom	12
1.3	Die Rolle von <i>PINK1</i> in der mitochondrialen Dysfunktion.....	13
1.4	Ceramid und das Parkinson-Syndrom	16
1.5	Der <i>pink1</i> -Phänotyp in <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.6	Zielsetzung	19
2	Materialien und Methoden.....	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Software	22
2.1.3	Verbrauchsmaterialien und Utensilien.....	23
2.1.4	Fliegenfutter	24
2.1.5	Kits, Lösungen und Puffer	25
2.1.6	Chemikalien	26
2.1.7	Antikörper	27
2.2	Modellorganismus: <i>Drosophila melanogaster</i>	28
2.2.1	Prinzipien der genetischen Arbeit mit <i>Drosophila melanogaster</i>	28
2.2.2	Verwendete Genotypen und Kreuzungsschemata	29
2.2.3	Haltung der Fliegen.....	30
2.3	Methoden	31
2.3.1	Messung des ATP-Protein-Verhältnisses	31
2.3.2	Messung des Proteingehalts.....	31
2.3.3	Mitochondrienisolation	32
2.3.4	Flugtest.....	32
2.3.5	Messung des ROS-Protein-Verhältnisses	33
2.3.6	SOD2-Western-Blot.....	33
2.3.7	OxyBlot.....	35
2.3.8	Messung mitochondrialer Aggregationen.....	36
2.3.9	Komplex-I-Aktivitätsmessung.....	37
2.4	Statistische Auswertung und Graphen	39

3	Ergebnisse	41
3.1	Messung des ATP-Protein-Verhältnisses	41
3.2	Testung der Flugfähigkeit	42
3.3	Mitochondriale Aggregation	43
3.4	Messung der Komplex-I-Aktivität	45
3.5	Messung des ROS-Protein-Verhältnisses	46
3.6	SOD2-Expression	48
3.7	Messung oxidierter Proteine	49
4	Diskussion	51
4.1	Reduzierte Ceramid-Spiegel verbessern die mitochondriale Atmungskette bei <i>pink1^{B9}</i> -Mutation.....	52
4.2	Reduzierte Ceramid-Spiegel senken die ROS-Last bei <i>pink1^{B9}</i> -Mutation ..	54
4.3	Reduzierte Ceramid-Spiegel vermindern das Auftreten mitochondrialer Aggregationen bei <i>pink1^{B9}</i> -Mutation.....	57
4.4	Zusammenfassung der Erkenntnisse und Perspektiven	59
5	Zusammenfassung.....	63
6	Summary.....	64
7	Literaturverzeichnis.....	65
8	Danksagung	74
9	Veröffentlichung der Arbeitsergebnisse	75

I. Abkürzungsverzeichnis

95% CI	95%-Konfidenzintervall	LOPD	<i>late-onset Parkinson's disease</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>		
Atg	<i>autophagy-related</i>	MDV	<i>mitochondrial-derived vesicles</i>
<i>B</i>	<i>bar</i>		
BC	<i>balancer-Chromosom</i>	MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
<i>bw¹</i>	<i>brown</i>		
CerS	Ceramidsynthase	Miro	<i>mitochondrial rho</i>
<i>cn¹</i>	Cinnabrit	MMP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
CoA	Coenzym A		
<i>Cy</i>	<i>curly</i>	MP	Morbus Parkinson
CyO	<i>curly derivative of Oster</i>	MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>		
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i>
DRP	<i>dynamain related protein 1</i>		
DTT	Dithiothreitol	NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
EOPD	<i>early-onset Parkinson's disease</i>	NdufA10	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A10</i>
ETK	Elektronentransportkette		
Fis1	<i>mitochondrial fission protein 1</i>	OMM	äußere mitochondriale Membran
FM7a	<i>1st multiply-inverted 7a</i>	PARL	<i>presenilin-associated rhomboid-like protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>		
HL3	<i>hemolymph-like solution</i>	PINK1	<i>phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1</i>
IMM	innere mitochondriale Membran		
LC3	<i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3</i>	PS	Parkinson-Syndrom
		ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
LC3-II	<i>LC3-phosphatidylethanolamine conjugate</i>	SD	Standardabweichung

sER	glattes endoplasmatisches Retikulum	<i>SPTLC2</i>	<i>serine palmitoyl-transferase and long chain base subunit 2</i>
SM	Sphingomyelin		
SMase	Sphingomyelinase	TIM	<i>translocase of the inner membrane complex</i>
<i>sn</i>	<i>singed</i>		
<i>SNc</i>	Substantia nigra pars compacta	TM	<i>transmembrane domain</i>
SOD2	Superoxiddismutase 2	TOM	<i>translocase of the outer membrane complex</i>
<i>sp¹</i>	<i>speck</i>	UBL	<i>ubiquitin-like domain</i>
SPT	Serin-Palmitoyl-transferase	<i>w^a</i>	<i>white apricot</i>
		<i>y</i>	<i>yellow</i>
<i>SPTLC1</i>	<i>serine palmitoyl-transferase and long chain base subunit 1</i>		

Tab. 1.: Verwendete Nomenklatur

	Gen	Protein
Mensch	<i>PINK1</i>	PINK1
	<i>Parkin</i>	Parkin
<i>D. melanogaster</i>	<i>pink1</i>	Pink1
	<i>parkin</i>	Parkin

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Faktoren und Konsequenzen der mitochondrialen Dysfunktion im Rahmen der Ätiopathogenese des Morbus Parkinson	12
Abb. 2.: Schematischer Aufbau des Proteins PINK1	13
Abb. 3.: Schematische Darstellung des PINK1-Parkin-Signalwegs an Mitochondrien.....	14
Abb. 4.: Illustration der verschiedenen Ceramid-Stoffwechselwege und Ansatzpunkt von <i>lace</i> ⁸	16
Abb. 5.: Schematische Darstellung der Formation eines Autophagosoms im Rahmen der Mitophagie.....	18
Abb. 6.: Schematische Darstellung des Phänotyps weiblicher <i>D. melanogaster</i> verursacht durch die Implementierung von <i>balancer</i> -Chromosomen	29
Abb. 7.: Die Reduktion der SPT-Aktivität in <i>D. melanogaster</i> mit <i>pink1</i> ^{B9} -Mutation führt zu erhöhten ATP-Spiegeln	41
Abb. 8.: Die Reduktion der SPT-Aktivität erhöht die Flugfähigkeit in <i>D. melanogaster</i> mit <i>pink1</i> ^{B9} -Mutation	42
Abb. 9.: Die Reduktion der SPT-Aktivität führt zu einer partiellen Wiederherstellung des tubulären mitochondrialen Netzwerkes in <i>D. melanogaster</i> mit <i>pink1</i> ^{B9} -Mutation	44
Abb. 10.: Die Reduktion der SPT-Aktivität vermindert das mitochondriale Clustering in <i>D. melanogaster</i> mit <i>pink1</i> ^{B9} -Mutation	45
Abb. 11.: Die Reduktion der SPT-Aktivität führt zu einer verbesserten Komplex-I-Aktivität in <i>D. melanogaster</i> mit <i>pink1</i> ^{B9} -Mutation und senkt die Komplex-I-Aktivität in Fliegen mit <i>pink1</i> -Wildtyp	46
Abb. 12.: Die Reduktion der SPT-Aktivität in <i>D. melanogaster</i> mit <i>pink1</i> ^{B9} -Mutation senkt die ROS-Produktion	47

Abb. 13.: Die Reduktion der SPT-Aktivität führt zu keinem nachweisbaren Unterschied in der SOD2-Expression der untersuchten Genotypen..... 48

Abb. 14.: Die Reduktion der SPT-Aktivität senkt die Anzahl Carbonylgruppen in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation. 49

Abb. 15.: Exemplarischer sequentiell inkubierter Western Blot mit ausgeprägter Präzipitatbildung zur Messung der SOD2-Expression in *D. melanogaster* 55

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.: Verwendete Nomenklatur	7
Tab. 2.: Ausgewählte monogene Parkinsonformen.....	11
Tab. 3.: Verwendete Geräte	21
Tab. 4.: Verwendete Software	22
Tab. 5.: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Utensilien.....	23
Tab. 6.: Verwendete Zutaten für das Fliegenfutter.....	24
Tab. 7.: Verwendete Kits, Lösungen und Puffer	25
Tab. 8.: Verwendete Chemikalien	26
Tab. 9.: Verwendete Antikörper	27
Tab. 10.: Übersicht verwendeter Marker-Mutationen.....	28
Tab. 11.: Zusammenfassung der Merkmale verwendeter <i>balancer</i> -Chromosomen	29
Tab. 12.: Kreuzungsschemata für die Züchtung der Genotypen	30
Tab. 13.: Pipettierschema des SOD2-Western-Blots gemäß berechneter Probenvolumina	34
Tab. 14.: Beispiel zur Probenbehandlung im Rahmen eines OxyBlots.....	35
Tab. 15.: Pipettierschema zur Bestimmung der Komplex-I-Aktivität.....	38
Tab. 16.: Pipettierschema zur Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität	39

1 Einleitung

1.1 Das Parkinson-Syndrom

Im Jahr 1817 beschrieb der englische Arzt James Parkinson in seinem „Essay über die Schüttellähmung“ erstmalig den Morbus Parkinson (MP) (Parkinson, 1817). Das Parkinson-Syndrom (PS) ist definiert als Symptomkomplex aus Bradykinese oder Akinese einhergehend mit einem der folgenden Kardinalsymptome: Posturale Instabilität, Rigor und Ruhetremor. Begleitend zeigen Patienten¹ häufig eine autonome, emotionale und kognitive Symptomatik. Als pathologisches Korrelat der motorischen Symptomatik wird der Untergang dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc) akzeptiert (Hirsch, Graybiel und Agid, 1988), durch den ein Dopaminmangel in der nigrostriatalen Projektion entsteht (Lang und Lozano, 1998). Ätiologisch lässt sich das PS neben primären (MP), sekundären und atypischen Formen in einen hereditären Subtyp unterteilen (Bloem, Okun und Klein, 2021). Diese monogenen Formen scheinen ungefähr 14 % aller PS-Fälle auszumachen (Skrahina *et al.*, 2021) und können sich klinisch bereits im frühen Erwachsenenalter als sog. *early onset parkinson's disease* (EOPD) manifestieren (Kasten *et al.*, 2018) (Tab. 2). Zu den monogenen Formen zählt u.a. das *phosphatase and tensin homolog* (PTEN)-induced kinase 1 (*PINK1*)-assoziierte PS, das den zentralen Bestandteil dieser Arbeit darstellt. Es handelt sich um eine seltene genetische Form mit einer Prävalenz

Tab. 2.: Ausgewählte monogene Parkinsonformen (Marras *et al.*, 2016)

Gen	Klinische Hinweise	Erbgang
PARK-DJ-1	EOPD	AR
PARK-<i>Parkin</i>	EOPD; oft mit Dystonie, oft in einer unteren Extremität	AR
PARK-<i>PINK1</i>	EOPD; häufig mit psychiatrischen Symptomen	AR
PARK-<i>SNCA</i>	Missense-Mutation mit PS; Duplikation/Triplikation mit EOPD und Demenz	AD
PARK-<i>LRRK2</i>	PS; LOPD	AD
PARK-<i>VPS35</i>	PS; LOPD	AD

AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv; EOPD – *early-onset Parkinson's disease*; LOPD – *late-onset Parkinson's disease*; *LRRK2* – *leucine-rich repeat kinase 2*; *PINK1* – *PTEN-induced putative kinase 1*; PS – Parkinson-Syndrom; *SNCA* – α -Synuclein; *VPS35* – *vacuolar protein sorting 35*

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich auf alle Geschlechter, insofern dies nicht anderweitig spezifiziert wird.

von 4 - 7 % in sporadischem EOPD (Kim und Alcalay, 2017). Zur Behandlung des PS stehen bisher lediglich symptomatische Therapien zur Verfügung. Diese bestehen grob umrissen aus pharmakologischen und neurochirurgischen Maßnahmen. Die pharmakologische Behandlungsform führt zu Beginn der Therapie zu einer guten Symptomkontrolle. Mit zunehmender Therapiedauer tritt jedoch eine Habituation gegenüber den Medikamenten ein (Bloem, Okun und Klein, 2021).

1.2 Die mitochondriale Dysfunktion und das Parkinson-Syndrom

Durch das Auftreten eines PS bei jungen Heroinabhängigen durch das Nebenprodukt 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) wurde ein erster Bezug zur mitochondrialen Beteiligung im PS postuliert (Davis *et al.*, 1979). MPTP inhibiert in dopaminergen Neuronen den Komplex-I der Atmungskette (ETK) (Singer *et al.*, 1988). Ein dysfunktionaler Komplex-I vermindert die ATP-Produktion (Singer *et al.*, 1988) und senkt die Freisetzung von Dopamin (Kitada *et al.*, 2007). In *PINK1*-assoziiertem PS steigert der assoziierte Einbruch des mitochondrialen Membranpotentials die Freisetzung von Cytochrom C (Morais *et al.*, 2009) und leitet die Autophagozytose der defekten Mitochondrien (Mitophagie) ein (Vives-Bauza *et al.*, 2010) (Abb. 1).

Die gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch defekte Mitochondrien wird als wesentliche Ursache für den oxidativen Schaden im Rahmen des PS angesehen (Dias, Junn und Mouradian, 2013) (Abb. 1). Bei ROS handelt es sich um eine Gruppe besonders reaktiver, sauerstoffhaltiger chemischer Verbindungen (u.a. H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot}), die in der Lage sind, so gut wie jedes biologische Makromolekül oxidativ zu schädigen (Perier

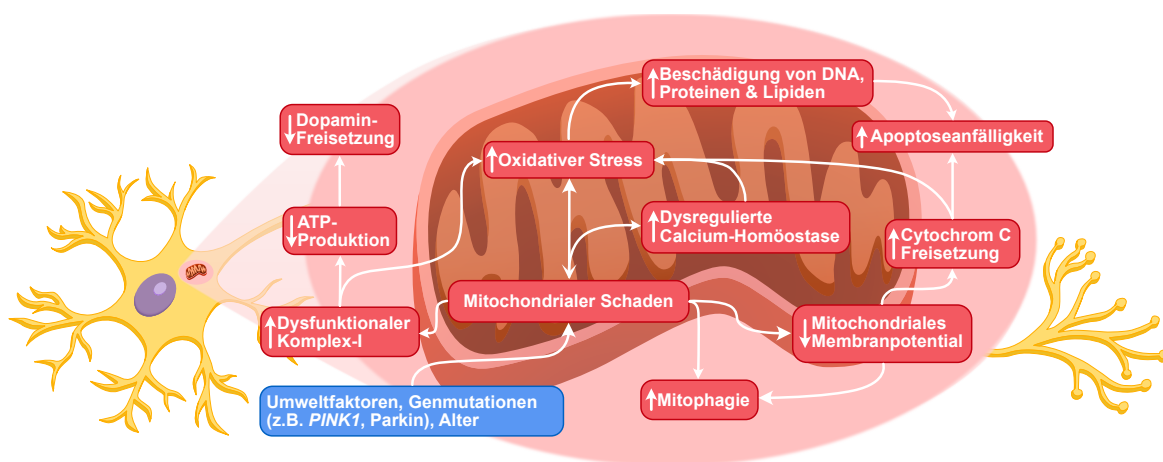


Abb. 1: Faktoren und Konsequenzen der mitochondrialen Dysfunktion im Rahmen der Ätiopathogenese des Morbus Parkinson (adaptiert nach Surmeier, Obeso und Halliday, 2017)

und Vila, 2012) (Abb. 1). Der Komplex-I scheint der Hauptverursacher der ROS zu sein (Brand *et al.*, 2004). Die Superoxiddismutase 2 (SOD2) ist maßgeblich am Abbau der ROS beteiligt und kommt exklusiv in Mitochondrien vor (Zelko, Mariani und Rodney, 2002). Im Sinne eines Kompensationsmechanismus für den oxidativen Stress scheint die Aktivität der SOD2 im Gewebe der Substantia nigra von Parkinson-Patienten erhöht zu sein (Saggu *et al.*, 1989). In neurodegenerative Krankheiten involvierte Neurone sind aufgrund geringer bioenergetischer Reservekapazität (Nicholls, 2008) und charakteristischer zytomorphologischer Konstitution (Braak *et al.*, 2004; Bolam und Pissadaki, 2012) besonders anfällig gegenüber dysfunktionalen Mitochondrien (Abb. 1). Von allen bisher erforschten vulnerablen Neuronen, weisen die dopaminergen Neurone der SNc das höchste basale Niveau an mitochondrialem oxidativen Stress und freier zytosolischer Calcium-Konzentration auf (Surmeier, Obeso und Halliday, 2017).

Im Rahmen dieser Arbeit wird im nächsten Unterkapitel gesondert auf das Gen *PINK1* und die damit in Verbindung stehende mitochondriale Dysfunktion eingegangen.

1.3 Die Rolle von *PINK1* in der mitochondrialen Dysfunktion

PINK1 besteht aus acht Exons, die das 581-Aminosäuren-lange Protein PINK1 kodieren (Valente *et al.*, 2004). N-terminal befindet sich eine *mitochondrial targeting sequence* (MTS), gefolgt von einer *transmembrane domain* (TM) und einer C-terminalen Serin-Threonin-Kinase-Domäne (Valente *et al.*, 2004) (Abb. 2).

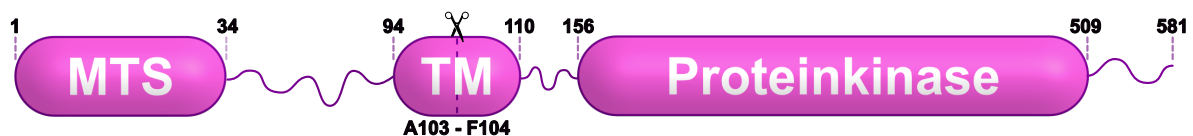


Abb. 2.: Schematischer Aufbau des Proteins PINK1 (adaptiert nach Kawajiri *et al.*, 2011)

Am N-Terminus befindet sich die MTS-Domäne und am C-Terminus die Proteinkinase-Domäne. Dazwischen liegt die TM-Domäne. Die Protease PARL durchtrennt PINK1 zwischen den Aminosäuren A103 und F104. MTS – *mitochondrial targeting sequence*; PARL – *presenilin-associated rhomboid-like protein*; PINK1 – *phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1*; TM – *transmembrane domain*

PINK1 ist für die Aktivität des Komplex-I essentiell, da es die Phosphorylierung von S250 in der Komplex-I-Untereinheit *NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A10* (NdufA10) durchführt. Dies befähigt den Komplex-I zur Reduktion von Ubichinon und garantiert auf diese Weise den Elektronfluss innerhalb der ETK. Bei dysfunktionalem PINK1 und unphosphorylierter NdufA10-Untereinheit wird entsprechend eine ATP-Depletion

beobachtet (Morais *et al.*, 2014). Ebenso reduziert eine dysfunktionale Kinase-Domäne über bislang unklare Reaktionsschritte die Induktion der SOD2 und steigert den oxidativen Stress (Chien *et al.*, 2013).

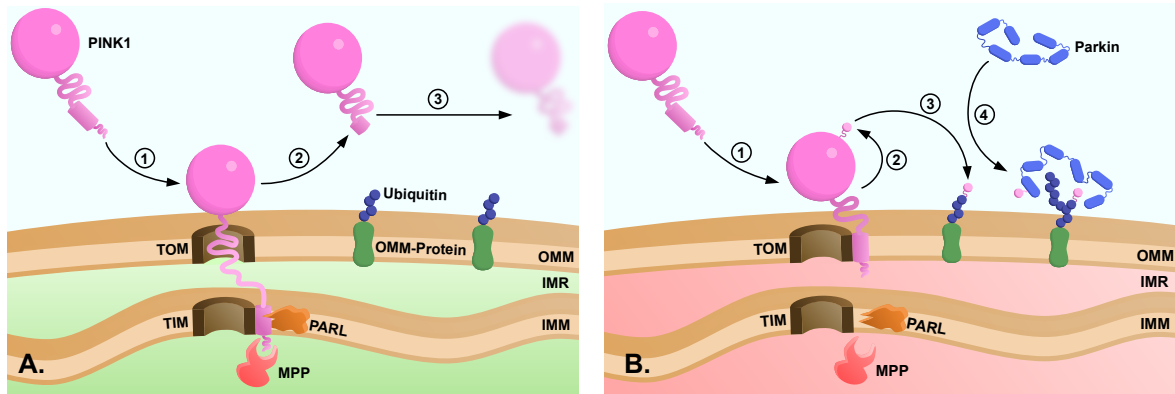


Abb. 3.: Schematische Darstellung des PINK1-Parkin-Signalwegs an Mitochondrien (adaptiert nach Pickrell und Youle, 2015)

A. 1) Bei regulärem MMP transloziert die TM von PINK1 zu der IMM. 2) Dort durchtrennen Proteasen die MTS und die TM-Domäne. Das gespaltene PINK1 wird konsekutiv in das Zytosol freigesetzt und 3) der proteasomalen Degradation zugeführt.

B. 1) Bei reduziertem MMP erfolgt keine Spaltung von PINK1. 2) PINK1 phosphoryliert sich und 3) Ubiquitin-Moleküle von bereits ubiquitinylierten OMM-Proteinen. 4) Diese Schritte stimulieren die Rekrutierung von Parkin und das Verlassen der autoinhibitorischen Konformation von Parkin. Die PINK1-vermittelte Phosphorylierung von Parkin an S65 in der UBL-Domäne stabilisiert dessen Ubiquitin-Ligase-Aktivität.

IMM – innere mitochondriale Membran; IMR – Intermembranraum; MMP – mitochondriales Membranpotential; MPP – *mitochondrial processing peptidase*; MTS – *mitochondrial targeting sequence*; OMM – äußere mitochondriale Membran; PARL – *presenilin-associated rhomboid-like protein*; PINK1 – *phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1*; TIM – *translocase of the inner membrane complex*; TM – *transmembrane domain*; TOM – *translocase of the outer membrane complex*; UBL – *ubiquitin-like domain*

PINK1 überwacht die Integrität des mitochondrialen Netzwerks (Pickrell und Youle, 2015) und leitet zusammen mit Parkin die Mitophagie ein (Vives-Bauza *et al.*, 2010) (Abb. 3). Hierbei handelt es sich um eine Unterform der Phagozytose, die dysfunktionale Mitochondrien erkennt, diese selektiv degradiert (Youle und Narendra, 2011) und so dem neuronalen Zelluntergang entgegenwirkt (Palikaras, Lionaki und Tavernarakis, 2018). Bei regulärem MMP wird PINK1 an funktionalen Mitochondrien durch Proteasen gespalten und ins Zytosol freigesetzt, wodurch die Mitophagie verhindert wird (Greene *et al.*, 2012; Yamano und Youle, 2013) (Abb. 3). Bei MMP-Reduktion bleibt PINK1 intakt (Okatsu *et*

al., 2013) und rekrutiert Parkin zum dysfunktionalen Mitochondrium (Narendra *et al.*, 2008, 2010), wo ein positives Feedback entsteht, das die Mitophagie fördert (Abb. 3) (Ordureau *et al.*, 2014).

Mitochondrien sind dynamische Organellen, die sich fortwährend Fusions- und Fissionszyklen unterziehen und ein zelldurchspannendes, tubuläres Netzwerk ausbilden. Dieses Netzwerk wird durch ein ausgeklügeltes System reguliert, das auf einem fragilen Gleichgewicht zwischen mitochondrialer Fusion und Fission basiert. Grundsätzlich können zwei oppositionäre Netzwerkformen mit einem hyperfusionierten, langstreckig-tubulären Netzwerk bei uneingeschränkter Fusion einerseits und einem hyperfragmentierten Netzwerk bei uneingeschränkter Fission andererseits unterschieden werden (Wai und Langer, 2016). Aus physiologischer Sicht scheint die Fission der Sequestrierung mutierter mitochondrialer DNA, der Segregation dysfunktionaler Mitochondrien aus dem mitochondrialen Netzwerk und durch fissionsbedingte Größenreduktion der Mitochondrien der Erleichterung der Mitophagie zu dienen (Twig und Shirihai, 2011). PINK1 stimuliert durch eine direkte und essentielle Phosphorylierung des pro-Fission-Protein Drp1 an S616 die mitochondriale Fission (Han *et al.*, 2020).

Als pro-Fusion GTPasen regulieren Mitofusin 1 und 2 (Mfn1 und Mfn2) an der OMM bzw. *optic atrophy 1* (Opa1) an der IMM die mitochondriale Fusion (Wai und Langer, 2016). Die Fusion von Mitochondrien dient dem Austausch von Matrixmetaboliten, mitochondrialer DNA-Kopien und Membrankomponenten und erschwert die Mitophagie (Twig und Shirihai, 2011). Mitochondrien mit dissoziiertem Membranpotential scheinen seltener zu fusionieren. Diese Selektivität der Fusion wird als wichtiger Garant für die zelluläre Homöostase gewertet, da die Fusion von intakten und dysfunktionalen Mitochondrien die Ausbreitung mitochondrialer Defekte erhöhen würde (Mouli, Twig und Shirihai, 2009; Twig und Shirihai, 2011). Der PINK1-Parkin-Signalweg inhibiert über die Aktivierung von Parkin die mitochondriale Fusion, da Parkin Mfn1 und Mfn2 ubiquitinyliert und so dem Proteasom zuführt (Tanaka *et al.*, 2010). Holistisch betrachtet, kippt der PINK1-Parkin-Signalweg das Gleichgewicht durch Stimulierung der Fission und Hemmung der Fusion in Richtung der Fission.

Mitochondrial Rho (Miro) ist eine GTPase der OMM, die einen anterograden axonalen Transport der Mitochondrien garantiert (Guo *et al.*, 2005). PINK1 phosphoryliert Miro an S156 und leitet zusammen mit Parkin die Degradierung durch das Ubiquitin-Proteasom-System ein (X. Wang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). So verhindert PINK1 den Transport und die Ausbreitung dysfunktionaler Mitochondrien innerhalb der Zelle. Gleichzeitig erhöht die

verminderte Mobilität der Mitochondrien die Wahrscheinlichkeit der Mitophagie (Twig *et al.*, 2008; Twig und Shirihai, 2011).

Alternativ zu der Degradierung eines ganzen Mitochondriums im Rahmen der Mitophagie, besitzt PINK1 die Fähigkeit, defekte mitochondriale Proteine zu sequestrieren (Soubannier *et al.*, 2012; McLelland *et al.*, 2014). Als Folge von oxidativem Stress entstehen mit der beschädigten Fracht beladene Vesikel, sog. *mitochondrial-derived vesicles* (MDV), von der mitochondrialen Membran aus (McLelland *et al.*, 2014). Diese MDVs werden PINK1- und Parkin-abhängig den Lysosomen zur Degradierung zugeführt (McLelland *et al.*, 2014).

1.4 Ceramid und das Parkinson-Syndrom

Ungefähr 50 % des Trockengewichts des Gehirns lässt sich auf dessen Lipidgehalt zurückführen. Somit stellt das Gehirn nach dem Fettgewebe das Organ mit der höchsten Lipidkonzentration dar (Hamilton *et al.*, 2007). Das Sphingolipid Ceramid rückt dabei immer weiter in den Forschungsfokus (Plotegher *et al.*, 2019; Vos, Klein und Hicks, 2023), u.a. da MP-Patienten erhöhte Sphingolipidspiegel nachweisen (Mielke *et al.*, 2013).

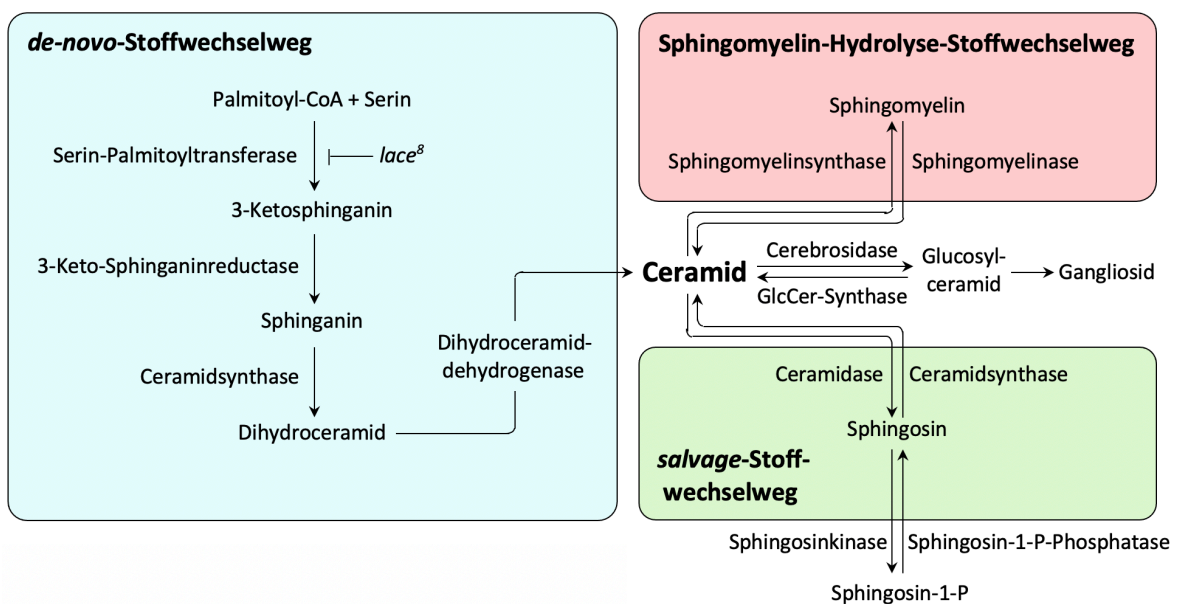


Abb. 4.: Illustration der verschiedenen Ceramid-Stoffwechselwege und Ansatzpunkt von *lace*^δ

Ersichtlich sind die Edukte, Produkte und die beteiligten Enzyme der Ceramid-Synthese. Die hypomorphe Mutation *lace*^δ reduziert die Aktivität der Serin-Palmitoyltransferase. CoA – Coenzym A; GlcCer-Synthase – Glucosylceramidsynthase; Sphingosin-1-P – Sphingosin-1-Phosphat

Als Grundbaustein aller Sphingolipide spielt Ceramid eine zentrale Rolle im Sphingolipidmetabolismus (Patwardhan, Beverly und Siskind, 2015) (Abb. 4). Die Ceramid-

Synthese wird hauptsächlich von drei Stoffwechselwegen übernommen: dem *de-novo*-Stoffwechselweg, dem Sphingomyelin (SM)-Hydrolyse-Stoffwechselweg und dem *salvage*-Stoffwechselweg (Abb. 4) (Plotegher *et al.*, 2019). Die Reaktionen des *de-novo*-Stoffwechselweg finden auf der zytoplasmatischen Seite des glatten endoplasmatischen Retikulums (sER) (Mandon *et al.*, 1992) sowie in den Mitochondrien statt (Bionda *et al.*, 2004). Der erste und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmende Schritt besteht in der Synthese von 3-Ketosphinganin aus Palmitoyl-CoA und Serin durch die Serin-Palmitoyltransferase (SPT) (Schilling *et al.*, 2013). Die SPT wird durch die Gene *serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1 (SPTLC1)* und *serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2 (SPTLC2)* kodiert und setzt sich aus den gleichnamigen Untereinheiten zusammen. In *Drosophila (D.) melanogaster* wird das SPTLC2-Monomer durch das Ortholog *lace* kodiert (Adachi-Yamada *et al.*, 1999; Goyal *et al.*, 2019). *Lace*-Mutationen in *D. melanogaster* führen zu morphologischen und funktionellen Defiziten von Synapsen (West *et al.*, 2018) und zu einer signifikant reduzierten Ceramid-Produktion (Goyal *et al.*, 2019). Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der hypomorphen Punktmutation *lace*^δ (Goyal *et al.*, 2019) bei *pink1*-Mutation.

Der MP wird mit einer Dysregulation der Apoptose in Verbindung gebracht (Mattson, 2000). Bei der Apoptose handelt es sich eigentlich um einen essentiellen und kontrollierten Vorgang zur Entfernung dysfunktionaler Zellen. Mitochondrien können eine zentrale Stellung in der Apoptose einnehmen. Diverse zytotoxische Reize, wie z.B. oxidativer Stress, führen zur Stimulierung proapoptotischer Proteine und initiieren durch die Permeabilisierung der OMM die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol und so schließlich die Aktivierung von Effektorcaspasen. Ceramid kann die Apoptose auf unterschiedlichen Wegen induzieren, zu denen auch der Zusammenschluss zu Cytochrom-C-freisetzenden Kanälen (*ceramide channels*) zählt (Siskind, Kolesnick und Colombini, 2002). Ein spezifischer Ceramid-Pool in Mitochondrien kann ebenfalls die Einleitung der Apoptose auslösen (Birbes *et al.*, 2001). Durch Inhibition des Komplex-I, -III und -IV der ETK löst Ceramid eine vermehrte ROS-Produktion in Mitochondrien aus (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000). Die Produktion von ROS stellt einen bedeutenden Faktor der Ceramid-vermittelten Apoptose dar (Andrieu-Abadie *et al.*, 2001). Zusätzlich führt die Ceramid-induzierte ROS-Produktion zum Zusammenbruch des MMP (Quillet-Mary *et al.*, 1997).

Bei der Mitophagie handelt es sich um eine Unterform der Autophagozytose (Lemasters, 2005). Die sich ausbildende Isolationsmembran (Phagophor) verbindet sich mediiert durch *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 (LC3)-phosphatidylethanolamine*

conjugate (LC3-II) mit an mitochondriale Ubiquitinketten gebundenen Autophagie-Rezeptoren (Nguyen, Padman und Lazarou, 2016) (Abb. 5). Durch Fusion des Autophagosoms mit Lysosomen wird das defekte Mitochondrium degradiert (Vives-Bauza *et al.*, 2010) (Abb. 5). C₁₈-Ceramid löst die Mitophagie durch Stimulation der LC3-II-Produktion und durch direkte Bindung des LC3-II-Autophagosoms durch in der OMM-verankertes C₁₈-Ceramid aus (Sentelle *et al.*, 2012).

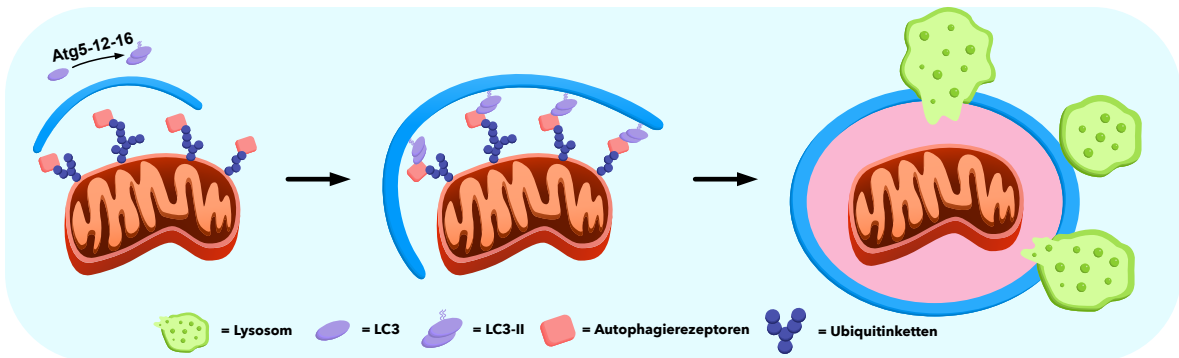


Abb. 5.: Schematische Darstellung der Formation eines Autophagosoms im Rahmen der Mitophagie

LC3 wird im Zytosol anhand diverser Enzyme zu LC3-II konjugiert und kann anschließend als Adapter zwischen dem Phagophor und an Ubiquitinketten gebundene Autophagierezeptoren fungieren. Dies ermöglicht durch schrittweisen Schluss des Phagophors die Ausbildung eines Autophagosoms um das defekte Mitochondrium. Die Fusion von Lysosomen mit dem Autophagosom leitet die Degradierung ein.

Atg – *autophagy-related*; LC3 – *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3*; LC3-II – *LC3-phosphatidylethanolamine conjugate*

1.5 Der *pink1*-Phänotyp in *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster ist ein etabliertes und potentes Modell in der genetischen Forschung, das als Modellorganismus diverse Vorteile mit sich bringt. Die geringe Größe ermöglicht es, Tiere auf geringem Raum mit geringen Kosten zu halten (Guo, 2012). Bei einer Generationszeit von lediglich 10 Tagen und einer Lebenspanne von ungefähr 60-80 Tagen (Guo, 2012), in der weibliche Organismen bis zu 2000 Eier legen (Jennings, 2011), wird der Grundstein für ein schnelles Voranschreiten der Forschungsarbeiten gelegt.

Unabhängig voneinander erzielten drei Forschungsgruppen durch den Nachweis der linearen Interaktion zwischen Parkin und Pink1 in *D. melanogaster* einen Durchbruch in der Erforschung des genetischen EOPD (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Morphologisch weisen *pink1*-Mutanten eine atypische Ausrichtung der Flügel und einen deformierten Thorax auf. Der indirekte Flugmuskel degeneriert apoptotisch und es tritt ein

deutlicher Verlust der Flugfähigkeit und Klettergeschwindigkeit auf. Im Vergleich zu den Kontrollen ist die Lebensspanne reduziert. Männliche Individuen sind steril (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006). Auf Ebene der Mitochondrien weisen *pink1*-Mutanten eine reduzierte Aktivität des Komplex-I der ETK einhergehend mit einer Reduktion des MMP (Morais *et al.*, 2009) und der ATP-Produktion auf (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2009). Elektronenmikroskopisch zeigen sich vergrößerte Mitochondrien in dopaminergen Neuronen (Park *et al.*, 2006) und im indirekten Flugmuskel immens geschwollene Mitochondrien (Park *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006) bzw. stark fragmentierte Cristae (Clark *et al.*, 2006). Gegenüber der Exposition mit oxidativem Stress weisen die *pink1*-Mutanten eine gesteigerte Vulnerabilität auf (Clark *et al.*, 2006).

1.6 Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit besteht in der Analyse der Interaktion von Pink1 und Ceramid. Die Lipidanalyse von *Pink1*-mutierten *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) zeigte erhöhte Ceramid-Spiegel (Vos *et al.*, 2017) und verbindet so die Themengebiete der Neurodegeneration und des dysregulierten Fettstoffwechsels. Interessanterweise stieg der ATP-Gehalt in *pink1^{B9}*-mutanten *D. melanogaster* durch pharmakologische Hemmung der SPT mit Myriocin (Vos *et al.*, 2021). Nach diesen ersten vielversprechenden Resultaten stellt sich nun die Frage nach der Erforschung dieser Erkenntnisse *in vivo* durch genetische Intervention:

- i. Die Ceramid-Spiegel sollen anhand der heterozygoten Einführung der hypomorphen Mutation *lace⁸* in das Genom der *pink1*-mutierten *D. melanogaster* gesenkt werden. Mutationen von *lace* führen zu einer verminderten Expression der SPT – dem ersten und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmenden Enzym des *de-novo*-Stoffwechselwegs und zu erniedrigten Ceramid-Spiegeln (Goyal *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit erfolgt keine direkte Messung der Ceramid-Spiegel, da eine Reduktion der Ceramid-Spiegel aus den beschriebenen Vorarbeiten abgeleitet wird (Goyal *et al.*, 2019; Vos *et al.*, 2021).
- ii. Da die *pink1*-Mutation und die Ceramid-Akkumulation ähnliche Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion aufweisen, soll untersucht werden, ob die Reduktion von Ceramid die Funktionalität der Mitochondrien in *pink1*-mutanten *D. melanogaster* optimiert. Hierzu werden die Funktionsweise der ETK anhand der ATP-Produktion, der Komplex-I-Aktivität sowie der Flugfähigkeit von *D. melanogaster* untersucht. Für die

Analyse des oxidativen Stresszustandes wird die ROS-Produktion, die SOD2-Expression, der Carbonylgruppengehalt in Proteinen sowie die mitochondriale Aggregation erforscht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tab. 3.: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
-80 °C Schrank	Forma 88000 Series	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
25 °C Inkubator	Cooled Incubator MIR-254-PE	Panasonic, Kadoma, JPN
Geldokumentationssystem	ChemiDoc Mp Universal Hood III	Bio-Rad, Hercules, USA
Dispenser	simplex 1-25 ml	Vitlab, Großostheim, DEU
Eismaschine	Scotsman AF80 Ice Flaker	Scotsman®, Illinois, USA
elektronisches Rührwerk	VOS 14	VWR, Darmstadt, DEU
Fluoreszenzmikroskop	Leica MZ10F	Leica Microsystems, Wetzlar, DEU
Folienschweißgerät	FS 3261 Bag sealer	CLATRONIC®, Kempen, DEU
Kochplatte	Kochplatte	Rommelsbacher, Dinkelsbühl, DEU
Kombi-Vortex-Zentrifuge	PCV 2400	Grant-bio, Grant instruments, Cambridge, UK
Konfokalmikroskop	ZEISS LSM 710	ZEISS, Oberkochen, DEU
Magnetrührer	MSH basic	yellow ^{line} by IKA®, Staufen, DEU
Mikroplatten-Leser	Synergy HAT Multi-Mode Microplate Reader	BioTek, Winooski, USA
Mikroskop	Mikroskop SMZ745	Nikon, Tokio, JPN
Mikroskoplampe	KL1600 LED	Schott, Mainz, DEU
pH-Meter	inoLab® pH Level1	WTW, Weilheim, DEU
Pipette	5 ml Abimed	Labmate, New Jersey, USA
Pipetten	2.5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU

Pipettierhilfe	Integra Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences Corp., Hudson, USA
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, DEU
Präzisionswaage	Kern ACJ/ACS 80-4	Kern & Sohn, Balingen, DEU
Rotator	VWR Tube Rotator EU Plug	VWR, Darmstadt, DEU
Spannungsquelle	PowerPac HC	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermocycler	PTC-100™ Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc., Quebec, CAN
Trockenschrank	ST 5042	Heraeus, Hanau, DEU
Vakuumpumpe	KNF LABOPORT®	KNF Neuberger, Inc., Trenton, USA
Waage	Kern EG 0,02g-420g	Kern & Sohn, Balingen, DEU
Zentrifuge	Centrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Software

Tab. 4.: Verwendete Software

Software	Bezeichnung	Hersteller
Bildbearbeitungsprogramm	ImageJ	NIH, Bethesda, USA
Bildgebungssoftware	ZEN 2011 SP3 (black edition) (64 bit)	ZEISS, Oberkochen, DEU
Datenanalysesoftware	Gen5	BioTek, Winooski, USA
Grafikprogramm	Affinity Designer Version 1.8.3	West Bridgford, Nottinghamshire, UK
Statistikprogramm	GraphPad Prism Version 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Statistikprogramm	RStudio Version 4.2	Rstudio: Integrated Development for R. Studio, PBC, Boston MA USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Utensilien

Tab. 5.: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Utensilien

Material	Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Alu-Laborfolie 0.013 x 300 mm x 100 m, weich, glatt, Spenderbox	T.H. Geyer, Renningen, DEU
Blot-Modul	XCell II™ Blot Module	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Blotmembran	Amersham Protran 0,2 µm NC	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Deckglas	Deckgläser 18 x 18 mm	Menzel, Wuppertal, DEU
Drosophila-Gefäße	16/68 ml	greiner Bio-one, Frickenhausen, DEU
Eindeckmedium	DAPI® Fluoromount-G®	Southern Biotech, Alabama, USA
Elektrophorese-kammer	XCell Surelock™ Mini-Cell	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Federschere	Vannas Spring Scissors – 3 mm Blades	Fine Science Tools Inc. British Columbia, CAN
Filterpapier	3 MM CHR Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Minutien Pins	Minutien Pins	Fine Science Tools Inc. British Columbia, CAN
Mikroplatte	96-well, weiß, lumitrac	greiner Bio-one, Frickenhausen, DEU
Mikroplatte	96-well, schwarz, µClear®	greiner Bio-one, Frickenhausen, DEU
Objektträger	Objektträger ca. 76 x 26 mm	Menzel-Gläser® by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Deckelkette	Multiply®-8er Deckelkette, flach, hochtransparent	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
PCR-Platte	96-PCR-Platte randlos	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Pinzette	Dumont #3c Forceps	Fine Science Tools Inc., British Columbia, CAN

Pinzette	Dumont #5 Forceps – Assorted Styles	Fine Science Tools Inc., British Columbia, CAN
Pipettenspitzen	Biosphere® filtertips	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Pipettenspitzen	1-5 ml Makro II	T.H. Geyer, Renningen, DEU
Reaktionsgefäß	Biosphere® 0,5/1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Reaktionsgefäß	SafeSeal Gefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Reaktionsgefäß	Röhrchen 15/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Serologische Pipetten	5, 10, 25, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Spritze	BD Discardit II Spritze 20 ml	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Sylgard-Petrischale	DD-ECON-90-10PK clear	Living Systems Instrumentation, St. Albans City, USA
Vakuumfilter	rapid - Filtermax 250 ml/500 ml	TPP®, Trasadingen, CHE
Vernichtungsbeutel	Spezialvernichtungsbeutel 600 x 780 x 0.050 mm	greiner bio-one, Kremsmünster, AUT
Watte	Cotton balls 51-101/102	Genesee Scientific, San Diego, USA
Western-Blot-Gel	NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris-Gel	Novex® by Life Technologies, Carlsbad, USA
Zellkulturplatte	96-well Cell Culture Cluster	Corning®, Corning, USA
Zellkulturplatten	Cell Culture Dish 100 mm x 20 mm Style	Corning®, Corning, USA

2.1.4 Fliegenfutter

Tab. 6.: Verwendete Zutaten für das Fliegenfutter

Zutat	Hersteller
Backhefe	gut&günstig, EDEKA, Hamburg, DEU
Bacto™ Agar	BD, Sparks, USA
Dextrose	Sigma-aldrich, St. Louis, USA
Ethanol absolut	J.T.Baker®, Center Valley, USA
feine Speisestärke	Dr. Oetker, Bielefeld, DEU

Methyl-4-hydroxybenzoat	Sigma-aldrich, St. Louis, USA
Propionic Acid	Sigma-aldrich, St. Louis, USA
Zuckerrohr Melasse	Rapunzel, Legau, DEU

2.1.5 Kits, Lösungen und Puffer

Tab. 7.: Verwendete Kits, Lösungen und Puffer

Name	Hersteller
1x DPBS	gibco® by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche, Rotkreuz, CHE
DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit	Abcam, Cambridge, UK
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
Guanidin/ATP-Extraktionspuffer	HPLC Wasser, Tris [100mM], EDTA [4mM], Guanidin-HCl [6M]
HL3	NaCl [110mM], KCl [5mM], NaHCO ₃ [10mM], HEPES [5mM], Sucrose [30mM], Trehalose [5mM], MgCl ₂ [10mM]
Mitochondrial Isolation Buffer	Sucrose [250mM], Tris-HCl [10mM], MgCl ₂ [0,15mM] HPLC Wasser, pH = 7,4, vakuumsterilisiert, 1 Tablette Proteaseinhibitor je 10 ml Lösung
NuPage™® Antioxidant	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPage™® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPage™® MES SDS Running Buffer (20x)	Novex® by Life Technologies, Carlsbad, USA
NuPage™® Transfer Buffer (20x)	Novex® by Life Technologies, Carlsbad, USA
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Millipore™ by Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Phosphatpuffer	KH ₂ PO ₄ [100 mM], HPLC Wasser, pH = 7,5

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad, Hercules, USA
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TBS 10x	11 HPLC Wasser, Tris [50mM], NaCl [150mM], Anpassung mit HCl [1M] bis pH = 7,5

2.1.6 Chemikalien

Tab. 8.: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Acetyl-Coenzym A (AcetylCoA)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Decylubiquinon	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Desoxycholsäure (DOC)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Ethanol 70 %, vergällt	CHEMSOLUTE® by T.H. Geyer, Renningen, DEU
HCl 32 %	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
HEPES	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
KCN	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Methanol	J.T. Baker®, Center Valley, USA
MgCl ₂	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
NaCl	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
NADH (grade II, disodium salt)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA

Nonidet P-40 (NP-40)	USB™, Ohio, USA
Oxalessigsäure	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Paraformaldehyd 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Proteaseinhibitor complete Mini	Roche, Rotkreuz, CHE
Proteaseinhibitor complete Mini	Roche, Rotkreuz, CHE
Rotenon	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Trehalose	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Tris	EMD Millipore, Billerica, USA
Triton® X-100	AppliChem, Darmstadt, DEU
Tween20	Bio-Rad, Hercules, USA

2.1.7 Antikörper

Tab. 9.: Verwendete Antikörper

Antigen	Methoden	Wirt	Dilution	Hersteller
Primäre Antikörper				
Anti-SOD2 /MnSOD	Western Blot	Maus	1:250	Abcam, Cambridge, UK
Anti-β-Actin	Western Blot	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Anti-ATP5A	Mitochondriale Morphologie	Maus	1:200	Abcam, Cambridge, UK
Normal Goat Serum (NGS)	Mitochondriale Morphologie	Ziege	1:10	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sekundäre Antikörper				
Anti-Hase- IgG	Western Blot	Ziege	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-Maus- IgG	Western Blot	Ziege	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-Maus- IgG 594nm	Mitochondriale Morphologie	Ziege	1:1000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Modellorganismus: *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Prinzipien der genetischen Arbeit mit *Drosophila melanogaster*

77 % aller humanen pathogenen Gene können im Genom von *D. melanogaster* als Orthologe wiedergefunden werden (Reiter *et al.*, 2001). Das Genom ist auf ein Paar Gonosomen und drei Paar Autosomen verteilt (Greenspan, 2004) und weist eine geringe Redundanz auf (Guo, 2012). Das vierte Chromosom besitzt eine geringe Größe und Genanzahl (Greenspan, 2004). Für die Arbeit mit *D. melanogaster* stehen eine Vielzahl genetischer Techniken zur Verfügung, deren Diskussion den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde. In diesem Sinne werden sich die folgenden Erläuterungen auf die Prinzipien von sog. Marker-Mutationen und *balancer*-Chromosomen (BC) beschränken.

Bei Marker-Mutationen handelt es sich um Mutationen in einem bestimmten Gen, die einen spezifischen Phänotyp verursachen (Tab. 10) (Greenspan, 2004).

Tab. 10.: Übersicht verwendeter Marker-Mutationen (Chyb und Gompel, 2013)

Marker-Mutation	Sym.	Phänotyp	Chr.	Vererbung
<i>Bar</i>	<i>B</i>	heterozygot: nierenförmige Augen homozygot: schlitzförmige Augen	X	AD
<i>singed</i>	<i>sn</i>	gelockte Borsten	X	AR
<i>white apricot</i>	<i>w^a</i>	orangene Augenfarbe	X	AR
<i>yellow</i>	<i>y</i>	gelbliche Körperfarbe	X	AR
<i>brown</i>	<i>bw^l</i>	braune Augenfarbe, weiß mit <i>cn^l</i>	2	AR
<i>cinnabar</i>	<i>cn^l</i>	zinnoberrote Augenfarbe	2	AR
<i>Curly</i>	<i>Cy</i>	nach oben gebogene Flügel	2	AD
<i>speck</i>	<i>sp^l</i>	schwarz-gefleckte Flügelansätze	2	AR

Sym. – Symbol; Chr. – Chromosom; AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv

Balancer-Chromosomen (BC) dienen der genetischen Konservierung von Fliegenstämmen. Die genetische Sequenz, und somit die Lokalisation von Genen, ist auf BC durch multiple Inversionen verschoben. So wird die Rekombination des Erbguts mit Chromosomen regulärer genetischer Sequenz durch Unterdrückung des Crossing-over in der Meiose verhindert (Greenspan, 2004). BC sind in homozygoter Ausprägung wegen rezessiven Mutationen häufig tödlich. X-BC tragen aufgrund der männlichen Hemizygotie i.d.R. ebenfalls rezessive Mutation, die in weiblichen Fliegen Sterilität verursachen, um so deren

genetische Dominanz in Kreuzungen zu verhindern (Greenspan, 2004). Es ist üblich dominante und rezessive Marker-Mutation an BC zu koppeln. So wird im Rahmen von Kreuzungsschemata eine einfache Selektion der Fliegen nach deren Phänotyp ermöglicht (Greenspan, 2004) (Abb. 6). Für die Kreuzungsschemata dieser Arbeit wurden die BC *Ist multiply-inverted 7a* (FM7a) und *Curly of Oster* (CyO) verwendet (Tab. 11).

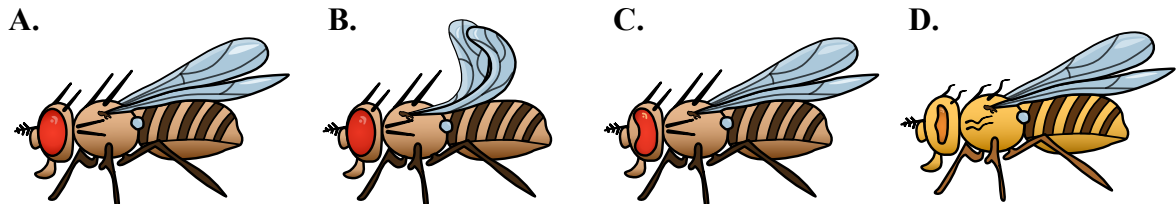


Abb. 6.: Schematische Darstellung des Phänotyps weiblicher *D. melanogaster* verursacht durch die Implementierung von *balancer*-Chromosomen

A. Wildtyp. B. *D. melanogaster* mit dem BC CyO in heterozygoter Ausprägung weisen nach oben gebogene Flügel und rötliche Augen auf. C. FM7-heterozygote Fliegen zeigen nierenförmige, rötliche Augen. D. In homozygoter Ausprägung führt FM7 zu streifenförmigen, orangenen Augen und zu einer gelblichen Färbung des Körpers. Die Borsten wirken geknickt und verkürzt.

Tab. 11.: Zusammenfassung der Merkmale verwendeter *balancer*-Chromosomen

BC	Marker-Mutationen	Chromosom	Homo-/hemizygoter Ausprägung
FM7	<i>y, w^a, sn, B</i>	X	♀: Sterilität; ♂: lebensfähig
CyO	<i>Cy, bw^l, cn^l, sp^l</i>	2	♀: Tod; ♂: Tod

2.2.2 Verwendete Genotypen und Kreuzungsschemata

Die Fliegen mit den Genotypen *w pinkI^{RV}* respektive *w pinkI^{B9}* wurden mir freundlicherweise als Geschenk von Prof. Bingwei Lu, PhD (Stanford University School of Medicine) zur Verfügung gestellt. Der Stamm mit dem Genotyp *y w eyFLP GMR::LacZ; P[y⁺] P[FRT40A neo⁺]* war ein Geschenk von Prof. Patrik Verstreken, PhD (Katholieke Universiteit Leuven). Der Genotyp *lace⁸ cn^l bw^l sp^l/CyO* mit der Stamm-Nummer 25150 wurde über das Bloomington Drosophila Stock Center (Bloomington, USA) bezogen. Die in den Experimenten verwendeten Genotypen entstanden anhand der in der Tab. 12 aufgeführten Kreuzungsschemata. Die Selektion traf ich nach dem Kriterium der Männlichkeit und im Sinne einer negativen Selektion nach dem Prinzip des Fehlens von mit BC gekoppelten Marker-Mutationen.

Tab. 12.: Kreuzungsschemata für die Züchtung der Genotypen

Stamm 1:	$\text{♀ } \frac{\textit{pink1}^{RV}}{\textit{pink1}^{RV}}; \frac{+}{+} \times \text{♂ } \frac{+}{y}; \frac{\textit{FRT40A}}{\textit{FRT40A}} \rightarrow \frac{\textit{pink1}^{RV}}{y}; \frac{+}{\textit{FRT40A}} \text{♂}$
Stamm 2:	$\text{♀ } \frac{\textit{pink1}^{RV}}{\textit{pink1}^{RV}}; \frac{+}{+} \times \text{♂ } \frac{+}{y}; \frac{\textit{lace}^8}{\textit{CyO-GFP}} \rightarrow \frac{\textit{pink1}^{RV}}{y}; \frac{\textit{lace}^8}{+} \text{♂}$
Stamm 3:	$\text{♀ } \frac{\textit{pink1}^{B9}}{\textit{FM7}}; \frac{+}{+} \times \text{♂ } \frac{+}{y}; \frac{\textit{FRT40A}}{\textit{FRT40A}} \rightarrow \frac{\textit{pink1}^{B9}}{y}; \frac{+}{\textit{FRT40A}} \text{♂}$
Stamm 4:	$\text{♀ } \frac{\textit{pink1}^{B9}}{\textit{FM7}}; \frac{+}{+} \times \text{♂ } \frac{+}{y}; \frac{\textit{lace}^8}{\textit{CyO-GFP}} \rightarrow \frac{\textit{pink1}^{B9}}{y}; \frac{\textit{lace}^8}{+} \text{♂}$

Die Fliegen mit dem Genotyp *lace⁸ cn¹ bw¹ sp¹/CyO-green fluorescent protein (GFP)* erhielt ich durch Kreuzung des Genotyps *lace⁸ cn¹ bw¹ sp¹/CyO* mit 33-571/*CyO-GFP*-Fliegen. Phänotypisch zeigten die Augen von männlichen *lace⁸ cn¹ bw¹ sp¹;CyO-GFP*-Fliegen aufgrund des Vorliegens von GFP ein helles zinnoberrot im Vergleich zu einem matteren rot der restlichen Genotypen der F₁. Die 33-571/*CyO-GFP*-Fliegen wurden mir freundlicherweise von Dr. Melissa Vos zur Verfügung gestellt.

Für alle Kreuzungsschemata wurden nur jungfräuliche Weibchen benutzt, um durch die potentielle Polyandrie genetische Kontamination zu verhindern. Jungfrauen können an einem dunklen und grünlichen abdominalen Fleck (Mekonium) erkannt werden (Greenspan, 2004). Die Experimente wurden an männlichen Fliegen durchgeführt. Je nach Experiment wurden die Fliegen bei -20 °C eingefroren.

2.2.3 Haltung der Fliegen

Die Fliegen wurden in mit Futter befüllten und mit Wattebäuschen verschlossenen Plastikzylindern (16 ml bzw. 68 ml) gehalten, um die Fortpflanzung mit anderen Fliegenstämmen zu verhindern. Die Zutaten pro Liter Fliegenfutter bestanden in 50 g Stärke, 7 g Hefe, 5,6 g Agar, 13,5 g Dextrose, 55 g Melasse, 1,1 g Methylhydroxybenzoat, 10 ml Ethanol abs., 4,8 ml Propionsäure und 1 l destilliertem Wasser. Die Masse wurde in einem Topf zum Kochen gebracht und nach dem Abkühlen mittels Dispenser auf die verschiedenen Plastikzylinder verteilt. Diese wurden abgedeckt in einem Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, um so einer möglichen genetischen Kontamination durch das Ablegen von Eiern entwichener weiblicher *D. melanogaster* vorzubeugen.

Nach drei Wochen transferierte ich die Fliegen in den 68 ml- bzw. nach zwei Wochen in den 16 ml-Gefäßen in frische Plastikzylinder. Während dieser Zeit wurden die Fliegen bei

Raumtemperatur bzw. je nach Bedarf in einem 25 °C Inkubator gehalten (z.B. um die Generationszeit zu verkürzen). Je nach Experiment erfolgte ein Einfrieren der Fliegen bei -20 °C.

2.3 Methoden

2.3.1 Messung des ATP-Protein-Verhältnisses

Zur Bestimmung des ATP-Protein-Verhältnisses in *D. melanogaster* wurde die ATP-Konzentration zum Zweck der Standardisierung in das Verhältnis zu der Proteinkonzentration gesetzt, um die versuchstierspezifische Größen- und Gewichtsvariabilität und konsekutiv verfälschte absolute ATP-Werte zu bereinigen. Dieses Verhältnis wurde als prozentualer Mittelwert mit dem Genotyp *pink1^{RV};FRT40A* als Referenzwert ausgedrückt. Der Genotyp *pink1^{RV}/lace⁸* diente als Negativkontrolle. Für jeden Genotyp wurde das Experiment 16-mal durchgeführt.

Zu zwei CO₂-betäubten Fliegen wurde 70 µl Guanidin/ATP-Extraktionspuffer zur Inhibition der ATPasen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Diese homogenisierte ich bei 1500 s⁻¹ mithilfe eines elektronischen Rührwerks für 1 min. Nach Schockgefrierung mit Trockeneis und Ethanol abs. wurden die Proben während 3 min gekocht und die Gefäße für 5 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 55 µl übernommen. Nach Anfertigung der ATP-Standardreihe gemäß dem ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II wurde das entsprechende Volumen des ATP-Standards nach Anleitung in die Wells einer 96-well-Mikroplatte pipettiert. Mit dem im Kit enthaltenen Luciferase-Mix wurden die Standard-Wells auf 50 µl aufgefüllt. Vom Überstand der Proben wurde 2 µl entnommen und 48 µl Luciferase-Mix hinzugefügt. Die Messung aller Proben und die ATP-Standardreihe wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Lumineszenz-Messung erfolgte im *Synergy HAT Multi-Mode Microplate Reader* bei 528 nm. Zur Normalisierung wurde der Proteingehalt der Proben mit Hilfe des PierceTM BCA Protein Assay Kits gemessen.

2.3.2 Messung des Proteingehalts

Der absolute Proteingehalt wurde gemäß der Bicinchoninsäure-Assay bestimmt. Die ersten Arbeitsschritte des Protokolls inklusive der Entnahme des Überstandes der Proben entsprachen denjenigen der ATP-Messung. Im Unterschied gab ich im weiteren Verlauf 10 µl der Proben respektive des Proteinstandards im Doppel in die Wells der 96-well-Mikroplatte. Der Proteinstandard wurde nach Anleitung im PierceTM BCA Protein Assay

Kits angefertigt und in die Wells 70 μl einer 50:1-Mischung aus Reagenz A und B hinzugefügt. Anschließend wurde die 96-well-Platte bei 37 °C im Trockenschrank ST 5042 während 30 min inkubiert. Die Messung der Probenintensität erfolgte im Mikroplatten-Leser bei 562 nm.

2.3.3 Mitochondrienisolation

Am Vortag der Mitochondrienisolation sammelte ich mindestens 50 Fliegen pro Genotyp. Am Folgetag wurden die Fliegen betäubt, indem sie in Plastikzylindern auf Eis gestellt wurden. Nach Überführung der Fliegen in einen 10 cm^3 -Glasbehälter gab ich in diesen 6 ml *Mitochondrial-Isolation-Medium* (MIM-Puffer) und homogenisierte die Fliegen während 5 min bei 1500 s^{-1} mit dem elektronischen Rührwerk. Die Proben wurden für 10 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert und die Pellets anschließend verworfen. Nach erneuter Zentrifugierung und Überführung des Überstandes in 2 ml Eppendorfgefäße, folgte eine weitere Zentrifugierung bei 10.000 g und 4 °C während 10 min. Mithilfe der KNF LABOPORT® saugte ich den Überstand ab. Das Pellet wurde in 100 μl MIM-Puffer resuspendiert. Es folgte die Einfrierung der Proben bei -85 °C.

2.3.4 Flugtest

Die Bestimmung der Flugfähigkeit gilt als etablierter Parameter zur Evaluation der Parkinson-Symptomatik bei *D. melanogaster* (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006). Gleichaltrige Fliegenexemplare wurden am Vortag mittels CO_2 -Betäubung gesammelt, um genügend Zeit für die Erholung von der CO_2 -Narkose zu erlauben. Anhand der Durchführung des Experiments zur gleichen Tageszeit am gleichen Ort, wurde versucht allfällige Einflüsse von Störfaktoren wie biologischen Rhythmen und Verhaltensweisen von *D. melanogaster* zu reduzieren. Von den fünf Tage alten Fliegen wurden 100 Fliegen pro Genotyp untersucht. Hierzu transferierte ich vier Fliegen in einen durchsichtigen 68 ml Plastikzylinder, der mit der Öffnung nach unten auf einer Arbeitsbank abgestellt wurde. Die Fliegen wurden durch vorsichtiges Klopfen auf die Ablage zum Flug animiert. Flugfähige Organismen wurden mit der Zahl eins (1) bewertet, während flugunfähige Exemplare die Zahl null (0) erhielten. Als flugunfähige Organismen galten Fliegen, die während des Klopfens auf die Ablage fielen. Da die Testung der Fliegen in Vierergruppen erfolgte und eine gegenseitige Beeinflussung nicht auszuschließen war, galt die Vierergruppe als kleinste unabhängige Beobachtungseinheit. Die dichotomen Einzelergebnisse auf Gruppenebene

wurden zu Prozenträngen (0 %, 25 %, 50 %, 75 % oder 100 %) zusammengefasst, um diese als unabhängige Beobachtungen analysieren zu können.

2.3.5 Messung des ROS-Protein-Verhältnisses

Für die Bestimmung des prozentualen Vorkommens von ROS wurden analoge Prinzipien wie bei der ATP-Messung angewandt, um für die Varianz des Körpervolumens der Fliegen und der konsekutiv verfälschten ROS-Werte aufzukommen. Von den Ergebnissen wurde der Mittelwert berechnet und anschließend die Kontrolle *pink1^{RV};FRT40A* als Normierung verwendet.

Das Experiment führte ich für jeden Genotyp 32-mal durch. 30 Fliegen pro Genotyp wurden abends gesammelt und am Morgen des Folgetages in einem Eppendorfggefäß bei -20 °C eingefroren. Als nächstes gab ich 100 µl 1x-Puffer aus dem DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit hinzu und homogenisierte die Fliegen bei 1500 s⁻¹. Die Proben wurden bei 10.000 g und 4 °C während 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 70 µl entnommen. Hiervon wurden 10 µl in ein Well der schwarzen 96-well-Mikroplatte gegeben und 140 µl des 50 µM DCFDA-Reagenz aus dem DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit hinzugefügt. Die 96-well-Mikroplatte wurde mit einem Aluminiumfolie-umwickelten Deckel abgedeckt und bei 37 °C im Trockenschrank ST 5042 für 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Fluoreszenzmessung (Ex/Em = 485/528 nm) im Mikroplattenleser. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Zusätzlich folgte die Bestimmung des Proteingehalt der jeweiligen Probe mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (siehe ATP-Messung).

2.3.6 SOD2-Western-Blot

Zur Normalisierung wurde die SOD2-Expression in das Verhältnis zur β-Actin-Expression gesetzt. Es wurden vier Western Blots zur Analyse herbeigezogen. Als Normierung wurden die Ergebnisse der Kontrolle *pink1^{RV}/FRT40A* benutzt.

Für jeden Western Blot wurden drei Fliegen pro Genotyp bei -20 °C eingefroren. Es folgte die Lyse der Fliegenexemplare in 100 µl RIPA-Puffer bei 1500 s⁻¹ auf Eis mithilfe des elektronischen Rührwerks (VWR® VOS 14) während 1 min. Nach erneuter mechanischer Zerkleinerung der Proben mit einer 10 µl-Pipette wurden die Lysate für 15 min auf Eis kaltgestellt. Diesen Vorgang wiederholte ich. Es folgte die Zentrifugierung bei 4 °C und 13.000 g während 20 min. Nach Entnahme des Überstandes wurde das Pellet verworfen und

der Proteingehalt mithilfe des DCTM Protein Assay Kit (Bio-Rad) im Mikroplattenleser bestimmt. Nach Adjustierung der Probenvolumina an äquivalente Proteinkonzentrationen pipettierte ich das benötigte Volumen in eine 96-PCR-Platte (Sarstedt). Das Probenvolumen wurde mit RIPA-Puffer auf 6,5 µl, 8 µl oder 10 µl addiert und NuPageTM® LDS Sample Buffer [4x] bzw. Dithiothreitol (DTT) gemäss hinzugegeben (Tab. 13).

Tab. 13.: Pipettierschema des SOD2-Western-Blots gemäß berechneter Probenvolumina

	berechnetes Probenvolumen mit 10 µg Protein		
	6,5 µl	8 µl	10 µl
DTT	1 µl	1,2 µl	1,5 µl
Sample Buffer [4x]	2,5 µl	3,1 µl	3,8 µl

Die Gelelektrophoresekammer wurde mit 5 % 20xMES-Puffer gelöst in Aqua dest. gefüllt und 500 µl NuPageTM® Antioxidant (Invitrogen) in die innere Kammer pipettiert. Das Gel (Novex®) wurde mit den Proben und einer Proteinleiter (Precision Plus ProteinTM All Blue Standards) beladen. Es erfolgte der Anschluss der Gelkammer an die Spannungsquelle PowerPac HC (Bio-Rad) während 15 min bei 100 V bzw. 60 min bei 150 V.

Für den Blotvorgang wurde das Gel mit Transferpuffer gespült. Das Transfersandwich bestehend aus Blotmembran (GE Healthcare), Gel und Filterpapier wurde in das Blot-Modul (Invitrogen) gespannt. Es folgte die Füllung der inneren Kammer mit Transferpuffer und der äußeren Kammer mit Wasser. Der Blotvorgang erfolgte bei 32 V während einer Stunde.

Die Blotmembran wurde 5 min in 0,1 % Tween 20 gelöst in Tris-buffered saline (TBST) auf dem Plattformschüttler (Heidolph) gewaschen. Danach wurde sie in zugeschnittene Vernichtungsbeutel (greiner Bio-One) eingeschweißt und 4 ml 1 %-Milch hinzugefügt. Die Membran inkubierte während 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rührchenrotator (VWR), um unspezifische Antikörper-Protein-Bindungen zu verhindern. Nach Entfernung der 1 %-Milch folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern SOD2/MnSOD (Abcam) in 1:250-Verdünnung und β -Actin (Sigma-Aldrich®) in 1:1000-Verdünnung in 1 %-Milch über Nacht bei 4 °C. Es schlossen sich drei Waschschrte von 5 min mit TBST und eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper Anti-Maus-IgG (Santa Cruz) in 1:5000-Verdünnung in 1 %-Milch für 1 h bei Raumtemperatur an. Nach drei Waschschrten von 5 min in TBST und Inkubation mit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate

(Thermo Fisher Scientific) für 2 min wurde der Blot im ChemiDoc Mp Universal Hood III (Bio-Rad) entwickelt.

2.3.7 OxyBlot

Bei erhöhter ROS-Last können in Proteinen Carbonylgruppen entstehen. Sie gelten als etablierter Parameter zum Nachweis von erhöhtem oxidativem Stress (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Der Vorteil des quantitativen Nachweis von Carbonylgruppen gegenüber Sauerstoffradikalen besteht darin, dass erstere chemisch stabiler sind und somit als sensitiver Biomarker für die oxidative Homöostase einer Zelle fungieren (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Es wurden 5 OxyBlots mit jeweils drei Fliegenexemplaren pro Genotyp durchgeführt. Zur Normalisierung der ROS-Werte in Bezug auf die Größen- und Gewichtsvarianz der Versuchstiere wurde das Referenz-Protein β -Actin in einem korrelierenden Western Blot benutzt. Die Bandenintensitäten wurden gemittelt und in Relation zu der Kontrolle *pink1^{RV};FRT40A* prozentual dargestellt.

Die Herstellung des Proteinlysats erfolgte analog zum Protokoll des Western Blots. Im Unterschied gab ich 10 % des Probenvolumens in Form des Reduktionsmittels DTT in das Eppendorfgefäß, um die Oxidation von Proteinen zu verhindern. Nach der Messung des Proteingehalts wurde das jeweilige Probenvolumen so berechnet, dass es 5 μ g Proteine enthielt. Dazu fügte ich dasselbe Volumen SDS (Sigma-Aldrich®) und das doppelte Volumen DNPH hinzu. Letzteres reagiert mit Carbonylgruppen von Proteinen zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon, an dessen DNP-Rest der Primärantikörper bindet. Die PCR-Platte ließ ich für 15 min inkubieren und addierte anschließend 75 % des Probenvolumens in Form von Neutralisationslösung. Ein Beispiel zur Berechnung der Probenvolumina kann der Tab. 14 entnommen werden.

Tab. 14.: Beispiel zur Probenbehandlung im Rahmen eines OxyBlot

Berechnetes Probenvolumen	SDS	DNPH	Neutr. Lösung
1,75 μ l	1,75 μ l	3,50 μ l	1,31 μ l

Die Geltaschen wurden mit den Proben für den OxyBlot und den korrelierenden Proben für den Western Blot beladen, der mit β -Actin als Referenzgen zur Normalisierung diente. Der Vorgang der Gelelektrophorese entsprach demjenigen des Western Blots. Um den OxyBlot und Western Blot getrennt zu entwickeln, wurde die Blot Membran an der entsprechenden

Stelle durchtrennt. Die Entwicklung des Western Blot erfolgte wie bereits beschrieben (siehe 2.3.6). Den Blotmembrananteil mit den OxyBlot-Proben wusch ich dreimal für 5 min in TBST. Darauf fügte ich den primären Antikörper aus dem OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore) in 1:150-Verdünnung in 1 %-Milch hinzu. Die eingeschweißte Membran rotierte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rührchenrotator. Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Blotmembran wurde dreimal für 5min in TBST gewaschen. Nun fügte ich den sekundären Antikörper aus dem OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit in 1:300-Verdünnung in 1 %-Milch hinzu. Die Inkubation erfolgte während 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rührchenrotator gefolgt von drei Waschschritten für 5 min in TBST. Die Entwicklung des OxyBlots entsprach derjenigen des Western Blot (siehe 2.3.6).

2.3.8 Messung mitochondrialer Aggregationen

Die Muskulatur von 5 Larven pro Genotyp wurde zu der Analyse der mitochondrialen Aggregation präpariert. Die Selektion der männlichen Larven erfolgte im 3. Larvenstadium gemäß folgenden Kriterien: Aufgrund des einheitlichen Genotyps der F₁ von Stamm 1, erfolgte die Selektion nach dem Merkmal der Männlichkeit. Die für das Experiment benötigten Genotypen der F₁ der Stämme 2 - 4 besitzen weder das BC CyO-GFP noch FM7 (Tab. 12). Da Genotypen mit diesen BC grün unter dem Fluoreszenzmikroskop Leica MZ10F (Leica) fluoreszieren, wurden nicht-fluoreszierende männliche Larven selektiert. Die Larven wurden mit Pins auf mit *hemolymph-like solution* (HL3) übergossenen Sylgard-Petrischalen fixiert. Die Dissektion der Larven erfolgte unter dem Mikroskop SMZ745 (Nikon) mit der Federschere Vannas Spring Scissors (Fine Science Tools Inc.) und den Pinzetten Dumont #3c bzw. #5 (Fine Science Tools Inc.). Die freipräparierte Muskulatur wurde mit 1 ml 3,7 % Paraformaldehyd gelöst in HL3 für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgten zwei Waschschrritte mit HL3 von 5 min bzw. 10 min Dauer. Dann transferierte ich die Larven in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß, in welches 1 ml PBX 0,4 % (TritonX100 gelöst in PBS) zur Permeabilisierung der Plasmamembran für die spätere Ermöglichung der intrazellulären Penetration der Antikörper hinzugefügt wurde. Das Gefäß wurde während jeweils 15 min bei Raumtemperatur auf dem Rotator (VWR) befestigt und das Medium viermal gewechselt. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen wurde NGS in einer 1:10-Lösung mit PBX 0,4 % gelöst und 1 ml für 1 h bei Raumtemperatur in das Eppendorfgefäß gefüllt. Die Lösung wurde verworfen und der primäre Antikörper Anti-

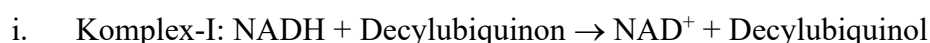
ATP5A in einer 1:200 Verdünnung in NGS-PBX 10 % hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte auf dem Probenröhrchen-Rotator bei 4 °C über Nacht. Es folgten vier Waschschriffe für jeweils 10 min mit PBX 0,4 % bei Raumtemperatur und die Zugabe des sekundären Antikörper *goat anti-mouse* (594 nm, ThermoFisher) in einer 1:1000 Verdünnung in NGS-PBX 10 %. Zur Inkubation rotierte das Gefäß während 1 h bei Raumtemperatur auf dem Probenröhrchen-Rotator in einem zum Schutz vor Lichtexposition mit Aluminiumfolie umwickelten 50 ml FalconTM-Zentrifugenröhrchen. Die Larven wurden 6-mal während 10 min in 1 ml PBX 0,4 % gewaschen. Anschließend wurde Eindickmedium (Southern Biotech) auf einen Objektträger aufgetragen, die Larven unter dem Mikroskop SMZ745 (Nikon) ausgebreitet und mit einem Deckglas (Menzel) abgedeckt. Die Präparate wurden bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Bilder der Muskelabschnitte der Larven wurden mit dem Konfokalmikroskop (ZEISS LSM 710), dem Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil M27 (ZEISS) und der Bildgebungssoftware ZEN 2011 SP3 (ZEISS) aufgenommen. Die Quantifizierung der mitochondrialen Aggregate erfolgte mit dem *analyzing particles plugin* von ImageJ (NIH). Die Bilder wurden zu einer Aufnahme fusioniert. Nach Adjustierung des Farbschwellenwertes folgte die Quantifizierung der Aggregate nach deren Kreisförmigkeit (0.40 – 1.00) und Größe (0.05 μm^2 - $\infty \mu\text{m}^2$).

2.3.9 Komplex-I-Aktivitätsmessung

Die Komplex-I-Aktivität wurde in den Proben der Mitochondrienisolation gemessen. Um die biologischen Unterschiede zwischen den Versuchstieren zu berücksichtigen und einer konsekutiven Verzerrung der Ergebnisse vorzubeugen, normierte ich die Komplex-I-Aktivität in Bezug auf die absolute Proteinmenge und die Citratsynthase-Aktivität in denselben Proben. Als Referenzwert diente der Genotyp *pink1^{RV};FRT40A*.

Zur luminometrischen Bestimmung der Komplex-I-Aktivität erstellte ich gemäß Pipettierschema in Tab. 15 die Ansätze mit den für die Komplex-I-Aktivität essentiellen Substraten. Nach Zugabe der Mitochondrien wurden die Proben für 1 min bei 37 °C im Mikroplattenleser stabilisiert. Es folgte die Zugabe von Decylubiquinon. Die Abnahme der Extinktion bei 340 nm durch Verbrauch von NADH und Bildung von NAD⁺ wurde während 2 min gemessen. Folgende Reaktion liegt zugrunde:



Tab. 15.: Pipettierschema zur Bestimmung der Komplex-I-Aktivität

Reagenz	Well 1	Well 2
Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,5	50 µl	50 µl
Bovines Serumalbumin (BSA) 10 mg/ ml	50 µl	50 µl
MgCl ₂ 0,1 M	10 µl	10 µl
NADH 1 mM	20 µl	20 µl
KCN 30 mM	4 µl	4 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO)	4 µl	–
Rotenon 5 mM in DMSO	–	4 µl
Aqua dest.	58 µl	58 µl
Mitochondrien	4 µl	4 µl
Decylubiquinon	2 µl	2 µl

Um sicherzustellen, dass nur die Komplex-I-Aktivität und nicht auch Hintergrundaktivität anderer Komponenten der Atmungskette gemessen wurde, fügte ich einem Ansatz den Komplex-I-Inhibitor Rotenon hinzu. Das Ergebnis dieses Ansatzes wurde von demjenigen ohne Komplex-I-Inhibition subtrahiert. Die Enzymaktivität wurde gemäß folgender Formel berechnet:

$$a = \frac{E \times 10^9}{\epsilon \times PC \times AS}$$

a = Enzymaktivität (nmol/min/mg Protein); E = Extinktion; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient = 6290 (l·mol⁻¹·cm⁻¹); PC = Protein Konzentration (mg/ml); AS = Probenvolumen (µl)

In einer separaten Messung wurde die Aktivität der Citratsynthase anhand des in Tab. 16 zu entnehmenden Pipettierschemas bestimmt. Die Proben wurden nach Zugabe der Mitochondrien für 2 min bei 37 °C im Mikroplattenleser stabilisiert und anschließend Oxalsäure hinzugefügt. Die Zunahme der optischen Dichte durch Bildung des gelben Farbstoffes 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) wurde bei 412 nm für 2 min spektralphotometrisch gemessen. Folgende Reaktionen liegen zugrunde:

- i. Citratsynthase: Acetyl-CoA + Oxalacetat → Citrat + CoA + H⁺ + H₂O
- ii. Kolorimetrische Reaktion: CoA + DTNB → TNB + CoA-TNB

Tab. 16.: Pipettierschema zur Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität

Reagenz	Volumen
Tris-HCl (0,1 mM – pH 8,1)	161 μ l
Acetyl-CoA 3 mM	4 μ l
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) 1 mM	20 μ l
Triton X 4 %	2,4 μ l
Mitochondrien	3 μ l
Oxalsäure 10 mM	10 μ l

Die Enzymaktivität wurde mit der obigen Formel berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt $13.600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4 Statistische Auswertung und Graphen

Ordinalskalierte Variablen wurden in Prozentwerten ausgedrückt. Für verhältnisskalierte Variablen wurde der Prozentwert in Relation zu dem Kontrollgenotyp *pink1^{RV};FRT40A* berechnet und anschließend das arithmetische Mittel kalkuliert. Als Streumasse wurde die Standardabweichung (SD) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0.05$ festgesetzt. Signifikante Ergebnisse wurden unterteilt in * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$.

Die Wahl der statistischen Verfahren richtete sich nach der im Studiendesign definierten Fragestellung: In Experimenten, in denen im Rahmen von Vorarbeiten oder wissenschaftlicher Publikationen der Einfluss der *pink1^{B9}*-Mutation gegenüber dem *pink1*-Wildtyp belegt wurde, beschränkte sich die Fragestellung auf den Effekt der *lace⁸*-Mutation innerhalb des definierten genetischen Hintergrundes des *pink1*-Wildtyps und der *pink1^{B9}*-Mutation. Folglich wurden nur die Paarungen *pink1^{RV};FRT40A* vs. *pink1^{B9};FRT40A* und *pink1^{RV};lace⁸* vs. *pink1^{B9};lace⁸* untersucht. Unterschiede zwischen den unabhängigen Gruppen wurden entsprechend des einfaktoriellen Designs anhand des Mann-Whitney-Tests analysiert. Da der Vergleich des *pink1*-Wildtyps und der *pink1^{B9}*-Mutation in diesen Fällen nicht Teil der Hypothese war, wurde kein statistischer Vergleich durchgeführt.

In Fällen, in denen keine Vorarbeiten oder wissenschaftlichen Daten vorlagen, wurde zur Untersuchung des Effektes zweier unabhängiger Variablen (*pink1*-Genotyp und *lace*-Status) bzw. deren Interaktion auf eine abhängige Variable die zweifaktorielle nicht-parametrische Varianzanalyse (*two way non-parametric ANOVA*) verwendet. Signifikante Haupteffekte

wurden in diesen Fällen durch paarweise Mann-Whitney-Tests mit vierfacher Bonferroni-Korrektur weiter untersucht.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse und zur Erstellung der korrelierenden Graphen wurden das Statistikprogramm GraphPad Prism Version 8 (GraphPad Software) und Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation) benutzt. Die *two way non-parametric ANOVA* wurde mit dem Statistikprogramm "RStudio" Version 4.2 (Rstudio: Integrated Development for R. Studio) und dem R-Paket rankFD durchgeführt. Paarweise Mann-Whitney-Tests wurden mit der base-R-Funktion `wilcox.test` berechnet. Die Anpassung der *p*-Werte erfolgte mittels `p.adjust` (Methode = "bonferroni"). Die Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Affinity Designer Version 1.8.3 (Serif Europe) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Messung des ATP-Protein-Verhältnisses

Die mitochondriale Dysfunktion stellt einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese des MP dar (Ryan *et al.*, 2015). Korrelierend zeigen *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation charakteristisch verringerte ATP-Werte (Park *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2012). Interessanterweise beeinflusst Ceramid durch Inhibition der Komplexe-I, -II und -IV die Funktionsweise der Atmungskette und somit die ATP-Produktion (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000). Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich die genetische Manipulation der Ceramid-Synthese auf die ATP-Produktion in *D. melanogaster* auswirkt.

Im Vergleich zu dem *pink1^{B9};FRT40A*-Genotyp führte der heterozygote Verlust von *lace* zu einem Anstieg des ATP-Protein-Verhältnis in *pink1^{B9};lace^δ*-Fliegen ($p = 0.04$) (Abb. 7). Das heterozygote Vorliegen der *lace^δ*-Mutation hatte keinen Effekt auf das ATP-Protein-Verhältnis in Fliegen mit *pink1*-Wildtyp (Abb. 7). Die genetische Senkung der Ceramid-Spiegel scheint entsprechend keine vollständige Restitution der ATP-Level zu garantieren, wobei dies statistisch nicht überprüft wurde.

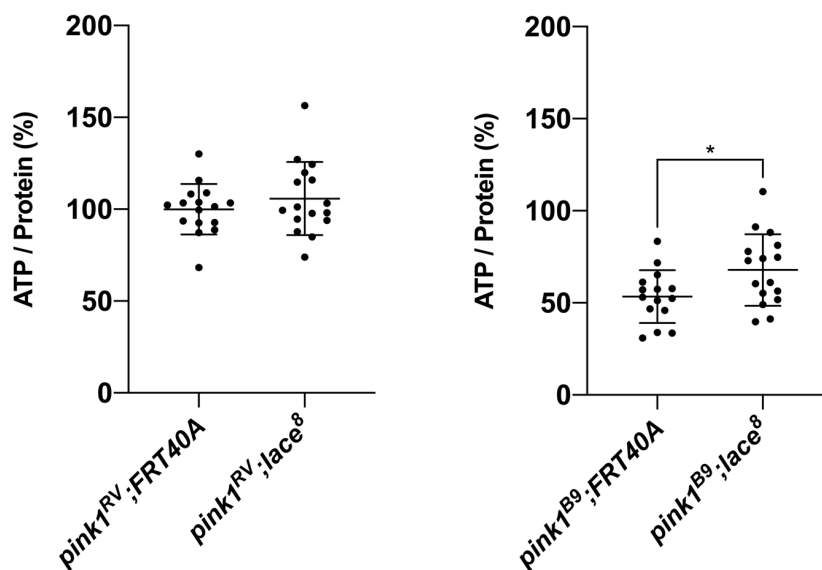


Abb. 7.: Die Reduktion der SPT-Aktivität in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation führt zu erhöhten ATP-Spiegeln.

Die Streudiagramme zeigen den prozentualen ATP-Mittelwert normiert auf den Proteingehalt des entsprechenden Genotyps ($n = 32$ Fliegen pro Genotyp). Dieser wurde in Relation zu dem Kontroll-Genotyp *pink1^{RV};FRT40A* berechnet. Jeder Punkt repräsentiert eine Analyse der ATP-Werte von zwei Fliegenexemplaren. Dargestellt ist weiterhin die Standardabweichung. Statistische Analyse: Mann-Whitney-Test; * $p < 0.05$.

Zusammenfassend scheint ein heterozygoten Vorliegen der *lace*^δ-Mutation in Fliegen mit *pink1*^{B9}-Mutation zu einer partiellen Restitution des ATP-Proteinverhältnisses zu führen, jedoch gleichzeitig das ATP-Level in Fliegen mit *pink1*-Wildtyp nicht negativ zu affizieren.

3.2 Testung der Flugfähigkeit

Für Insekten stellt das Fliegen aufgrund der hohen Kontraktionsfrequenz der Flugmuskulatur einen sehr energieaufwendigen Prozess dar (Harrison und Roberts, 2000). Fliegen mit *pink1*^{B9}-Mutation zeigen eine reduzierte ATP-Produktion, eine Degeneration des indirekten Flugmuskels und ein charakteristisch reduziertes Flugverhalten (Park *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2012). Aufgrund des erhöhten ATP-Protein-Verhältnisses in *pink1*^{B9};*lace*^δ-Fliegen wurde beschlossen, die Auswirkungen der Ceramid-Reduktion auf die Flugfähigkeit von *pink1*^{B9}-Mutanten zu erforschen. Im Vergleich mit *pink1*^{B9};*FRT40A*-Fliegen verbesserte die Einführung der *lace*^δ-Mutation in das Genom von *pink1*^{B9}-Mutanten die Flugfähigkeit ($p < 0.001$) (Abb. 8). Es wurde jedoch keine vollständige Restitution der Flugfähigkeit von *pink1*^{B9}-Mutanten beobachtet (Abb. 8). Die *lace*^δ-Mutation hatte keinen Effekt auf die Flugfähigkeit bei Vorliegen eines *pink1*-Wildtyp.

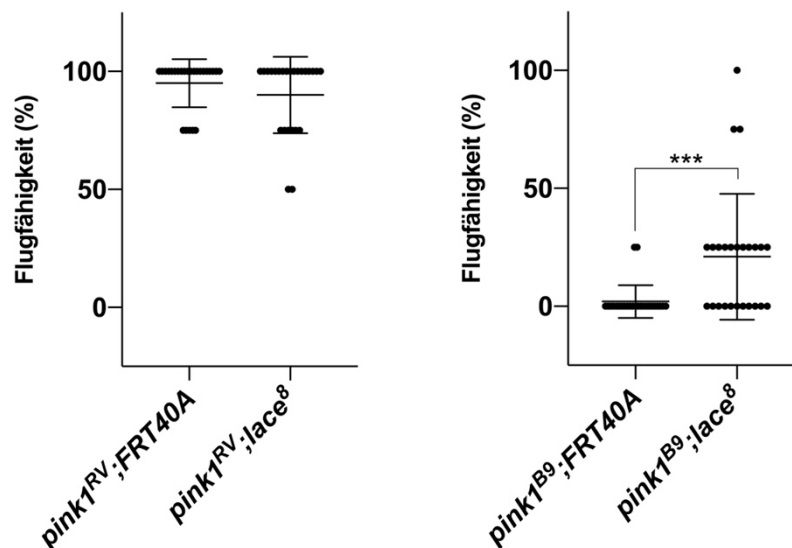


Abb. 8.: Die Reduktion der SPT-Aktivität verbessert die Flugfähigkeit in *D. melanogaster* mit *pink1*^{B9}-Mutation.

Die Streudiagramme zeigen den Mittelwert der Flugfähigkeit des jeweiligen Genotyps ($n = 100$ Fliegen pro Genotyp) und die Standardabweichung. Jeder Punkt entspricht der Prozentzahl flugfähiger Fliegen aus einer Gruppe mit 4 Exemplaren. Statistische Analyse: Mann-Whitney-Test; *** $p < 0.001$.

Folglich legen die Ergebnisse nahe, dass der heterozygote Verlust von *lace* in *pink1^{B9}*-Mutanten eine partielle Restitution der Flugfähigkeit bedingt, während sich die Flugfähigkeit beim *pink1*-Wildtyp nicht verschlechtert.

3.3 Mitochondriale Aggregation

Unter basalen Bedingungen bilden Mitochondrien ein dynamisches tubuläres Netzwerk innerhalb einer Zelle aus (Abb. 9A und B). Mitochondriale Schäden können zum Kollaps dieses tubulären mitochondrialen Netzwerks führen (Wai und Langer, 2016). Dabei entstehen mitochondriale Aggregationen (Bottone *et al.*, 2013), die u.a. im Rahmen der *pink1^{B9}*-Mutation (Vos *et al.*, 2012) und bei apoptotischen Stimuli wie einer Ceramid-Exposition (Esposti *et al.*, 1999) beobachtet werden. Daher stellte sich nun die Frage, ob die Reduktion der Ceramid-Spiegel neben der gesteigerten ATP-Produktion mit einer Wiederherstellung des mitochondrialen tubulären Netzwerks korreliert.

Wie bereits vorbeschrieben (Vos *et al.*, 2012) erschienen die mitochondrialen Aggregationen im Genotyp *pink1^{B9};FRT40A* visuell verglichen mit dem Genotyp *pink1^{RV};FRT40A* prominenter (Abb. 9A und C; Abb. 10). Dieser Umstand wurde nicht statistisch überprüft. Der heterozygote Verlust von *lace* bedingte eine Abnahme des mitochondrialen Clusterings in *pink1^{B9}*-Mutanten ($p < 0.01$) (Abb. 9C und D; Abb. 10). Eine vollständige Wiederherstellung des mitochondrialen tubulären Netzwerkes durch die genetische Senkung der Ceramid-Spiegel wurde jedoch nicht beobachtet (Abb. 9C und D; Abb. 10). Die Einführung der *lace^δ*-Mutation bedingte keine Veränderung der mitochondrialen Morphologie in der Kontrollgruppe (Abb. 9A und B; Abb. 10).

Zusammenfassend führt das heterozygote Vorliegen der *lace^δ*-Mutation in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation zu einer Reduktion der mitochondrialen Clusterbildung, während die Einführung der *lace^δ*-Mutation das tubuläre mitochondriale Netzwerk der Kontrollgruppe nicht beeinträchtigt.

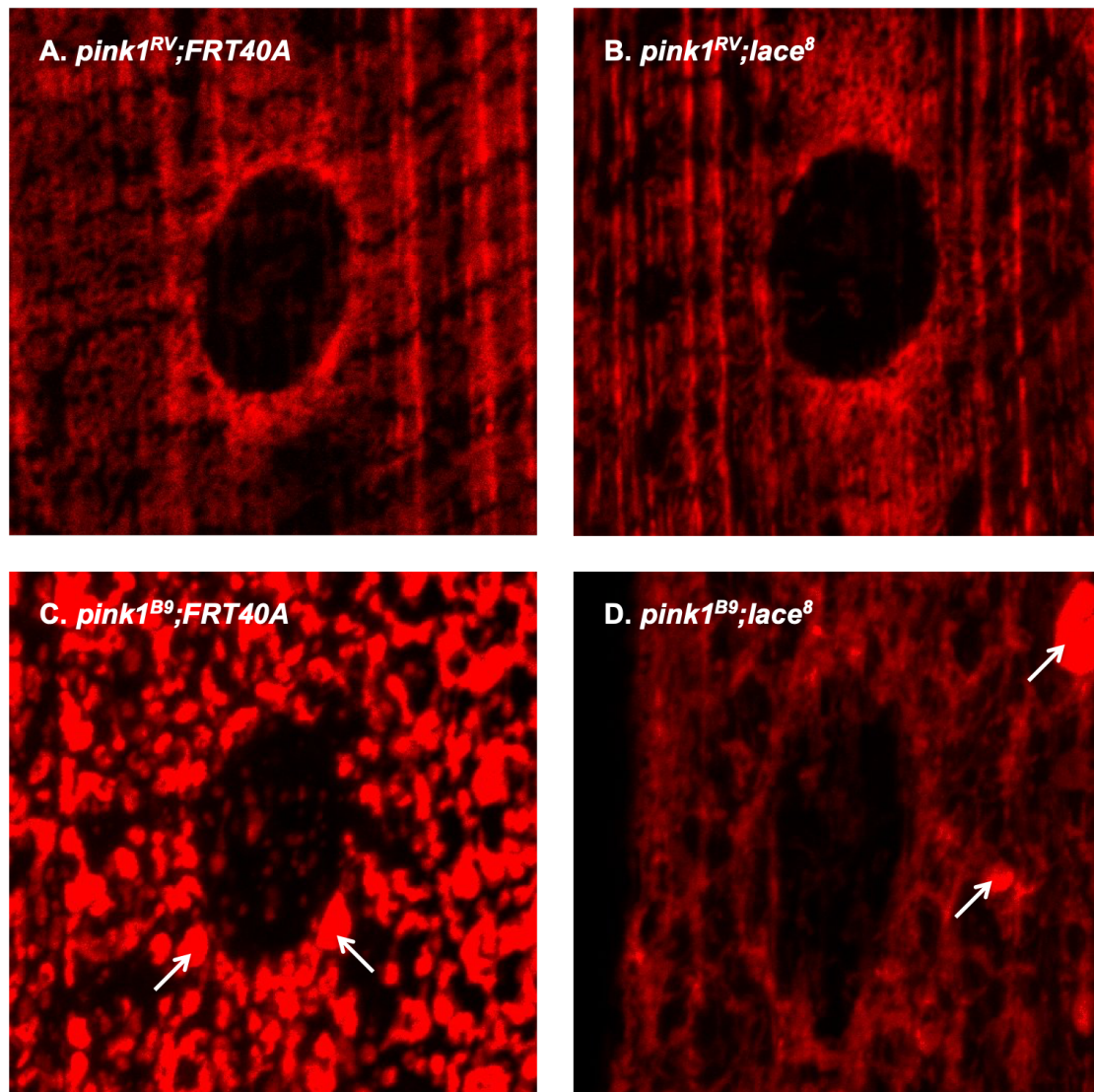


Abb. 9.: Die Reduktion der SPT-Aktivität führt zu einer partiellen Wiederherstellung des tubulären mitochondrialen Netzwerkes in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation.

Abgebildet sind beispielhafte larvale Muskelabschnitte der untersuchten Genotypen. Im Zentrum befindet sich der Zellkern als elliptische, schwarze Struktur. Die Immunfärbung lässt Mitochondrien rot fluoreszieren. Einzelne mitochondriale Aggregationen wurden exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert. In den Bildern A und B ist ein tubuläres mitochondriales Netzwerk zu erkennen. Der Genotyp *pink1^{B9};FRT40A* (A) zeigt einen Kollaps des tubulären mitochondrialen Netzwerkes mit deutlichen mitochondrialen Aggregationen, während *pink1^{B9}*-Fliegen mit *lac8*-Mutation (D) nur vereinzelte Aggregationen aufweisen.

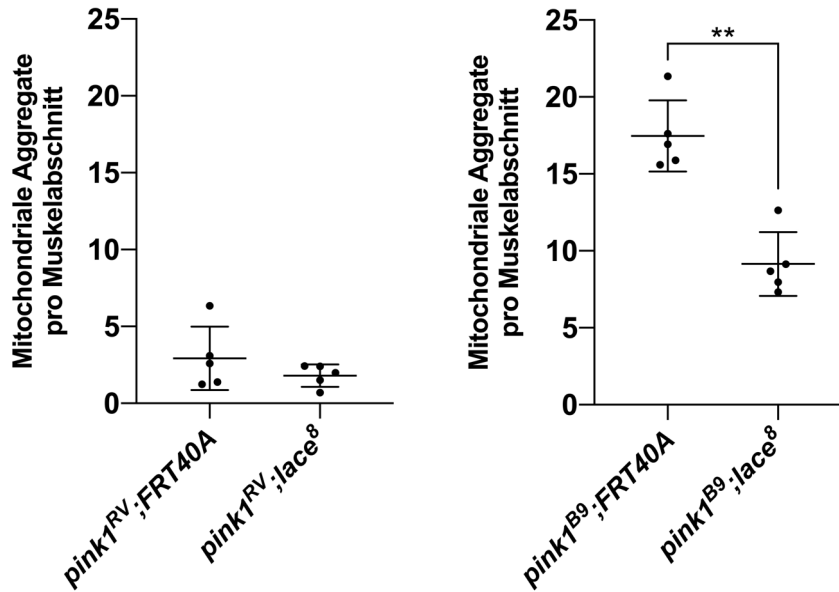


Abb. 10.: Die Reduktion der SPT-Aktivität vermindert das mitochondriale Clustering in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation.

Die Streudiagramme zeigen den Mittelwert mitochondrialer Aggregate pro Muskelabschnitt der jeweiligen Genotypen ($n = 5$ Larven pro Genotyp). Jeder Punkt entspricht der gemittelten Anzahl mitochondrialer Aggregate einer Larve. Abgebildet ist zudem die Standardabweichung. Statistische Analyse: Mann-Whitney-Test; ** $p < 0.01$.

3.4 Messung der Komplex-I-Aktivität

Eine verminderte Aktivität des Komplex-I der Atmungskette wird im Rahmen der *PINK1*-Mutation aufgrund einer ausbleibenden *PINK1*-vermittelten Phosphorylierung von dessen NdufA10-Untereinheit beobachtet (Morais *et al.*, 2014). Interessanterweise inhibiert Ceramid den Komplex-I (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000). In Anbetracht der gesteigerten ATP-Werte und der partiellen Wiederherstellung des tubulären mitochondrialen Netzwerkes in den Vorversuchen, sollte die Auswirkung eines reduzierten Ceramid-Spiegels auf die Aktivität des Komplex-I im Sinne eines Erklärungsansatzes für die oben erwähnten Effekte untersucht werden.

In Übereinstimmung mit der Literatur erschien die Aktivität des Komplex-I des Genotyps *pink1^{B9};FRT40A* gegenüber dem Genotyp *pink1^{RV};FRT40A* vermindert (Abb. 11) (Morais *et al.*, 2014). Der heterozygote Verlust von *lace* in *pink1^{B9}*-mutanten *D. melanogaster* bedingte eine Zunahme der Komplex-I-Aktivität ($p = 0.02$) (Abb. 11), wobei die Komplex-I-Aktivität dem Anschein nach nur partiell wiederhergestellt wurde. Überraschenderweise führte die Einführung der *lace⁸*-Mutation in Fliegen mit

pink1-Wildtyp zu einer signifikant eingeschränkten Aktivität des Komplex-I ($p < 0.0001$) (Abb. 11).

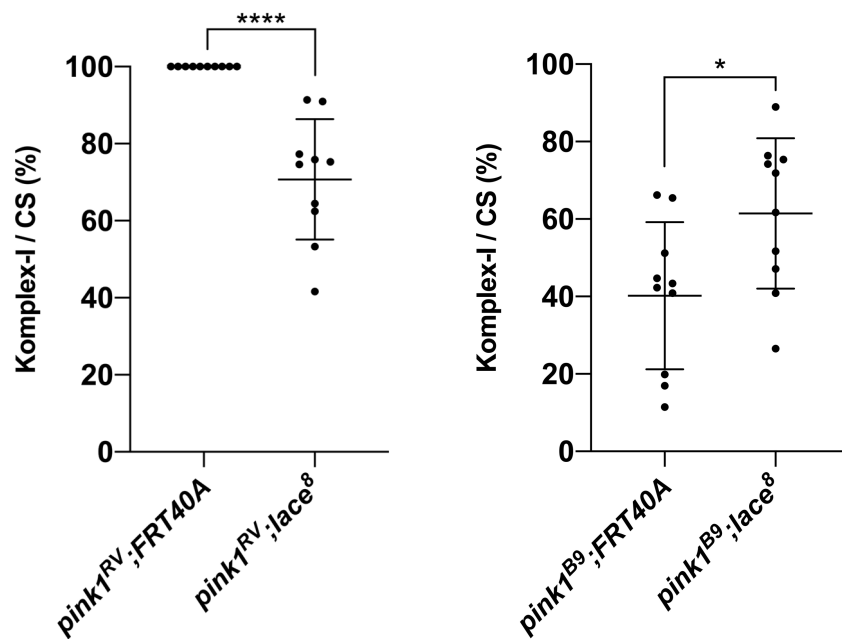


Abb. 11.: Die Reduktion der SPT-Aktivität führt zu einer verbesserten Komplex-I-Aktivität in *D. melanogaster* mit *pink1*^{B9}-Mutation und senkt die Komplex-I-Aktivität in Fliegen mit *pink1*-Wildtyp.

In den Streudiagrammen ist der auf die CS-Aktivität normierte Mittelwert der Komplex-I-Aktivität ($n = 10$ Analysen) bezogen auf den entsprechenden Genotyp in Prozent dargestellt. Der Genotyp *pink1*^{RV};FRT40A diente als Referenzwert. Ferner ist die Standardabweichung abgebildet. Statistische Analyse: Mann-Whitney-Test; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. CS – Citratsynthase.

Zusammenfassend scheint die heterozygote Einschränkung der SPT-Aktivität in Fliegen mit *pink1*^{B9}-Mutation die Aktivität des Komplex-I zu verbessern, jedoch gleichzeitig eine Inhibition des Komplex-I in Fliegen mit *pink1*-Wildtyp zu verursachen.

3.5 Messung des ROS-Protein-Verhältnisses

Die Pathogenese des MP wird mit erhöhtem oxidativem Stress in Verbindung gebracht (Dias, Junn und Mouradian, 2013). Ein dysfunktionaler Komplex-I wird in der Literatur als Hauptverursacher der ROS im Rahmen der mitochondrialen Dysfunktion beschrieben (Brand *et al.*, 2004). Ceramid kann konzentrationsabhängig zur Zunahme der ROS-Produktion führen (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000; Jembrek, Hof und Šimić, 2015). Da sowohl Ceramid als auch Pink1 über die bereits diskutierte

aktivitätsregulierende Funktion des Komplex-I die ROS-Produktion affektieren, sollte untersucht werden, ob sich eine Ceramid-Reduktion auf die ROS-Spiegel auswirkt.

Das ROS-Protein-Verhältnis schien in Übereinstimmung mit der Literatur (Esposito *et al.*, 2013) in *pink1^{B9};FRT40A*-Fliegen verglichen mit *pink^{RV};FRT40A*-Fliegen erhöht (Abb. 12). Interessanterweise senkte der heterozygote Verlust von *lace* die relative ROS-Last in *pink1^{B9}*-mutanten Fliegen ($p = 0.04$) (Abb. 12). Die *lace⁸*-Mutation hatte keinen Einfluss auf die ROS-Produktion in *pink1*-Wildtyp

Abschließend scheint die heterozygote Einführung der Mutation *lace⁸* in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation eine Reduktion der ROS-Produktion zu bedingen.

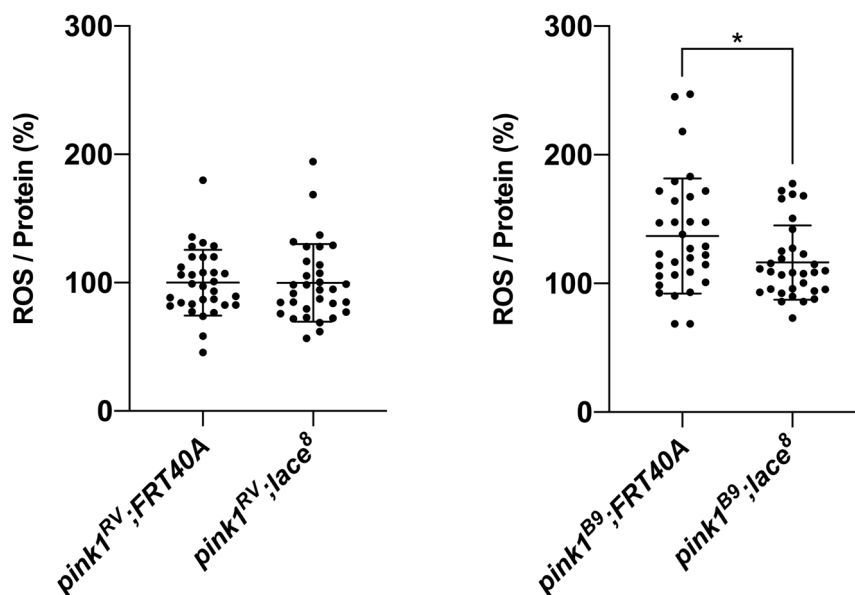


Abb. 12.: Die Reduktion der SPT-Aktivität in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation senkt die ROS-Produktion.

Die Streudiagramme zeigen den auf den Proteingehalt normierten prozentualen ROS-Mittelwert in Bezug auf den entsprechenden Genotyp. Diese wurde aus dem Mittelwert ($n = 960$ Fliegen pro Genotyp) in Relation zu dem Kontroll-Genotyp *pink1^{RV};FRT40A* berechnet. Jeder Punkt repräsentiert eine Analyse der ROS-Werte von 30 Fliegenexemplaren. Evident sind weiterhin der Mittelwert und die Standardabweichung. Statistische Analyse: Mann-Whitney-Test; * $p < 0.05$.

3.6 SOD2-Expression

Um die Pathophysiologie der verminderten ROS-Spiegel weiter abzuklären, wurde entschieden die SOD2-Expression in *pink1^{B9}*-Mutanten in Reaktion auf die Reduktion der Ceramid-Spiegel zu untersuchen. Die mitochondriale SOD2 ist maßgeblich am Abbau toxischer Superoxide in Mitochondrien beteiligt (Zelko, Mariani und Rodney, 2002). Entsprechend wird die SOD2-Expression bei Zunahme des zellulären oxidativen Stresses reaktiv gesteigert (Wang *et al.*, 2018).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab keine statistisch signifikante Interaktion ($F(1, 8.192) = 1.757, p = 0.221$). Weder der *pink1*-Status ($F(1, 8.192) = 0.010, p = 0.921$) noch die SPT-Aktivität ($F(1, 8.192) = 0.964, p = 0.694$) zeigten einen signifikanten Einfluss auf die SOD2-Expression (Abb. 13).

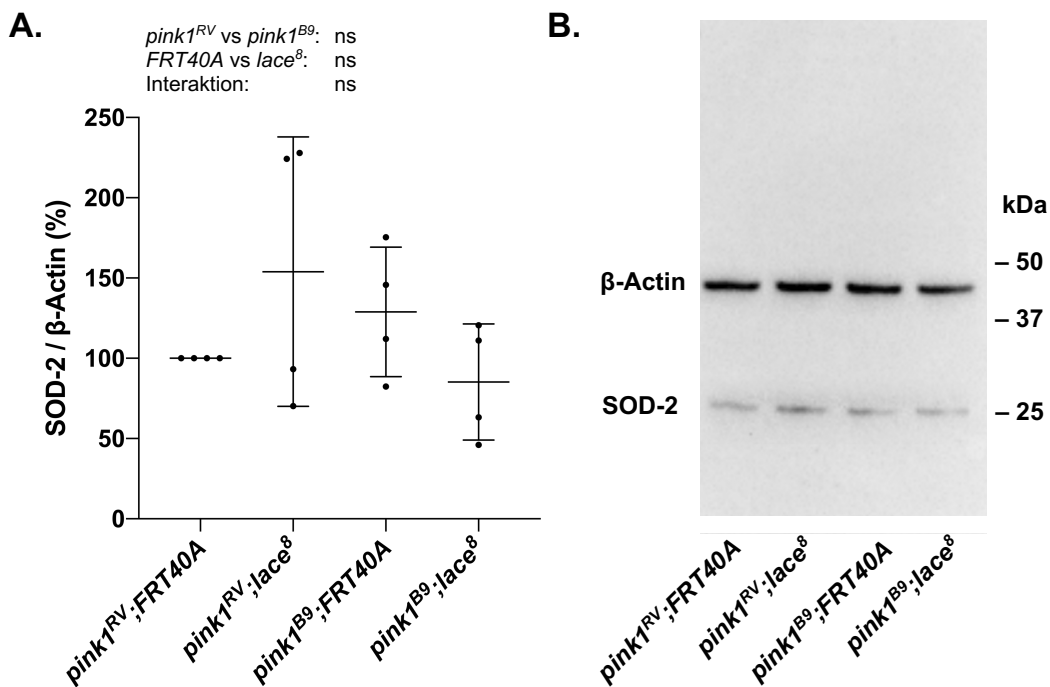


Abb. 13.: Die Reduktion der SPT-Aktivität führt zu keinem nachweisbaren Unterschied in der SOD2-Expression der untersuchten Genotypen.

A. Das Diagramm zeigt den auf β-Actin normierten Mittelwert ($n = 12$ Fliegen pro Genotyp) der SOD2-Expression des entsprechenden Genotyps in Prozent. Die Fliegen des *pink1^R;FRT40A*-Genotyps dienen als Referenzwert. Jeder Punkt entspricht einem Western Blot. Abgebildet ist weiterhin die Standardabweichung. Statistische Analyse: *two way non-parametric ANOVA* [*pink1^{RV} vs pink1^{B9}*: $F(1, 8.192) = 0.010, p = 0.921$; *FRT40A vs lace⁸*: $F(1, 8.192) = 0.964, p = 0.694$; Interaktion: $F(1, 8.192) = 1.757, p = 0.221$]. ns – nicht signifikant.

B. Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot zur Analyse der SOD2-Expression der jeweiligen Genotypen. Abgebildet sind SOD2-Banden und das Referenzgen β-Actin. Die Position der Markerproteine ist rechts indiziert.

3.7 Messung oxidierter Proteine

In dem Bestreben die Auswirkungen einer reduzierten Ceramid-Produktion auf die ROS-Spiegel zu erforschen, wurden zur Abschätzung des zellulären Oxidationsstatus Carbonylgruppen gemessen, die gehäuft an den Seitenketten von Proteinen bei der Exposition gegenüber oxidativem Stress entstehen (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

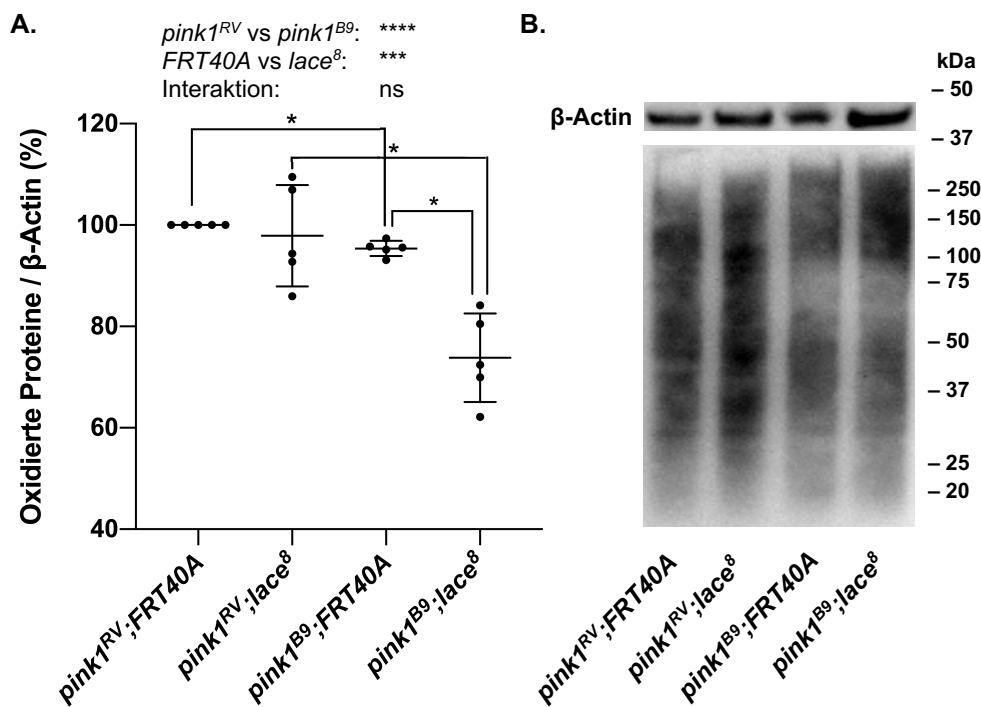


Abb. 14.: Die Reduktion der SPT-Aktivität senkt die Anzahl Carbonylgruppen in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation.

A. Das Streudiagramm zeigt den auf β -Actin normierten Mittelwert oxidierter Proteine des entsprechenden Genotyps in Prozent ($n = 15$ Fliegen pro Genotyp). Als Referenzwert diente der Genotyp *pink1^{RV};FRT40A*. Jeder Punkt repräsentiert einen OxyBlot. Abgebildet ist weiterhin die Standardabweichung. Statistische Analyse: *two way non-parametric ANOVA* [*pink1^{RV} vs pink1^{B9}*: $F(1, 16) = 19.977, p < 0.0001$; *FRT40A vs lace⁸*: $F(1, 16) = 12.963, p = 0.001$; Interaktion: $F(1, 16) = 1.541, p = 0.268$]. Paarweise Post-hoc Analyse mittels Mann-Whitney-Test mit vierfacher Bonferroni-Korrektur. * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns – nicht signifikant.

B. Ergebnis eines exemplarischen OxyBlot zur Analyse des Gehalts von Carbonylverbindungen in den jeweiligen Genotypen. Abgebildet ist weiterhin das Referenzprotein β -Actin aus dem korrelierenden Western Blot. Die Position der Markerproteine ist rechts indiziert.

Es wurde eine zweifaktorielle nicht-parametrische Varianzanalyse durchgeführt, um den Effekt der Pink1- und der SPT-Aktivität auf den Carbonylgruppengehalt zu untersuchen. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab keine statistisch signifikante

Interaktion ($F(1, 16) = 1.541, p = 0.268$). Der *pink1*-Status ($F(1, 16) = 19.977, p < 0.0001$) sowie SPT-Aktivität ($F(1, 16) = 12.963, p < 0.001$) zeigten jedoch einen signifikanten Einfluss auf den Carbonylgruppengehalt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der ROS-Messung wiesen Fliegen mit dem Genotyp *pink1^{B9};FRT40A* ($p_{\text{Bonferroni}} = 0.02$) und *pink1^{B9};lace⁸* ($p_{\text{Bonferroni}} = 0.04$) überraschenderweise einen erniedrigten Carbonylgruppengehalt gegenüber *pink1^{RV}*-Fliegen auf (Abb. 14). Analog zu den Ergebnissen aus der ROS-Messung führte die *lace⁸*-Mutation in Fliegen mit *pink1^{B9}*-Mutation jedoch zu einer Reduktion der Carbonylgruppen ($p_{\text{Bonferroni}} = 0.04$) (Abb. 14). Der Carbonylgruppengehalt in Fliegen mit *pink1*-Wildtyp und unterschiedlichem *lace*-Status zeigte keinen Unterschied ($p_{\text{Bonferroni}} = 1$).

In Zusammenschau der Befunde scheint die *lace⁸*-Mutation eine Reduktion der Carbonylgruppen in Fliegen mit *pink1^{B9}*-Mutation zu bewirken, während *pink1^{RV}*-Fliegen mit erniedrigter ROS-Last in Widerspruch zu den Ergebnissen aus der ROS-Messung erhöhte Carbonylgruppen-Spiegel aufweisen.

4 Diskussion

Obwohl die Pathophysiologie des MP zunehmend besser verstanden wird, fehlen bis heute kurative Therapieansätze. Daher basiert die aktuelle Therapie auf Pharmaka, die das zerebrale Dopamin-Angebot steigern oder auf neurochirurgischen Eingriffen, die mittels Impulsgeneration die Basalganglienschleife modifizieren.

Bei den Forschungsarbeiten geraten der Lipidstoffwechsel und die mitochondriale Dysfunktion zunehmend in das Zentrum der Aufmerksamkeit und verbinden die Thematik der Neurodegeneration mit derjenigen des dysregulierten Fettmetabolismus. U.a. wurden in Parkinson-Patienten *post mortem* in Lewy-Körperchen Lipid-Aggregate und dysmorphe Mitochondrien nachgewiesen (Shahmoradian *et al.*, 2019). Wegweisend für die vorliegende Arbeit war der Nachweis erhöhter Spiegel des Sphingolipids Ceramid in einer Lipidom-Analyse von isolierten Mitochondrien aus MEFs mit *pink1*-Knock-Out (Vos *et al.*, 2017). Interessanterweise löst Ceramid die Ceramid-vermittelte Mitophagie aus (Sentelle *et al.*, 2012), greift durch Hemmung des Komplex-I der ETK (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000; Ganesan *et al.*, 2010) in die Energieproduktion und durch Steigerung der ROS-Produktion in die zelluläre Redox-Situation ein (Quillet-Mary *et al.*, 1997).

Als Grundbaustein der Sphingolipide fungiert Ceramid als zentraler Metabolit im Sphingolipidstoffwechsel. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Rahmen der Ceramid-*de-novo*-Synthese wird durch die SPT vorgenommen. Die SPT setzt sich aus den Untereinheiten SPTLC1 und SPTLC2 zusammen. In Fliegen kodiert das Ortholog *lace* die SPTLC2-Untereinheit. Hypomorphe *lace*-Mutationen führen zu einer signifikant reduzierten Ceramid-Produktion (Goyal *et al.*, 2019). Die pharmakologische Hemmung der Ceramid-Produktion mit Myriocin (Inhibitor der SPT) verbesserte den Phänotyp von *D. melanogaster* mit *pink1*^{B9}-Mutation (Vos *et al.*, 2021).

Als Limitation sei angemerkt, dass auf eine direkte Messung der Ceramid-Spiegel in Anlehnung an wissenschaftliche Publikationen (Vos *et al.*, 2017; Goyal *et al.*, 2019; Vos *et al.*, 2021), die eine Ceramidreduktion durch Hemmung der SPT belegten, verzichtet wurde. Wenn erhöhte oder erniedrigte Ceramid-Spiegel erwähnt werden, handelt es sich hierbei folglich um evidenzbasierte Annahmen in Anlehnung auf die oben erwähnten Publikationen.

4.1 Reduzierte Ceramid-Spiegel verbessern die mitochondriale Atmungskette bei *pink1^{B9}*-Mutation

PINK1 garantiert durch Phosphorylierung der NdufA10-Untereinheit des Komplex-I dessen effiziente Funktion (Morais *et al.*, 2014). Die Dysfunktion des Komplex-I im Rahmen der *PINK1*-Mutation bringt neben der verminderten ATP-Produktion weitere schwerwiegende sekundäre Folgen mit sich, die über vermehrten oxidativen Stress, eine dysregulierte Calcium-Homöostase und Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials eine gesteigerte Apoptoseanfälligkeit auslösen (Abb. 1) (Surmeier, Obeso und Holliday, 2017). Ceramid wiederum inhibiert den Komplex-I, -III und -IV der ETK (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000; Ganesan *et al.*, 2010). Wie erwartet führte die Exposition von *pink1^{B9}*-mutierten *D. melanogaster* gegenüber Myriocin zu einer erhöhten ATP-Produktion und einer verbesserten Flugfähigkeit (Vos *et al.*, 2021). In einem nächsten Schritt wurde daher die Funktionsweise der ETK auf die genetische Reduktion des Ceramid-Spiegels durch Einführung der Mutation *lace⁸* untersucht.

Den Erwartungen entsprechend zeigten Fliegen mit *pink1^{B9}*- und *lace⁸*-Mutation eine Erhöhung der ATP-Spiegel, während Fliegen mit erhöhten Ceramid-Spiegeln und *pink1^{B9}*-Mutation gemäß Voruntersuchungen (Vos *et al.*, 2021) in Übereinstimmung mit der Literatur den charakteristisch reduzierten ATP-Gehalt aufwiesen (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006) (Abb. 7). Die erhobenen Daten legen somit nahe, dass die selektive Reduktion erhöhter Ceramid-Spiegel in Genotypen mit der Mutation *pink1^{B9}* eine gesteigerte ATP-Produktion bedingt. Eine vollständige Wiederherstellung der ATP-Spiegel auf das Niveau der Kontrollgruppe erscheint jedoch unwahrscheinlich, da das ATP-Defizit in *pink1^{B9};lace⁸*-Fliegen gegenüber dem Genotyp *pink1^{RV};lace⁸* dem Eindruck nach fortbesteht (Abb. 7). Dieser Aspekt wurde allerdings statistisch nicht überprüft.

Hinsichtlich der Flugfähigkeit konnte derselbe Sachverhalt beobachtet werden. So führten die erniedrigten Ceramid-Spiegel im Genotyp *pink1^{B9};lace⁸* zu einer verbesserten Flugfähigkeit im Vergleich mit dem Genotyp *pink1^{B9};FRT40A* (Abb. 8). Gleichzeitig erweist sich der positive Effekt auf die Flugfähigkeit bei 21 % flugfähigen *D. melanogaster* mit Genotyp *pink1^{B9};lace⁸* nur mäßig ausgeprägt. Unter Einbezug der Ergebnisse der ATP-Messung legt dieser Umstand nahe, dass die Senkung des Ceramidgehalts nicht ausreicht, um die genetische Dysfunktion von *pink1* in Bezug auf die ATP-Produktion und Flugfähigkeit zu kompensieren.

Passend zu den vorliegenden ATP-Daten führte die Ceramidreduktion in Fliegen mit *pink1^{B9}*-Mutation ebenfalls zu einer partiellen Wiederherstellung der Komplex-I-Aktivität (Abb. 11). Auch in diesem Versuch wurde jedoch lediglich ein moderat positiver Effekt auf die Komplex-I-Aktivität mit einem Anstieg von 24,2 % beobachtet. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte der Genotyp *pink1^{B9};FRT40A* im visuellen Vergleich zu den *pink1^{RV};FRT40A*-Fliegen eine Reduktion der Komplex-I-Aktivität um mehr als 50 % (Abb. 11) (Morais *et al.*, 2014). Die Disinhibition des Komplex-I im Zuge der Ceramid-Reduktion scheint das *pink1^{B9}*-vermittelte ATP-Defizit nicht vollständig zu kompensieren. Dies wäre nicht weiter verwunderlich, zumal bei persistierender Pink1-Dysfunktion, eine vollständige Erholung der Komplex-I-Aktivität aufgrund der ausbleibenden Pink1-medierten Phosphorylierung unwahrscheinlich erscheint. Interessanterweise inhibiert Ceramid ebenfalls die β -Oxidation (Raichur *et al.*, 2014; Turpin *et al.*, 2014). Folglich ließe sich die partielle ATP-Restitution anteilsweise auch durch eine Enthemmung der β -Oxidation erklären. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen wäre es in einem nächsten Schritt interessant, den Einfluss von Ceramid auf die Aktivität der β -Oxidation im Rahmen der *pink1*-Mutation zu untersuchen, um die partielle Reversibilität der ATP-Depletion aufzuschlüsseln und allenfalls neue Therapieansätze für den MP aufzudecken.

Entgegen den Erwartungen zeigte die Kontrollgruppe *pink1^{RV};lace⁸* eine reduzierte Aktivität des Komplex-I (Abb. 11). Diese Beobachtung könnte durch erhöhte Palmitat-Spiegel erklärt werden. Im Ceramid *de-novo*-Stoffwechselweg dient Palmitat in seiner aktivierten Form als Palmitoyl-CoA zusammen mit Serin der SPT als Edukt zur Synthese der Ceramid-Vorstufe 3-Ketosphingarin. In Fliegen mit *lace⁸*-Mutation wäre es vorstellbar, dass sich die Edukte der dysfunktionalen SPT anstauen. Dies ist insofern relevant, da Palmitat selektiv die aktive Unterform des Komplex-I hemmt und diese Hemmung bei physiologischen Temperaturen von 37 °C irreversibel sein kann (Loskovich *et al.*, 2005). Jedoch basiert dieses Erkenntnis auf Experimenten an submitochondrialen Partikeln. Ferner werden in Anbetracht der niedrigen Löslichkeit von Palmitat weitere Studien benötigt, um die physiologische Relevanz dieser Inhibition zu unterstreichen (Loskovich *et al.*, 2005). Da in dem vorliegenden Experiment keine Palmitat-Spiegel in *pink1^{RV};lace⁸*-Fliegen bestimmt wurden, bleibt die Hemmung der Komplex-I-Aktivität durch Palmitat hypothetisch. Jedoch sind in *D. melanogaster* mit *pink1*-Wildtyp die Palmitat-Spiegel im Vergleich mit *pink1^{B9}*-Mutanten erhöht (Vos *et al.*, 2017). In *pink1^{B9}*-Fliegen könnte dies einerseits auf eine erhöhte Aktivität der β -Oxidation als alternative Energiequelle zu der dysfunktionalen ETK oder

andererseits auf eine vermehrte Ceramid-Produktion zur Induktion der Ceramid-vermittelten Mitophagie bei dysfunktionaler Pink1-mediiertes Mitophagie hinweisen.

4.2 Reduzierte Ceramid-Spiegel senken die ROS-Last bei *pink1^{B9}*-Mutation

Besonders reaktive sauerstoffhaltige Moleküle werden als ROS (u.a. H₂O₂, O₂^{·-}, HO[·]) bezeichnet. Ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und Abbau im Sinne einer ROS-Überproduktion führt zu oxidativem Stress mit potentiell verheerenden Konsequenzen, da ROS-Moleküle in der Lage sind praktisch jedem zellulären Molekül, inklusive DNA, Proteinen und Lipiden oxidativen Schaden zuzufügen (Perier und Vila, 2012). Mittlerweile ist bekannt, dass der im Rahmen der mitochondrialen Dysfunktion erhöhte oxidative Stress einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese des MP darstellt (Dias, Junn und Mouradian, 2013). Die vulnerablen dopaminergen Neurone der SNc weisen ein besonders hohes basales Niveau an mitochondrialem oxidativen Stress auf (Surmeier, Obeso und Halliday, 2017). Als pathophysiologisches Korrelat wurde in der SNc von MP-Patienten *post mortem* eine verminderte Komplex-I-Aktivität nachgewiesen (Schapira *et al.*, 1989). Die wissenschaftliche Beweislage deutet auf den Komplex-I als Hauptverursacher der ROS-Produktion dysfunktionaler Mitochondrien hin (Brand *et al.*, 2004). *D. melanogaster* mit *pink1*-Mutation zeigen charakteristischerweise eine erhöhte ROS-Last (Esposito *et al.*, 2013). Da Ceramid interessanterweise die Komplexe I, III und IV der ETK inhibiert und auf diese Weise eine gesteigerte ROS-Produktion bedingt (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000; Ganesan *et al.*, 2010), stellte sich die Frage, wie sich eine Ceramid-Reduktion durch Einführung der *lace⁸*-Mutation auf die ROS-Produktion in *pink1*-Mutanten auswirkt.

Der Genotyp *pink1^{B9};FRT40A* schien in Übereinstimmung mit der Literatur erhöhte ROS-Werte aufzuweisen (Esposito *et al.*, 2013), wobei es sich hierbei um eine visuelle Beobachtung ohne statistische Überprüfung handelt. während die Ceramid-Reduktion im Genotyp *pink1^{B9};lace⁸* die Sauerstoffradikallast deutlich senkte (Abb. 12). Ein möglicher Erklärungsansatz besteht in der reduzierten Ceramid-induzierten ROS-Produktion durch den Komplex-I der Atmungskette. Analog zu den Vorversuchen wurde dem Anschein nach keine vollständige Remission im Genotyp *pink1^{B9};lace⁸* erreicht (Abb. 12). Da trotz der Ceramid-Reduktion die vermittelten Konsequenzen der *pink1*-Mutation persistieren, könnten diverse Gründe diesen Umstand erklären. Unter anderem entfällt durch die erniedrigten Ceramid-Spiegel der Grundbaustein für die Ceramid-induzierte Mitophagie, während die Pink1-induzierte Mitophagie weiterhin erschwert abläuft. Ebenfalls bleibt die Pink1-vermittelte

selektive Sequestrierung defekter mitochondrialer Bestandteile (z.B. des Komplex-I) anhand von MDVs eingeschränkt. Die mitochondriale Qualitätskontrolle im Sinne der Mitophagie könnte folglich zunehmend daran scheitern, dysfunktionale, ROS-produzierende Mitochondrien zu beseitigen.

Um die Ursache der reduzierten ROS-Last weiter zu analysieren, wurde als nächstes die SOD2-Expression untersucht. Bei der SOD2 handelt es sich um ein exklusiv in Mitochondrien vorkommendes Enzym, das maßgeblich am Abbau der im Rahmen der Atmungskette entstehenden Superoxidanionen beteiligt ist (Zelko, Mariani und Rodney, 2002). Die SOD2-Expression im MP wird kontrovers diskutiert (Flynn und Melovn, 2013). Es gibt Studien, in denen die SOD2-Expression der Substantia nigra von Parkinson-Patienten erhöht ist und als möglicher Kompensationsmechanismus betrachtet wird (Saggu *et al.*, 1989). Unterstützend reduziert die SOD2-Überexpression in *pink1*-mutanten *D. melanogaster* die ROS-Last und stellt das reguläre tubuläre mitochondriale Netzwerk einer Zelle sowie die Kletterfähigkeit der Fliegen wieder her (Biosa *et al.*, 2018). Leider

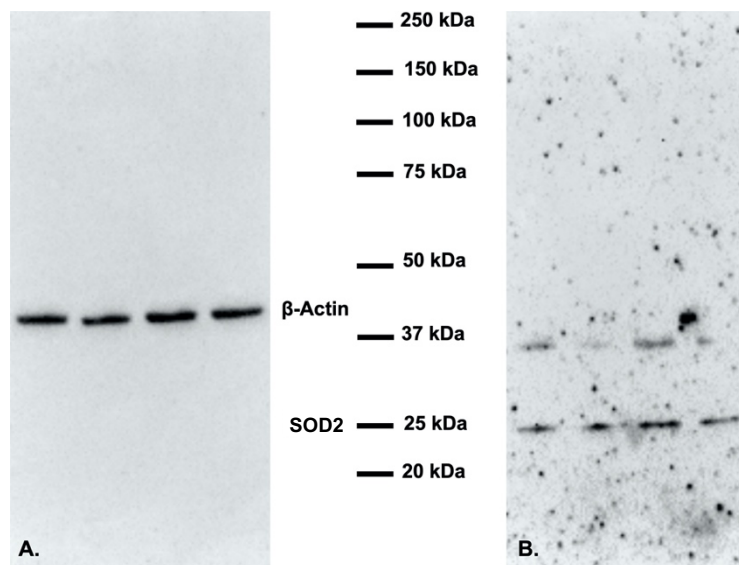


Abb. 15.: Exemplarischer sequentiell inkubierter Western Blot mit ausgeprägter Präzipitatbildung zur Messung der SOD2-Expression in *D. melanogaster*.

A. Die initiale Inkubation erfolgte mit dem Primärantikörper β -Actin in 1:1000-Verdünnung. Auf der Höhe von 42 kDa sind klare β -Actin-Banden ohne Präzipitate ersichtlich.

B. Dieselbe Membran wurde in TBST gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper SOD2/MnSOD in 1:250-Verdünnung inkubiert. Erkennbar sind SOD2-Banden auf der Höhe von 25 kDa sowie unspezifische Banden knapp unterhalb von 37 kDa. Diverse Präzipitate erstrecken sich über die Blotmembran und verhindern eine unverfälschte Intensitätsmessungen der SOD2-Banden.

konnten jedoch anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten keine verlässlichen Rückschlüsse auf die SOD2-Expression in Reaktion auf die Manipulation der Ceramid-Spiegel getätigt werden (Abb. 13). Aufgrund unspezifischer Reaktionen des Primärantikörpers mit dem Blockierungsstoff konnte Präzipitat-bedingt nur eine geringe Anzahl Western Blots (n = 4) analysiert werden (Abb. 15).

Der Wechsel des Blockierungstoffes von Milchlösung auf Rinderserumalbum verhinderte zwar das Auftreten der Antikörper-Blockierungsstoff-Präzipitate, führte jedoch zu diversen unspezifischen Banden, so dass eine sichere Zuordnung der SOD2-Bande unmöglich wurde. Weiterhin wiesen die wenigen verwertbaren Western Blots eine erhebliche Streuung der Messerwerte auf. So betrug die SD beim Genotyp *pink1^{RV};lace⁸* 83.9 %, beim Genotyp *pink1^{B9};FRT40A* 40.3 % und beim Genotyp *pink1^{B9};lace⁸* 36.2 %. In Zusammenschau sind die Streuungsmaße zu groß und Stichprobengröße zu klein, um eine fundierte Aussage über die Reaktion der SOD2-Expression auf die manipulierten Ceramid-Spiegel in *pink1^{B9}*-Mutanten zu tätigen. In Anbetracht der verfügbaren wissenschaftlichen Literatur wäre es jedoch vorstellbar, dass die SOD2-Expression auf die Redox-Stresssituation in *pink1^{B9};FRT40A*-Fliegen reaktiv gesteigert wird: Beispielsweise löst die Exposition von humanen Nicht-kleinzelliges-Lungenkarzinom-Zellen gegenüber exogenem C₈-Ceramid einen deutlichen Anstieg der SOD2-Expression aus (Chang *et al.*, 2018). Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass der gesenkte Ceramidspiegel in *pink1^{B9};lace⁸*-Fliegen zu einer reduzierten ROS-Last führt (Abb. 12). Daher wäre es denkbar, dass die SOD2-Expression proportional an die Redox-Stresssituation angepasst wird und somit eine verringerte Expression der SOD2 im Vergleich zu *pink1^{B9};FRT40A* besteht. Andererseits wiesen *normal human dermal fibroblasts* mit *PINK1*-Mutation eine verringerte SOD2-Expression auf (Piccoli *et al.*, 2008). In diesem Sinne wäre es ebenfalls denkbar, dass durch einen bis dato unbekanntem Regulationsmechanismus zwischen dysfunktionalem PINK1 und SOD2, eine verminderte Aktivität der SOD2 resultiert und konsekutiv eine erhöhte ROS-Last. Möglicherweise sind diese unterschiedlichen Ergebnisse jedoch auf die divergenten Versuchsmodelle zurückzuführen.

Wie bereits erwähnt, stellt oxidativer Schaden durch oxidativen Stress einen wesentlichen Aspekt in der Pathogenese des MP dar (Dias, Junn *et Mouradian*, 2013). Bei der Exposition von Proteinen gegenüber ROS entstehen an deren Seitenketten Carbonylgruppen. Der semiquantitative Nachweis von Carbonylgruppen kann entsprechend als Surrogatparameter zur Abschätzung des oxidativen Stress herbeigezogen werden (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Folglich sollte in einem nächsten Schritt der oxidative Stress in Reaktion auf die Ceramid-

Reduktion untersucht werden. Analog zu den Ergebnissen aus der ROS-Quantifizierung wiesen die *pink1^{B9};lace⁸*-Fliegen weniger Carbonylgruppen verglichen mit *pink1^{B9};FRT40A*-Fliegen auf (Abb. 14). Dies würde die Hypothese bekräftigen, dass der oxidative Stress durch die Ceramid-Reduktion gesenkt wird. Interessanterweise zeigten jedoch sowohl *pink1^{B9};FRT40A*- als auch *pink1^{B9};lace⁸*-Mutanten im Vergleich mit den *pink1*-Wildtyp-Kontrollen einen signifikant niedrigeren Gehalt an oxidierten Proteinen (Abb. 14). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der ROS-Untersuchung (Abb. 12) und der Literatur über ROS (Esposito *et al.*, 2013), gemäß denen erhöhte Carbonylgruppen-Werte in den *pink1*-Mutanten zu erwarten gewesen wären. Diese Hypothese unterstützend zeigte die Gewebeanalyse der SNc von MP-Patienten erhöhte Carbonyl-Werte (Floor und Wetzell, 1998). Weiterhin wiesen humane Fibroblasten mit *Parkin*-Mutation erhöhte Carbonylgruppen auf (Grünwald *et al.*, 2010). Da Parkin und PINK1 in derselben Reaktionskette agieren, erscheint es sinnvoll, das Ergebnis dieses ähnlichen wenngleich divergenten PS-Modells in der Interpretation der vorliegenden Daten zu berücksichtigen. Weiterhin zeigten Ratten in einem 6-Hydroxydopamin-induziertem PS-Modell erhöhte Carbonylgruppen im Striatum (Haleagrahara *et al.*, 2011). Daher sollte das Resultat des durchgeführten Experiments in Anbetracht der Divergenz zur Literatur und zur ROS-Messung kritisch hinterfragt werden.

4.3 Reduzierte Ceramid-Spiegel vermindern das Auftreten mitochondrialer Aggregationen bei *pink1^{B9}*-Mutation

Mitochondrien bilden unter basalen Bedingungen ein dynamisches, tubuläres Netzwerk innerhalb einer Zelle aus, dessen Morphologie durch ein fein reguliertes System aus balancierten Fissions- und Fusionszyklen situativ an die vorliegende Stoffwechsellage angepasst wird (Wai und Langer, 2016). Enzymatisch wird die Fission durch Drp1 und Fis1 ausgeführt, während die Fusion durch Mfn1, Mfn2 sowie Opa1 vorgenommen wird (Wai und Langer, 2016). Grundsätzlich können zwei oppositionäre Netzwerkformen mit einem hyperfusionierten, langstreckig-tubulären Netzwerk bei uneingeschränkter Fusion einerseits und einem hyperfragmentierten Netzwerk bei uneingeschränkter Fission andererseits unterschieden werden (Wai und Langer, 2016). Physiologisch betrachtet dient die Fusion dem Austausch mitochondrialer Bestandteile (z.B. Matrixmetabolite und DNA), der Maximierung der oxidativen Kapazität sowie dem Angleich des Membranpotentials. Prinzipiell wirkt die mitochondriale Fusion protektiv bzw. antiapoptotisch und kann bis zu

einer kritischen Schwelle toxischen Stress kompensieren (Youle und Van Der Blik, 2012). Bedeutend hierfür ist eine Fusionspräferenz von Mitochondrien mit regulärem MMP untereinander gegenüber Mitochondrien mit erniedrigtem MMP (Twig *et al.*, 2008). Durch die Fission wiederum können defekte mitochondriale Bestandteile sequestriert sowie dysfunktionale Mitochondrien aus dem mitochondrialen Netzwerk segregiert werden (Youle und Van Der Blik, 2012). Eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Qualitätskontrolle nimmt die fissionsbedingte mitochondriale Größenreduktion durch Ermöglichung der Umschließung durch das Phagophor als Voraussetzung für die Mitophagie ein (Wai und Langer, 2016). Zellen mit fehlender Fissionsfähigkeit zeigen entsprechend eine deutliche Reduktion der Mitophagierate (Twig *et al.*, 2008).

Es bestehen eine Vielzahl zellulärer Stressoren, die eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes auslösen. Oxidativer Stress stellt einen besonders relevanten Stressor dar (Knott *et al.*, 2008). Die *Pink1^{B9}*-Mutation verschiebt das Gleichgewicht ebenfalls in Richtung der mitochondrialen Fragmentierung (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2012). Weiterhin kann eine fragmentiertes mitochondriales Netzwerk mit perinukleären Aggregationen während der Apoptose beobachtet werden (Bottone *et al.*, 2013). Interessanterweise führt eine gesteigerte Ceramid-Produktion zu einer ROS-Zunahme, zu einer Abnahme des MMPs und Freisetzung von Cytochrom C durch die Formation von Ceramid-Kanälen in der mitochondrialen Membran (Jana, Hogan und Pahan, 2009). Das Konzept des Experiments bestand nun darin, zu untersuchen ob erniedrigte Ceramid-Spiegel das mitochondriale Clustering beeinflussen würden.

In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte der *pink1^{B9};FRT40A*-Genotyp erwartungsgemäß visuell die höchste Dichte an mitochondrialen Aggregation (Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2017), wobei dies jedoch nicht statistisch geprüft wurde, während die Reduktion der Ceramid-Spiegel in *pink1^{B9};lace⁸*-Fliegen im Vergleich zu *pink1^{B9};FRT40A*-Fliegen zu einem deutlich Rückgang der Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes führte (Abb. 9). Wie in den vorherigen Experimenten schien die Reduktion der Ceramid-Spiegel im Genotyp *pink1^{B9};lace⁸* nicht zu einer vollständigen Remission zu führen (Abb. 10). Dieser Beobachtung liegen vermutlich mehrere Aspekte zugrunde. In der ROS-Messung wurde gezeigt, dass eine Ceramid-Reduktion bei *pink1^{B9}*-Mutation die ROS-Spiegel zwar deutlich senkt, jedoch weiterhin erhöhte ROS-Werte zu vermuten sind. Da oxidativer Stress einen der bedeutendsten Aspekte für die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes darstellt (Knott *et al.*, 2008), liegt es nahe, dass im Rahmen einer nicht vollständig reduzierten ROS-Last weiterhin mitochondriale Aggregationen

beobachtet werden. Weiterhin kann Ceramid anhand der Formation von Ceramid-Kanälen das die Apoptose-einleitende Molekül Cytochrom C aus der mitochondrialen Matrix in das Zytosol freisetzen (Siskind, Kolesnick und Colombini, 2002). Entsprechend könnte durch die Ceramid-Reduktion ein apoptotischer Stimulus mit Konsequenz der Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks vermindert werden. Da Ceramid die Fähigkeit besitzt, die Mitophagie in der Funktion eines Autophagierezeptors über die Bindung an LC3-II direkt einzuleiten (Sentelle *et al.*, 2012) wäre es vorstellbar, dass die reduzierte Anzahl mitochondrialer Aggregationen in *pink1^{B9};lace⁸*-Fliegen ein Hinweis auf eine verminderte Aktivität der Ceramid-induzierten Mitophagie wäre. Entsprechend wäre es in einem nächsten Schritt interessant die Mitophagierate in Reaktion auf die Ceramid-Reduktion zu untersuchen.

4.4 Zusammenfassung der Erkenntnisse und Perspektiven

Zielsetzung i – Einführung der *lace⁸*-Mutation

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Analyse der Interaktion von Pink1 und Ceramid in *pink1^{B9}*-mutanten *D. melanogaster*. In Anbetracht der bereits erforschten Auswirkungen der pharmakologischen Hemmung der SPT in *pink1^{B9}*-mutanten *D. melanogaster* (Vos *et al.*, 2021) sollte die Pink1-Ceramid-Interaktion nach genetischer Alteration untersucht werden. Die Zielsetzung *i* der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich anhand der heterozygoten Einführung der hypomorphen Mutation *lace⁸* in das Genom *pink1*-mutierter *D. melanogaster* umgesetzt werden.

Zielsetzung ii – Funktionalität der Mitochondrien in *pink1*-mutanten *D. melanogaster*

Angesichts der ähnlichen Auswirkungen von *pink1*-Mutationen und Ceramid-Akkumulation auf die mitochondriale Funktion sollte die Auswirkung reduzierter Ceramid-Spiegel auf zelluläre Mechanismen in der Pathogenese des PS untersucht werden. Hieraus resultierten folgende Erkenntnisse:

- 1) Die Reduktion der Ceramid-Spiegel optimiert die Funktionsweise der ETK in *pink1^{B9}*-mutanten *D. melanogaster*.

Genauer betrachtet führen reduzierte Ceramid-Spiegel zu einer gesteigerten Aktivität des Komplex-I bei Fliegen mit *pink1^{B9}*-Mutation, wobei dieser Umstand eine

Erklärungsgrundlage für das erhöhte ATP-Protein-Verhältnis sowie die verbesserte Flugfähigkeit von *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation darstellt.

In der Folge wurde entschieden, durch die spezifische Analyse des oxidativen und mitochondrialen Stresses einen weiteren wichtigen Aspekt der Pathogenese des PS zu untersuchen. Hierbei konnte folgende Schlussfolgerung getroffen werden:

2) *Die Reduktion der Ceramid-Synthese senkt den oxidativen und mitochondrialen Stress in pink1^{B9}-mutanten D. melanogaster.*

Die verminderten Ceramid-Spiegel führen in *pink1^{B9}*-mutanten *D. melanogaster* zu einer reduzierten ROS-Produktion. Ursächlich für die gesenkte ROS-Produktion ist zumindest anteilsweise die verbesserte Komplex-I-Funktion nach Ceramid-Reduktion zu nennen. Als Kompensationsmechanismus zur Reduktion der ROS-Last wäre eine gesteigerte SOD2-Expression *pink1^{B9}*-mutanten *D. melanogaster* zu erwarten gewesen. Die Daten aus dieser Arbeit lassen jedoch keine evidenzbasierte Schlussfolgerung über die SOD2-Expression zu. Wie vermutet resultiert aber die Reduktion der Ceramid-Spiegel in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation in einem erniedrigten Carbonylgruppengehalt. Jedoch zeigen Fliegen mit *pink1*-Wildtyp im Vergleich zur *pink1^{B9}*-Mutation im Widerspruch zur Literatur überraschend erhöhte Carbonylgruppen. Dieses Ergebnis sollte kritisch hinterfragt werden. Hingegen führt die reduzierte Ceramidsynthese in *D. melanogaster* mit *pink1^{B9}*-Mutation erwartungsgemäß angesichts des gesenkten zellulären Stresses zu einem Rückgang der mitochondrialen Aggregation.

Abschließend kann gesagt werden, dass die *PINK1*-Mutationen zu einer Reihe verheerender Folgen für den Organismus führen, die u.a. auf die Funktionalität der Mitochondrien zurückgehen. Durch die Dysregulation des Fusion-Fission-Gleichgewichts nimmt die unselektive Fusion gesunder und dysfunktionaler Mitochondrien zu (Mouli, Twig und Shirihai, 2009; Twig und Shirihai, 2011), der Komplex-I produziert weniger ATP (Park *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2014) bzw. vermehrt ROS (Brand *et al.*, 2004) und die Mitophagie als zentrale Instanz der mitochondrialen Qualitätskontrolle scheitert zunehmend daran, dysfunktionale Mitochondrien zu beseitigen (Pickrell und Youle, 2015). Als Kompensationsversuch dieses Circulus vitiosus scheint es plausibel, dass vermehrt Ceramid produziert wird, um die Ceramid-medierte Mitophagie anzuregen. In Einklang mit dieser Hypothese zeigten *D. melanogaster* mit *pink1*-Mutation und erhöhten Ceramid-Spiegeln als

Pendant eines erhöhten Mitophagiebedarfs eine prominente Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks im Vergleich zu *D. melanogaster* mit gesenkten Ceramid-Spiegeln. In diesem Sinne wäre es interessant, die Mitophagierate in Relation erhöhter sowie reduzierter Ceramid-Spiegel bei *pink1*-Mutation zu bestimmen, um zu evaluieren, ob neben der erhöhten Zufuhr zur Mitophagie auch der entscheidende Schritt der Degradierung von Mitochondrien erhöht ist. Falls nicht, könnte der Kreislauf aus mitochondrialer Dysfunktion und der kompensatorisch stimulierten Ceramid-Produktion mit seinen begleitenden schädlichen Effekten exazerbieren. Beispielsweise hemmt Ceramid den Komplex-I, -III und -IV der ETK (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000). Die ATP-Bestimmung zeigte, dass reduzierte Ceramid-Spiegel die ATP-Produktion in Fliegen mit *pink1^{B9}*-Mutation erhöht. Die gesteigerten ATP-Spiegel bei *pink1*-Mutation ließen sich zumindest anteilsweise durch die verbesserte Komplex-I-Aktivität in Reaktion auf die Ceramid-Reduktion erklären. Da Ceramid ebenfalls die β -Oxidation inhibiert, wäre es interessant die Aktivität der β -Oxidation in *pink1*-Mutanten in Reaktion auf erniedrigte Ceramid-Spiegel zu erforschen. Als alternative ATP-Quelle bei dysfunktionaler ETK könnte die Inhibition der β -Oxidation die zelluläre ATP-Produktion zusätzlich in eine schädliche Abwärtsspirale versetzen.

Ceramid löst durch die Formation mitochondrialer *ceramide channels* die Freisetzung von Cytochrom C (Stiban, Caputo und Colombini, 2008) und die Ceramid-medierte Apoptoseinduktion aus (Birbes *et al.*, 2001). Die wissenschaftliche Literatur stuft Ceramid eindeutig als zellulären Stressor und ROS-Induktor ein (Gudz, Tserng und Hoppel, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997; Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000; Ganesan *et al.*, 2010). Im Zuge dieser Arbeit korrelierte eine erniedrigte ROS-Konzentration im Rahmen der *pink1*-Mutation zwar mit reduzierten Ceramid-Spiegeln, jedoch erwies sich die Datenlage bezüglich der Konsequenzen heterogen. Beispielsweise konnte trotz wissenschaftlichen Hinweisen hinsichtlich einer vermehrten SOD2-Expression bei erhöhten Ceramid-Spiegeln (Di Paola, Cocco und Lorusso, 2000; Ganesan *et al.*, 2010) keine verlässlichen Rückschlüsse auf die SOD2-Expression gezogen werden. Insgesamt erscheint eine SOD2-Hochregulierung im Sinne eines zellulären Schutzmechanismus gegenüber vermehrtem oxidativem Stress jedoch wahrscheinlich. Ferner korrelierten reduzierte Ceramid-Spiegel erwartungsgemäß mit verminderten Carbonylgruppen im Rahmen der *pink1*-Mutation. Da der MP mit erhöhtem oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird und der Carbonylgruppengehalt in den Kontrollgruppen gegenüber den *pink1*-Mutanten erhöht war, sollte dieses Ergebnis jedoch kritisch hinterfragt werden.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit, die als Anteil eines Manuskripts erfolgreich in der wissenschaftlichen Zeitschrift PNAS publiziert wurde, vertiefte Einblicke in ein Forschungsgebiet am Schnittpunkt zwischen Lipidmetabolismus und familiärem PS geben. Es wäre vorstellbar, dass eine medikamentöse Einschränkung der Ceramid-Produktion eine protektive Funktion auf die vulnerablen SNc-Neurone ausüben könnte. Hierfür bestehen bereits indirekte Hinweise. So zeigten klinische Studien, dass Statine neuroprotektive Effekte in MP-Patienten ausüben und die Inzidenz des MP senken (Q. Wang *et al.*, 2011). Hierfür gäbe es zahlreiche potentielle Erklärungsansätze. Einer davon wäre die Tatsache, dass Statine die Ceramid-Produktion senken (Ng *et al.*, 2014). Um eine eindeutige Korrelation nachzuweisen, sind jedoch weitere Forschungsarbeiten notwendig.

5 Zusammenfassung

Das *PINK1*-assoziierte Parkinson-Syndrom wird mit dysfunktionalen Mitochondrien in Verbindung gebracht. PINK1 übernimmt eine essentielle neuroprotektive Rolle, indem es die Funktionalität des mitochondrialen Netzwerkes reguliert und defekte Mitochondrien im Sinne einer Qualitätskontrolle beseitigt (Mitophagie). Korrelierend zeigen *D. melanogaster* mit *pink1*-Mutation einen dysfunktionalen Komplex-I mit erniedrigter ATP-Produktion, eine reduzierte Flugfähigkeit, eine gesteigerte Sauerstoffradikal-Produktion sowie übermäßige mitochondriale Aggregationen. Zusätzlich weisen *pink1*-mutante *D. melanogaster* erhöhte Ceramid-Spiegel auf. Interessanterweise bedingt die Akkumulation von Ceramid ebenfalls eine dysfunktionale Atmungskette, eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale sowie eine PINK1-unabhängige Mitophagie. Somit wurde in dieser Arbeit die Hypothese einer *pink1*-Phänotyp-Verbesserung durch Reduktion der Ceramid-Spiegel untersucht. Die erste Reaktion der *de-novo*-Ceramidsynthese wird durch die Serin-Palmitoyltransferase durchgeführt, die durch das Fliegen-Ortholog *lace* kodiert wird. Durch Kreuzungsversuche wurde die hypomorphe *lace*⁸-Mutation eingeführt und so die Ceramid-Spiegel gesenkt. In der Folge wurden die ATP-Produktion, die Komplex-I-Aktivität und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mittels biochemischer Verfahren untersucht. Die Bestimmung des Carbonylgruppen-Gehalts und der Superoxiddismutase-2-Expression erfolgte durch Blotting-Verfahren. Die mitochondriale Aggregation wurde mittels Immunfluoreszenz am Konfokalmikroskop untersucht. Ebenfalls erfolgte die Evaluation der Flugfähigkeit. Die Inhibition der Ceramid-Produktion führte in Fliegen mit *pink1*-Mutation zu einer gesteigerten ATP-Produktion, einer verbesserten Flugfähigkeit, einer Reduktion der mitochondrialen Aggregate, einer erhöhten Aktivität des Komplex-I und zu einem Rückgang der Sauerstoffradikalproduktion. Die Untersuchung der Superoxiddismutase-2-Expression blieb inkonklusiv. Die Analyse des Carbonylgruppen-Gehalts ergab widersprüchliche Ergebnisse, so dass diese Resultate mit Vorsicht zu interpretieren sind. In Anbetracht der Ceramid-vermittelten Inhibition der β -Oxidation sowie der Ceramid-induzierten Apoptose und Mitophagie wäre es für zukünftige Forschungsarbeiten interessant, die Auswirkungen gesenkter Ceramid-Spiegel im Rahmen der *PINK1*-Mutation auf die Aktivität dieser für die zelluläre Energiehomöostase elementaren Stoffwechselprozesse zu untersuchen. Als Fazit verbessert die Reduktion der Ceramid-Spiegel die mitochondriale Dysfunktion des *pink1*-Phänotyp und könnte einen therapeutischen Angriffspunkt zur Behandlung des Parkinson-Syndroms darstellen

6 Summary

PINK1-associated Parkinson's disease is coupled with dysfunctional mitochondria. *PINK1* assumes an essential neuroprotective role by regulating the functionality of the mitochondrial network and eliminating defective mitochondria in the sense of a quality control (mitophagy). Accordingly, *D. melanogaster* with *pink1* mutation exhibit a dysfunctional complex I with decreased ATP production, reduced flight ability, increased oxygen radical production, and excessive mitochondrial aggregations. In addition, *pink1* mutant *D. melanogaster* show increased ceramide levels. Interestingly, ceramide accumulation also conditions a dysfunctional respiratory chain, increased reactive oxygen species production, and *PINK1* independent mitophagy. Thus, in this work, the hypothesis of *pink1* phenotype improvement by reduction of ceramide levels was investigated. The initial reaction of *de novo* ceramide synthesis is carried out by serine palmitoyltransferase, which is encoded by the fly ortholog *lace*. Crossing experiments introduced the hypomorph *lace*⁸ mutation, thereby lowering ceramide levels. Subsequently, ATP production, complex I activity and reactive oxygen species production were biochemically determined. Blotting procedures were used to determine carbonyl group content and superoxide dismutase-2 expression. Mitochondrial aggregation was examined by immunofluorescence on a confocal microscope. Also, an evaluation of flying ability was performed. Inhibition of ceramide production in flies with *pink1* mutation resulted in increased ATP production, improved flying ability, reduction of mitochondrial aggregates, increased complex I activity and a decrease in oxygen radical production. Examination of superoxide dismutase-2 expression remained inconclusive. Analysis of carbonyl group content yielded conflicting results. Hence, these outcomes should be interpreted with caution. Considering the ceramide-mediated inhibition of β -oxidation as well as ceramide-induced apoptosis and mitophagy, it would be interesting for future research to investigate the effects of lowered ceramide levels in the context of the *PINK1* mutation on the activity of these metabolic processes elementary for cellular energy homeostasis. In conclusion, the reduction of ceramide levels partially ameliorates mitochondrial dysfunction of the *pink1* phenotype and may provide a therapeutic target for the treatment of the Parkinson syndrome.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi-Yamada, T. *et al.* (1999) 'De Novo Synthesis of Sphingolipids Is Required for Cell Survival by Down-Regulating c-Jun N-Terminal Kinase in *Drosophila* Imaginal Discs', *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), pp. 7276–7286. doi: 10.1128/mcb.19.10.7276.
- Andrieu-Abadie, N. *et al.* (2001) 'Ceramide in apoptosis signaling: Relationship with oxidative stress', *Free Radical Biology and Medicine*, 31(6), pp. 717–728. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00655-4.
- Bionda, C. *et al.* (2004) 'Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria?', *Biochemical Journal*, 382(2), pp. 527–533. doi: 10.1042/bj20031819.
- Biosa, A. *et al.* (2018) 'Superoxide dismutating molecules rescue the toxic effects of PINK1 and parkin loss', *Human Molecular Genetics*, 27(9), pp. 1618–1629. doi: 10.1093/hmg/ddy069.
- Birbes, H. *et al.* (2001) 'Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis', *The FASEB Journal*, 15(14), pp. 2669–2679. doi: 10.1096/fj.01-0539com.
- Bloem, B. R., Okun, M. S. and Klein, C. (2021) 'Parkinson's disease', *The Lancet*, 397(10291), pp. 2284–2303. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00218-X.
- Bolam, J. P. and Pissadaki, E. K. (2012) 'Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die', *Movement Disorders*, 27(12), pp. 1478–1483. doi: 10.1002/mds.25135.
- Bottone, M. *et al.* (2013) 'Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview', *Cells*, 2(2), pp. 294–305. doi: 10.3390/cells2020294.
- Braak, H. *et al.* (2004) 'Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology', *Cell and Tissue Research*, 318(1), pp. 121–134. doi: 10.1007/s00441-004-0956-9.
- Brand, M. D. *et al.* (2004) 'Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins', *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), pp. 755–767. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034.
- Chang, Y. C. *et al.* (2018) 'Exogenous C8-ceramide induces apoptosis by overproduction of ROS and the switch of superoxide dismutases SOD1 to SOD2 in human lung cancer cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), pp. 1–13. doi:

10.3390/ijms19103010.

- Chien, W. L. *et al.* (2013) 'Increase of oxidative stress by a novel PINK1 mutation, P209A', *Free Radical Biology and Medicine*, 58, pp. 160–169. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.008.
- Chyb, S. and Gompel, N. (2013) *Atlas of Drosophila morphology*. Edited by S. Chyb and N. B. T.-A. of D. M. Gompel. San Diego: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384688-4.00005-5>.
- Clark, I. E. *et al.* (2006) 'Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin.', *Nature*, 441(7097), pp. 1162–1166. doi: 10.1038/nature04779.
- Dalle-Donne, I. *et al.* (2003) 'Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress', *Clinica Chimica Acta*, 329, pp. 23–38. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2.
- Davis, G. C. *et al.* (1979) 'Chronic Parkinsonism Secondary to Intravenous Injection of Meperidine Analogues', *Psychiatry Research*, 1(3), pp. 249–254. doi: 10.1016/0165-1781(79)90006-4.
- Dias, V., Junn, E. and Mouradian, M. M. (2013) 'The role of oxidative stress in parkinson's disease', *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), pp. 461–491. doi: 10.3233/JPD-130230.
- Esposito, G. *et al.* (2013) 'Aconitase Causes Iron Toxicity in Drosophila pink1 Mutants', *PLoS Genetics*, 9(4), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pgen.1003478.
- Esposti, M. D. *et al.* (1999) 'Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals', *Journal of Biological Chemistry*, 274(42), pp. 29831–29837. doi: 10.1074/jbc.274.42.29831.
- Floor, E. and Wetzel, M. G. (1998) 'Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay', *Journal of Neurochemistry*, 70(1), pp. 268–275. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70010268.x.
- Flynn, J. M. and Melov, S. (2013) 'SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration', *Free Radical Biology and Medicine*, 62, pp. 4–12. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027.
- Ganesan, V. *et al.* (2010) 'Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane', *Apoptosis*, 15(5), pp. 553–562. doi: 10.1007/s10495-009-0449-0.
- Goyal, G. *et al.* (2019) 'Sphingolipid-dependent Dscam sorting regulates axon segregation', *Nature Communications*. Springer US, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-

08765-2.

- Greene, A. W. *et al.* (2012) 'Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment', *EMBO reports*. Nature Publishing Group, 13(4), pp. 378–385. doi: 10.1038/embor.2012.14.
- Greenspan, R. J. (2004) 'The Basics of Doing a Cross', in Inglis, J., Crotty, D., and Steuer, R. (eds) *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. Second Edi. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 3–25.
- Grünewald, A. *et al.* (2010) 'Mutant Parkin Impairs Mitochondrial Function and Morphology in Human Fibroblasts', *PLoS ONE*, 5(9), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0012962.
- Gudz, T. I., Tserng, K. Y. and Hoppel, C. L. (1997) 'Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide', *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), pp. 24154–24158. doi: 10.1074/jbc.272.39.24154.
- Guo, M. (2012) 'Drosophila as a model to study mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), pp. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a009944.
- Guo, X. *et al.* (2005) 'The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to drosophila synapses', *Neuron*, 47(3), pp. 379–393. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.027.
- Haleagrahara, N. *et al.* (2011) 'Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum', *Neuroscience Letters*, 500, pp. 139–143. doi: 10.1016/j.neulet.2011.06.021.
- Hamilton, J. A. *et al.* (2007) 'Brain uptake and utilization of fatty acids, lipids and lipoproteins: Application to neurological disorders', *Journal of Molecular Neuroscience*, 33(1), pp. 2–11. doi: 10.1007/s12031-007-0060-1.
- Han, H. *et al.* (2020) 'PINK1 phosphorylates Drp1(S616) to regulate mitophagy-independent mitochondrial dynamics.', *EMBO reports*. England, p. e48686. doi: 10.15252/embr.201948686.
- Harrison, J. F. and Roberts, S. P. (2000) 'Flight Respiration and Energetics', *Annual Review of Physiology*, 62, pp. 179–205.
- Hirsch, E., Graybiel, A. M. and Agid, Y. A. (1988) 'Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease', *Nature*, 334, pp. 345–348.
- Jana, A., Hogan, E. L. and Pahan, K. (2009) 'Ceramide and neurodegeneration:

- Susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death', *Journal of the Neurological Sciences*, 278(1–2), pp. 5–15. doi: 10.1016/j.jns.2008.12.010.
- Jembrek, M. J., Hof, P. R. and Šimić, G. (2015) 'Ceramide in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and A β Accumulation', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015(1), pp. 1–17. doi: 10.1155/2015/346783.
- Jennings, B. H. (2011) 'Drosophila-a versatile model in biology & medicine', *Materials Today*. Elsevier Ltd, pp. 190–195. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70113-4.
- Kasten, M. *et al.* (2018) 'Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review', *Movement Disorders*, 33(5), pp. 730–741. doi: 10.1002/mds.27352.
- Kim, C. Y. and Alcalay, R. N. (2017) 'Genetic Forms of Parkinson's Disease', *Seminars in Neurology*, 37(2), pp. 135–146. doi: 10.1055/s-0037-1601567.
- Kitada, T. *et al.* (2007) 'Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), pp. 11441–11446. doi: 10.1073/pnas.0702717104.
- Knott, A. B. *et al.* (2008) 'Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration', *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), pp. 505–518. doi: 10.1038/nrn2417.
- Lang, A. E. and Lozano, A. (1998) 'Parkinson's Disease – First of Two Parts', *The New England Journal of Medicine*, 339(15), pp. 1044–1053.
- Lemasters, J. J. (2005) 'Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging', *Rejuvenation Research*, 8(1), pp. 3–5.
- Liu, S. *et al.* (2012) 'Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria.', *PLoS genetics*, 8(3), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pgen.1002537.
- Loskovich, M. V. *et al.* (2005) 'Inhibitory effect of palmitate on the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) as related to the active-de-active enzyme transition', *Biochemical Journal*, 387(3), pp. 677–683. doi: 10.1042/BJ20041703.
- Mandon, E. C. *et al.* (1992) 'Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver', *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), pp. 11144–11148.

- 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), pp. 436–457. doi: 10.1002/mds.26527.
- Mattson, M. P. (2000) ‘Apoptosis in neurodegenerative disorders’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), pp. 120–129. doi: 10.1038/35040009.
- McLelland, G. L. *et al.* (2014) ‘Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control’, *EMBO Journal*, 33(4), pp. 282–295. doi: 10.1002/emj.201385902.
- 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’, *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0073094.
- 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), pp. 99–111. doi: 10.1002/emmm.200900006.
- Morais, V. A. *et al.* (2014) ‘PINK1 Loss-of-function mutations affect Mitochondrial complex 1 activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling’, *Science*, 344(6180), pp. 203–207. doi: 10.5061/dryad.rd70f.
- Mouli, P. K., Twig, G. and Shirihai, O. S. (2009) ‘Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function’, *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 96(9), pp. 3509–3518. doi: 10.1016/j.bpj.2008.12.3959.
- Narendra, D. *et al.* (2008) ‘Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy’, *Journal of Cell Biology*, 183(5), pp. 795–803. doi: 10.1083/jcb.200809125.
- Narendra, D. P. *et al.* (2010) ‘PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin’, *PLoS Biology*, 8(1), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.
- Ng, T. W. K. *et al.* (2014) ‘Dose-dependent effects of rosuvastatin on the plasma sphingolipidome and phospholipidome in the metabolic syndrome’, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(11), pp. E2335–E2340. doi: 10.1210/jc.2014-1665.
- Nguyen, T. N., Padman, B. S. and Lazarou, M. (2016) ‘Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy’, *Trends in Cell Biology*, 26(10), pp. 733–744. doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.008.
- Nicholls, D. G. (2008) ‘Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, pp. 53–60. doi:

10.1196/annals.1427.002.

- Okatsu, K. *et al.* (2013) ‘A dimeric pink1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates parkin recruitment’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(51), pp. 36372–36384. doi: 10.1074/jbc.M113.509653.
- Ordureau, A. *et al.* (2014) ‘Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis’, *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 56(3), pp. 360–375. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.007.
- Palikaras, K., Lionaki, E. and Tavernarakis, N. (2018) ‘Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology’, *Nature Cell Biology*, pp. 1013–1022. doi: 10.1038/s41556-018-0176-2.
- Di Paola, M., Cocco, T. and Lorusso, M. (2000) ‘Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria’, *Biochemistry*, 39(22), pp. 6660–6668. doi: 10.1021/bi9924415.
- Park, J. *et al.* (2006) ‘Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin’, *Nature*, 441(7097), pp. 1157–1161. doi: 10.1038/nature04788.
- Parkinson, J. (1817) *An Essay on the Shaking Palsy*. London: Sherwood, Neely and Jones.
- Patwardhan, G. A., Beverly, L. J. and Siskind, L. J. (2015) ‘Sphingolipids and mitochondrial apoptosis’, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48(2), pp. 153–168. doi: 10.1007/s10863-015-9602-3.
- Perier, C. and Vila, M. (2012) ‘Mitochondrial Biology in Parkinson’s Disease’, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 4(2), pp. 1–19. doi: 10.1101/cshperspect.a009332.
- Piccoli, C. *et al.* (2008) ‘Mitochondrial Respiratory Dysfunction in Familial Parkinsonism Associated with PINK1 Mutation’, *Neurochemical Research*, 33, pp. 2565–2574. doi: 10.1007/s11064-008-9729-2.
- Pickrell, A. M. and Youle, R. J. (2015) ‘The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson’s disease’, *Neuron*. Elsevier Inc., 85(2), pp. 257–273. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.007.
- Plotegher, N. *et al.* (2019) ‘Ceramides in Parkinson’s Disease: From Recent Evidence to New Hypotheses’, *Frontiers in Neuroscience*, 13(April), pp. 1–7. doi: 10.3389/fnins.2019.00330.
- Quillet-Mary, A. *et al.* (1997) ‘Implication of Mitochondrial Hydrogen Peroxide Generation in Ceramide-induced Apoptosis’, *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), pp. 21388–21395. doi: 10.1074/jbc.272.34.21388.

- Raichur, S. *et al.* (2014) ‘CerS2 haploinsufficiency inhibits β -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance’, *Cell Metabolism*, 20(4), pp. 687–695. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.015.
- Reiter, L. T. *et al.* (2001) ‘A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*’, *Genome Research*, pp. 1114–1125. doi: 10.1101/gr.169101.
- Ryan, B. J. *et al.* (2015) ‘Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson’s: From familial to sporadic disease’, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 40(4), pp. 200–210. doi: 10.1016/j.tibs.2015.02.003.
- Saggu, H. *et al.* (1989) ‘A Selective Increase in Particulate Superoxide Dismutase Activity in Parkinsonian Substantia Nigra’, *Journal of Neurochemistry*, 53(3), pp. 692–697.
- Schapira, A. H. V. *et al.* (1989) ‘Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson’s Disease’, *The Lancet*, 1(8649), p. 1269. doi: 10.1016/s0140-6736(89)92366-0.
- Schilling, J. D. *et al.* (2013) ‘Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), pp. 2923–2932. doi: 10.1074/jbc.M112.419978.
- Sentelle, R. D. *et al.* (2012) ‘Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy.’, *Nature chemical biology*, 8(10), pp. 831–838. doi: 10.1038/nchembio.1059.
- Shahmoradian, S. H. *et al.* (2019) ‘Lewy pathology in Parkinson’s disease consists of crowded organelles and lipid membranes’, *Nature Neuroscience*, 22(7), pp. 1099–1109. doi: 10.1038/s41593-019-0423-2.
- Singer, T. P. *et al.* (1988) ‘Mechanism of the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP)⁺, the toxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)’, *Toxicology*, 49(1), pp. 17–23. doi: 10.1016/0300-483x(88)90169-2.
- Siskind, L. J., Kolesnick, R. N. and Colombini, M. (2002) ‘Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(30), pp. 26796–26803. doi: 10.1074/jbc.M200754200.
- Skrahina, V. *et al.* (2021) ‘The Rostock International Parkinson’s Disease (ROPAD) Study: Protocol and Initial Findings’, *Movement Disorders*, 36(4), pp. 1005–1010. doi: 10.1002/mds.28416.
- Soubannier, V. *et al.* (2012) ‘A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes’, *Current Biology*, 22(2), pp. 135–141. doi:

- 10.1016/j.cub.2011.11.057.
- Stern, Y. (1990) 'MPTP-Induced Parkinsonism', *Neurobiology*, 34, pp. 107–114.
- Stiban, J., Caputo, L. and Colombini, M. (2008) 'Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins', *Journal of Lipid Research*, 49(3), pp. 625–634. doi: 10.1194/jlr.m700480-jlr200.
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A. and Halliday, G. M. (2017) 'Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease.', *Nature reviews. Neuroscience*, 18(2), pp. 101–113. doi: 10.1038/nrn.2016.178.
- Tanaka, A. *et al.* (2010) 'Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin', *Journal of Cell Biology*, 191(7), pp. 1367–1380. doi: 10.1083/jcb.201007013.
- Turpin, S. M. *et al.* (2014) 'Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance', *Cell Metabolism*, 20(4), pp. 678–686. doi: 10.1016/j.cmet.2014.08.002.
- Twig, G. *et al.* (2008) 'Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy', *EMBO Journal*, 27(2), pp. 433–446. doi: 10.1038/sj.emboj.7601963.
- Twig, G. and Shirihai, O. S. (2011) 'The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy', *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(10), pp. 1939–1951. doi: 10.1089/ars.2010.3779.
- Valente, E. M. *et al.* (2004) 'Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1', *Science*, 304(5674), pp. 1158–1160. doi: 10.1126/science.1096284.
- Vives-Bauza, C. *et al.* (2010) 'PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), pp. 378–383. doi: 10.1073/pnas.0911187107.
- Vos, M. *et al.* (2012) 'Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency.', *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), pp. 1306–10. doi: 10.1126/science.1218632.
- Vos, M. *et al.* (2017) 'Cardiolipin promotes electron transport between ubiquinone and complex I to rescue PINK1 deficiency', *Journal of Cell Biology*, 216(3), pp. 695–708. doi: 10.1083/jcb.201511044.
- Vos, M. *et al.* (2021) 'Ceramide accumulation induces mitophagy and impairs β -oxidation in PINK1 deficiency', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 118(43). doi: 10.1073/pnas.2025347118.
- Vos, M., Klein, C. and Hicks, A. A. (2023) 'Role of Ceramides and Sphingolipids in Parkinson's Disease', *Journal of Molecular Biology*, 435(12), p. 168000. doi: 10.1016/j.jmb.2023.168000.
- Wai, T. and Langer, T. (2016) 'Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(2), pp. 105–117. doi: 10.1016/j.tem.2015.12.001.
- Wang, Q. *et al.* (2011) 'Statins: Multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases', *Experimental Neurology*, 230(1), pp. 27–34. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.04.006.
- Wang, X. *et al.* (2011) 'PINK1 and Parkin target miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility', *Cell*, 147(4), pp. 893–906. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.018.
- Wang, Y. *et al.* (2018) 'Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling', *Journal of Cell Biology*, 217(6), pp. 1915–1928. doi: 10.1083/jcb.201708007.
- West, R. J. H. *et al.* (2018) 'Sphingolipids regulate neuromuscular synapse structure and function in *Drosophila*', *Journal of Comparative Neurology*, 526(13), pp. 1995–2009. doi: 10.1002/cne.24466.
- Yamano, K. and Youle, R. J. (2013) 'PINK1 is degraded through the N-end rule pathway', *Autophagy*, 9(11), pp. 1758–1769. doi: 10.4161/auto.24633.
- 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 of the United States of America*, 103(28), pp. 10793–10798. doi: 10.1073/pnas.0602493103.
- Youle, R. J. and Van Der Blik, A. M. (2012) 'Mitochondrial fission, fusion, and stress', *Science*, 337(6098), pp. 1062–1065. doi: 10.1126/science.1219855.
- Youle, R. J. and Narendra, D. P. (2011) 'Mechanisms of mitophagy', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), pp. 9–14. doi: 10.1038/nrm3028.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J. and Rodney, J. F. (2002) 'Superoxide dismutase mutligene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression', *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), pp. 337–349.

8 Danksagung

Besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. med. Christine Klein. Sie ermöglichte es mir, diese Doktorarbeit am Institut für Neurogenetik verfassen zu dürfen. Ich bedanke mich für die Bereitstellung der Materialien und Geräte. Die wertvollen fachlichen Ratschläge bei der kritischen Durchsicht dieser Arbeit schätze ich sehr. Zudem möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit für die wiederholte akademische Unterstützung außerhalb dieser Doktorarbeit ausdrücken.

Meiner Betreuerin Melissa Vos, PhD danke ich herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas. Die geduldige Einführung in die Arbeit mit *Drosophila* sowie die wiederholte konstruktive und fachliche Kritik bei der Korrektur des Manuskripts weiß ich zu schätzen.

Weiterhin danke ich der Forschungskommission Medizin für die finanzielle Unterstützung durch das Promotionsstipendium "Lübecker Exzellenzmedizin".

Der labortechnischen Assistentin T. L. danke ich herzlich für die Hilfsbereitschaft und die vielen frohen Stunden im Fliegenlabor.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik, jedoch insbesondere meinen engen Freunden, L. und C., danke ich für die produktive Unterstützung und die anregende Zeit, an die ich mich gerne erinnern werde.

Meiner Mutter, meinem Vater und meiner Partnerin danke ich für die bedingungslose Geduld, die zahlreichen ermutigenden Worte und die unerschöpfliche Hilfsbereitschaft. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

9 Veröffentlichung der Arbeitsergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der Zeitschrift PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) veröffentlicht:

Vos, M., Dulovic-Mahlow, M., Mandik, F., Frese, L., Kanana, Y., Haissatou Diaw, S., Depperschmidt, J., Böhm, C., **Rohr, J.**, Lohnau, T., König, I. R., & Klein, C. (2021) 'Ceramide accumulation induces mitophagy and impairs β -oxidation in PINK1 deficiency', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*