

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle von GDAP1 und BNIP3 bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 4A am
Modell der *Drosophila melanogaster*

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

Vorgelegt von

Janina Kopetzky
aus Groß-Umstadt

Mainz, 2024

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

1. Gutachter: 

2. Gutachter: 

Tag der Promotion: 16.09.2024

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit	1
1.1.1 Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 4A.....	3
1.2 Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	4
1.2.1 Lokalisation und Aufbau.....	4
1.2.2 Funktion und Wirkungsweise.....	6
1.2.3 Mutationen.....	8
1.3 BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3	11
1.3.1 Lokalisation und Aufbau.....	11
1.3.2 Funktion und Wirkungsweise.....	11
1.3.3 Die Verbindung zwischen BNIP3 und GDAP1.....	13
1.4 Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.4.1 Gdap1 und BNIP3 in <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.4.2 Das Gal4/UAS-System.....	15
1.4.3 Genregulation durch RNA-Interferenz.....	16
1.4.4 Genregulation durch Knockout.....	17
1.5 Potenzielle Wirkstoffe zur Behandlung von CMT4A	19
1.5.1 J147.....	19
1.5.2 CMS121.....	20
1.5.3 J147 und CMS121 als Therapiemöglichkeit bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit.....	21
1.6 Zielsetzung	23
2 Material	24
2.1 Fliegenstämme	24
2.2 Reagenzien und Lösungen	25
2.3 Kits	26
2.4 Primer & Sonden	26
2.5 Antikörper und Marker	27
2.6 Verbrauchsmaterial	28
2.7 Geräte	29
2.8 Software	30
3 Methoden	31
3.1 Haltung der <i>Drosophila melanogaster</i>	31
3.2 Herstellung von Fliegenlinien mit Protein-Knockdown in verschiedenen Geweben	31
3.3 Herstellung eines Fliegenstammes mit <i>GDAP1</i>-Knockdown in Neuronen	32
3.4 Messung der Lebensspanne der <i>Drosophila melanogaster</i>	33
3.4.1 Messung der Lebensspanne während Gabe eines Nährbreis.....	33
3.4.2 Messung der Lebensspanne während Gabe einer Saccharose-Lösung.....	34
3.4.3 Messung der Lebensspanne während Behandlung mit Toxinen.....	34

3.4.4	Messung der Lebensspanne während Behandlung mit J147 und CMS121.....	35
3.5	Verhaltensversuch: Negative Geotaxis	35
3.6	Proteinbiochemie	36
3.6.1	Proteingewinnung	36
3.6.2	Konzentrationsbestimmung der Proteingemische.....	36
3.6.3	Proteinauftrennung durch SDS-Page.....	37
3.6.4	Proteinnachweis durch Western Blot.....	38
3.7	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	38
3.7.1	Isolation von RNA und Herstellung von cDNA aus Geweben der <i>Drosophila melanogaster</i>	38
3.7.2	Nukleinsäure-Nachweis durch qPCR	39
3.8	Messung des ATP-Gehaltes	41
3.9	Statistische Auswertung.....	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Der Gdap1-RNAi-Phänotyp	42
4.1.1	Nachweis des <i>Gdap1</i> -Knockdowns in <i>Gdap1</i> -Knockdown-Fliegen.....	42
4.1.2	Knockdown von <i>Gdap1</i> reduziert die Lebenserwartung	43
4.1.3	<i>Gdap1</i> -Knockdown beeinträchtigt die negative Geotaxis	44
4.1.4	Neuronaler <i>Gdap1</i> -Knockdown reduziert die ATP-Konzentration im Thorax	45
4.1.5	Fliegen mit neuronalem <i>Gdap1</i> -Knockdown reagieren sensibler auf Rotenon und Tunicamycin	46
4.1.6	J147 und CMS121 verlängern die Lebenserwartungen von <i>Gdap1</i> -Knockdown-Fliegen nicht.....	48
4.1.7	Saccharose verlängert die Lebenserwartung von <i>Gdap1</i> -Knockdown-Fliegen	50
4.2	Der BNIP3-RNAi-Phänotyp	52
4.2.1	Nachweis des <i>BNIP3</i> -Knockdowns in <i>BNIP3</i> -Knockdown-Fliegen	52
4.2.2	Knockdown von <i>BNIP3</i> reduziert die Lebenserwartung	53
4.2.3	<i>BNIP3</i> -Knockdown beeinträchtigt die negative Geotaxis	53
4.2.4	<i>BNIP3</i> -Knockdown-Fliegen sind gegenüber Rotenon resistent und reagieren sensibler auf Tunicamycin	54
4.3	Zusammenhang zwischen Gdap1 und BNIP3	56
4.3.1	Die <i>BNIP3</i> -Konzentration ist in <i>Gdap1</i> -Knockdown-Fliegen nicht signifikant erhöht.....	56
4.3.2	Die Lebenserwartung von Fliegen mit <i>Gdap1</i> - und <i>BNIP3</i> -Knockdown ist stark verkürzt.....	56
4.4	Phänotyp der <i>Gdap1</i>-Knockout-Fliegenlinien	58
4.4.1	Nachweis des <i>Gdap1</i> -Knockouts und der <i>GDAP1</i> -Expression in <i>Gdap1</i> -Knockout-Fliegenlinien..	58
4.4.2	Homozygoter <i>Gdap1</i> -Knockout bewirkt Letalität.....	60
4.4.3	<i>Gdap1</i> -Knockout und <i>GDAP1</i> -Insertionen bewirken Veränderungen der Lebenserwartungen ...	61
4.4.4	<i>Gdap1</i> -Knockout und <i>GDAP1</i> -Insertionen bewirken Veränderungen der negativen Geotaxis.....	64
4.4.5	<i>Gdap1</i> -Knockout-Fliegen weisen keine signifikant veränderte ATP-Konzentration auf.....	65
4.4.6	<i>Gdap1</i> -Knockout-Fliegenlinien mit <i>GDAP1</i> -Insertionen reagieren nicht sensibler auf Rotenon und Tunicamycin	66
4.4.7	J147 und CMS121 verlängern nicht die Lebenserwartungen der <i>Gdap1</i> -Knockout-Fliegenlinien, aber die der Wildtypfliege	68
4.4.8	J147 und CMS121 verbessern nicht die negative Geotaxis der <i>Gdap1</i> -Knockout-Fliegenlinien und Wildtypfliegen	70
4.4.9	Saccharose verkürzt die Lebenserwartung von Wildtypfliegen, jedoch nicht von <i>Gdap1</i> -Knockout-Fliegen.....	71
5	Diskussion.....	73
5.1	Gdap1 und GDAP1 am Modell der <i>Drosophila melanogaster</i>	73
5.2	Funktionen und Wirkungsweisen von Gdap1 und GDAP1.....	75
5.3	Einfluss von Gdap1 und GDAP1 auf den Stoffwechsel	77
5.4	BNIP3 am Modell der <i>Drosophila melanogaster</i>	79

5.5	Verbindung zwischen Gdap1 und BNIP3.....	80
5.6	Potenzielle Therapiemöglichkeiten für CMT4A-Patienten	81
6	Zusammenfassung.....	84
	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>85</i>
	<i>Danksagung.....</i>	<i>93</i>
	<i>Lebenslauf.....</i>	<i>94</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die häufigsten Symptome von Patienten mit CMT4A. (Eigene Darstellung nach Rzepnikowska & Kochanski, 2018)	4
Abbildung 2: Schematischer Aufbau von GDAP1. (Eigene Darstellung nach Rzepnikowska & Kochanski, 2018)	5
Abbildung 3: Modell des Ablaufs der Spaltung von Mitochondrien. (Eijkenboom et al., 2019)	6
Abbildung 4: Modell der Entstehung der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit durch Mutationen des GDAP1. (Rzepnikowska & Kochanski, 2018)	10
Abbildung 5: Schematischer Aufbau von BNIP3. (Eigene Darstellung nach Vasagiri & Kutala, 2014)	11
Abbildung 6: Systematik der RNA-Interferenz in Kombination mit dem Gal4/UAS-System am Beispiel des Gdap1-Knockdowns in Neuronen.	16
Abbildung 7: Schematische Lokalisationen der in dieser Arbeit verwendeten Mutationen in GDAP1. (Eigene Darstellung nach Rzepnikowska & Kochanski, 2018)	19
Abbildung 8: Einfluss von J147 und CMS121 auf den Energiestoffwechsel.	21
Abbildung 9: Systematik der Generierung eines Fliegenstammes mit GDAP1-Knockdown in Neuronen.	33
Abbildung 10: Validierung des Gdap1-Knockdowns in Gdap1-Knockdown-Linien.	42
Abbildung 11: Lebenserwartungen der Gdap1-Knockdown-Fliegen.	43
Abbildung 12: Negative Geotaxis der Gdap1-Knockdown-Fliegen.	44
Abbildung 13: ATP-Konzentrationen in Köpfen und Thoraces von Fliegen mit neuronalem Gdap1-Knockdown.	46
Abbildung 14: Lebenserwartungen der Fliegen mit neuronalem Gdap1-Knockdown während täglicher Gabe einer Saccharose-Toxin-Lösung.	47
Abbildung 15: Einfluss von J147 und CMS121 auf die Lebenserwartungen der Fliegen mit neuronalem Gdap1-Knockdown.	49
Abbildung 16: Einfluss verschiedenen Futters auf die Lebenserwartung der Fliegen mit neuronalem Gdap1-Knockdown.	50
Abbildung 17: Validierung des BNIP3-Knockdowns in tubP>BNIP3-RNAi-Fliegen.	52
Abbildung 18: Lebenserwartungen der BNIP3-Knockdown-Fliegen.	53

Abbildung 19: Negative Geotaxis der <i>BNIP3</i>-Knockdown-Fliegen.	54
Abbildung 20: Lebenserwartungen der Fliegen mit neuronalem <i>BNIP3</i>-Knockdown während täglicher Gabe einer Saccharose-Toxin-Lösung.	55
Abbildung 21: Expression der <i>BNIP3</i>-mRNA in <i>Gdap1</i>-Knockdown-Fliegen.	56
Abbildung 22: Lebenserwartung der Fliegen mit <i>Gdap1</i>- und <i>BNIP3</i>-Knockdown.	57
Abbildung 23: Validierung des <i>Gdap1</i>-Knockouts und der <i>GDAP1</i>-mRNA-Expression in <i>Gdap1</i>-Knockout-Linien.	58
Abbildung 24: Prozentuale Verteilung der Nachkommen bei Kreuzungen der heterozygoten Fliegenlinien.	60
Abbildung 25: Lebenserwartungen der <i>Gdap1</i>-Knockout-Fliegen.	62
Abbildung 26: Lebenserwartungen der R161H-, P274L-, P153L- und R120W-Mutationen-tragenden Fliegen.	63
Abbildung 27: Negative Geotaxis der <i>Gdap1</i>-Knockout-Fliegen.	64
Abbildung 28: ATP-Konzentration in Thoraces von R161H-Mutation-tragenden Fliegen.	66
Abbildung 29: Lebenserwartungen der <i>Gdap1</i>-Knockout-Linien während täglicher Gabe einer Saccharose-Toxin-Lösung.	67
Abbildung 30: Einfluss von J147 und CMS121 auf die Lebenserwartungen der <i>Gdap1</i>-Knockout-Fliegen.	69
Abbildung 31: Einfluss von J147 und CMS121 auf die negative Geotaxis der <i>Gdap1</i>-Knockout-Fliegen.	70
Abbildung 32: Einfluss verschiedenen Futters auf die Lebenserwartung der R161H-Mutation-tragenden Fliegen.	72
Abbildung 33: Modell der Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels durch <i>GDAP1</i>-Knockdown und durch einseitige Saccharose-Ernährung. (Modifiziert nach Wolf et al., 2021)	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Genotypen der <i>GDAP1</i>-Knockout-Fliegenstämme	18
Tabelle 2: Fliegenstämme	24
Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen	25
Tabelle 4: Kits	26
Tabelle 5: Primer	26
Tabelle 6: Sonden	27
Tabelle 7: Antikörper und Marker	27
Tabelle 8: Verbrauchsmaterial	28
Tabelle 9: Geräte	29
Tabelle 10: Software	30
Tabelle 11: Übersicht der Gal4/UAS-Kreuzungen	32
Tabelle 12: Mastermix zur Herstellung von cDNA aus RNA-Proben mittels des <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits</i> von Applied Biosystems™	39
Tabelle 13: Mastermix für die qPCR mittels <i>Takyon™ No Rox Probe 2X MasterMix dTTP Blue</i> von Eurogentec	40
Tabelle 14: Mastermix für die qPCR mittels <i>FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)</i> von Sigma-Aldrich	40

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
<i>BNIP3</i>	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-Gen</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
ca.	zirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Krankheit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
G	Zentrifugalbeschleunigung
H ₂ O	Wasser
Gdap1	<i>Ganglioside-induced differentiation associated protein 1, Drosophila melanogaster</i>
<i>Gdap1</i>	<i>Ganglioside-induced differentiation associated protein 1-Gen, Drosophila melanogaster</i>
GDAP1	<i>Ganglioside-induced differentiation associated protein 1, human</i>
<i>GDAP1</i>	<i>Ganglioside-induced differentiation associated protein 1-Gen, human</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
IgG	Immunglobulin G
M.	Morbus
Mbp	Megabasenpaare
mRNA	Boten-RNA
n	Anzahl
NCV	Nervenleitungsgeschwindigkeit
N-terminal	Amino-terminal
n.s.	nicht signifikant
PDC	Pyruvatdehydrogenasekomplex
RIPA	Radioimmunpräzipitationspuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
Tween® 20	Polysorbat 20
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
z.B.	zum Beispiel

SI-Einheiten

cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
g	Gramm
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
s	Sekunde
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit

Mit einer Häufigkeit von 1:2500 ist die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT), die auch als hereditäre motorisch sensible Neuropathie bekannt ist, die häufigste vererbte Neuropathie (Skre, 1974). Bei dieser kommt es in den meisten Fällen sowohl zu einem Verlust von sensorischen als auch motorischen Neuronen, seltener sind nur motorische Nerven betroffen (Pareyson & Marchesi, 2009). Benannt wurde die Krankheit nach den Neurologen Jean-Martin Charcot, Pierre Marie und Howard Henry Tooth, von denen sie erstmals im Jahr 1886 beschrieben wurde (Charcot & Marie, 1886; Tooth, 1886).

Mutationen in verschiedenen Genen führen zu einer Schädigung von Axonen oder Myelinscheiden der Patienten, wodurch die längsten Neurone des Körpers zuerst beeinträchtigt sind. Die Innervation der distalen Muskeln nimmt somit als erstes ab, was zu einer Atrophie der Fußmuskeln und zu Fußdeformitäten, wie z.B. dem Pes Cavus oder Pes Planus, führt. Der Krankheitsbeginn variiert zwischen dem 10. bis 40. Lebensjahr und die Neuropathie schreitet üblicherweise über mehrere Jahrzehnte voran, wobei sich die Schädigung auf immer kürzere Neurone ausweitet. Dadurch sind in späten Stadien die kompletten unteren Gliedmaßen sowie die Hände der Patienten von einer Muskelatrophie betroffen. Verminderte sensorische Empfindungen sind seltener und finden sich vorrangig nur in den unteren Extremitäten (Dyck, 1993; Pareyson, Scaiola, & Laura, 2006).

Dyck und Lambert (Dyck & Lambert, 1968a, 1968b) sowie Thomas und Harding (Thomas et al., 1974; Harding & Thomas, 1980a, 1980b) klassifizierten die Krankheit anhand der Vererbungsform und dem klinischen, elektrophysiologischen und pathologischen Bild. Anhand der muskulären Nervenleitungsgeschwindigkeit (NCV) lassen sich demyelinisierende und axonale Formen unterscheiden (Harding & Thomas, 1980a).

Die demyelinisierenden Formen, bezeichnet als CMT1 im Falle der autosomal-dominanten Vererbung bzw. CMT4 bei autosomal-rezessiver Vererbung, entstehen durch Schädigungen der Myelinscheiden des Axons. Mehrfache Demyelinisierungen und Remyelinisierungen resultieren dabei in vielen Schichten dünner,

funktionsbeeinträchtigt Myelinscheiden um die Neurone. Sie werden als mikroskopisch sichtbare „onion bulbs“ bezeichnet und führen zu einer Verringerung der NCV. Bei den axonalen Formen, zu denen unter anderem CMT2 gehört, kommt es zu einer Schädigung der neuronalen Axone. Dadurch bleibt die NCV gleich, aber die Höhe des Summenaktionspotentials des innervierten Muskels verringert sich. Unterformen weichen jedoch teilweise von der Einteilung in die demyelinisierenden und axonalen Formen ab oder können Zwischenformen aufweisen (Schröder, 2006; Pareyson, Scaiola, & Laura, 2006).

Harding und Thomas stellten fest, dass die mittlere NCV von CMT-Patienten bei 38 m/s liegt (Harding & Thomas, 1980a). Bei Patienten mit einer NCV unter 38 m/s wird von der demyelinisierenden Form der Krankheit ausgegangen, während eine Geschwindigkeit über 38 m/s für die axonale Form spricht.

Ursache der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit sind Mutationen in Genen, die für Proteine mit verschiedenen Funktionen kodieren, welche vor allem in Schwann-Zellen und Neuronen exprimiert werden (Pareyson & Marchesi, 2009). Viele dieser Proteine sind mit Mitochondrien assoziiert (Cassereau et al., 2020). Es sind Mutationen mit sowohl autosomal-rezessivem, autosomal-dominantem und X-chromosomal-rezessivem Erbgang bekannt, wobei die autosomal-dominante Form die häufigste ist (Pareyson & Marchesi, 2009).

Es sind bis heute über 80 Gene bekannt, welche in mutierter Form die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit verursachen können (Timmerman, Strickland, & Züchner, 2014). Dabei können Mutationen im gleichen Gen verschiedene Formen der Krankheit auslösen, aber auch Mutationen unterschiedlicher Gene in derselben Form resultieren (ebd.). Während die häufigste Mutation, die Duplikation des *Peripheral Myelin Protein 22* (PMP22) -Gens, welche zum Typ CMT1A führt, bei über 60% der CMT-Patienten in Europa zu finden ist (Dubourg et al., 2001), sind auch Mutationen in den Genen für *Gap junction beta-1 protein* (GJB1), *myelin protein zero* (MPZ) und *Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1* (GDAP1) relativ häufig (Manganelli et al., 2014).

Das für GDAP1 kodierende Gen wird als *GDAP1* bezeichnet. Es sind sowohl autosomal-rezessiv (Baxter et al., 2002; Claramunt et al., 2005) als auch autosomal-dominant (Claramunt et al., 2005; Chung et al., 2008) vererbte Mutationen des *GDAP1* bekannt, die entweder zur demyelinisierenden oder zur axonalen Form der

Krankheit führen können. Autosomal-rezessive Mutationen des *GDAP1* kommen häufiger vor und führen vorwiegend zu der schwerwiegenden Variante CMT4A (Baxter et al., 2002). Diese beginnt üblicherweise im ersten Jahrzehnt des Patientenlebens und wird der demyelinisierenden Form zugeordnet (ebd.). Seltener tritt durch Mutationen im selbigen Gen CMT2K auf, welche zu der axonalen Form gehört, entweder autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt wird und einen vergleichsweise milden Verlauf hat (Crimella et al., 2010).

Auch die Formen CMT2H/K, welche einen sehr frühen Krankheitsbeginn hat und häufig mit einer Stimmbandparese einhergeht, sowie AR-CMT2 (autosomal-rezessive CMT2) können durch Veränderungen des *GDAP1* verursacht sein (Pareyson & Marchesi, 2009).

Heutzutage werden CMT-Patienten vorrangig symptomatisch therapiert, wie z.B. mit Fußheber-Orthesen bis hin zu Rollstühlen, um Beeinträchtigungen im Alltag durch die fortschreitende Muskelschwäche zu reduzieren. Neben dieser Therapieform sind seit der Einführung des „next generation sequencing“ und den damit erforschten krankheitsverursachenden Mutationen auch molekulare Therapiemöglichkeiten, die auf die einzelnen Subtypen der Krankheit zielgerichtet sind, Gegenstand aktueller Forschung.

1.1.1 Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 4A

CMT4 ist eine überwiegend autosomal-rezessiv vererbte Form der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, die in Subtypen untergliedert werden kann, wobei der Typ CMT4A am häufigsten vorkommt (Nelis et al., 2002). CMT4A gehört zu den schwerwiegenden Formen der Krankheit und kann sowohl axonal als auch demyelinisierend ausgeprägt sein (Cuesta et al., 2002; Nelis et al., 2002). Die vorrangig normale oder nur leicht erniedrigte NCV bei Patienten lässt allerdings eine überwiegend axonale Form der Krankheit vermuten (Claramunt et al., 2005).

CMT4A wird durch Mutationen in *GDAP1* ausgelöst (Cuesta et al., 2002; Baxter et al., 2002). Diese Mutationen gehen mit einem Funktionsverlust des Proteins einher, was zu Schädigungen der peripheren Nerven führt (Pedrola et al., 2005; Rzepnikowska & Kochanski, 2018). Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass CMT4A ausschließlich autosomal-rezessiv vererbt wird, jedoch wurden mittlerweile auch autosomal-dominante Mutationen bei Patienten gefunden, die einen mildereren Verlauf der Krankheit aufweisen (Claramunt et al., 2005).

Meist beginnt die rezessive Form der Krankheit schon im Kleinkindalter. Es kommt zu einer Muskelschwäche und Patienten leiden häufig an einer heiseren Stimme oder einer Stimmbandparese (Sevilla et al., 2003).

Die folgende Abb. 1 zeigt eine Übersicht der häufigsten Symptome von Patienten mit CMT4A.

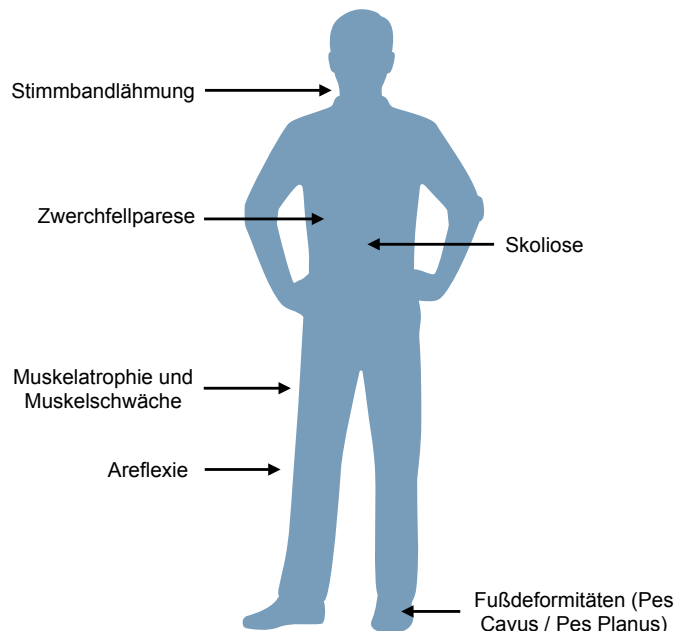


Abbildung 1: **Die häufigsten Symptome von Patienten mit CMT4A.** Patienten mit CMT4A entwickeln häufig eine in den Extremitäten beginnende Muskelatrophie und Muskelschwäche, die mit abgeschwächten Reflexen einhergeht. Oftmals treten Fußdeformitäten wie der Pes Cavus oder Pes Planus auf. Zu den weiteren häufigen Symptomen zählen eine Stimmbandlähmung, eine Skoliose sowie eine Zwerchfellparese. (Eigene Darstellung nach Rzepnikowska & Kochanski, 2018)

Histopathologisch zeigen sich bei peripheren Nerven von Patienten häufig degenerierte Axone und ein hochgradiger Verlust von myelinisierten Axonen, während sich teilweise auch Demyelinisierungen und „onion bulbs“ finden lassen (Nelis et al., 2002; Senderek et al., 2003; Sevilla et al., 2003).

1.2 Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1

1.2.1 Lokalisation und Aufbau

Die *Ganglioside-induced differentiation-associated proteins 1-10* wurden erstmals 1999 in Neuro2A Zellen gefunden, wobei diese eine erhöhte Konzentration während der durch das Gangliosid GD3 induzierten Differenzierung aufwiesen (Liu, Nakagawa, Kanematsu, Uchida, & Tsuji, 1999).

Im Genom des Menschen liegt *GDAP1* auf dem achten Chromosom und besteht aus 23.728 Basenpaaren. Die DNA kodiert für RNA, die aus sechs Exons und fünf Introns besteht und mit der ein 358 Aminosäuren langes Protein hergestellt werden kann (Cassereau et al., 2011).

Das Protein wird vor allem in Neuronen exprimiert, wobei die Konzentration im Rückenmark höher ist als in Dorsalwurzelganglien oder im Gehirn (Pedrola et al., 2005). Laut Pedrola et al. wird GDAP1 in Schwann-Zellen nicht exprimiert (ebd.), was vermuten lässt, dass CMT4A primär zu einer Schädigung der Neurone und nicht der Schwann-Zellen führt und die Beobachtung der überwiegend axonalen Form der Krankheit (Claramunt et al., 2005) erklärt. Im Gegensatz dazu konnten Niemann et al. GDAP1 auch in Schwann-Zellen, vor allem im Cytoplasma in der perinukleären Region und in Schmidt-Lanterman-Einkerbungen, nachweisen (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005). Auch Noack et al. konnten GDAP1 in Schwann-Zellen nachweisen, wobei sich die Konzentration dort jedoch viel niedriger als in Neuronen herausstellte (Noack et al., 2012).

GDAP1 besitzt zwei Domänen, die für das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) kodieren (Nelis et al., 2002). Dadurch wird vermutet, dass *GDAP1* zu der Familie der Glutathion-S-Transferasen gehört (Marco, Cuesta, Pedrola, Palau, & Marín, 2004). GST verbinden toxische Substanzen mit reduziertem Glutathion, um diese unschädlich zu machen und aus dem Körper zu eliminieren. Auf der C-terminalen Seite hat das Protein eine Transmembrandomäne, mit der es hauptsächlich an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert wird, aber auch an Peroxisomen befestigt werden kann (Huber, Guimaraes, Schrader, Suter, & Niemann, 2013; Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005). Die hydrophobe Domäne HD1, die neben der Transmembrandomäne liegt, spielt vor allem bei der mitochondrialen Fission eine wichtige Rolle (Wagner, Rüegg, Niemann, & Suter, 2009).



Abbildung 2: **Schematischer Aufbau von GDAP1**. Die Zahlen geben die Positionen der begrenzenden Aminosäuren der jeweiligen Domänen an: *GST* Glutathion-S-Transferase Domäne; *HD* hydrophobe Domäne; *TMD* Transmembrandomäne. (Eigene Darstellung nach Rzepnikowska & Kochanski, 2018)

1.2.2 Funktion und Wirkungsweise

Mitochondrien unterliegen einem ständigen Spaltungs- und Verschmelzungsprozess, welcher wichtig für deren Formbestand und Funktion ist (Chan, 2006). Dieser spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die korrekte Lokalisation der Mitochondrien in der Zelle sowie für die oxidative Phosphorylierung, Autophagie, Calciumhomöostase, Zelldifferenzierung und Zelltodregulation (Kasahara & Scorrano, 2014). Beeinträchtigungen in Spaltungs- und Verschmelzungsprozessen der Mitochondrien werden schon seit längerem mit der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Bossy-Wetzler, Barsoum, Godzik, Schwarzenbacher, & Lipton, 2003).

An Zellen und am Modell der *Drosophila melanogaster* wurde entdeckt, dass GDAP1 ein Faktor ist, der zu einer mitochondrialen Spaltung und somit zu deren Fragmentierung führt (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005; López Del Amo et al., 2015). Dabei spielt dessen korrekte Lokalisation an der äußeren Mitochondrienmembran eine wichtige Rolle (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005).

Mitochondrial Fission

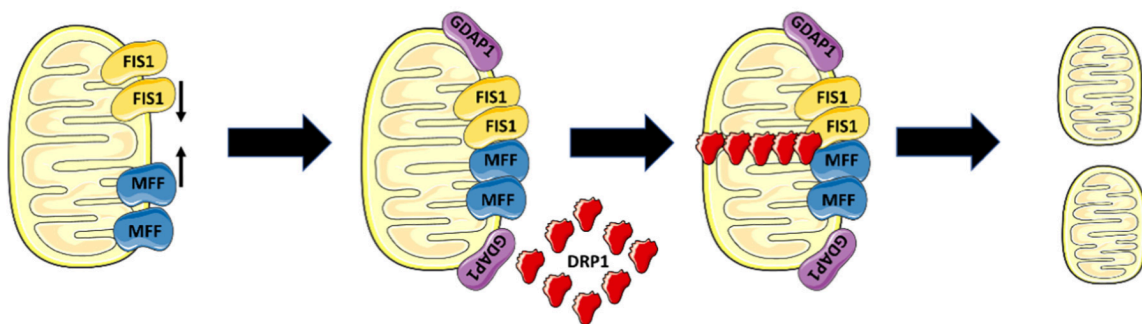


Abbildung 3: **Modell des Ablaufs der Spaltung von Mitochondrien.** Diese ist abhängig von mehreren Faktoren, wie unter anderem FIS1 (*Mitochondrial fission 1 protein*), MFF (*mitochondrial fission factor*), GDAP1 und DRP1 (*Dynamin-related protein 1*). (Eijkenboom et al., 2019)

Zu diskutieren bleibt, ob GDAP1 als direkter Faktor oder indirekt durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eine Spaltung der Mitochondrien verursacht. Wolf et al. vermuten, dass GDAP1 durch Interaktion mit F-Aktin bewirkt, dass DRP1 (*Dynamin-related protein 1*) leichter zu den Mitochondrien gelangen und dort zu deren Spaltung führen kann (Wolf et al., 2021).

Nicht nur die Größe, sondern auch die intrazelluläre Lokalisation und Verteilung der Mitochondrien wird durch GDAP1 beeinflusst, was durch Interaktionen des Proteins

mit dem Zytoskelett begründet wird (Pla-Martín et al., 2013; López Del Amo et al., 2017).

GDAP1 interagiert also mit mehreren Proteinen innerhalb der Zelle, wozu F-Aktin, β -Tubulin, RAB6B (*Ras-related protein Rab-6B*) und Caytaxin gehören. F-Aktin und β -Tubulin sind Teile des Zytoskeletts, während RAB6B an dem Transport von Vesikeln von Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) involviert ist und Caytaxin an dem Transport von Vesikeln und Mitochondrien. Diese Interaktionen lassen vermuten, dass GDAP1 Transporte von Mitochondrien und weiteren Zellorganellen unterstützt (Pla-Martín et al., 2013).

Huber et al. konnten zeigen, dass GDAP1 nicht nur als Fissionsfaktor für Mitochondrien wirkt, sondern auch für Peroxisomen. Für die Spaltung von sowohl Mitochondrien als auch Peroxisomen durch GDAP1 sind dessen hydrophobe Domäne und Transmembrandomäne essentiell. Sie ist außerdem abhängig von den Faktoren DRP1 und MFF (*mitochondrial fission faktor*) (Huber, Guimaraes, Schrader, Suter, & Niemann, 2013).

Auch weitere Zellorganellen können durch GDAP1 beeinflusst werden. Binięda et al. konnten nachweisen, dass GDAP1 die Struktur des Golgi-Apparates beeinflusst und vermuten, dass dadurch die Funktion des Zellorganells verändert werden kann (Binięda et al., 2021). Es wurde außerdem beschrieben, dass GDAP1 die Reifung der Lysosomen fördert und deren Membrankontakt mit Mitochondrien unterstützt (Cantarero et al., 2020).

Noack et al. wiesen durch Zellkulturen nach, dass durch GDAP1 die zelluläre Konzentration von Glutathion erhöht wird (Noack et al., 2012). Auch López Del Amo et al. konnten diesen Effekt in älteren Fruchtfliegen nachweisen (López Del Amo et al., 2015). Als weitere Funktionen des Proteins werden die Erhöhung des mitochondrialen Membranpotentials und der Schutz vor oxidativer Glutamattoxizität sowie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vermutet (Noack et al., 2012).

Der Schutz vor Glutamattoxizität sowie ROS scheint jedoch nicht auf die GST-Domänen des GDAP1 zurückzuführen sein. Obwohl es zwei dieser Domänen besitzt, konnten Pedrola et al. sowie Shield et al. keine Aktivität des Enzyms feststellen (Pedrola et al., 2005; Shield, Murray, & Board, 2006). Huber et al. konnten nachweisen, dass GDAP1 mit fehlender hydrophober Domäne HD1 und

Transmembrandomäne diese Enzymaktivität jedoch besitzt. Sie nehmen deshalb an, dass HD1 eine inhibitorische Funktion für die GST-Domänen hat und die GST-Domänen lediglich als ein Sensor für ROS dienen (Huber et al., 2016).

GDAP1 spielt ebenfalls eine Rolle in der Calcium-Hämostase der Zelle. Es fördert die Interaktion von ER mit Mitochondrien, indem das Protein an Mitochondrien-assoziierte ER-Membranen (MAM) bindet. Dadurch kann Calcium über *Store Operated Calcium Entry* (SOCE) in die Mitochondrien gelangen (Pla-Martín et al., 2013; Wolf et al., 2021). Die Calciumkonzentration im Mitochondrium reguliert dessen Überleben, Funktion sowie Bewegung innerhalb der Zelle und wird streng reguliert (Clapham, 2007). Eine der Hauptaufgaben mitochondrialen Calciums ist die Förderung der ATP-Synthese durch Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung (Balaban & S., 2002; Hansford & Zorov, 1998).

Auch GDAP1 wurde bereits mit der mitochondrialen ATP-Produktion in Verbindung gebracht (Cassereau et al., 2009; López Del Amo et al., 2015), was somit unter anderem auf die Regulation der Calciumhämostase zurückzuführen sein könnte.

Der Einfluss auf die ATP-Produktion könnte auch durch Einwirkung von GDAP1 auf den zellulären Stoffwechsel bedingt sein. An Zellen und anhand des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* konnte ein veränderter Stoffwechsel nachgewiesen werden, der unter anderem auf eine Inaktivierung des Insulin-Signalwegs und eine verminderte Funktionsfähigkeit des PDC zurückgeführt wird (López Del Amo et al., 2017; Wolf et al., 2021).

1.2.3 Mutationen

Es sind sowohl frameshift-, nonsense- als auch missense-Mutationen des *GDAP1* bekannt, die zur Charcot-Marie-Tooth-Krankheit führen können, wobei die beiden ersteren in der Regel zu schwerwiegenderen Formen führen (Pedrola et al., 2005). Die Mutationen können sowohl autosomal-rezessiv als auch autosomal-dominant vererbbar sein und ebenfalls sporadisch auftreten (Claramunt et al., 2005). Besonders autosomal-rezessive Mutationen werden mit schweren Ausprägungen und einem frühen Beginn der Krankheit in Verbindung gebracht, während autosomal-dominante Mutationen zu einer mildereren Ausprägung führen (Zimón et al., 2011).

Wie mutiertes GDAP1 auf molekularer Ebene genau die Krankheit auslöst, ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch geht man von dessen Funktionsverlust und einer

damit einhergehenden mitochondrialen Beeinträchtigung als häufigste Ursache der Krankheitsentstehung aus (Zimoń et al., 2011). Vor allem autosomal-rezessive Mutationen werden mit dem Funktionsverlust des Proteins in Verbindung gebracht, während bei autosomal-dominanten Mutationen von einer erworbenen toxischen Funktion des GDAP1 ausgegangen wird (Zimoń et al., 2011; Niemann, Wagner, Ruegg, & Suter, 2009). Dennoch führen beide Formen zu ähnlichen Symptomen (ebd.).

Bei den häufigeren autosomal-rezessiven Mutationen führt der Funktionsverlust des Proteins durch eine gestörte Spaltung der Mitochondrien zu einer veränderten Mitochondriendynamik (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005). Die Calciumhomöostase innerhalb der Zelle ändert sich durch verminderten Kontakt zwischen ER und Mitochondrium und dem dadurch bedingten verringerten SOCE (Pla-Martín et al., 2013; Wolf et al., 2021). Ebenfalls wird der Transport von Vesikeln und Zellorganellen entlang des Axons beeinträchtigt (ebd.). Der Funktionsverlust des GDAP1 führt zu Beeinträchtigungen der ATP-Produktion des Mitochondriums (Cassereau et al., 2009; López Del Amo et al., 2015) und der Schutz vor ROS nimmt ab (Noack et al., 2012). Diese Änderungen zusammen führen zu einem Funktionsverlust des Neurons.

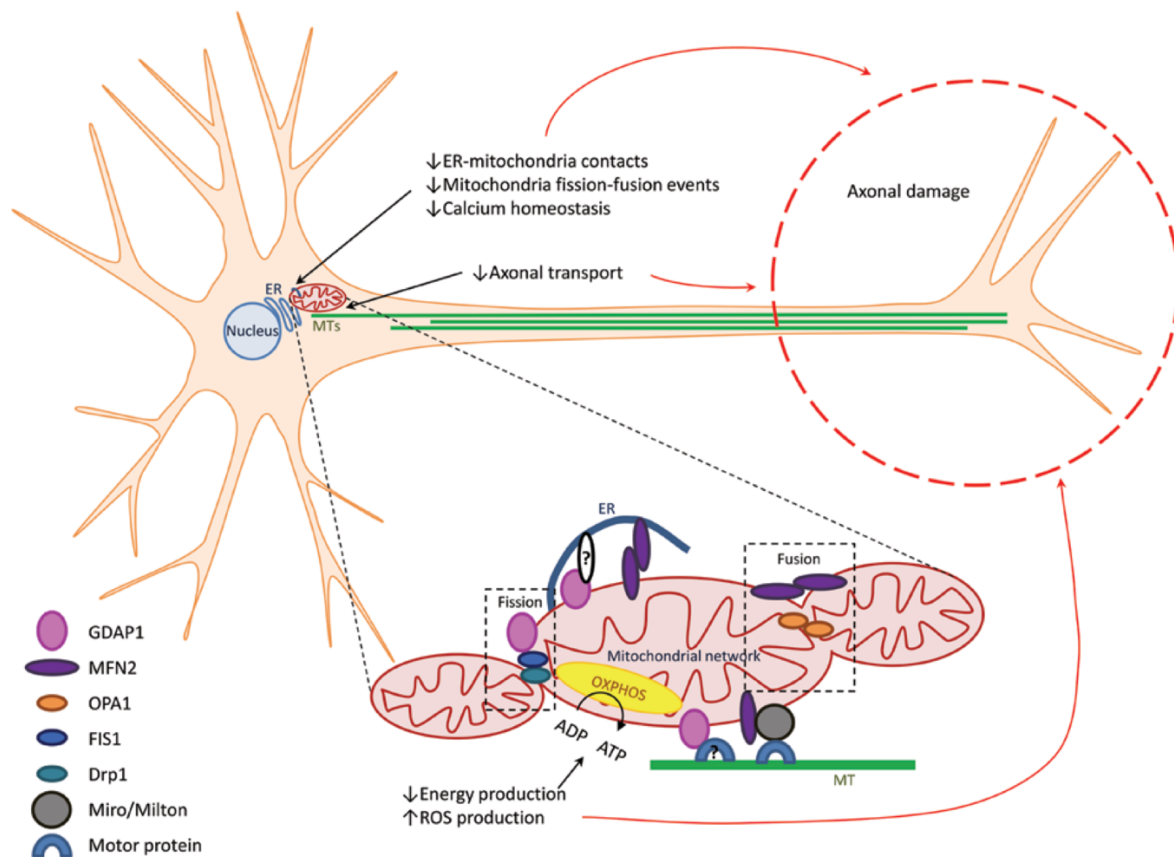


Abbildung 4: **Modell der Entstehung der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit durch Mutationen des *GDAP1*.** Mutationen von *GDAP1* führen zu einem Funktionsverlust des Proteins. Dadurch kommt es zu einem verminderten Kontakt zwischen ER und Mitochondrium sowie zu einer veränderten Calciumhomöostase und Mitochondriendynamik. Auch der Transport von Vesikeln und Zellorganellen entlang des Axons wird beeinträchtigt. Im Mitochondrium führen die Veränderungen zu Beeinträchtigungen in der ATP-Produktion und der Schutz vor ROS nimmt ab. Durch diese Änderungen innerhalb der Zelle wird das Axon geschädigt, sodass die Funktionsfähigkeit des Neurons abnimmt. *MTs* Mikrotubuli (Rzepnikowska & Kochanski, 2018)

Je nach Lokalisation der Mutation im Gen kommt es zu verschiedenen Schweregraden der Erkrankung (Cassereau et al., 2020). Kabzińska et al. fanden heraus, dass Mutationen, die am C-terminalen Ende des Proteins liegen und dort die korrekte Lokalisation an die äußere mitochondriale Membran beeinflussen, zu schwerwiegenderen Formen der Krankheit führen als Mutationen, die sich auf der N-terminalen Seite befinden (Kabzińska et al., 2011). Huber et al. fanden heraus, dass Mutationen an der N-terminalen Seite des *GDAP1* nur die Fission der Mitochondrien beeinträchtigen, nicht jedoch die der Peroxisomen, während C-terminale Mutationen zusätzlich die Dynamik der Peroxisomen beeinflussen (Huber, Guimaraes, Schrader, Suter, & Niemann, 2013).

1.3 BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3

1.3.1 Lokalisation und Aufbau

1994 wurde erstmals das *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) entdeckt (Boyd et al., 1994), das zu der Familie der Bcl-2 Proteine gehört und dessen Gen auf dem 10. Chromosom des menschlichen Genoms liegt.

BNIP3 besteht aus 194 Aminosäuren, wiegt 21,5 kDa und lässt sich in 4 Hauptdomänen einteilen (Chen et al., 1997). Innerhalb der N-terminalen Domäne befindet sich eine PEST-Domäne aus Prolin, Glutamat, Serin, Threonin und Aspartat (ebd.). PEST-Domänen besitzen eine hemmende Wirkung auf das gesamte Protein, in welchem sie enthalten sind (Rogers, Wells, & Rechsteiner, 1986). Neben der PEST-Domäne liegt die „Bcl-2 homology“-Domäne 3 (BH3) und daneben die CD (*conserved-domain*) (Vasagiri & Kutala, 2014). C-terminal befindet sich die Transmembrandomäne (TMD), durch die das Protein an die äußere Mitochondrienmembran binden kann und die außerdem in der proapoptotischen Wirkung des Proteins involviert ist (Yasuda M. T., 1998; Velde et al., 2000).

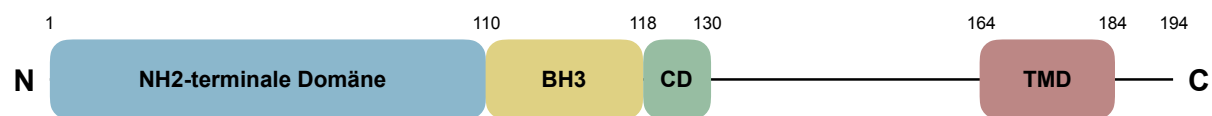


Abbildung 5: **Schematischer Aufbau von BNIP3.** Die Zahlen geben die Positionen der begrenzenden Aminosäuren der jeweiligen Domänen an: *BH3 Bcl-2 homology domain 3*; *CD conserved domain*; *TMD Transmembrandomäne*. (Eigene Darstellung nach Vasagiri & Kutala, 2014)

BNIP3 spielt eine Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, zu denen vor allem Regulationen der Apoptose, Nekrose und der Autophagie gehören (Velde et al., 2000; Kim, Cho, Ha, & Park, 2002; Daido et al., 2004). Veränderungen des Proteins sind mit vielen Krankheiten assoziiert, wie zum Beispiel Karzinomen, kardiovaskulären sowie neurologischen Erkrankungen (Vasagiri & Kutala, 2014).

1.3.2 Funktion und Wirkungsweise

Zu den Hauptfunktionen von BNIP3 gehört das Einleiten von Zelltod und Autophagie, wobei bisher unbekannt ist, ob diese zwei Funktionen eigenständig wirken oder ob eine der beiden Funktionen durch die jeweils andere hervorgerufen wird. Es wird

vermutet, dass BNIP3 durch mehrere Wege einen Zelltod bewirken kann, der sowohl apoptotisch als auch nekrotisch verlaufen kann (Zhang & Ney, 2009).

BNIP3 reagiert unter anderem auf ROS mit Homodimerisierung, wodurch es aktiviert wird (Kubli, Quinsay, Huang, Lee, & Gustafsson, 2008). Kim et. al. zeigten an isolierten Mitochondrien, dass BNIP3 durch seine TMD die „permeability transition pore“ öffnet, die sich zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran befindet, was zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie zu einer Freisetzung von Cytochrom C und weiteren proapoptischen Proteinen aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytoplasma führt. Dies bewirke letztendlich die Einleitung der zellulären Apoptose (Kim, Cho, Ha, & Park, 2002).

Im Gegensatz dazu fanden Velde et al. heraus, dass eine Überexpression von BNIP3 am Zellmodell auch während Abwesenheit von Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), Caspase-9 und Caspase-3 zum Zelltod führen kann, ohne Cytochrom C aus den Mitochondrien freizulassen, was für eine nekrotische Wirkung des Proteins spricht (Velde et al., 2000).

BNIP3 interagiert außerdem mit antiapoptischen Faktoren wie BCL-2 und BCL-xl. Yasuda et. al. fanden heraus, dass die BH3-Domäne mit diesen Faktoren Heterodimere bildet und sie vermuten, dass dadurch deren Wirkung herabgesetzt wird (Yasuda, Theodorakis, Subramanian, & Chinnadurai, 1998).

Das Protein spielt nicht nur eine Rolle beim Zelltod, sondern auch bei der Aktivierung der Autophagie, was erstmals von Daido et al. beschrieben wurde (Daido et al., 2004). BNIP3 wird dabei durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Hypoxie, hochreguliert und führt durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zur Einleitung der Autophagie (Bellot et al., 2009). Zu diesen gehört z.B. LC3 (*Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3*), welches durch Interaktion mit BNIP3 den Abbau von Zellbestandteilen wie Mitochondrien und ER mittels Autophagosomen bewirkt (Hanna et al., 2012). Der Zelltod durch Autophagie stellt eine Sonderform des Zelltods dar und kann ebenfalls durch Hochregulation von BNIP3 eingeleitet werden (Daido et al., 2004; Kanzawa et al., 2005).

Der Abbau von Mitochondrien durch Autophagie wird auch als Mitophagie bezeichnet. Zhang et al. beschreiben, dass BNIP3 durch Interaktion mit dem Protein PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) die Mitophagie einleiten kann. BNIP3 verhindert die Spaltung von PINK1, wodurch sich dieses an die äußere Mitochondrienmembran anlagert. Dies

bewirkt eine vermehrte Bindung des Proteins Parkin an die Mitochondrien, welches deren Abbau einleitet (Zhang et al., 2016).

An einem Fruchtfliegen-Modell mit M. Parkinson wurden als weitere Funktionen des BNIP3 eine Wiederherstellung von veränderten Mitochondrien und die Förderung der ATP-Produktion beschrieben (Zhang et al., 2016).

1.3.3 Die Verbindung zwischen BNIP3 und GDAP1

An einem Zellmodell mit *GDAP1*-Knockdown (Wolf et al., 2021) konnten Mitglieder unserer Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Konzentration des BNIP3 erhöht ist (unpublizierte Daten).

Da ein Funktionsverlust des GDAP1 Änderungen der mitochondrialen Morphologie bewirkt, könnte BNIP3 als proapoptotisches Protein den Zelltod der durch gestörte Mitochondrien geschädigten Zellen fördern. Es stellt sich deshalb die Frage, ob BNIP3 bei CMT4A-Patienten zu einer übermäßigen Apoptose führt und der Neuronenuntergang unter anderem daraus resultiert. Andererseits könnte eine hohe Expression des BNIP3 nötig sein, um die Autophagie der Mitochondrien einzuleiten und beschädigte Mitochondrien wiederherzustellen, damit die Zelle repariert werden kann und somit überlebt.

1.4 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist ein Modellorganismus, der schon seit 1910 (Morgan, 1910) zu genetischen Forschungszwecken genutzt wird, um vor allem Entwicklungs- und zelluläre Prozesse der höheren Lebewesen zu verstehen. Er zählt mittlerweile zu den am besten untersuchtesten Organismen in der Biologie.

Im Jahr 2000 wurde erstmals das gesamte ca. 180 Mbp große Genom der *Drosophila melanogaster* durch Adams et al. sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass ca. zwei Drittel des Genoms (entspricht 120 Mbp) aus Euchromatin besteht und dieses etwa 13.600 Gene kodiert. Das Genom besteht aus insgesamt 4 Chromosomenpaaren: den Geschlechtschromosomen X/X bzw. X/Y, zwei großen und einem kleinen Autosom (Adams et al., 2000).

Es wird geschätzt, dass etwa 75% der bekannten krankheitsassoziierten Gene des Menschen mit den Genen der *Drosophila melanogaster* übereinstimmen, wodurch

diese einen erheblichen Anteil zur Erforschung von Krankheiten beitragen kann (Reiter, Potocki, Chien, Gribskov, & Bier, 2001).

Die Arbeit mit *Drosophila melanogaster* birgt viele Vorteile im Vergleich zu anderen Modellorganismen, denn diese ist zum einen einfach und kostengünstig zu halten und zum anderen ist deren Generationszyklus mit etwa 10 Tagen und die Lebenserwartung von ca. 3 Monaten relativ kurz. Zudem hat sie eine sehr hohe Anzahl an Nachkommen von bis zu 400 pro Generation. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Fliegenstämmen vorhanden, die über verschiedene Stockcenter kommerziell erworben werden können.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um die Expression von bestimmten Proteinen in *Drosophila melanogaster* zu verändern, wozu vor allem genetische Veränderungen zählen. Balancer-Chromosomen verhindern dabei die Rekombination, sodass genetisch veränderte Fruchtfliegen über mehrere Generationen hinweg genutzt werden können. In dieser Arbeit wurde die RNA-Interferenz (RNAi) in Kombination mit dem Gal4/UAS-System sowie ein Gen-Knockout zur Verminderung der Proteinexpression genutzt, welche im Folgenden in den Kapiteln 1.4.1 bis 1.4.3 erklärt werden.

1.4.1 Gdap1 und BNIP3 in *Drosophila melanogaster*

Um das Protein GDAP1 am Modell der *Drosophila melanogaster* erforschen zu können, wurde zunächst untersucht, ob die Fruchtfliege ein homologes Gen zu dem humanen *GDAP1* und somit auch ein homologes Protein besitzt. Marco et al. fanden heraus, dass das Produkt des Gens CG4623, welches auf dem zweiten Chromosom der *Drosophila melanogaster* liegt, große Ähnlichkeit zu humanem GDAP1 besitzt (Marco, Cuesta, Pedrola, Palau, & Marín, 2004). López Del Amo et al. konnten 2015 nachweisen, dass dieses Gen dem menschlichen *GDAP1* entspricht und dass die Funktionen des Proteins der *Drosophila melanogaster*, im Folgenden *Gdap1* genannt, denen des humanen GDAP1 entsprechen (López Del Amo et al., 2015).

Im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* bewirkt *Gdap1* eine Spaltung der Mitochondrien, was durch Unterstützung deren Spaltung oder Hemmung deren Fusion bedingt sein könnte. Das Protein spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des Kontaktes zwischen Mitochondrien und ER sowie der Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zelle, denn eine verminderte Expression von *Gdap1* führt zur Migration

der Mitochondrien von peripher nach zentral. Gdap1 beeinflusst außerdem die ATP-Synthese und die Menge des oxidativen Stresses (López Del Amo et al., 2015; López Del Amo et al., 2017).

Eine erhöhte oder erniedrigte Expression des Proteins führt durch verminderte ER-Mitochondrien-Kontakte zu einer systemischen Inaktivierung des Insulin-Signalwegs und dadurch zu Mengenverschiebungen von Metaboliten wie Kohlenhydraten und Aminosäuren. Es kommt zu einer Erhöhung der Menge an Kohlenhydraten und zu einer Verminderung der Aminosäuren. Außerdem führt sowohl die erhöhte als auch verringerte Expression von Gdap1 zu einer Hochregulation der Pyruvatdehydrogenasekinase, welche den Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDC) hemmt, wodurch es kompensatorisch zu einer verstärkten β -Oxidation von Lipiden kommt. Somit scheint das Protein auch den Stoffwechsel der Fruchtfliege zu beeinflussen (López Del Amo et al., 2017).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Veränderungen in der Quantität des Gdap1 zu einem Verlust von Neuronen und Muskelzellen führen (López Del Amo et al., 2015). Dadurch verkürzt sich die Lebenszeit der Fliege und die Fähigkeit zur negativen Geotaxis, dem Klettern entgegen der Richtung der Schwerkraft, nimmt ab (López Del Amo et al., 2017).

Auch BNIP3 wird im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* synthetisiert. Das kodierende Gen befindet sich auf dem zweiten Chromosom des Genoms. Bezeichnet wird es sowohl mit CG5059 als auch mit *BNIP3* (Lieber, Jeedigunta, Palozzi, Lehmann, & Hurd, 2019).

1.4.2 Das Gal4/UAS-System

Mithilfe des Gal4/UAS-Systems kann gezielt die Expression von bestimmten Genen erhöht werden. Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch genetische Veränderung an bestimmten Stellen des Genoms der Fruchtfliege eingefügt werden kann, wodurch es möglich ist, die Genexpression in bestimmten Geweben oder während bestimmter Entwicklungsstufen zu verändern. UAS (*Upstream Activating Sequence*) ist ein Enhancer, an den der Transkriptionsfaktor Gal4 binden kann und diesen dadurch aktiviert. Das System wird genutzt, indem homozygote Gal4-Linien mit homozygoten UAS-Linien verkreuzt werden, wodurch die nächste Generation in ihrem Genom heterozygot sowohl das Gal4- als auch das UAS-Konstrukt enthält und somit das

gewünschte Gen, das sich downstream von UAS befindet, vermehrt exprimiert (Prokop & Root, 2013).

1.4.3 Genregulation durch RNA-Interferenz

Um spezifisch die Expression von Genen in bestimmten Geweben zu reduzieren, eignet sich die RNA-Interferenz, die zu den Methoden des Knockdowns gehört. Indem UAS-RNAi-Konstrukte mit Gal4-Konstrukten kombiniert werden, kann gezielt die Expression von Proteinen in spezifischen Geweben oder während bestimmter Entwicklungsstufen der Fruchtfliege vermindert werden. Die durch den aktivierten UAS-Enhancer transkribierte RNAi bindet an die mRNA des gewünschten Proteins und führt somit zu dessen Abbau (Prokop & Root, 2013).

Die für diese Arbeit genutzte Genregulation durch das Gal4/UAS-System und die RNA-Interferenz wird an dem folgenden Beispiel nochmals vereinfacht erläutert.

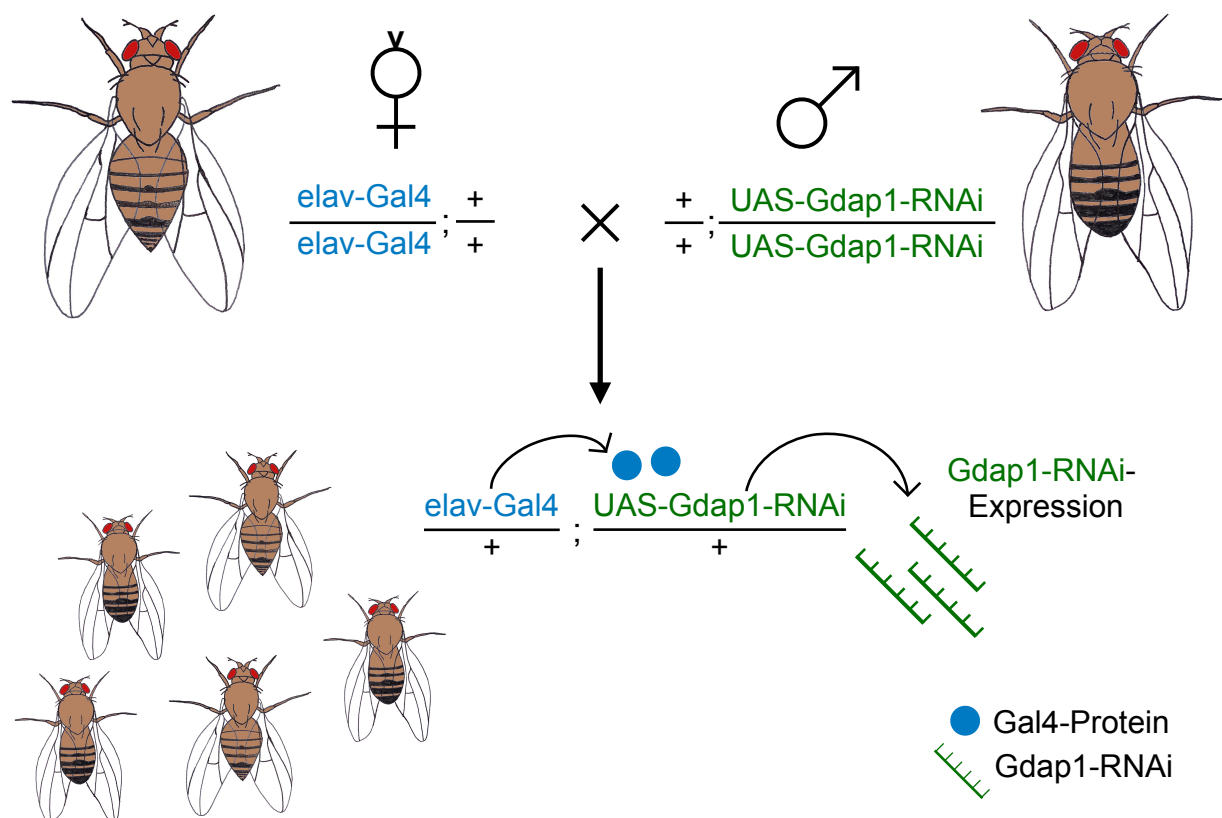


Abbildung 6: **Systematik der RNA-Interferenz in Kombination mit dem Gal4/UAS-System am Beispiel des *Gdap1*-Knockdowns in Neuronen.** Indem eine elav-Gal4-Linie mit einer UAS-Gdap1-RNAi-Linie verkreuzt wird, erhält man in der F1-Generation Fruchtfliegen, die heterozygot sowohl das Gal4- als auch das UAS-Konstrukt tragen. Der Transkriptionsfaktor elav-Gal4 wird im Nervensystem der Fruchtfliege exprimiert und bindet dort an das UAS-Gdap1-RNAi-Konstrukt im Genom. Dadurch wird dieses aktiviert, was zur Transkription der Gdap1-RNAi führt. Die RNAi kann an die Gdap1-RNA binden und bewirkt deren Abbau.

In dieser Arbeit soll auf der einen Seite das Gal4/UAS-System kombiniert mit der RNA-Interferenz dazu genutzt werden, die Eigenschaften der Proteine Gdap1 und BNIP3 durch Knockdown genauer zu erörtern. Auf der anderen Seite dienen die Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen als Modell für CMT4A, indem der krankheitsverursachende Funktionsverlust des Proteins (Pedrola et al., 2005) mittels Knockdowns nachgestellt wird.

1.4.4 Genregulation durch Knockout

Eine weitere Möglichkeit, um die Expression von Proteinen in *Drosophila melanogaster* zu vermindern, ist die Generierung von Fliegenstämmen mit einem ubiquitären Gen-Knockout. Die in dieser Arbeit verwendeten Knockout-Fliegenstämme wurden freundlicherweise von [REDACTED] aus der Polytechnischen Universität Valencia in Spanien zur Verfügung gestellt.

[REDACTED] et al. generierten Fliegenstämme, die einen homozygoten Gen-Knockout des *Gdap1* haben und an dessen Stelle das humane Wildtyp-*GDAP1* bzw. ein mutiertes *GDAP1* tragen, um damit Fliegenmodelle für die durch *GDAP1*-Mutationen verursachte Charcot-Marie-Tooth-Krankheit abzubilden.

Um die Fliegenstämme zu generieren, wurde zunächst nach der Methode von Baena-Lopez et al. (Baena-Lopez, Alexandre, Mitchell, Pasakarnis, & Vincent, 2013) der Vektor pTVCherry in das erste Intron des Gens inseriert, wodurch die Expression des *Gdap1* vollständig unterdrückt wird. Nach dem Knockout des *Gdap1* im Genom der *Drosophila melanogaster* wurden cDNAs mit dem humanen *GDAP1*, sowohl in der Wildtyp-Form als auch in verschiedenen mutierten Formen, geklont. Die cDNA wurde anschließend in einen RIV-Vektor geklont und dieser zusammen mit der PhiC31 Integrase durch eine Mikroinjektion in die Fliegenembryos eingefügt, was von dem *Centro de Biología Molecular Severo Ochoa* der Autonomen Universität Madrid in Spanien durchgeführt wurde. Dadurch befindet sich das Transgen des humanen *GDAP1* in den transgenen Fliegen an gleicher Stelle, an der deren eigenes *Gdap1* lag und unterliegt somit der physiologischen Expressionsstärke und Regulation. Als Kontrolllinien wurden eine Linie mit dem reinen *GDAP1*-Knockout belassen und in eine weitere Linie ein leerer RIV-Vektor eingefügt (unpublizierte Daten von [REDACTED]).

In der folgenden Tabelle sind die Genotypen der in dieser Arbeit genutzten Knockout-Linien beschrieben.

Tabelle 1: Übersicht der Genotypen der *GDAP1*-Knockout-Fliegenstämme

Genotyp	Schematischer Genotyp	Beschreibung	CMT-Form
w; KO attp. <i>Gdap1</i> / TM6B	<i>Gdap1</i> ^{KO/+}	<i>Gdap1</i> -Knockout-Linie	
w; KO attp. <i>Gdap1</i> AV1 / TM6B	<i>Gdap1</i> ^{KO (EV)/+}	<i>Gdap1</i> -Knockout-Linie mit leerem Vektor	
w; KO attp. <i>Gdap1</i> WT- <i>GDAP1</i> / TM6B	<i>Gdap1</i> ^{KO (GDAP1)/+}	Humanes Wildtyp- <i>GDAP1</i>	
w; KO attp. <i>Gdap1</i> R161H- <i>GDAP1</i> / TM6B	<i>Gdap1</i> ^{KO (GDAP1 R161H)/+}	Humanes <i>GDAP1</i> mit der autosomal-rezessiven missense-Mutation R161H	CMT4A
w; KO attp. <i>Gdap1</i> P274L- <i>GDAP1</i> / TM6B	<i>Gdap1</i> ^{KO (GDAP1 P274L)/+}	Humanes <i>GDAP1</i> mit der autosomal-dominanten missense-Mutation P274L	CMT2, CMT-INT
w; KO attp. <i>Gdap1</i> P153L- <i>GDAP1</i> / TM6B	<i>Gdap1</i> ^{KO (GDAP1 P153L)/+}	Humanes <i>GDAP1</i> mit der autosomal-rezessiven missense-Mutation P153L	CMT2, CMT4C4
w; KO attp. <i>Gdap1</i> R120W- <i>GDAP1</i> / TM6B	<i>Gdap1</i> ^{KO (GDAP1 R120W)/+}	Humanes <i>GDAP1</i> mit der autosomal-dominanten missense-Mutation R120W	CMT4A

Die missense-Mutation R120W kommt bei CMT-Patienten verglichen zu den anderen in dieser Arbeit genutzten Modellen am häufigsten vor, wird autosomal-dominant vererbt und geht üblicherweise mit einem milden Verlauf der CMT4A einher (Sivera et al., 2010; Claramunt et al., 2005). Auch die missense-Mutation R161H führt zu CMT4A, wird jedoch autosomal-rezessiv vererbt und weist einen schwereren Verlauf

der Krankheit auf (Baxter et al., 2002). Die Vererbung der missense-Mutation P274L erfolgt autosomal-dominant. Sie wurde bereits bei Patienten CMT2 und CMT-INT entdeckt (Zimoń et al., 2011). Die missense-Mutation P153L wird autosomal-rezessiv vererbt und wurde im Genom von Patienten mit CMT4C4 und CMT2 gefunden (Kabzińska et al., 2007; Auer-Grumbach et al., 2008).



Abbildung 7: **Schematische Lokalisationen der in dieser Arbeit verwendeten Mutationen in GDAP1.** Die Mutationen R120W und P153L befinden sich innerhalb des α -Loops und die Mutationen R161H sowie P274L in der C-terminalen Glutathion-S-Transferase-Domäne. Die Zahlen geben die Positionen der begrenzenden Aminosäuren der jeweiligen Domänen an. Grün gekennzeichnet sind autosomal-rezessive Mutationen, während autosomal-dominante Mutationen rot gekennzeichnet sind. GST Glutathion-S-Transferase-Domäne; HD hydrophobe Domäne; TMD Transmembrandomäne. (Eigene Darstellung nach Rzepnikowska & Kochanski, 2018)

Abb. 7 zeigt schematisch die Lokalisationen der Mutationen der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme. Die Mutationen R120W und P153L befinden sich im α -Loop des GDAP1, welcher eine wichtige Rolle bei der Substratbindung aufweist (Googins et al., 2020). Mutationen an dieser Stelle werden vor allem mit einem verminderten SOCE in Verbindung gebracht (González-Sánchez, Satrústegui, Palau, & Del Arco, 2019).

Die Mutationen R161H und P274L befinden sich in der C-terminalen GST-Domäne. Über 50% der bekannten Mutationen, die zu CMT4A oder CMT2K führen, liegen in den GST-Domänen und sind mit schweren Formen der Erkrankung assoziiert (Cassereau et al., 2011).

1.5 Potenzielle Wirkstoffe zur Behandlung von CMT4A

1.5.1 J147

J147, ein Derivat des Gewürzes Curcumin, hat sich als potenzielles Pharmakon zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. M. Alzheimer, herausgestellt. Als Angriffspunkt dient die mitochondriale α -F1-ATP-Synthase (ATP5A) als Teil der ATP-Synthase (Goldberg et al., 2018). Der Wirkstoff verursacht auf molekularer Ebene durch seine Bindung eine Erhöhung des intrazellulären

Calciumgehaltes, wodurch unter anderem der AMPK/mTOR-Signalweg aktiviert wird (ebd.).

An Zellen fanden Currais et al. heraus, dass durch Behandlung mit J147 die Konzentration von Acetyl-CoA erhöht wird, was unter anderem auf die Inhibition der Acetyl-CoA-Carboxylase 1, welche das Schrittmacherenzym der Fettsäure-Biosynthese ist, zurückzuführen ist (Currais et al., 2019).

Chen et al. konnten zeigen, dass der Wirkstoff in normalen und neurodegenerativen Zellmodellen neuroprotektiv wirkt und die Gedächtnisfunktion fördert, indem es unter anderem vor Verlust von synaptischen Proteinen schützt (Chen et al., 2011). Auch an Mausmodellen mit M. Alzheimer erwies sich ein neuroprotektiver Effekt durch J147 (Currais et al., 2015). Ursächlich für die neuroprotektive Wirkung könnte die induktive Wirkung auf die neurotrophen Wachstumsfaktoren NGF (*nerve growth factor*) und BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) sein (Prior, Dargusch, Ehren, Chiruta, & Schubert, 2013).

Am Wildtyp-Modell der *Drosophila melanogaster* konnten bei Gabe von J147 eine verlängerte Lebensspanne sowie eine erhöhte ATP-Konzentration in Köpfen nachgewiesen werden (Goldberg et al., 2018).

1.5.2 CMS121

CMS121 ist ein Derivat des gelben Farbstoffs Fisetin, der zur Stoffgruppe der Flavonole gehört. 2014 wurde es erstmals als potenzielles Pharmakon für M. Alzheimer-Patienten entdeckt (Prior et al., 2014).

Wie J147, bindet auch CMS121 an die ATP-Synthase der Mitochondrien. Es weist ähnliche Wirkungen wie J147 auf, darunter die Erhöhung der zellulären Acetyl-CoA-Konzentration durch Inhibition der Acetyl-CoA-Carboxylase 1 (Currais et al., 2019).

Am Mausmodell mit M. Alzheimer konnte bereits eine verbessernde Wirkung des CMS121 auf die Gedächtnisfunktion gezeigt werden. Es wirkt der Apoptose entgegen, hemmt die Lipidperoxidation und hat anti-inflammatorische Wirkung (Ates, Goldberg, Currais, & Maher, 2020).

1.5.3 J147 und CMS121 als Therapiemöglichkeit bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit

Wie M. Alzheimer ist auch die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit eine neurodegenerative Erkrankung, sodass die Gabe von J147 oder CMS121 auch bei dieser eine mögliche Therapieoption sein könnte.

Wolf et al. zeigten, dass ein GDAP1-Funktionsverlust in Zellen in einer Funktionsbeeinträchtigung des PDC resultiert und kompensatorisch zu einer erhöhten alternativen Energiegewinnung über Fettsäuren und Glutamin führt (Wolf et al., 2021). Die inhibierende Wirkung von J147 und CMS121 auf die Acetyl-CoA-Carboxylase 1 könnte den Energiestoffwechsel ebenfalls verändern und dadurch auf die kranken Zellen eine positive Wirkung haben, indem es die Konzentration an Acetyl-CoA erhöht und somit die Energiegewinnung positiv beeinflusst. Dies wird an der folgenden Abbildung genauer verdeutlicht.

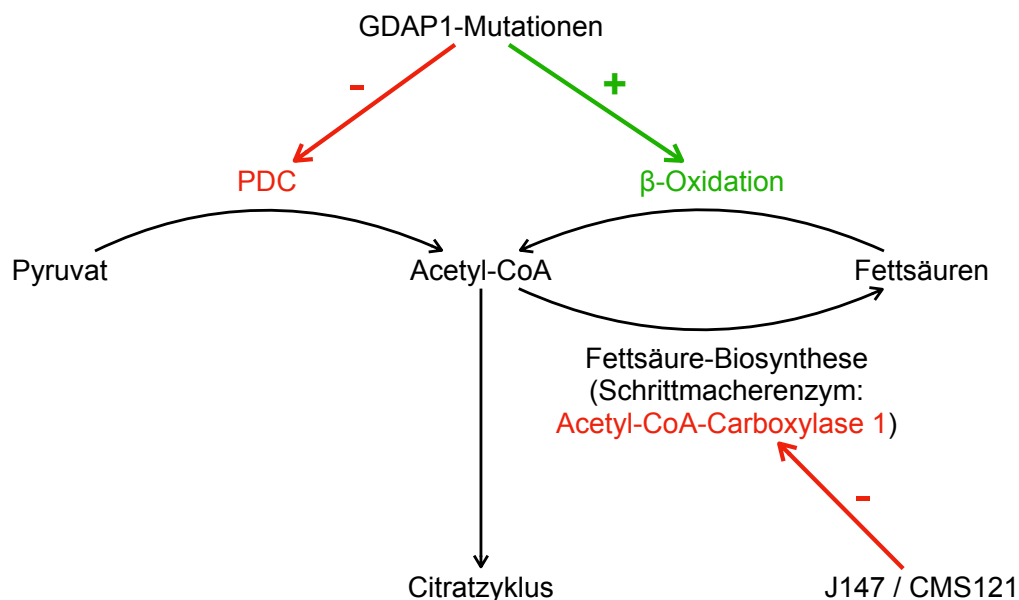


Abbildung 8: **Einfluss von J147 und CMS121 auf den Energiestoffwechsel.** Ein Funktionsverlust des GDAP1, welcher durch Mutationen verursacht sein kann, führt zu einer Hemmung der PDC und somit zu einer verminderten Acetyl-CoA-Konzentration (Wolf et al., 2021). Vermutlich kommt es kompensatorisch zu einer vermehrten β -Oxidation, um die Konzentration an Acetyl-CoA aufrechtzuerhalten. Auch J147 und CMS121 könnten die Konzentration an Acetyl-CoA erhöhen, da sie hemmend auf die Acetyl-CoA-Carboxylase 1, das Schrittmacherezym der Fettsäure-Biosynthese, wirken. Durch die Hemmung würde weniger Acetyl-CoA zu Fettsäuren umgebaut werden, sodass mehr Acetyl-CoA für die Energiegewinnung im Citratzyklus zur Verfügung stehen könnte. Die Gabe von J147 bzw. CMS121 könnte somit den Mangel an Acetyl-CoA durch GDAP1-Mutationen ausgleichen.

Außerdem resultiert ein GDAP1-Funktionsverlust in einer verminderten zellulären ATP-Konzentration (Wolf et al., 2021; Cassereau et al., 2009; López Del Amo et al., 2015). Deshalb stellt sich die Frage, ob der dadurch entstehende Energieverlust

wieder durch Therapie mittels J147, welches am Fliegenmodell bereits zu einer ATP-Erhöpfung führte (Goldberg et al., 2018), bzw. CMS121 aufgebaut werden könnte.

Während Curcumin, das Vorläufermolekül von J147, bereits an CMT1A- und CMT2A-Modellen getestet wurde und dort zu einer verminderten Apoptose führte (Morena, Gupta, & Hoyle, 2019), wurde der Effekt von J147 und CMS121 an Zell- oder Tiermodellen mit der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit bis heute noch nicht getestet.

1.6 Zielsetzung

In den letzten Jahren konnte bereits viel über die Funktionen und Wirkungsweisen des GDAP1 und BNIP3 erforscht werden. In dieser Arbeit sollen die Proteine weiter in ihrer Funktion sowie in ihrem gegenseitigen Zusammenspiel analysiert werden.

Mittels des Gal4/UAS-Systems am Modellorganismus *Drosophila melanogaster* soll durch gezielten Knockdown der Proteine in verschiedenen Geweben dessen Einfluss auf Messgrößen wie Lebensspanne, Klettergeschwindigkeit und ATP-Gehalt gemessen werden. Dabei stellt eine Linie mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen ein Modell für CMT4A dar, um Rückschlüsse auf die Krankheit zu ziehen.

Mitglieder unserer Arbeitsgruppe konnten bereits an Zellen nachweisen, dass eine verminderte Expression des *GDAP1* zu einer Hochregulation von *BNIP3* führt (unpublizierte Daten). In dieser Arbeit soll der Versuch auf das Fliegenmodell übertragen, die Ergebnisse verglichen und die Ursache sowie Funktion erörtert werden.

Auf der anderen Seite werden Knockout-Linien, die homozygot anstelle des *Gdap1* der *Drosophila melanogaster* das humane Wildtyp-*GDAP1* bzw. dieses Gen mit verschiedenen Mutationen tragen, als weitere Modelle für die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit genutzt. Mit diesen Linien soll validiert werden, dass *GDAP1* anstelle des *Gdap1* in der Fruchtfliege fungieren kann sowie gezeigt werden, welche Einflüsse das mutierte *GDAP1* auf das Fliegenmodell hat, indem Lebensspanne, Klettergeschwindigkeit und ATP-Gehalt gemessen werden.

Letztendlich sollen mit den beiden experimentellen Wirkstoffen J147 und CMS121 deren potenzielle Wirksamkeit auf die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 4A getestet werden, wobei sowohl die Gal4/UAS- als auch die Knockout-Linien als Modelle dienen.

Mit dieser Arbeit möchte ich einen Beitrag dazu leisten, die Entstehung der durch *GDAP1*-Mutationen verursachten Charcot-Marie-Tooth-Krankheit genauer zu verstehen und neue, mögliche Therapieoptionen zu erörtern.

2 Material

2.1 Fliegenstämme

Tabelle 2: Fliegenstämme

Name	Firma
elav-Gal4 (BL458)	Bloomington Stock Center
FM6/FM6; Sco/CyO	Gespendet von [REDACTED]
Gdap1 ^{KO/+}	Polytechnische Universität Valencia
Gdap1 ^{KO (EV)/+}	Polytechnische Universität Valencia
Gdap1 ^{KO (GDAP1)/+}	Polytechnische Universität Valencia
Gdap1 ^{KO (GDAP1 P153L)/+}	Polytechnische Universität Valencia
Gdap1 ^{KO (GDAP1 P274L)/+}	Polytechnische Universität Valencia
Gdap1 ^{KO (GDAP1 R120W)/+}	Polytechnische Universität Valencia
Gdap1 ^{KO (GDAP1 R161H)/+}	Polytechnische Universität Valencia
mef2-Gal4	Gespendet von [REDACTED]
Oregon R	Gespendet von [REDACTED]
tubP-Gal4 (BL5138)	Bloomington Stock Center
UAS-always early-RNAi (v13673)	Vienna Drosophila Resource Centre
UAS-BNIP3-RNAi (BL42494)	Bloomington Stock Center
UAS-Gdap1-RNAi (BL51903)	Bloomington Stock Center
w-	Gespendet von [REDACTED]

2.2 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen

Name	Firma
10x Tris/Glycine/SDS	Bio-Rad
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad
Agar-Agar in Fäden	C.E. Roper
CMS121	gespendet durch das Salk Institut für Biologische Studien, USA
DMSO	Roth®
Ethanol für Fliegenfutter	Roth®
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth®
J147	gespendet durch das Salk Institut für Biologische Studien, USA
Maismehl	Bauck
Maltzin (Enzyminaktivierter Malzextrakt)	Jung & Schmidt
Methanol	Roth®
Milchpulver	Roth®
Natriumchlorid	Roth®
Nipagin (Methyl-4-hydroxybenzoat)	VWR®
Nuclease-Free Water	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific™
Nuclease-Free Water 50 ml	Ambion®
RIPA-Puffer	Thermo Fisher Scientific™
Rotenon	Sigma-Aldrich
Saccharose	Roth®

Sojamehl	SoBo Naturkost
Takyon™ No Rox Probe 2X MasterMix dTTP Blue	Eurogentec
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth®
Trockenbackhefe	Huber Mühle
Tunicamycin from Streptomyces sp.	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Roth®
Zuckerrübensaft	Grafschafter Krautfabrik

2.3 Kits

Tabelle 4: Kits

Kit	Firma
ATP Bioluminescence Assay Kit HSII	Roche
BC Assay Protein Quantification Kit	interchim®
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific™
RNA MiniPrep Kit	Zymo Research

2.4 Primer & Sonden

Die Primer wurden hergestellt von der Firma Eurofins Genomics in DE-5560 Ebersberg. Es wurden Sonden der Universal Probe Library (Roche) genutzt.

Tabelle 5: Primer

Primer	Richtung	Sequenz
<i>BNIP3</i> -Primer (<i>Drosophila</i>)	<i>forward</i>	CACCAAATCGAGCGAAGA
<i>BNIP3</i> -Primer (<i>Drosophila</i>)	<i>reverse</i>	GCAGCTGTTGTGCTGAGTTC
<i>Gdap1</i> -Primer (<i>Drosophila</i>)	<i>forward</i>	TACAACCTCCATGCGCAAAA

<i>Gdap1</i> -Primer (<i>Drosophila</i>)	<i>reverse</i>	GGTCCACCACATAGGGAAAG
<i>GDAP1</i> -Primer (human)	<i>forward</i>	TGCAAAGAAGAAATGAAGAAACC
<i>GDAP1</i> -Primer (human)	<i>reverse</i>	ATGTGACAGCGAGTGAGACG
<i>rp49</i> -Primer	<i>forward</i>	TTCCTTGACGTGCCAAAACCT
<i>rp49</i> -Primer	<i>reverse</i>	AATGATCTATAACAAAATCCCCTGA

Tabelle 6: Sonden

Sonde	Nummer (Universal ProbeLibrary)
<i>Gdap1</i> -Sonde (<i>Drosophila</i>)	59
<i>GDAP1</i> -Sonde (human)	1 variant 2,3
<i>rp49</i> -Sonde	122

2.5 Antikörper und Marker

Tabelle 7: Antikörper und Marker

Name	Firma
680-conjugated anti-mouse IgG Sekundärantikörper	LI-COR®
800-conjugated anti-rabbit IgG Sekundärantikörper	LI-COR®
Anti-GDAP1 tag Primärantikörper, IgG, polyklonal, Ratte	Sigma-Aldrich
Anti-HA tag Primärantikörper, IgG, polyklonal, Ratte	Abcam
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	LI-COR®

2.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 8: Verbrauchsmaterial

Name	Firma
0,2 ml 8-Strip PCR Tubes	STARLAB
0,2 ml 96-Well PCR Plates	VWR®
0,2 ml 96-Well PCR TW-MT-Plates	Biozym
Benchkote® Absorbent Protector Sheets	Whatman®
Combitips®	Eppendorf
Injekt Luer Solo 10 ml	Braun
Laminierfolien A5	Peach
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems™
Microseal® 'B' seals	Bio-Rad
Mikrotiterplatte 96-Loch, klar	Greiner Bio-One
Mikrotiterplatte 96-Loch, weiß	Greiner Bio-One
Milbenstopfen 26 mm Durchmesser	K-TK e.K
Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels	Bio-Rad
Pipettenspitzen	STARLAB
Polypropylen Reaktionsgefäß 15 ml UV-geschützt	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäß (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf
RNAse AWAY®	Molecular BioProducts, Thermo Fisher Scientific™
Rotilabo®-Reaktionsgefäße schwarz	Roth
STERICAN Kanülen 23 Gx3 1/5 0,6x80 mm	Braun
Surgical Disposable Scalpels	Braun
Trans-Blot Turbo Nitrocellulose	Bio-Rad
XCEED Nitril Einweghandschuhe, puderfrei	STARLAB

Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner
Zylindrische Kunststoffröhrchen	Dominique Dutscher

2.7 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Name	Firma
Fisherbrand™ Präzisionswaage	Thermo Fisher Scientific™
Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific™
Ice maker	Scotsman
Infinite® 200 PRO	Tecan
Infinite® Spark	Tecan
Kühlraum 4°C	Viessmann
Kühlschrank (4°C; -20°C)	Liebherr Comfort
Kühlschrank MediLine (4°C; -20°C)	Liebherr
Mikroskop LEICA MS5	Leica
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
Mini-Zentrifuge	Biozym
Multipette M4	Eppendorf
Odyssey SA Infrared Imaging System	LI-COR®
peqSTAR Thermocycler	Peqlab by VWR®
Pico™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific™
Pipette (10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Eppendorf
Pipette PIPETMAN® (10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Gilson
Powerpac Basic	Bio-Rad

Präzisionswaage	Heidolph
Roller Mixer SRT9	stuart®
Schweißgerät	Severin
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner
StepOnePlus™ PCR System	Applied Biosystems™
Synthetics Pinsel Größe 1	Brunnen
ThermoMixer F1.5	Eppendorf
Trans-Blot® Turbo Transfer System	Bio-Rad
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wippschüttler Rocking Platform	VWR®
Z216 MK Zentrifuge	Hermle

2.8 Software

Tabelle 10: Software

Name	Firma
Affinity Designer	Serif Europe Ltd.
Fotos	Apple Inc.
Graph Pad Prism 6	Graph Pad Prism
i-control™	Tecan
Keynote	Apple Inc.
Microsoft Excel Version 16.42	Microsoft
Odyssey Sa Express software	LI-COR® Biosciences
StepOne Software	Applied Biosystems™

3 Methoden

3.1 Haltung der *Drosophila melanogaster*

Die in dieser Arbeit genutzten Fliegenstämme wurden bei einer Temperatur von 18°C bzw. 25°C, je nach gewünschter Entwicklungsgeschwindigkeit, in zylindrischen Kunststoffröhrchen, dessen Boden mit einem Nährmedium bedeckt war, gehalten.

20 l des Nährmediums bestehen aus den folgenden Komponenten:

- 130 g Agar
- 1050 g Maismehl
- 125 g Sojamehl
- 350 g Hefeflocken
- 1100 g Malzextrakt
- 550 g Zuckerrübensaft
- 30 g Nipaginpulver gelöst in 100 ml Ethanol
- H₂O

Die Kreuzungen für verschiedene Experimente wurden in Röhrchen mit oben genanntem Nährmedium durchgeführt, wobei jungfräuliche Weibchen mit Männchen unbekanntes Alters in einem 25°C-Inkubator verpaart wurden.

3.2 Herstellung von Fliegenlinien mit Protein-Knockdown in verschiedenen Geweben

Zur Analyse der *Drosophila melanogaster* mit einem Protein-Knockdown in bestimmten Geweben wurden Fliegenlinien mittels des Gal4/UAS-Systems hergestellt. Dafür wurden jungfräuliche Weibchen, die ein Gal4-Konstrukt besaßen, mit Männchen unbekanntes Alters, die das gewünschte UAS-RNAi-Konstrukt trugen, nach dem in Kapitel 1.4.3 gezeigten Schema in einem 25°C-Inkubator verpaart. Zur Genregulation in Neuronen wurden das elav-Gal4-, in den Muskelzellen das mef2-Gal4- und zur ubiquitären Regulation das tubP-Gal4-Konstrukt verwendet.

Fliegen der F1-Generation, welche nicht durch Balancer-Chromosomen markiert waren, trugen heterozygot sowohl das Gal4- als auch UAS-RNAi-Konstrukt und wurden für nachfolgende Versuche verwendet.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht aller in dieser Arbeit durchgeführten Gal4/UAS-Kreuzungen.

Tabelle 11: Übersicht der Gal4/UAS-Kreuzungen

Parentalgeneration		F1-Generation	Funktion
♀	♂		
tubP-Gal4	UAS-always early-RNAi	tubP>Kontroll-RNAi	Kontrolle
tubP-Gal4	UAS-BNIP3-RNAi	tubP>BNIP3-RNAi	Ubiquitärer <i>BNIP3</i> -Knockdown
tubP-Gal4	UAS-Gdap1-RNAi	tubP>Gdap1-RNAi	Ubiquitärer <i>Gdap1</i> -Knockdown
elav-Gal4	UAS-always early-RNAi	elav>Kontroll-RNAi	Kontrolle
elav-Gal4	UAS-BNIP3-RNAi	elav>BNIP3-RNAi	Neuronaler <i>BNIP3</i> -Knockdown
elav-Gal4	UAS-Gdap1-RNAi	elav>Gdap1-RNAi	Neuronaler <i>Gdap1</i> -Knockdown
mef2-Gal4	UAS-always early-RNAi	mef2>Kontroll-RNAi	Kontrolle
mef2-Gal4	UAS-BNIP3-RNAi	mef2>BNIP3-RNAi	Muskulärer <i>BNIP3</i> -Knockdown
mef2-Gal4	UAS-Gdap1-RNAi	mef2>Gdap1-RNAi	Muskulärer <i>Gdap1</i> -Knockdown

3.3 Herstellung eines Fliegenstammes mit *GDAP1*-Knockdown in Neuronen

Um Fliegen mit einem Knockdown von 2 verschiedenen Proteinen mittels RNAi und des Gal4/UAS-Systems herstellen zu können, muss zunächst ein Fliegenstock generiert werden, der eine der gewünschten RNAi in einem spezifischen Gewebe exprimiert und über längere Zeit gehalten werden kann. In dieser Arbeit soll ein neuronaler Knockdown durch sowohl *Gdap1*-RNAi als auch *BNIP3*-RNAi mit einem

Knockdown durch Gdap1-RNAi und einer Kontroll-RNAi verglichen werden. Dafür wurde ein Fliegenstock, der Gdap1-RNAi in Neuronen exprimiert, durch Kreuzungen von weiblichen Jungfrauen mit beliebig alten Männchen verschiedener Fliegenlinien nach dem im Folgenden dargestellten Schema generiert. Für anschließende Kreuzungen wurden jungfräuliche Weibchen der rot eingekreisten Linie genutzt.

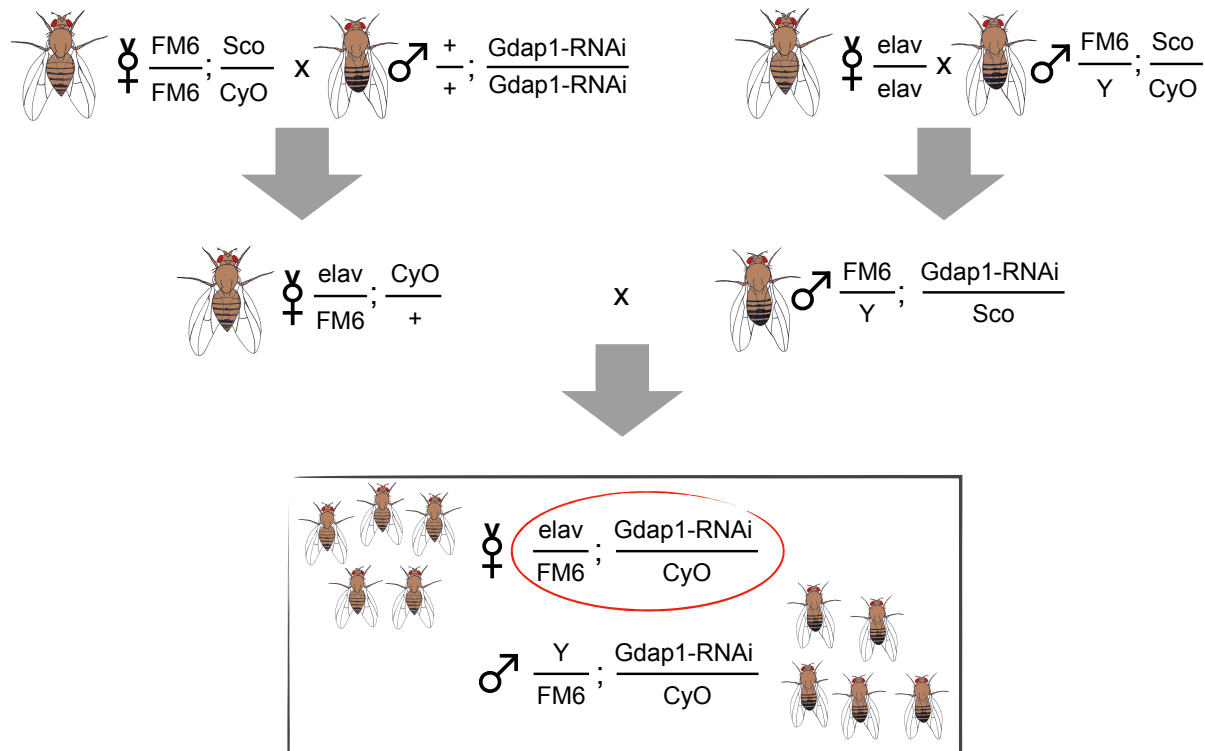


Abbildung 9: **Systematik der Generierung eines Fliegenstammes mit GDAP1-Knockdown in Neuronen.** Zunächst werden in zwei verschiedenen Kreuzungen Fliegen mit den Balancer-Chromosomen *FM6*, *Scutoid* (*Sco*) und *Curly O* (*CyO*) mit UAS-Gdap1-RNAi-tragenden bzw. elav-Gal4-tragenden Fliegen nach oben gezeigtem Schema verkreuzt. Bei der erstgenannten Kreuzung werden jungfräuliche Fliegenweibchen des Phänotyps *CyO* und *FM6* gesammelt und mit Männchen aus der zweitgenannten Kreuzung, die den Phänotyp *FM6* und *Sco* tragen, verkreuzt. Durch Sammeln von Nachkommen des Phänotyps *FM6* und *CyO* kann ein Fliegenstamm generiert werden, der über längere Zeit gehalten werden kann und in der Abbildung im schwarzen Kasten dargestellt ist. Für nachfolgende Kreuzungen wurden jungfräuliche Weibchen des rot eingekreisten Genotyps benutzt.

3.4 Messung der Lebensspanne der *Drosophila melanogaster*

3.4.1 Messung der Lebensspanne während Gabe eines Nährbreis

Um die Lebensspanne verschiedener Fliegenlinien zu messen, wurden diese in Kunststoffröhrchen mit Nährmedium (Herstellung in 3.1 beschrieben) bei 25°C gehalten, da bei dieser Temperatur das Gal4/UAS-System aktiviert wird (Prokop & Root, 2013). Pro Röhrchen wurden bis zu 30 Fliegen einer Linie im Alter von 0 bis 3

Tagen gesammelt und anschließend mit luftdurchlässigen Milbenstopfen aus Schaumstoff verschlossen. Die noch lebenden Fliegen wurden 2-Mal wöchentlich in ein neues Kunststoffröhrchen mit frischem Futtermedium gegeben, wobei die Anzahl der gestorbenen Fliegen innerhalb der letzten 3 bzw. 4 Tage gezählt wurde.

3.4.2 Messung der Lebensspanne während Gabe einer Saccharose-Lösung

Um die Lebensspanne zu messen, während die zu untersuchenden Fliegenlinien durch eine Zuckerlösung, die 5% Saccharose enthält, ernährt werden, wurden diese in Kunststoffröhrchen, die durch luftdurchlässige Milbenstopfen verschlossen waren, gehalten und bei 25°C gelagert. Auf den Boden wurden mehrere Lagen Filterpapier gelegt und gruppenweise 20 Fliegen im Alter von 0-3 Tagen in ein Röhrchen gesetzt. In 50 ml deionisiertem H₂O wurden 2,5 g Saccharose aufgelöst, sodass sich eine 5%-ige Lösung ergab. Erstmalig wurde das Filterpapier mit insgesamt 0,5 ml der Lösung getränkt. Anschließend wurden alle 24 Stunden 0,1 ml Saccharose-Lösung hinzugegeben, um das Filterpapier durchgehend feucht zu halten. Die Anzahl der gestorbenen Fliegen wurde täglich gezählt.

3.4.3 Messung der Lebensspanne während Behandlung mit Toxinen

Rotenon ist ein Insektizid, welches den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette hemmt und somit zu einer verminderten ATP-Produktion sowie erhöhten Entstehung von Superoxidradikalen führt (Li et al., 2003). Das Nukleosid-Antibiotikum Tunicamycin verursacht durch Hemmung der GlcNAc-1-P-Transferase (Tkacz & Lampen, 1975) eine Fehlfaltung von Proteinen und führt dadurch zum ER-Stress.

Zur Messung der Lebensspanne während einer Rotenon- bzw. Tunicamycinbehandlung wurden ca. 20 Fliegen einer Linie im Alter von 0-3 Tagen in Kunststoffröhrchen mit mehreren Lagen Filterpapier gegeben, diese durch luftdurchlässige Milbenstopfen verschlossen und bei 25°C gelagert.

300 µl einer 50 mM DMSO-Rotenon-Stammlösung wurden in 15 ml einer 5%-igen Saccharose-Lösung gegeben, sodass sich eine ca. 1 mM Lösung ergab.

Aus 300 µl einer 1,2 mM DMSO-Tunicamycin-Stammlösung und 15 ml 5%-iger Saccharose-Lösung ergab sich eine Konzentration von ca. 24 µM in der Futterlösung. Das Filterpapier der Röhrchen wurde erstmals mit 0,5 ml der jeweiligen Futterlösung getränkt und anschließend zum Schutz vor Austrocknung und aufgrund der Instabilität

der Toxine alle 24 Stunden 0,1 ml der jeweiligen Lösung hinzugegeben. Die Anzahl der gestorbenen Fliegen wurde täglich gezählt.

Als Kontrollgruppen wurden mit Saccharose behandelte Fliegen genutzt, die in Kapitel 3.4.2 beschrieben wurden.

3.4.4 Messung der Lebensspanne während Behandlung mit J147 und CMS121

Um die Wirkstoffe J147 und CMS121 zu testen, wurden ca. 20 Fliegen einer zu testenden Fliegenlinie im Alter von 0-3 Tagen in Kunststoffröhrchen mit mehreren Lagen Filterpapier gegeben, diese durch luftdurchlässige Milbenstopfen verschlossen und bei 25°C gelagert.

Aus 10 mg 350,431 g/mol J147 und 14,2 ml DMSO bzw. 10 mg 321,4 g/mol CMS121 und 15,6 ml DMSO wurden zunächst Stammlösungen mit einer Konzentration von 2 mM hergestellt.

50 µl der J147- bzw. CMS121-Stammlösung wurden mit 50 ml einer 5%-igen Saccharose-Lösung verdünnt, sodass der Wirkstoff in der Futterlösung eine Konzentration von ca. 2 µM hatte. Das Filterpapier am Boden der Röhrchen wurde erstmals mit 0,5 ml der jeweiligen Futterlösung getränkt und dann alle 24 Stunden 0,1 ml hinzugegeben, aufgrund der Instabilität der Wirkstoffe und um vor Austrocknung zu schützen. Die Haltung erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) und die Anzahl der gestorbenen Fliegen wurde täglich gezählt.

Als Kontrollgruppe dienten die wie in Kapitel 3.4.2 beschriebenen mit Saccharose behandelten Fliegen.

3.5 Verhaltensversuch: Negative Geotaxis

Die negative Geotaxis ist ein charakteristisches Verhalten der *Drosophila melanogaster*, welches initiiert werden kann, indem zylindrische Röhrchen, in denen sich die Fliegen befinden, auf einen Untergrund geklopft werden, sodass sie auf den Boden der Röhrchen fallen. Die Fliegen klettern anschließend an den Wänden des Röhrchens wieder nach oben. Die Messung der negativen Geotaxis kann Hinweise auf die Fortbewegungsfähigkeit der Fliegen geben (Gargano, Martin, Bhandari, & Grotewiel, 2005).

Zur Messung der negativen Geotaxis wurden je 15 Fliegen, die sich unmittelbar vorher über eine Dauer von mindestens 1 Tag im 25°C Inkubator befanden, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit einem durch kleine Löcher versehenen Deckel verschlossen. Mehrere Röhrchen wurden in ein Gestell platziert und zusammen mit diesem mehrmals auf den Boden geklopft. Die folgende Zeit, in der die Fliegen an den Wänden nach oben kletterten, wurde als Video aufgezeichnet. Zwischen 4 Wiederholungen pro Röhrchen wurden ca. 1 min lange Erholungsphasen eingehalten. Die Versuche wurden immer zwischen 10:00 und 12:00 Uhr bei möglichst gleichen Lichtverhältnissen durchgeführt. Analysiert wurden die aufgezeichneten Videos, indem pro Röhrchen der Anteil an Fliegen gezählt wurde, der innerhalb einer bestimmten Zeit eine 8 cm-Marke durch Klettern überschritt.

3.6 Proteinbiochemie

3.6.1 Proteingewinnung

Um Proteine der *Drosophila melanogaster* zu isolieren, wurden pro Genotyp 7 Fliegen mit 100 µl RIPA-Puffer homogenisiert und anschließend bei 13.000*G und 4°C 20 min lang zentrifugiert. Der RIPA-Puffer enthielt 25 mM Tris-HCl zur pH-Stabilisation, 150 mM NaCl, 1% Nonylphenoethoxylate und die als Detergenzien wirkenden Desoxycholsäure (1%) und SDS (0,1%). Der Überstand, der sich durch die Zentrifugation bildete, beinhaltete das isolierte Proteingemisch und wurde zur weiteren Proteinanalyse verwendet.

3.6.2 Konzentrationsbestimmung der Proteingemische

Die Konzentrationen der Proteingemische wurden mithilfe des *BC Assay Protein Quantification Kits* von interchim® ermittelt. Das Kit basiert auf einer Farbreaktion durch Kupfer-Ionen mit Proteinen, wobei die Kupfer-Ionen reduziert werden und einen lilafarbenen Komplex bilden, der durch ein Photometer bei einer Wellenlänge von 562nm quantifiziert werden kann.

Zur späteren Bestimmung einer Eichgerade wurden je 15 µl einer Standardreihe in eine 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:25 mit H₂O verdünnt und in Triplikaten, dabei 15 µl pro Well, ebenfalls in die Mikrotiterplatte pipettiert. Zu der Standardreihe und den Proteinproben wurden je 200 µl der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen des Reagenz A und 1 Teil des Reagenz

B bestand, gegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte 30 min lang bei 37°C inkubiert. Durch photometrische Analyse bei der Wellenlänge 562 nm mittels des *Tecan Infinite® 200 PRO* konnte die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

3.6.3 Proteinauftrennung durch SDS-Page

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteinen in Stoffgemischen nach ihrer molekularen Masse. Durch das negativ geladene Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), welches sich an die Proteine anlagert, werden diese entfaltet und durch negative Ladungen bedeckt, wobei die Stärke der negativen Ladung proportional zur molekularen Masse ist.

Das Proteingemisch, dessen Herstellung in Kapitel 3.5.1 beschrieben wurde, wurde je nach Konzentration mit H₂O verdünnt, sodass sich 20 µg Protein in 15 µl Lösung befanden. Je Probe wurden 15 µl Proteinlösung mit 5 µl 4x Laemmli Sample Buffer + 2-Mercaptoethanol gemischt und anschließend 3 min bei 95°C erhitzt, was zur Denaturierung der Proteine führte. Der Puffer enthielt 62,5 mM Tris-HCl zur pH-Stabilisation, 10% Glycerol, welches das Absinken in den Geltaschen fördert, 1% Lithium-Dodecyl-Sulfat (LDS), welches anstelle des SDS als Detergenz genutzt wurde, und 0,005% des Farbstoffes Bromophenolblau, welcher als Marker der vordersten Fraktion des Proteingemischs dient und das Wandern der Teilchen über das Ende des Gels hinaus verhindert.

Je Probe wurden die 20 µl Lösung in eine Geltasche eines vorgegossenen Polyacrylamidgels von Bio-Rad gegeben und diese in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt, die mit 10x Tris/Glycine/SDS gefüllt war. Dieser SDS-Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 100 V über eine Zeit von 60 min angelegt. Das vorgegossene Gel war in ein Sammelgel und ein Trenngel aufgeteilt, wobei die kleineren Proteine durch die angelegte Spannung schneller durch das Gel wanderten als die größeren.

Als Standard wurde 5 µl der vorgefärbten Chameleon Duo Pre-stained Protein Leiter verwendet, welche später das Abschätzen der Bandengrößen der Proben ermöglicht.

3.6.4 Proteinnachweis durch Western Blot

Durch den Western Blot können die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine nachgewiesen werden. Zunächst wurden hierfür die Proteine durch den *Trans-Blot®Turbo* (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurde diese 60 min lang in TBS-T mit 5% Milchpulver inkubiert. Der TBS-T Puffer enthielt 20 mM Tris, 150 mM NaCl und 0,1% des Detergenzes Tween® 20.

Anschließend wurde die Membran über Nacht mit einem spezifischen Primärantikörper für das zu analysierende Protein, welcher in TBS-T mit 5% Milchpulver verdünnt wurde, auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Anti-HA Tag Primärantikörper. Die Primärantikörper sind mithilfe von Ratten hergestellte IgG, welche an bestimmte Proteine binden und mittels Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden können. Bevor die Inkubation durch den Sekundärantikörper erfolgte, wurde die Membran 3-mal für eine Dauer von je 5 min in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mittels Sekundärantikörper, welche an den Fc-Teil der Primärantikörper binden, erfolgte ebenfalls verdünnt in TBS-T mit 5% Milchpulver. Die Membran wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur mittels eines Schüttlers in der Lösung inkubiert und anschließend erneut 3-mal für eine Dauer von je 5 min in TBS-T gewaschen. Anschließend konnten die an Fluorochrome gebundenen Sekundärantikörper mittels des *Odyssey SA Infrared Imaging Systems* von LI-COR® nachgewiesen werden.

3.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

3.7.1 Isolation von RNA und Herstellung von cDNA aus Geweben der *Drosophila melanogaster*

Um die Konzentration bestimmter mRNA in *Drosophila melanogaster* durch eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zu analysieren, muss zunächst die RNA isoliert werden. Daraus wird mittels einer reversen Transkriptase cDNA hergestellt, welche letztendlich zur Quantifizierung genutzt werden kann.

Zur RNA-Isolation wurden pro zu untersuchender Fliegenlinie 3 Proben angesetzt, wobei für die Knockout-Linien und die Linien, die den tubP-Gal4 und mef2-Gal4 Transkriptionsfaktor trugen, je 7 ganze Fliegen verwendet wurden. Für Linien, die den elav-Gal4 Transkriptionsfaktor trugen wurden je 9 Fliegenköpfe benutzt. Diese wurden

von den Körpern getrennt, indem die Fliegen in ein Reaktionsgefäß gegeben und dieses für einige Sekunden in flüssigen Stickstoff gelegt wurde. Nach einem Druckausgleich durch kurzes Öffnen der Deckel erfolgte die Trennung durch mehrmaliges Werfen der Gefäße auf eine stabile Oberfläche.

Um aus den Fliegen bzw. Fliegenköpfen RNA zu isolieren, wurde das *RNA MiniPrepKit* von ZymoResearch genutzt und nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des *Tecan Infinite® 200 PRO*.

Aus der RNA wurde mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* von Applied Biosystems™ cDNA hergestellt, wobei je Probe ein Mastermix aus den folgenden Komponenten hergestellt wurde:

Tabelle 12: Mastermix zur Herstellung von cDNA aus RNA-Proben mittels des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* von Applied Biosystems™

Komponente	Volumen (µl)
10X Reverse Transkriptase Puffer	4
25X dNTP Mix (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	1,6
10X Zufallsprimer	4
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	2
Nukleasefreies H ₂ O	8,4

Die RNA-Proben wurden mit nukleasefreiem H₂O verdünnt, sodass sich in 20 µl 400 ng RNA befand. Zu jeder Probe wurde 20 µl des Mastermix gegeben und im *peqSTAR Thermocycler* von Peqlab by VWR® nach Herstellerangaben inkubiert. Die hergestellte cDNA hatte somit eine Konzentration von 20 µg/µl.

3.7.2 Nukleinsäure-Nachweis durch qPCR

Die qPCR dient dem Nachweis der Konzentration von Nukleinsäuren in Proben. Sie basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ermöglicht dabei zusätzlich eine Quantifizierung der Nukleinsäuren durch Fluoreszenz. Durch spezifische Primer und Sonden können bestimmte DNA-Sequenzen untersucht werden. In dieser Arbeit wurde die qPCR mit cDNA durchgeführt, die wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben aus mRNA hergestellt wurde.

Zur Analyse der cDNA mittels qPCR wurden der *Takyon™ No Rox Probe 2X MasterMix dTTP Blue* von Eurogentec für die in Kapitel 4.4.1 gezeigten und der *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)* von Sigma-Aldrich für die in den Kapiteln 4.1.1, 4.2.1 und 4.3.1 gezeigten Ergebnisse benutzt.

Für beide Methoden wurde zunächst ein Primermix aus 5 µl des *forward*-Primers, 5 µl des *reverse*-Primers und 90 µl nukleasefreiem H₂O hergestellt. 20 µl der Sonden wurden mit je 114 µl nukleasefreiem H₂O verdünnt. Zur Ladekontrolle wurden rp49-Sonde und -Primer verwendet.

Für die erstgenannte Methode wurde pro Probe ein Mastermix aus den folgenden Komponenten gemischt:

Tabelle 13: Mastermix für die qPCR mittels *Takyon™ No Rox Probe 2X MasterMix dTTP Blue* von Eurogentec

Komponente	Volumen (µl)
Takyon™ MasterMix	10
Primermix	2
Sonde	1
Nukleasefreies H ₂ O	5

In 0,2 ml PCR Gefäße wurde zu je 2 µl cDNA-Lösung 18 µl des Mastermix gegeben und nach Herstellerangaben im *StepOnePlus™ PCR System* von Applied Biosystems™ 40 Zyklen nach einer 3-minütigen Aktivierungsphase inkubiert.

Für die zweitgenannte Methode wurde pro Probe ein Mastermix aus den folgenden Komponenten hergestellt:

Tabelle 14: Mastermix für die qPCR mittels *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)* von Sigma-Aldrich

Komponente	Volumen (µl)
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	5
Primermix	2
Nukleasefreies H ₂ O	2

9 µl des Mastermix wurden mit 1 µl cDNA-Lösung gemischt und im *StepOnePlus™ PCR System* von Applied Biosystems™ nach Herstellerangaben inkubiert.

3.8 Messung des ATP-Gehaltes

Die Messung des ATP-Gehalts der *Drosophila melanogaster* erfolgte mit dem *ATP Bioluminescence Assay Kit HSII* von Roche.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Fliegen in zylindrischen Röhrchen für ca. 1 min auf Eis gelegt, sodass sie lebendig entnommen werden konnten. Nachdem die Köpfe mithilfe eines Skalpells vom Thorax getrennt wurden, wurden je nach dem zu untersuchenden Gewebe pro Probe 2 Thoraxe oder 7 Köpfe mit 100 µl *Lysis Buffer* in Reaktionsgefäßen homogenisiert. Die Proben wurden 60 s lang bei 4°C und 21.100*G zentrifugiert. Nach Überführen des Überstandes in neue Reaktionsgefäße wurden sie erneut 60 s lang bei 4°C und 21.100*G zentrifugiert. Je Probe wurden in 2 Well einer Mikrotiterplatte je 2,5 µl des Überstandes mit 187,5 µl *Dilution Buffer* vermischt. Als Standard wurden ATP-Lösungen bekannter Konzentrationen in die Mikrotiterplatte pipettiert und ebenfalls mit *Dilution Buffer* vermischt. Kurz vor der Analyse mittels *Tecan Infinite® Spark* wurde 10 µl des Enzyms Luciferase hinzugegeben, wodurch proportional zum ATP-Gehalt der Probe Lumineszenz entstand, welche quantifiziert wurde.

3.9 Statistische Auswertung

Zunächst wurde mittels des D'Agostino & Pearson-Tests und Shapiro-Wilk-Tests geprüft, ob die zu vergleichenden Werte jeweils normalverteilt sind. Bei einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$ lagen normalverteilte Werte vor und wurden durch parametrische Tests analysiert. Bei zwei Gruppen wurde ein t-Test und bei mehr als zwei Gruppen die einfaktorielle Varianzanalyse (one way ANOVA) sowie der Tukey's multiple comparisons-Test verwendet. Nicht normalverteilte Daten wurden mit den nicht-parametrischen Tests Mann-Whitney-Test bei zwei Gruppen bzw. mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's multiple comparisons-Test bei mehr als zwei Gruppen analysiert. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Der Gdap1-RNAi-Phänotyp

4.1.1 Nachweis des *Gdap1*-Knockdowns in *Gdap1*-Knockdown-Fliegen

Zur Analyse der Rolle von *Gdap1* mithilfe des Gal4/UAS-Systems wurden die in Kapitel 3.2 und Tabelle 11 beschriebenen Linien mit *Gdap1*-Knockdown verwendet, die durch Kreuzung einer Fliegenlinie mit Gal4-Konstrukt und einer Fliegenlinie mit UAS-*Gdap1*-RNAi-Konstrukt hergestellt wurden. Während Fliegen mit *Gdap1*-RNAi in Neuronen mittels *elav*-Gal4 und in Muskelzellen mittels *mef2*-Gal4 hergestellt werden konnten, verursachte der ubiquitäre Knockdown durch *tubP*-Gal4 Letalität während der Entwicklung als Puppe.

Als Kontrollgruppen dienten Fliegen mit einem Kontroll-Knockdown durch UAS-*always early*-RNAi, die im Folgenden als Kontroll-RNAi bezeichnet wird. *Always early* kodiert für ein Protein, welches im Hoden exprimiert wird und dort den Beginn der Spermatidendifferenzierung und den Übergang in die G2-Meiose steuert (White-Cooper, Leroy, MacQueen, & Fuller, 2000). Ein Knockdown führt zu Unfruchtbarkeit der männlichen Fliegen.

Abb. 10 zeigt die Validierung des Knockdowns anhand der durch qPCR gemessenen *Gdap1*-mRNA-Expression. Sowohl der Knockdown in Neuronen als auch in Muskelzellen weist eine verminderte Expression der *Gdap1*-mRNA auf.

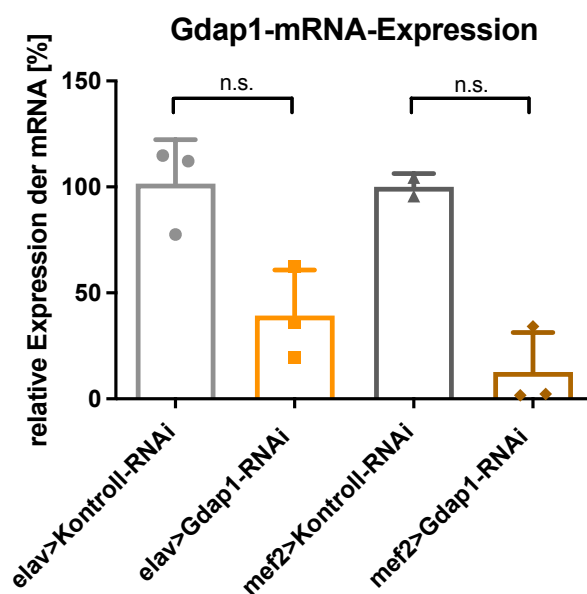


Abbildung 10: **Validierung des *Gdap1*-Knockdowns in *Gdap1*-Knockdown-Linien.** Gezeigt ist die durch qPCR analysierte prozentuale Expression der *Gdap1*-mRNA in Fliegenlinien mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen (*elav*) bzw. Muskelzellen (*mef2*) im Vergleich zu einem Kontroll-Knockdown in denselben Geweben. Die qPCR wurde mit cDNA durchgeführt, die pro Gruppe aus 3 mRNA-Proben von jeweils 9 Fliegenköpfen (*elav*) bzw. 7 ganzen Fliegen (*mef2*) hergestellt wurde. Als Ladekontrolle wurde *rp49* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte Mann-Whitney-Tests (n.s. $p > 0,05$).

4.1.2 Knockdown von *Gdap1* reduziert die Lebenserwartung

Die Messung der Lebensspanne von Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in verschiedenen Geweben kann Hinweise auf die Bedeutsamkeit des Proteins innerhalb dieser Gewebe geben. Pedrola et al. und Niemann et al. konnten bereits nachweisen, dass *Gdap1* vor allem in Neuronen und Schwann-Zellen exprimiert wird. Sie vermuten deshalb, dass das Protein für diese Zellen eine besonders große Rolle spielt (Pedrola et al., 2005; Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005).

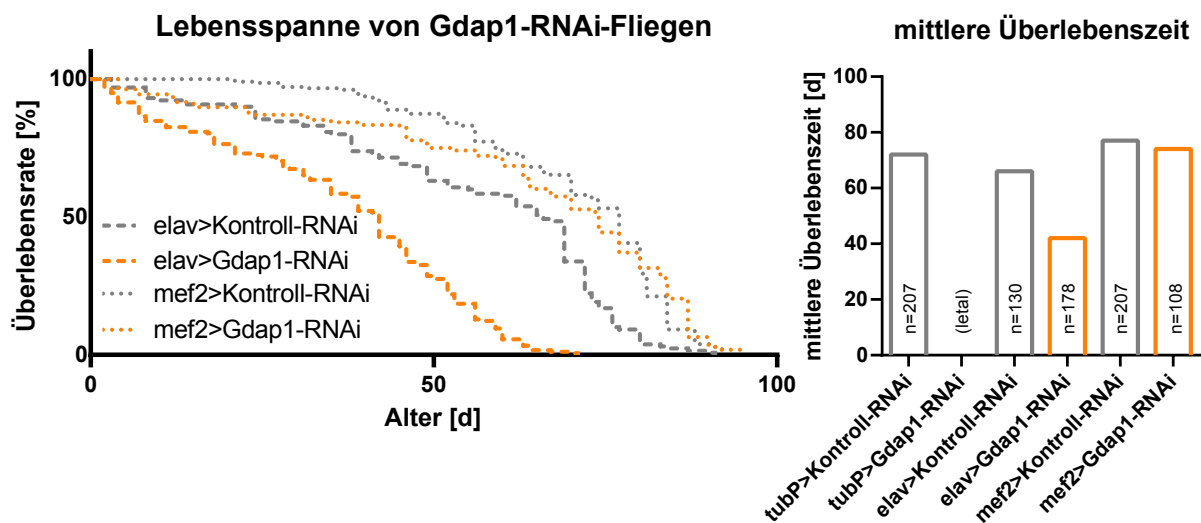


Abbildung 11: **Lebenserwartungen der *Gdap1*-Knockdown-Fliegen.** Die linke Abbildung zeigt die Lebenserwartungen von *Gdap1*-Knockdown-Fliegen während einer Haltung bei 25°C und Ernährung mit einem Nährbrei. Rechts sind die mittleren Überlebenszeiten der Fliegenlinien dargestellt.

Abb. 11 zeigt, dass ein *Gdap1*-Knockdown in Neuronen zu einer stark verminderten Lebenserwartung führt. Die mittlere Überlebenszeit ist um ca. 43% verkürzt, was die eben genannte Theorie von Pedrola et al. und Niemann et al. unterstützt (Pedrola et al., 2005; Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005).

Auch ein muskulärer Knockdown des Proteins führt zu einer verkürzten Lebenserwartung der Fliege, sodass *Gdap1* ebenfalls in diesen Zellen eine Rolle zu spielen scheint. Die mittlere Überlebenszeit ist um ca. 14% verkürzt.

Der ubiquitäre Knockdown von *Gdap1* mittels des Transkriptionsfaktors tubP-Gal4 führt zur Letalität während der Entwicklung als Puppe, während ein ubiquitärer Kontroll-Knockdown bis zu einer mittleren Überlebenszeit von 72 Tagen überlebt wird. Dies könnte darauf hinweisen, dass *Gdap1* auch für andere Zellen als Neuronen und Muskelzellen wichtige Funktionen aufweist. Im Gegensatz dazu konnten López Del Amo et al. Fliegen mit ubiquitärem *Gdap1*-Knockdown mittels Ac5C-Gal4 herstellen.

Die maximale Überlebenszeit betrug bei den Knockdown-Fliegen 70 Tage, während die Kontrollgruppe bis zu 90 Tage überlebte (López Del Amo et al., 2017). Ursächlich für die Letalität der *tubP>Gdap1*-RNAi-Fliegen in dieser Arbeit könnte somit auch ein insgesamt stärkerer *Gdap1*-Knockdown durch *tubP*-Gal4 im Vergleich zu *Ac5C*-Gal4, *elav*-Gal4 und *mef2*-Gal4 sein.

4.1.3 *Gdap1*-Knockdown beeinträchtigt die negative Geotaxis

Die negative Geotaxis ist ein charakteristisches Verhalten der *Drosophila melanogaster*, beschreibt deren Bewegung in die Gegenrichtung der Schwerkraft und kann sowohl Hinweise auf deren sensorische Funktion als auch auf die Fortbewegungsfähigkeit geben (Gargano, Martin, Bhandari, & Grotewiel, 2005). Da Patienten mit CMT4A eine zunehmende Beeinträchtigung der Muskeln erfahren (Sevilla et al., 2003), scheint die Messung der negativen Geotaxis eine gute Möglichkeit zu sein, um die Auswirkungen des *Gdap1*-Knockdowns auf das Muskelgewebe des Fliegenmodells zu analysieren.

López Del Amo et al. konnten bereits eine eingeschränkte negative Geotaxis am Fliegenmodell bei ubiquitärem *Gdap1*-Knockdown mittels des *Ac5C*-Gal4 Transkriptionsfaktors feststellen (López Del Amo et al., 2017). In dieser Arbeit sollte sie anhand von Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen und im Muskelgewebe gemessen werden, was im Folgenden verglichen wurde.

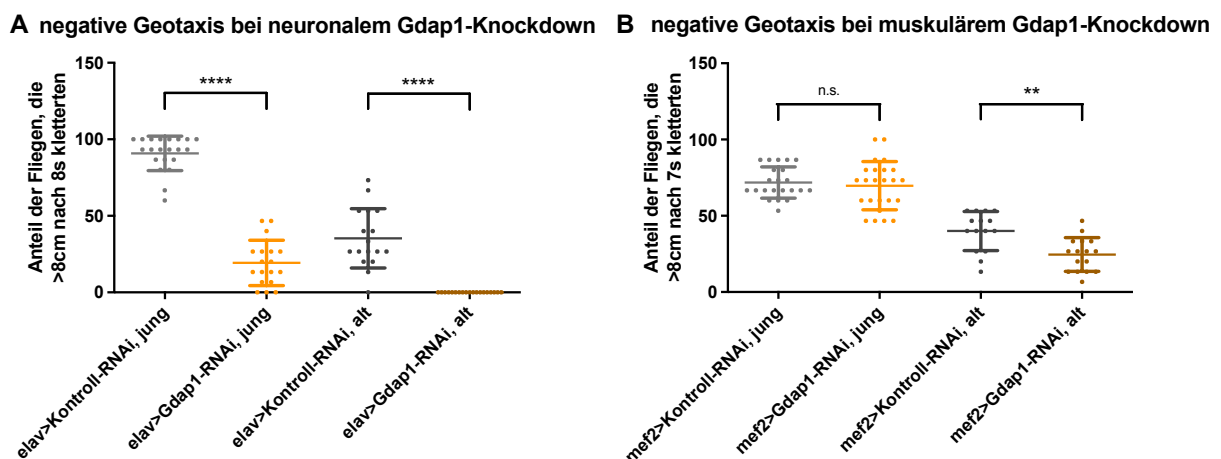


Abbildung 12: **Negative Geotaxis der *Gdap1*-Knockdown-Fliegen.** Dargestellt ist die Fähigkeit zur negativen Geotaxis von Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen (Abbildung **A**) bzw. Muskelzellen (Abbildung **B**). Es wurde der Anteil an jeweils 20 Fliegen gemessen, der nach 8 s (Abbildung **A**) bzw. 7 s (Abbildung **B**) eine 8 cm-Grenze des Röhrchens überschritt. Zunächst erfolgte die Messung mit „jungen“ Fliegen im Alter von 1 - 3 Tagen. Sie wurde mit denselben Fliegen nach 3 Wochen wiederholt, sodass die als „alt“ bezeichneten Fliegen ein Alter von 22 - 24 Tagen hatten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW ± SD). Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte Mann-Whitney-Tests (n.s. $p > 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

Abb. 12 A zeigt die Fähigkeit zur negativen Geotaxis von Fliegen aus zwei verschiedenen Altersgruppen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen. Abb. 12 B stellt diese bei Fliegen verschiedenen Alters mit *Gdap1*-Knockdown in Muskelzellen dar. Während sich bei neuronalem *Gdap1*-Knockdown ein starker Unterschied in der Fähigkeit zur negativen Geotaxis von sowohl jungen als auch alten Fliegen im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt, führt der muskuläre Knockdown nur zu einer leicht verminderten Beeinträchtigung bei alten Fliegen.

Das Ergebnis zeigt, dass vor allem der neuronale Knockdown von *Gdap1* die muskuläre Funktion der Fruchtfliege beeinträchtigt, was vermutlich durch die gestörte Innervation der Muskelzellen verursacht wird.

4.1.4 Neuronaler *Gdap1*-Knockdown reduziert die ATP-Konzentration im Thorax

Als Nächstes sollte erörtert werden, wie ein Verlust von *Gdap1* die Fruchtfliege auf zellulärer Ebene beeinflusst, sodass es zu der verkürzten Lebenszeit sowie verlangsamten negativen Geotaxis kommt.

Gdap1 interagiert vor allem mit Mitochondrien, zu deren Hauptaufgaben die ATP-Synthese zählt. López Del Amo et al. konnten bereits eine reduzierte ATP-Konzentration der *Drosophila melanogaster* bei ubiquitärem *Gdap1*-Knockdown in Muskelzellen nachweisen (López Del Amo et al., 2015). Da sich in dieser Arbeit anhand der Lebenserwartung und der negativen Geotaxis herausstellte, dass vor allem ein neuronaler *Gdap1*-Knockdown zu einem kranken Phänotyp im Fliegenmodell führt, stellte sich die Frage, ob der Knockdown in Neuronen auch Effekte auf die ATP-Konzentration hat.

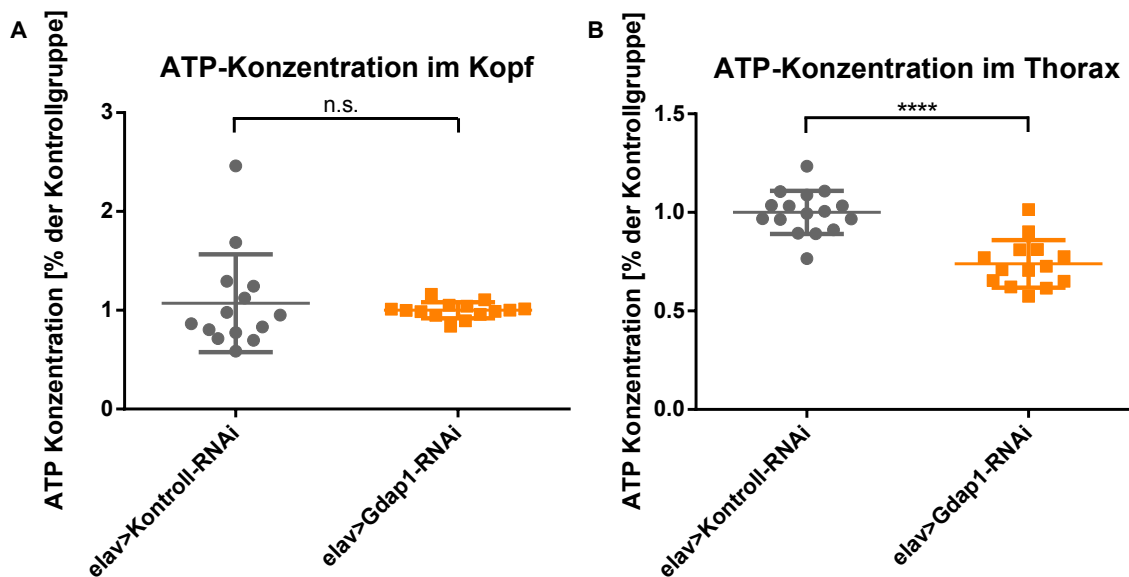


Abbildung 13: **ATP-Konzentrationen in Köpfen und Thoraces von Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown.** Die Abbildungen zeigen den prozentualen ATP-Gehalt von Köpfen bzw. Thoraces von *elav>Gdap1-RNAi*-Fliegen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser wurde mittels des ATP Bioluminescence Assay Kits HSII von Roche und des *Tecan Infinite® Spark* gemessen, wobei pro Gruppe mehrere Proben aus jeweils 2 Thoraces bzw. 7 Köpfen gemessen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten Mann-Whitney-Test (Abbildung A) bzw. einem ungepaarten t-Test (Abbildung B) (n.s. $p > 0,05$; **** $p \leq 0,0001$).

In Abb. 13 ist zu erkennen, dass die ATP-Konzentration in Thoraces der *Gdap1*-Knockdown-Fliegen im Vergleich zur Kontrolllinie reduziert ist. Der verminderte ATP-Gehalt der Thoraxe kann dabei sowohl durch die Beeinträchtigung der Mitochondrien in Neuronen und die dadurch verminderte ATP-Konzentration in peripheren Neuronen wie z.B. α -Motoneuronen als auch durch die verminderte Innervation des Muskelgewebes infolge zugrunde gehender Neuronen und der damit einhergehenden Muskelzellbeeinträchtigung bedingt sein. In Köpfen lässt sich im Gegensatz dazu kein Unterschied in der ATP-Konzentration erkennen, was dadurch begründet sein könnte, dass eine verminderte *Gdap1*-Expression vor allem die ATP-Produktion im peripheren Nervensystem und weniger im Gehirn beeinflusst.

4.1.5 Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown reagieren sensibler auf Rotenon und Tunicamycin

Die hemmende Wirkung von Rotenon auf den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und die damit einhergehende verminderte ATP-Produktion sowie erhöhte Entstehung von Superoxidradikalen kann genutzt werden, um die Widerstandsfähigkeit der Zellen auf freie Radikale und ATP-Verlust zu testen.

Tunicamycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das zu einer Fehlfaltung von Proteinen und damit zum ER-Stress führt, sodass dessen Gabe zur Einschätzung der Widerstandsfähigkeit des ER dienen kann.

In bisherigen Forschungsergebnissen wurde GDAP1 bereits mit dem Schutz vor oxidativer Glutamattoxizität und ROS in Verbindung gebracht (Noack et al., 2012). Im Folgenden wurde dessen Schutz vor mitochondrialem und ER-Stress analysiert, indem die Lebensspanne während täglicher Gabe der Toxine Rotenon und Tunicamycin mit der bei Gabe einer 5%-igen Saccharose-Lösung verglichen wurde.

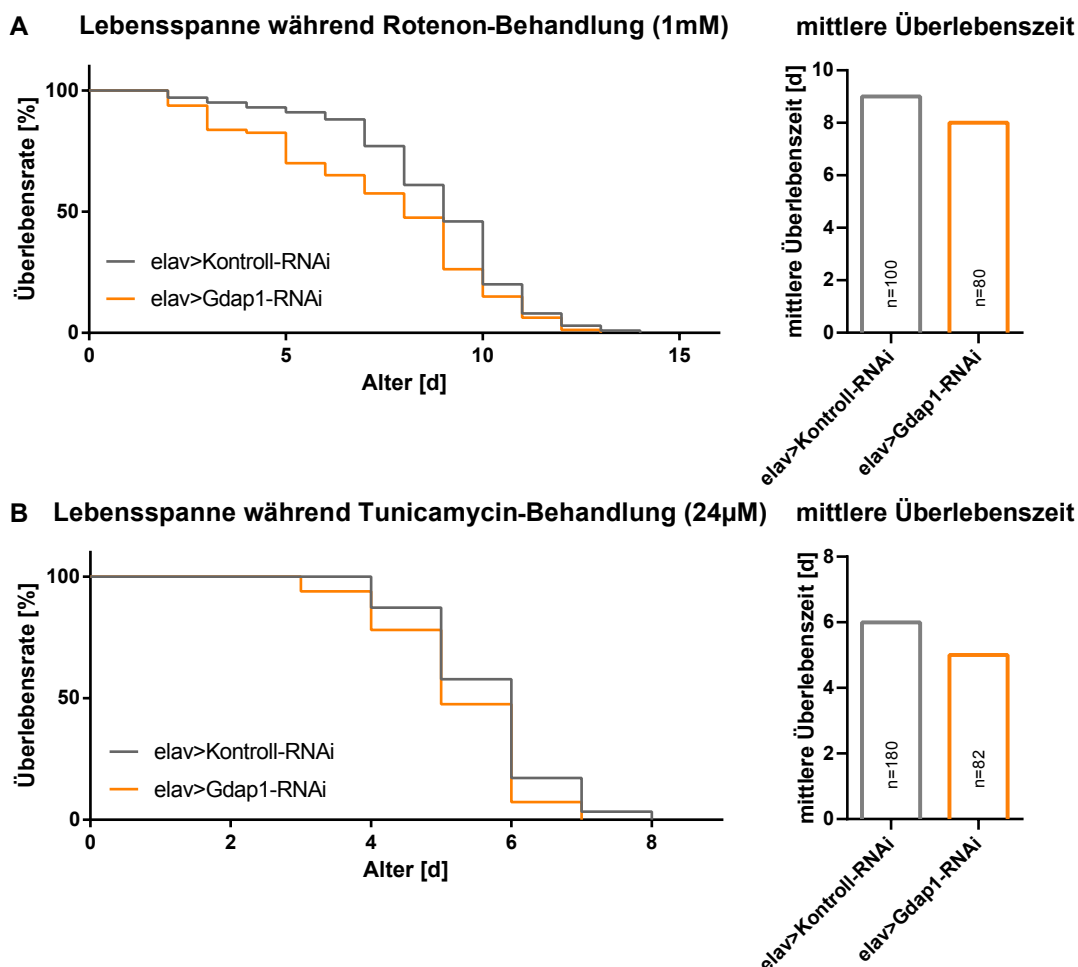


Abbildung 14: **Lebenserwartungen der Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown während täglicher Gabe einer Saccharose-Toxin-Lösung.** Die Abbildungen zeigen die Lebenserwartungen sowie mittleren Überlebenszeiten von elav>Gdap1-RNAi-Fliegen und der Kontrollgruppe während täglicher Toxin-Gabe. Während die Haltung der Fliegen bei 25°C erfolgte, wurde täglich eine Nährlösung mit 5% Saccharose und 1 mM Rotenon (Abbildung A) bzw. 24 µM Tunicamycin (Abbildung B) verabreicht.

Abb. 14 stellt dar, dass die Lebensspanne von Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen sowohl während täglicher Gabe von Rotenon als auch Tunicamycin im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt ist.

Während Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown bei alleiniger Fütterung mit 5%-iger Saccharose-Lösung eine mittlere Überlebenszeit von 47 Tagen haben (Daten zur Saccharose-Behandlung sind in Abb. 15 dargestellt), führt die Beimischung von Rotenon zu einer Reduktion dieser um ca. 82%. Die Kontrollfliegen, die bei täglicher Gabe von 5%-iger Saccharose-Lösung eine mittlere Lebenszeit von 39 Tagen haben, weisen durch Beimischung von Rotenon eine Reduktion dieser um ca. 77% auf.

Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown reagieren auf die Behandlung mit Tunicamycin mit einer um ca. 89% und die Kontrollgruppe mit einer um ca. 85% verkürzten Lebensspanne.

Dies zeigt, dass Fliegen mit einem neuronalen *Gdap1*-Knockdown im Vergleich zu Kontrollfliegen sowohl sensibler auf Rotenon als auch Tunicamycin reagieren. Das passt zu der Hypothese, dass GDAP1 vor oxidativer Glutamattoxizität und ROS schützen kann (Noack et al., 2012). Es könnte ebenfalls eine schützende Wirkung gegenüber ER-Stress haben.

4.1.6 J147 und CMS121 verlängern die Lebenserwartungen von *Gdap1*-Knockdown-Fliegen nicht

J147 und CMS121 greifen in den Energiestoffwechsel der Zelle ein, indem sie die Acetyl-CoA-Carboxylase 1 hemmen und somit die Konzentration von Acetyl-CoA erhöhen (Currais et al., 2015).

Beide Wirkstoffe zeigten bereits positive Effekte bei der Therapie des M. Alzheimer am Tiermodell (Currais et al., 2015; Ates, Goldberg, Currais, & Maher, 2020). Da CMT4A ebenfalls eine neurodegenerative Erkrankung ist, sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen auf die Lebensspanne von Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown durch J147 und CMS121 beobachtet werden.

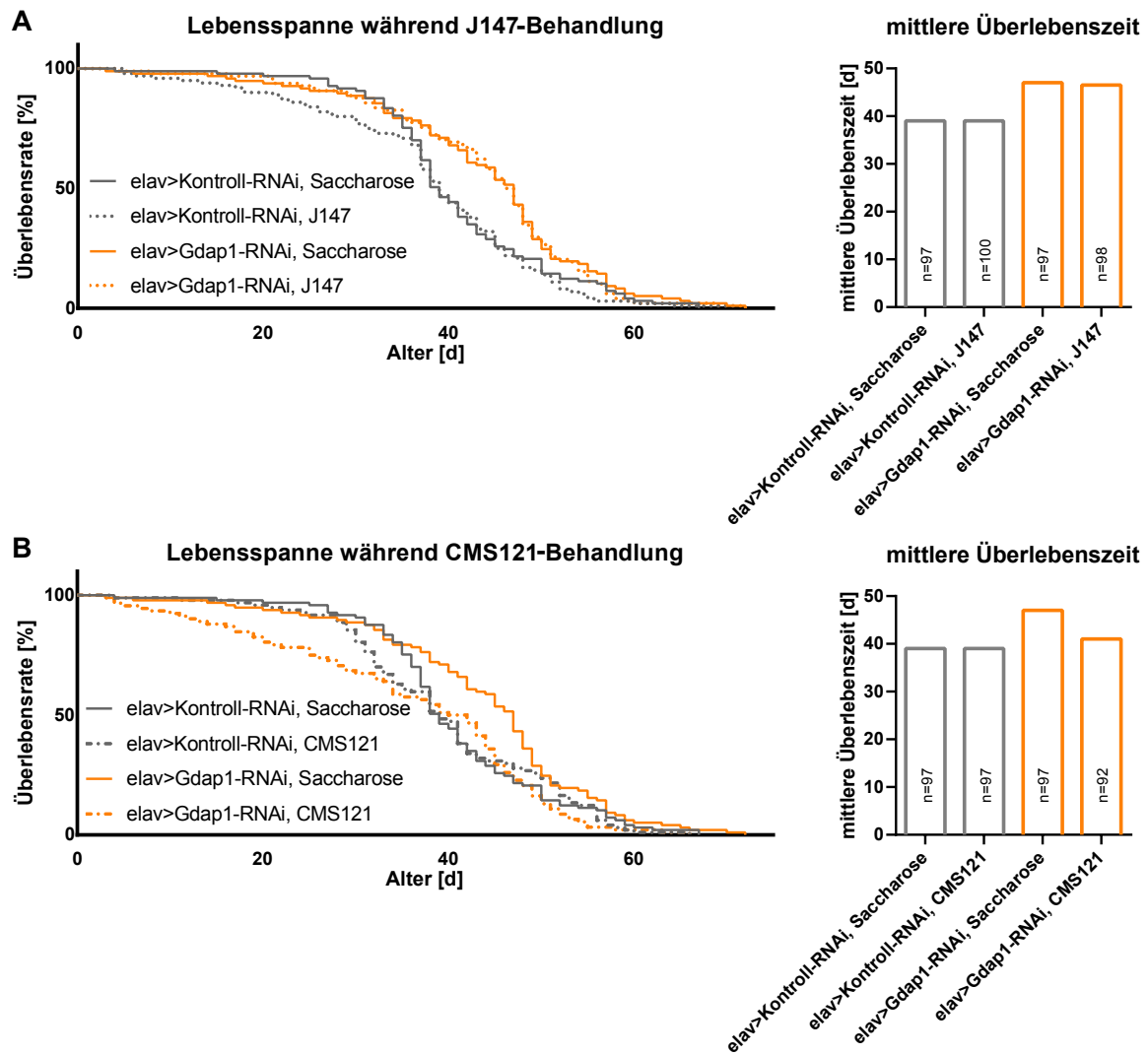


Abbildung 15: **Einfluss von J147 und CMS121 auf die Lebenserwartungen der Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown.** Dargestellt sind die Lebenserwartungen und mittleren Überlebenszeiten von elav>*Gdap1*-RNAi-Fliegen und der Kontrollgruppe während der Behandlung mit dem Wirkstoff J147 bzw. CMS121. Es wurde täglich 0,1 ml einer 5%-igen Saccharose-Lösung gegeben, die 2 μ M des Wirkstoffs J147 (Abbildung **A**) bzw. CMS121 (Abbildung **B**) enthielt. Als Kontrolle wurde täglich eine reine 5%-ige Saccharose-Lösung verabreicht. Die Haltung der Fliegen erfolgte bei Raumtemperatur.

Abb. 15 zeigt die Veränderungen der Lebenserwartungen von Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown und einer Kontrolllinie bei täglicher Gabe der Stoffe J147 und CMS121. Während Goldberg et al. nachweisen konnten, dass J147 an Wildtyp-Fliegen eine lebensverlängernde Wirkung besitzt (Goldberg et al., 2018) und Kepchia et al. die gleiche Wirkung durch CMS121 feststellten (Kepchia et al., 2021), erweist sich hier kein Effekt auf die Lebenserwartung der Kontrolllinie elav>Kontroll-RNAi.

Auch die Lebenserwartung von *Gdap1*-Knockdown-Fliegen verändert sich durch J147 nicht und die Gabe von CMS121 führt sogar zu einer Verkürzung dieser.

Auffällig ist, dass in Abb. 15 A und B Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown eine insgesamt längere Lebensspanne aufweisen als die Kontrollgruppe, während sich dies bei Gabe

eines Nährbreis (Abb. 11) umgekehrt verhält. Dies wurde im Folgenden weiter analysiert.

4.1.7 Saccharose verlängert die Lebenserwartung von *Gdap1*-Knockdown-Fliegen

In Kapitel 4.1.2 stellte sich heraus, dass Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen eine kürzere Lebensspanne als Kontrollfliegen haben, was wahrscheinlich auf den Funktionsverlust des Proteins zurückzuführen ist. Interessanterweise ist in Abb. 15 zu erkennen, dass die gleichen Knockdown-Fliegen bei täglicher Gabe einer 5%-igen Saccharose-Lösung eine verlängerte Lebensspanne im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen.

Deshalb stellte sich die Frage, ob die Gabe verschiedenen Futters einen unterschiedlichen Effekt auf die Lebensspannen von *Gdap1*-Knockdown-Fliegen und Kontrollfliegen haben könnte.

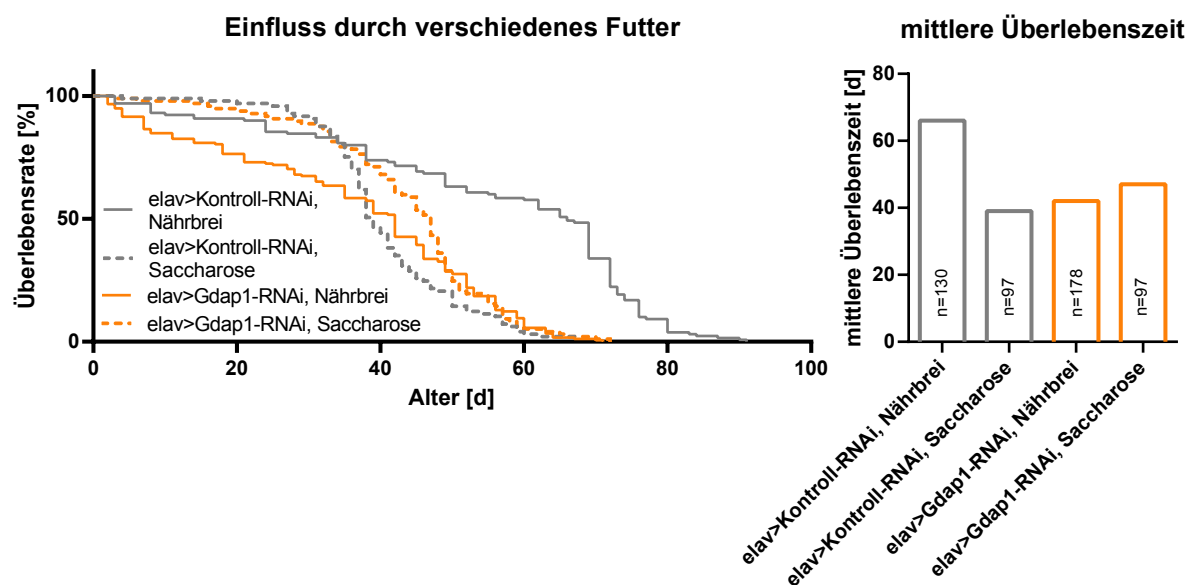


Abbildung 16: **Einfluss verschiedenen Futters auf die Lebenserwartung der Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown.** Dargestellt sind die Lebensspannen und mittleren Überlebenszeiten von *Gdap1*-Knockdown-Fliegen und Kontrollfliegen bei dauerhafter Haltung in Röhrchen mit beinhaltenem Nährbrei im Vergleich zu einer Haltung in Röhrchen mit Filterpapier und täglicher Gabe einer 5%-igen Saccharose-Lösung. Die Haltung der Fliegen im Nährmedium erfolgte bei 25°C und die der mit Saccharose-Lösung gefütterten Fliegen bei Raumtemperatur.

In Abb. 16 ist die Lebenserwartung von *Gdap1*-Knockdown-Fliegen und Kontrollfliegen bei Gabe verschiedenen Futters dargestellt. Bei den Kontrollfliegen lässt sich eine deutliche Verkürzung der Lebensspanne und Reduktion der mittleren Überlebenszeit um ca. 41% während täglicher Gabe einer 5%-igen Saccharose-Lösung im Vergleich

zu der Gabe eines auf *Drosophila melanogaster* angepassten Nährmediums erkennen. Bei *Gdap1*-Knockdown-Fliegen stellt sich ein gegenteiliger Effekt dar. Im Vergleich zur Gabe des Nährmediums haben die Knockdown-Fliegen eine um ca. 12% erhöhte mittlere Lebenszeit, wenn ihnen 5%-ige Saccharose-Lösung gegeben wird.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ein Funktionsverlust von *Gdap1* zu Veränderungen im zellulären Energiestoffwechsel führt. Auch López Del Amo et al. und Wolf et al. nehmen an, dass das Protein die Energiegewinnung beeinflusst und dessen Funktionsverlust dadurch die Entstehung von CMT4A fördert (López Del Amo et al., 2017; Wolf et al., 2021). Der veränderte Energiestoffwechsel könnte dazu führen, dass Saccharose besser von den Fruchtfliegen verwertet werden kann.

4.2 Der BNIP3-RNAi-Phänotyp

4.2.1 Nachweis des *BNIP3*-Knockdowns in *BNIP3*-Knockdown-Fliegen

Als Nächstes sollten die Funktionen von BNIP3 am Modell der *Drosophila melanogaster* durch dessen Knockdown in verschiedenen Geweben erörtert werden. Dazu wurden die in Kapitel 3.2 und Tabelle 11 beschriebenen Linien mit *BNIP3*-Knockdown verwendet. Sie wurden durch Kreuzung einer Fliegenlinie mit Gal4-Konstrukt und einer Fliegenlinie mit UAS-*BNIP3*-RNAi-Konstrukt hergestellt. Als Kontrollgruppen dienten Linien mit einem Kontroll-Knockdown durch UAS-always early-RNAi.

Zunächst sollte der Knockdown des Proteins durch die UAS-*BNIP3*-RNAi mittels qPCR validiert werden.

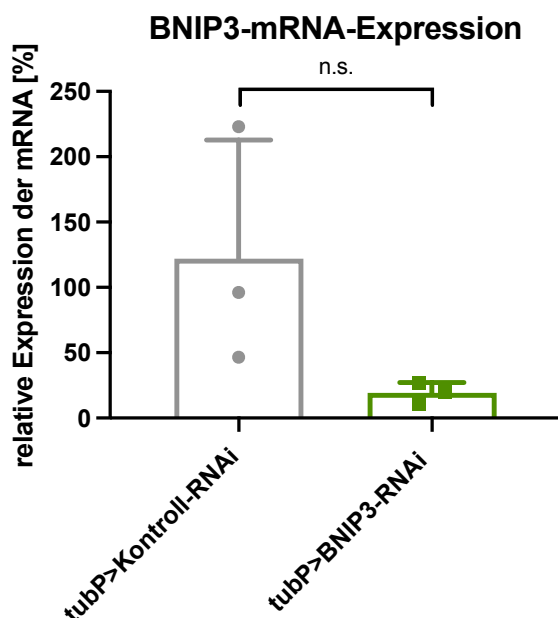


Abbildung 17: **Validierung des *BNIP3*-Knockdowns in *tubP>BNIP3*-RNAi-Fliegen.** Dargestellt ist die durch qPCR analysierte prozentuale Expression der *BNIP3*-mRNA in Fliegen mit ubiquitärem *BNIP3*-Knockdown im Vergleich zu Fliegen mit einem Kontroll-Knockdown durch eine Kontroll-RNAi. Die qPCR wurde mit cDNA durchgeführt, die pro Gruppe aus 3 mRNA-Proben von jeweils 7 Fliegen hergestellt wurde. Als Ladekontrolle wurde rp49 verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD, n = 3 unabhängige). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten Mann-Whitney-Test (n.s. p > 0,05).

Abb. 17 zeigt die verminderte mRNA-Expression des *BNIP3* in *tubP>BNIP3*-RNAi-Fliegen verglichen mit der Kontrollgruppe, was die Funktionsfähigkeit des UAS-RNAi-Konstrukts bestätigt. Im Folgenden wurde die *BNIP3*-RNAi genutzt, um die Wirkungen des neuronalen, muskulären und ubiquitären *BNIP3*-Knockdowns auf *Drosophila melanogaster* zu beurteilen.

4.2.2 Knockdown von *BNIP3* reduziert die Lebenserwartung

Zur Analyse der Bedeutung des *BNIP3* für verschiedene Gewebe der *Drosophila melanogaster* wurden die Lebensspannen von Fliegen mit *BNIP3*-Knockdown gemessen, welche in folgender Abb. 18 dargestellt sind.

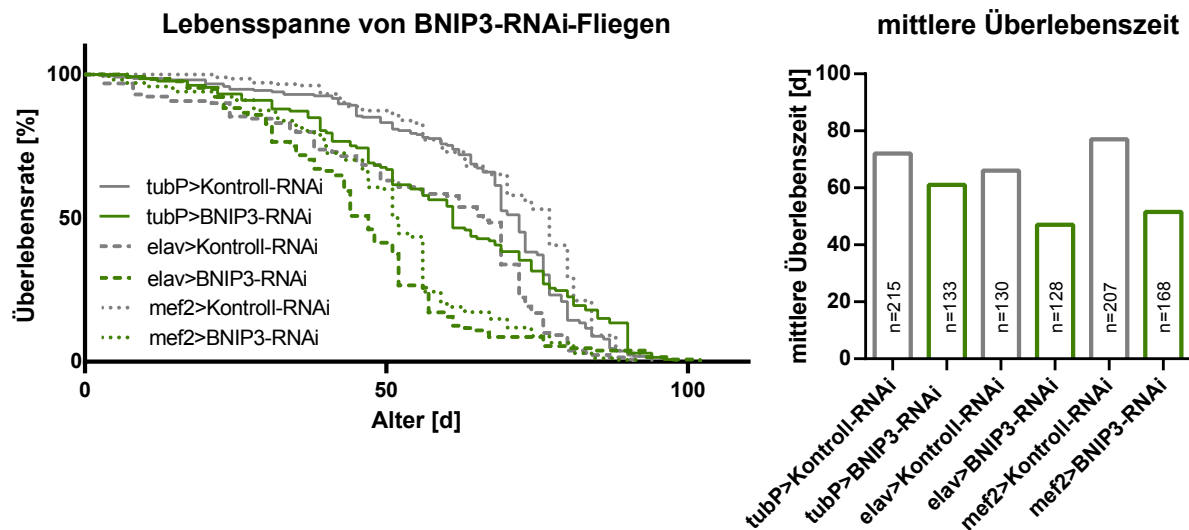


Abbildung 18: **Lebenserwartungen der *BNIP3*-Knockdown-Fliegen.** Links sind die Lebenserwartungen von Fliegen mit *BNIP3*-Knockdown in verschiedenen Geweben im Vergleich zu den Kontrolllinien dargestellt. Auf der rechten Abbildung sind die mittleren Überlebenszeiten der Fliegenlinien abgebildet. Die Haltung erfolgte bei 25°C und die Ernährung mit einem Nährbrei.

Der ubiquitäre Knockdown in tubP>BNIP3-RNAi-Fliegen resultiert in einer leicht verkürzten Lebensspanne verglichen zur Kontrollgruppe, wobei die mittlere Überlebenszeit um ca. 15% reduziert ist. Durch muskulären und neuronalen Knockdown wird die Lebenserwartung stärker verkürzt. Die mittlere Überlebenszeit ist bei Fliegen mit neuronalem Knockdown durch elav-Gal4 verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe um ca. 29% verkürzt und die der Fliegen mit muskulärem Knockdown durch mef2-Gal4 um ca. 33%. Dies gibt Hinweise darauf, dass das Protein im Vergleich zu anderen Geweben besonders in Neuronen und Muskelzellen eine wichtige Rolle spielt, was im Folgenden weiter analysiert wurde.

4.2.3 *BNIP3*-Knockdown beeinträchtigt die negative Geotaxis

Abb. 18 ließ anhand der Lebensspanne von *BNIP3*-Knockdown-Fliegen erkennen, dass *BNIP3* sowohl in Muskelzellen als auch in Neuronen eine wichtige Rolle für das Überleben spielt. Anhand der Messung der negativen Geotaxis sollte als Nächstes die

muskuläre Funktion der Fliegenmodelle mit *BNIP3*-Knockdown in Muskelzellen und Neuronen untersucht werden.

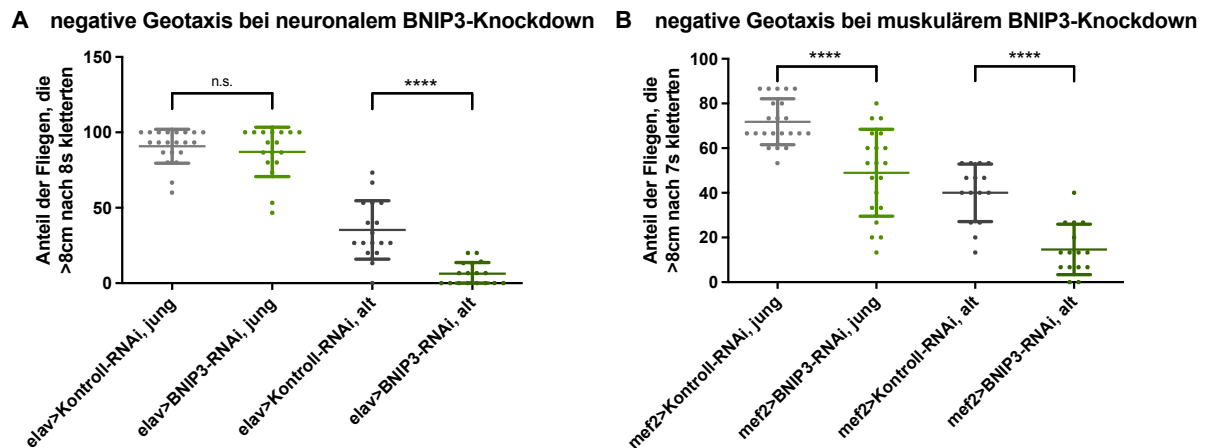


Abbildung 19: **Negative Geotaxis der *BNIP3*-Knockdown-Fliegen.** Dargestellt ist die Fähigkeit zur negativen Geotaxis von Fliegen mit *BNIP3*-Knockdown in Neuronen (Abbildung **A**) und Muskelzellen (Abbildung **B**). Es wurde der Anteil an jeweils 20 Fliegen gemessen, der nach 8 s (Abbildung **A**) bzw. 7 s (Abbildung **B**) eine 8 cm-Marke des Röhrchens durch Klettern überschritt. Zunächst erfolgte die Messung mit „jungen“ Fliegen im Alter von 1 - 3 Tagen. Diese wurde mit denselben Fliegen nach 3 Wochen wiederholt, sodass die als „alt“ bezeichneten Fliegen ein Alter von 22 - 24 Tagen hatten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparisons-Test (n.s. $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$).

Abb. 19 A zeigt, dass der Knockdown von *BNIP3* in Neuronen bei jungen Fliegen keine signifikante Auswirkung auf die Fähigkeit zur negativen Geotaxis hat und erst im höheren Alter zu einer Verlangsamung führt. In Abb. 19 B ist erkennbar, dass Fliegen mit *BNIP3*-Knockdown in Muskelzellen bei der negativen Geotaxis bereits im jungen Alter beeinträchtigt sind. Die Beeinträchtigung der Fliegen mit muskulärem Knockdown erweist sich insgesamt stärker als bei neuronalem Knockdown.

Eine herabgesetzte Konzentration von *BNIP3* in Neuronen oder Muskelzellen bewirkt also sowohl eine verkürzte Lebensdauer als auch eine beeinträchtigte Muskelfunktion der Fruchtfliege. Dies zeigt, dass das Protein für beide Gewebe wichtige Funktionen besitzt. *BNIP3* scheint in den Muskelzellen für deren Funktion eine besonders hohe Relevanz zu haben, da bereits junge, 1-3 Tage alte Fliegen mit *BNIP3*-Knockdown in Muskelzellen bei der negativen Geotaxis verlangsamt sind.

4.2.4 *BNIP3*-Knockdown-Fliegen sind gegenüber Rotenon resistent und reagieren sensibler auf Tunicamycin

Rotenon und Tunicamycin sollten im nächsten Schritt dazu genutzt werden, um die Widerstandsfähigkeit der Fliegen mit neuronalem *BNIP3*-Knockdown auf

mitochondrialen bzw. ER-Stress zu testen, indem deren Lebensspanne gemessen wurde.

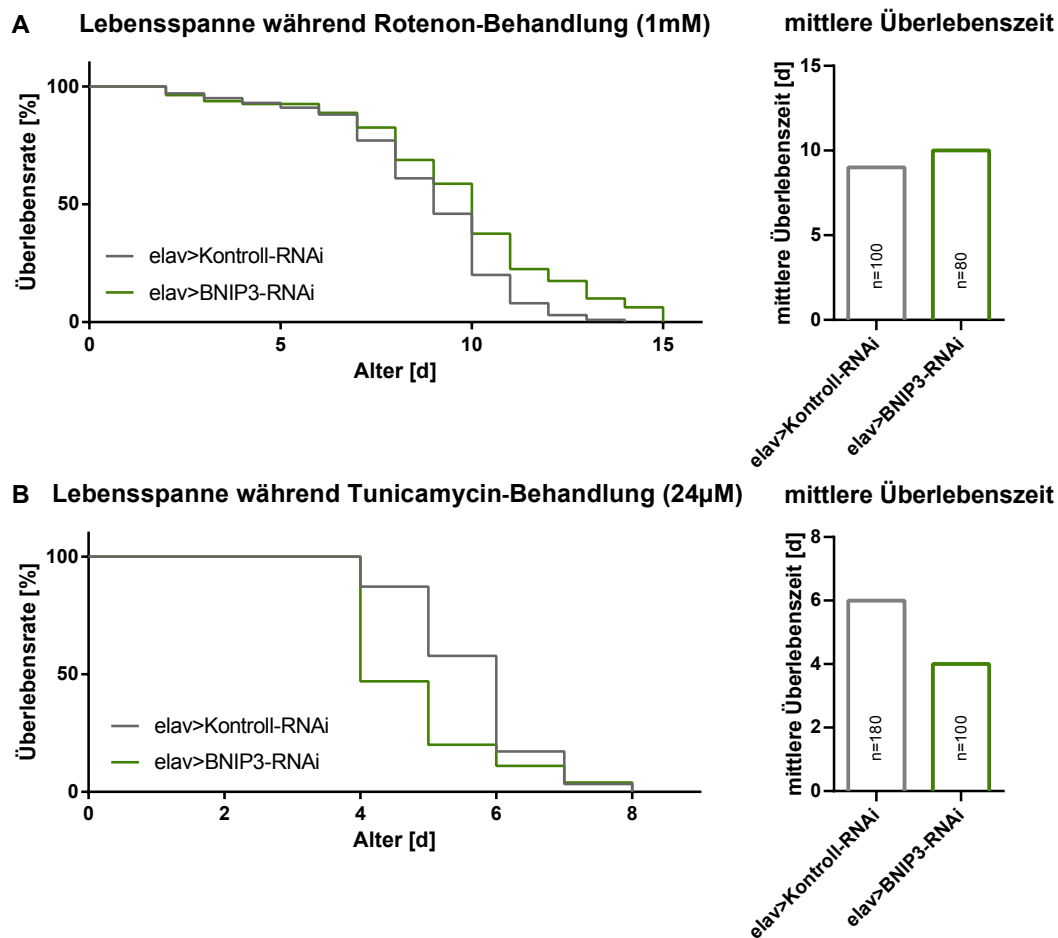


Abbildung 20: **Lebenserwartungen der Fliegen mit neuronalem *BNIP3*-Knockdown während täglicher Gabe einer Saccharose-Toxin-Lösung.** Die Abbildungen zeigen die Lebenserwartungen sowie mittleren Überlebenszeiten von elav>BNIP3-RNAi-Fliegen und Kontrollgruppe bei täglicher Toxin-Gabe. Während die Haltung der Fliegen bei 25°C erfolgte, wurde täglich eine Nährlösung mit 5% Saccharose und 1 mM Rotenon (Abbildung A) bzw. 24 µM Tunicamycin (Abbildung B) verabreicht.

Abb. 20 A zeigt die Lebenserwartung von Fliegen mit *BNIP3*-Knockdown in Neuronen bei täglicher Gabe von Rotenon, wobei diese gegenüber der Kontrollgruppe leicht verlängert ist. Im Gegensatz dazu stellte sich in Abb. 18 die Lebenserwartung dieser bei normaler Ernährung verglichen mit der Kontrollgruppe als stark verkürzt heraus. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass *BNIP3* die Anfälligkeit gegenüber mitochondrialem Stress und ROS fördert, was bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

Die Lebenserwartung der Fliegen mit neuronalem *BNIP3*-Knockdown bei täglicher Gabe von Tunicamycin, die in Abb. 20 B dargestellt ist, ist im Vergleich zur Kontrollfliege verkürzt. Eine verminderte Konzentration von *BNIP3* geht also mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber ER-Stress einher.

4.3 Zusammenhang zwischen Gdap1 und BNIP3

4.3.1 Die BNIP3-Konzentration ist in *Gdap1*-Knockdown-Fliegen nicht signifikant erhöht

Mitglieder unserer Arbeitsgruppe fanden bereits heraus, dass sich bei einem Knockdown des GDAP1 am Zellmodell die Konzentration von BNIP3 erhöht (unpublizierte Daten). In dieser Arbeit wird analysiert, ob der gleiche Effekt am Modell der *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden kann.

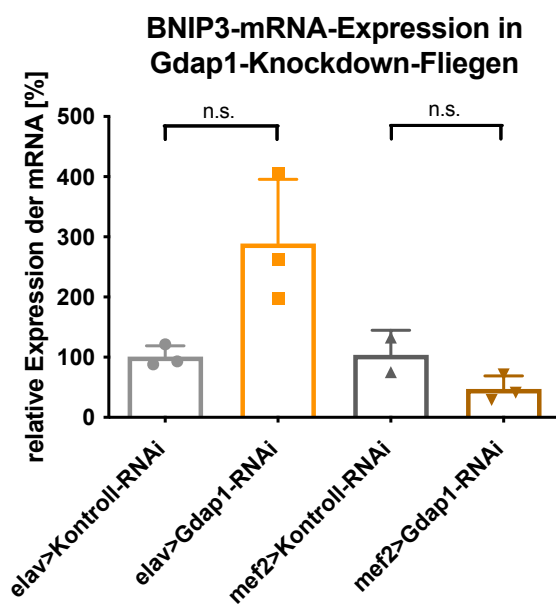


Abbildung 21: **Expression der *BNIP3*-mRNA in *Gdap1*-Knockdown-Fliegen.** Dargestellt ist die durch qPCR analysierte prozentuale Expression der *BNIP3*-mRNA in Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen (*elav*) und Muskelzellen (*mef2*) im Vergleich zu einem Kontroll-Knockdown durch eine Kontroll-RNAi. Die qPCR wurde mit cDNA durchgeführt, die pro Gruppe aus 3 mRNA-Proben von jeweils 9 Fliegenköpfen (*elav*) bzw. 7 ganzen Fliegen (*mef2*) hergestellt wurde. Als Ladekontrolle wurde *rp49* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte mit ungepaarten Mann-Whitney-Tests (n.s. $p > 0,05$).

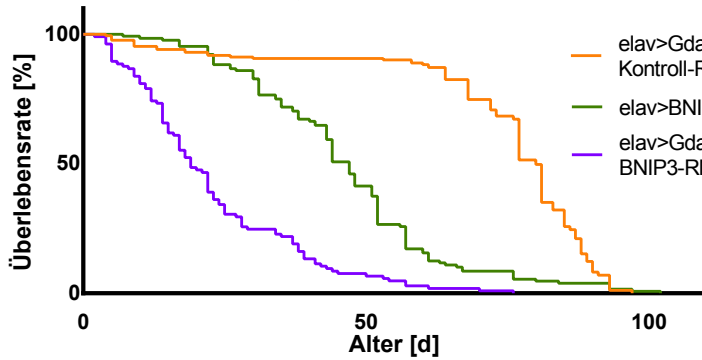
Abb. 21 zeigt die Expression der *BNIP3*-mRNA in Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen bzw. Muskelzellen. Fliegen mit einem neuronalen Knockdown weisen eine erhöhte, jedoch nicht signifikante, mRNA-Expression des *BNIP3* auf als die zugehörige Kontrollgruppe, was mit dem *GDAP1*-Knockdown-Zellmodell unserer Arbeitsgruppe korrespondiert.

Im Gegensatz dazu haben Fliegen mit muskulärem *Gdap1*-Knockdown keinen signifikanten Unterschied der mRNA-Expression verglichen mit den Kontrollfliegen.

4.3.2 Die Lebenserwartung von Fliegen mit *Gdap1*- und *BNIP3*-Knockdown ist stark verkürzt

Um zu testen, inwieweit die Konzentration von BNIP3 die Zellen mit *Gdap1*-Funktionsverlust beeinflusst, wurde die Lebensspanne von Fliegen mit einem Knockdown von *Gdap1* und *BNIP3* gemessen. Als Vergleich diente eine Linie mit *Gdap1*- und einem Kontroll-Knockdown sowie eine *BNIP3*-Knockdown-Linie.

Lebensspanne von Fliegen mit Gdap1- und BNIP3-Knockdown



mittlere Überlebenszeit

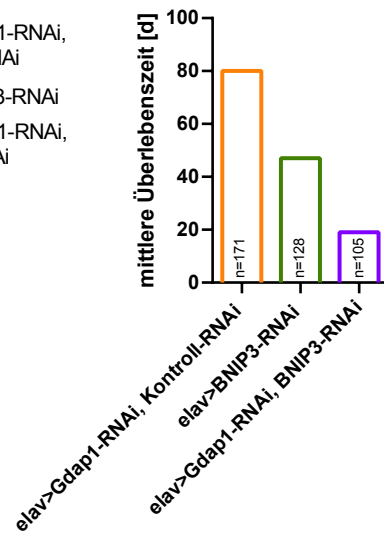


Abbildung 22: **Lebenserwartung der Fliegen mit *Gdap1*- und *BNIP3*-Knockdown.** In der Abbildung sind die Lebenserwartungen von elav>*Gdap1*-RNAi, Kontroll-RNAi-Fliegen im Vergleich zu den Kontrollgruppen elav>*BNIP3*-RNAi und elav>*Gdap1*-RNAi, *BNIP3*-RNAi dargestellt. Die Haltung erfolgte bei 25°C und die Ernährung mit einem Nährbrei.

In Abb. 22 sind die Lebensspannen und mittleren Überlebenszeiten der drei Linien dargestellt, wobei eine stark verkürzte Lebenserwartung der Fliegen mit *Gdap1*- und *BNIP3*-Knockdown verglichen zu beiden Kontrollgruppen erkennbar ist. Das Ergebnis ist mit einem synergistischen, lebenserwartungsverkürzenden Effekt durch Verluste von *Gdap1* und *BNIP3* vereinbar. Somit scheint *BNIP3* eine wichtige Funktion in den Zellen mit *Gdap1*-Verlust aufzuweisen.

4.4 Phänotyp der *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien

4.4.1 Nachweis des *Gdap1*-Knockouts und der *GDAP1*-Expression in *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien

Als zweite Methode zur Analyse der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit am Fliegenmodell wurden *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien genutzt, welche heterozygot den Knockout des *Gdap1* und an dessen Stelle das mutierte, humane *GDAP1* tragen. Als Kontrollgruppen dienten zwei Linien mit einem reinen Knockout des *Gdap1*, eine Linie mit dem humanen Wildtyp-*GDAP1* anstelle des *Gdap1* sowie die beiden Wildtypenlinien „w-“ (Kapitel 4.4.1) bzw. „Oregon R“ (Kapitel 4.4.3 – 4.4.9).

Zunächst sollte der heterozygote *Gdap1*-Knockout aller Linien validiert und die Expression des humanen *GDAP1* bei entsprechenden Linien bestätigt werden.

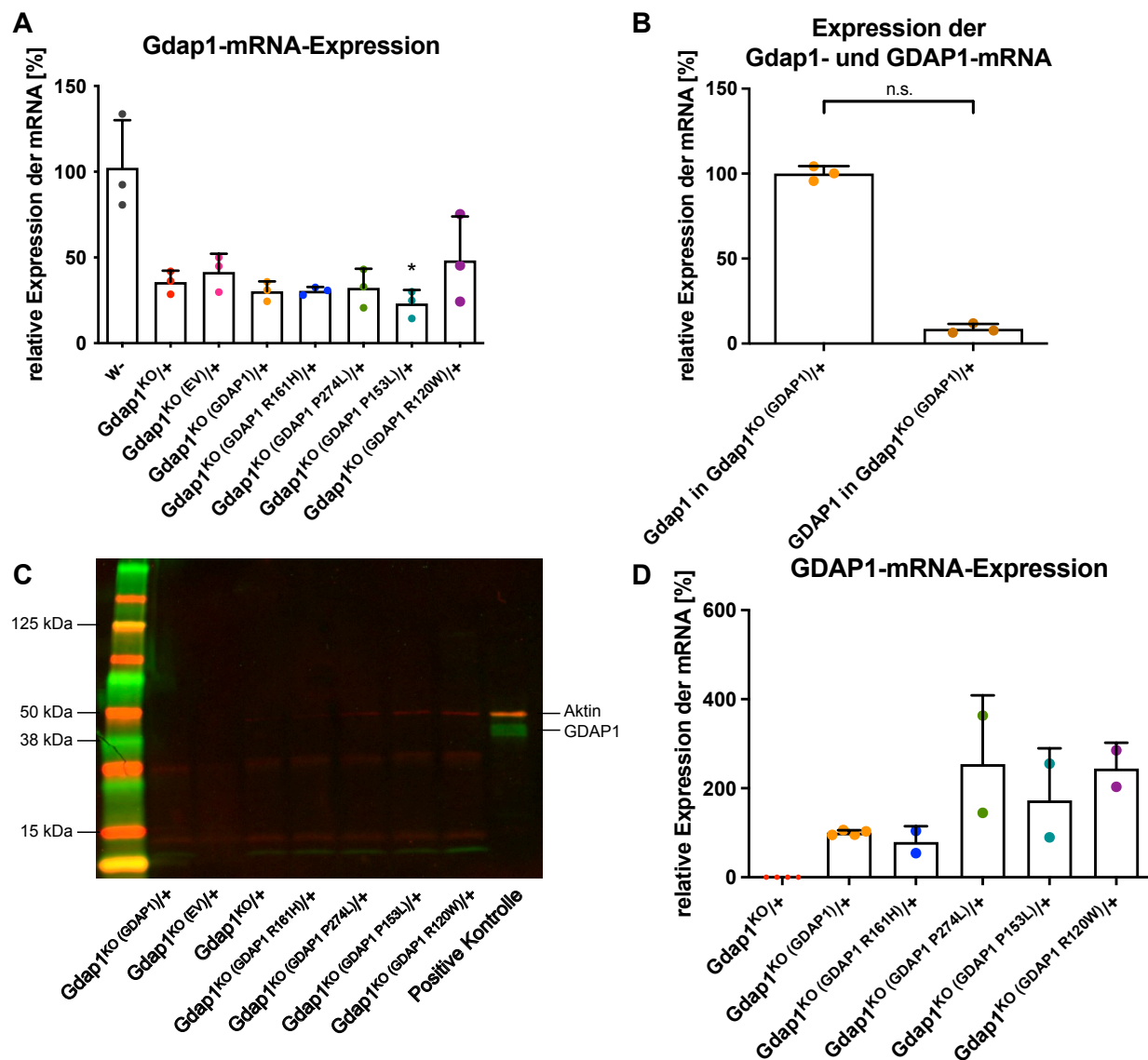


Abbildung 23: Validierung des *Gdap1*-Knockouts und der *GDAP1*-mRNA-Expression in *Gdap1*-Knockout-Linien. Abbildung A zeigt die prozentuale Expression von *Gdap1*-mRNA in den *Gdap1*-Knockout-Linien. Als Kontrollgruppe diente die Wildtypfliege w-. Die Messung erfolgte durch qPCR.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparisons-Test (* $p \leq 0,05$). Abbildung **B** zeigt einen Vergleich der mRNA-Expression von *Gdap1* und *GDAP1* in der Linie *Gdap1*^{KO (GDAP1)/+}, welche ebenfalls durch qPCR analysiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten Mann-Whitney-Test (n.s. $p > 0,05$). Abbildung **C** zeigt einen Western Blot nach erfolgter SDS-Page mit Proteinproben der Fliegenlinien. Rechts ist eine positive Kontrolle mittels einer Zellprobe mit *GDAP1*-Expression sichtbar, welche freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt wurde. Während das Kontrollprotein Aktin (ca. 42 kDa) in Rot dargestellt ist, ist *GDAP1* (ca. 30 kDa) in der Farbe Grün sichtbar. In Abbildung **D** ist die relative Expression der *GDAP1*-mRNA im Verhältnis zu der Knockout-Linie *Gdap1*^{KO (GDAP1)/+} dargestellt, dessen Analyse durch qPCR erfolgte. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die qPCRs der Abbildungen **A**, **B** und **D** wurden mit cDNA durchgeführt, die pro Gruppe aus mehreren mRNA-Proben von je 7 Fliegen hergestellt wurde. Als Ladekontrolle wurde jeweils rp49 verwendet.

Abb. 23 A validiert den *Gdap1*-Knockout aller Knockout-Linien. Die um mindestens 50% reduzierte mRNA-Expression aller Knockout-Linien im Vergleich zur Wildtypfliege weist nach, dass alle Fliegen den homozygoten Knockout in ihrem Genom tragen.

In Abb. 23 B ist ein prozentualer Vergleich der mRNA-Expression von *Gdap1* und *GDAP1* in der Linie *Gdap1*^{KO (GDAP1)/+} dargestellt. Da Fliegen dieser Linie heterozygot sowohl *Gdap1* als auch *GDAP1* tragen, sollte die Expression der Proteine erwartungsgemäß gleichmäßig verteilt sein, was sich anhand der qPCR nicht bestätigen ließ. Stattdessen beträgt die Höhe der mRNA-Expression von *GDAP1* nur ca. 8% der mRNA-Expression von *Gdap1*.

Abb. 23 C zeigt einen Western Blot mittels Anti-HA tag und Anti-*GDAP1* tag Antikörper, um die Expression des *GDAP1* zu bestätigen. Als positive Kontrolle dient eine Zellprobe mit *GDAP1*-Expression, die freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt wurde. Während in den Fliegenproben Aktin als Kontrolle in Rot teilweise nachgewiesen werden konnte, wurde *GDAP1* durch den Antikörper nicht detektiert, sodass die Expression stattdessen mittels qPCR gemessen wurde.

Der Nachweis des *GDAP1* mittels einer qPCR in den Linien mit humanem *GDAP1* ist in Abb. 23 D dargestellt. Die Expression der mRNA in den *GDAP1*-tragenden Linien konnte validiert werden, während sie in der Linie *Gdap1*^{KO/+} nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expressionsstärke ist je nach Wildtyp-Form und Mutation des Proteins unterschiedlich.

Zusammenfassend zeigt dies, dass der homozygote Knockout in allen Linien erfolgreich war, die Expression des neuen Transgens jedoch entweder nur eingeschränkt oder überhaupt nicht funktioniert. Ursächlich könnten Komplikationen bei der Insertion des Transgens oder eine verminderte Transkription oder Translation sein.

4.4.2 Homozygoter *Gdap1*-Knockout bewirkt Letalität

Um den Phänotyp der *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien zu untersuchen, wurden zunächst heterozygote Fliegen der gleichen Linie miteinander verkreuzt und dessen Nachkommenverteilung analysiert, was in der folgenden Abb. 24 dargestellt ist.

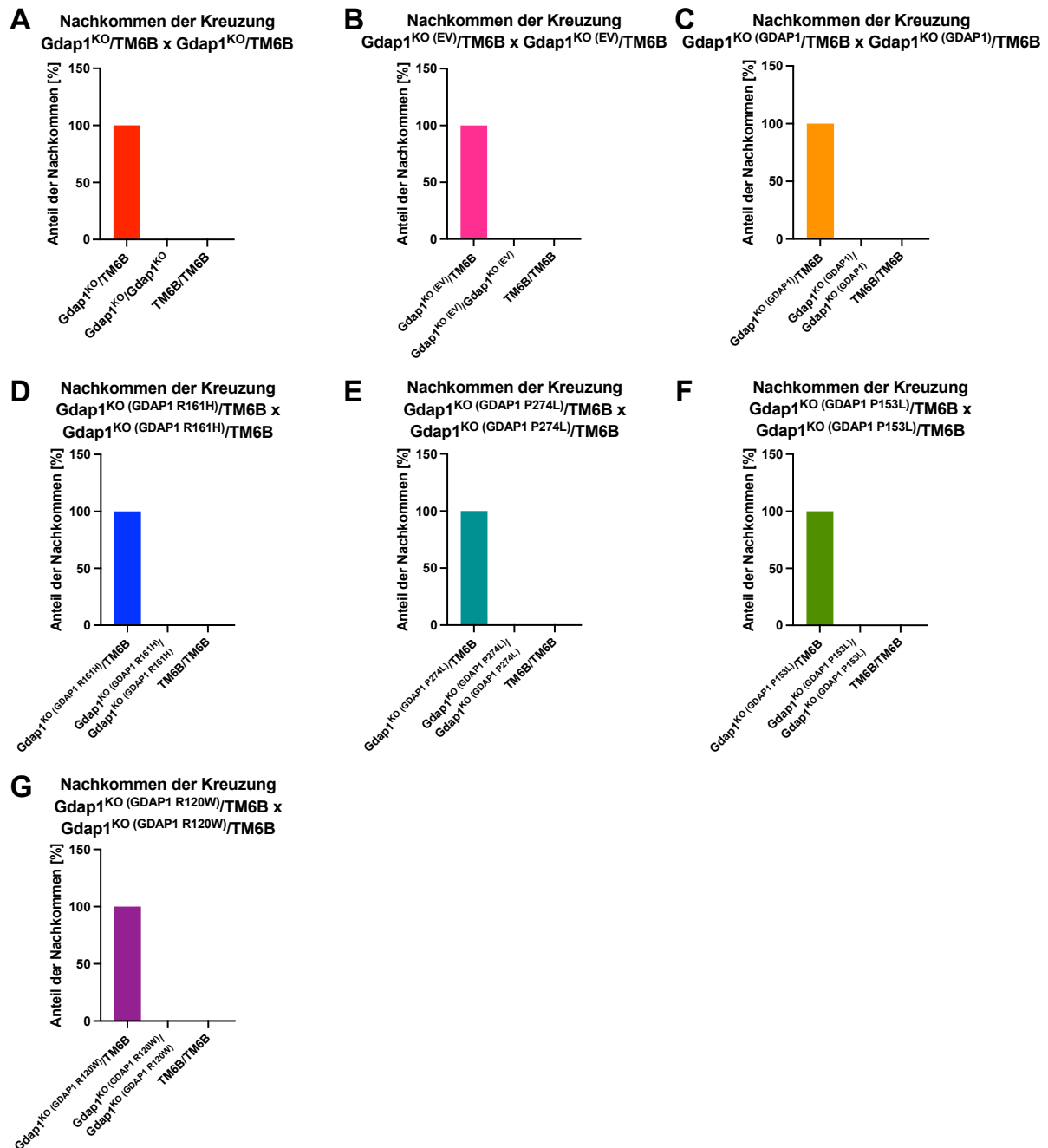


Abbildung 24: **Prozentuale Verteilung der Nachkommen bei Kreuzungen der heterozygoten Fliegenlinien.** Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der Genotypen der F1-Generation bei Kreuzung von Fliegenlinien mit heterozygotem *Gdap1*-Knockout. Bei allen Fliegenlinien entstehen als Nachkommen nur heterozygote Fliegen mit demselben Genotyp der Parentalgeneration.

Während laut der Mendelschen Regeln 50% der Nachkommen heterozygote Träger des Knockout- und des Balancer-Chromosoms sowie jeweils 25% homozygote Träger

der jeweiligen Chromosomen sein müssten, stellt sich hier eine andere Verteilung heraus. Der homozygote Knockout des *Gdap1* bewirkt Letalität, welche durch humanes *GDAP1* in der Wildtypform oder in mutierten Formen nicht verhindert werden kann. Dies zeigt, dass eine bestimmte Expressionsstärke von *Gdap1* notwendig für die Entwicklung der Fruchtfliegen ist. *GDAP1* in Wildtypform oder mutierter Form scheint entweder nicht in ausreichender Menge exprimiert zu werden oder das Protein in seiner Funktion zu eingeschränkt zu sein, um das *Gdap1* der Fruchtfliege zu ersetzen. Die niedrige Expression konnte bereits im vorherigen Kapitel 4.4.1 nachgewiesen werden. Da ebenfalls das homozygote Balancer-Chromosom TM6B für *Drosophila melanogaster* letal ist, entstanden bei allen 7 Linien nur heterozygote Fliegen als Nachkommen, welche denselben Genotyp wie die Parentalgeneration trugen.

4.4.3 *Gdap1*-Knockout und *GDAP1*-Insertionen bewirken Veränderungen der Lebenserwartungen

Im nächsten Schritt sollte der Phänotyp, der durch den *Gdap1*-Knockout entsteht, untersucht werden. Außerdem sollte analysiert werden, ob *GDAP1* in der Fliege trotz der verminderten Expression (Abb. 23 B) die Funktionen des *Gdap1* übernehmen kann, wozu im Folgenden die Lebensspannen der Wildtypfliege, der *Gdap1*-Knockout-Linien und der *GDAP1*-tragenden Linie verglichen wurden. Obwohl die Knockout-Linien auf der Linie w- basieren und diese die richtige Kontrolllinie darstellt, wurde in den folgenden Versuchen als Kontrolle Oregon R verwendet, da die Linie w- zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht verfügbar war.

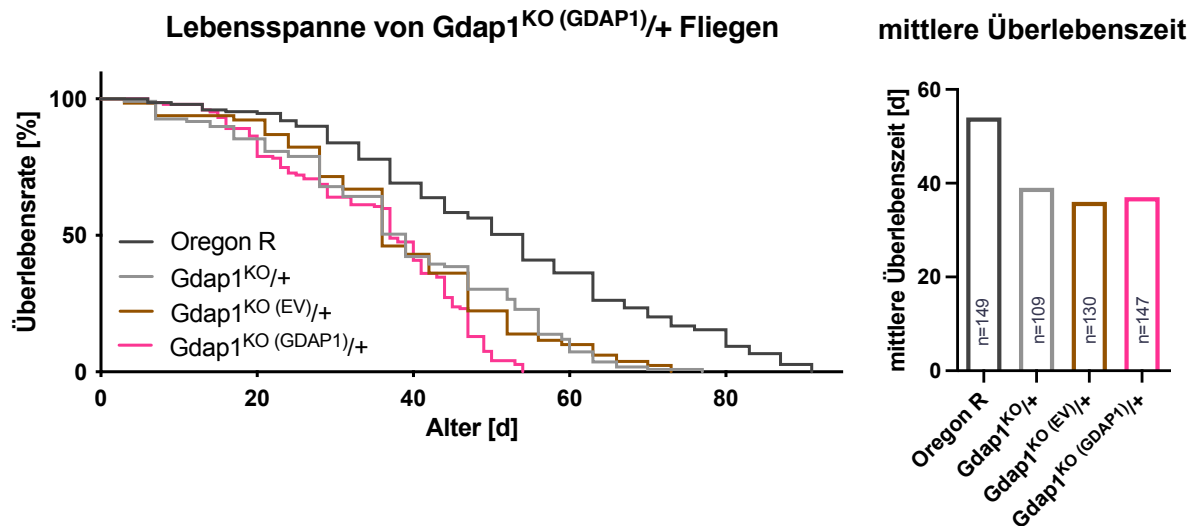


Abbildung 25: **Lebenserwartungen der Gdap1-Knockout-Fliegen.** Dargestellt sind die Lebenserwartungen und mittleren Überlebenszeiten der Fliegenlinien Gdap1^{KO}/+ und Gdap1^{KO} (EV)/+ als Modelle für den heterozygoten Gdap1-Knockout und Gdap1^{KO} (GDAP1)/+ als das Wildtyp-GDAP1-tragende Modell. Als Kontrolle wurde der Wildtyp-Stamm „Oregon R“ verwendet. Die Haltung der Fliegen erfolgte bei 25°C und die Ernährung mit einem Nährbrei.

Die Lebenserwartungen der zwei Gdap1-Knockout-Fliegenstämme zeigen sich in Abb. 25 im Vergleich zur Wildtypfliege reduziert, was die Relevanz des Proteins für den Organismus verdeutlicht.

Die Fliegenlinie Gdap1^{KO} (GDAP1)/+ hat ebenfalls eine verkürzte Lebensspanne. Die Expression des GDAP1 könnte mit ca. 8% der erwarteten Expressionsmenge (Abb. 23 B). zu niedrig sein, damit das Protein die Funktionen des Gdap1 der Fliege übernehmen kann. Während López Del Amo et al. nachweisen konnten, dass GDAP1 die gleichen Funktionen wie Gdap1 besitzt und dieses ersetzen kann (López Del Amo et al., 2015), zeigt die Lebensspanne in Abb. 25 sogar einen lebensverkürzenden Effekt durch das Vorhandensein von GDAP1 statt Gdap1. Das könnte durch einen toxischen Effekt des GDAP1 auf die Fruchtfliege begründet sein.

Als Nächstes sollten die Fliegenlinien, deren GDAP1 die Mutationen R161H, P274L, P153L und R120W beinhalten, mittels Messung der Lebensspanne untersucht werden.

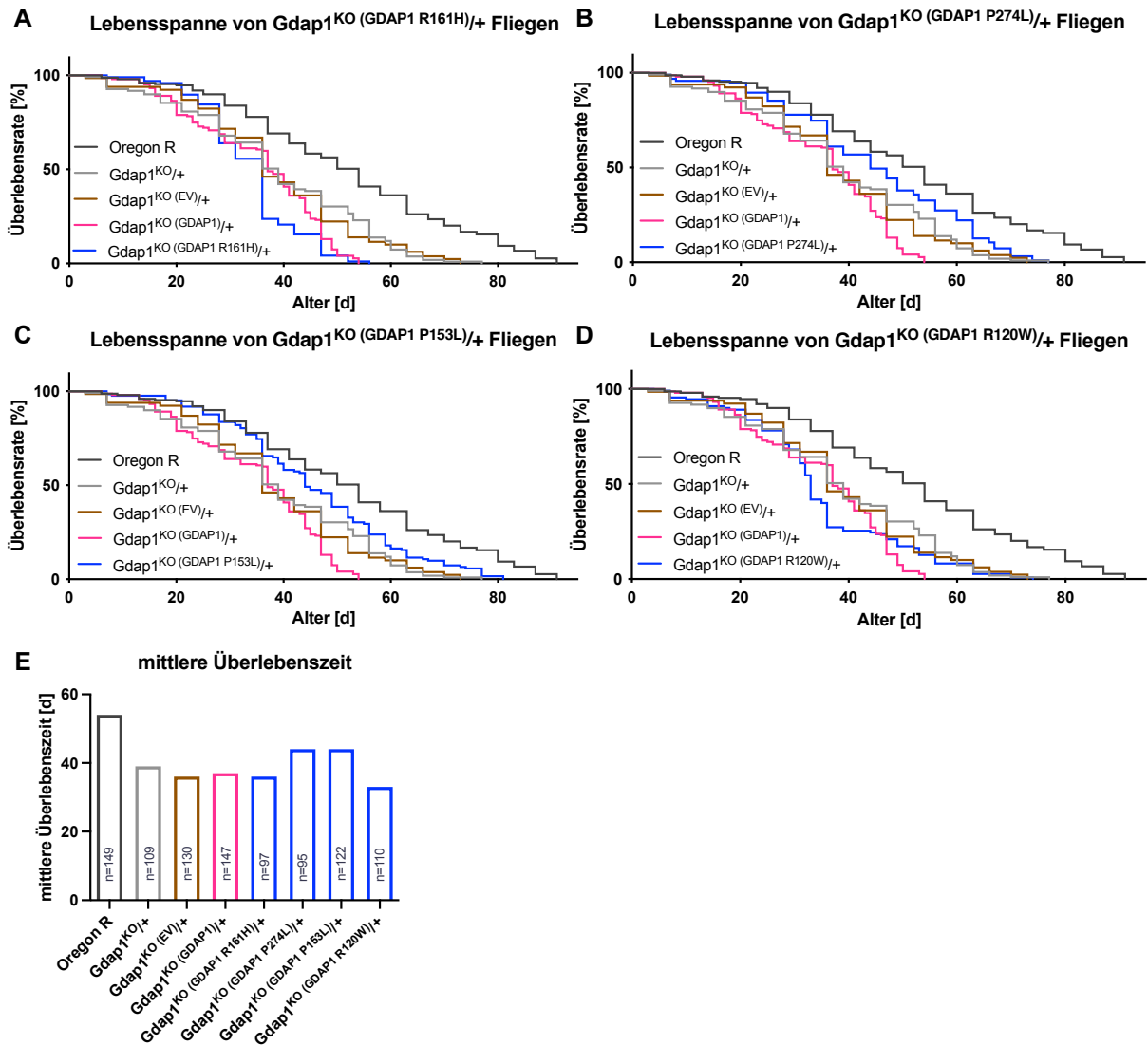


Abbildung 26: **Lebenserwartungen der R161H-, P274L-, P153L- und R120W-Mutationen-tragenden Fliegen.** Die Abbildungen **A - D** stellen die jeweiligen Lebensspannen und Abbildung **E** die mittleren Überlebenszeiten der Fliegen mit verschiedenen Mutationen des *GDAP1* im Vergleich zu mehreren Kontrollgruppen dar. Als Kontrolle wurden jeweils „Oregon R“ als Wildtypfliege, $Gdap1^{KO/+}$ und $Gdap1^{KO} (EV)/+$ sowie $Gdap1^{KO} (GDAP1)/+$ verwendet. Die Haltung der Fliegen erfolgte bei 25°C und die Ernährung mit einem Nährbrei.

Abb. 26 A - D zeigen die Lebensspannen der Fliegen, die verschiedene Mutationen des *GDAP1* in ihrem Genom tragen sowie die mehrerer Kontrollgruppen, während Abb. 26 E die mittleren Überlebenszeiten darstellt.

Es ist erkennbar, dass *Drosophila melanogaster* unterschiedlich auf verschiedene *GDAP1*-Mutationen reagiert, obwohl *GDAP1* jeweils nur in einer geringen Menge exprimiert wird. Im Vergleich zu den Knockoutmodellen $Gdap1^{KO/+}$ und $Gdap1^{KO} (EV)/+$ sind die Lebenserwartungen der Fliegen mit den Mutationen P274L und P153L verlängert und die der Fliegen mit den Mutationen R161H und R120W verkürzt. Ursächlich dafür könnte sein, dass *GDAP1* mit den Mutationen P274L oder P153L in der Fruchtfliege teilweise funktionsfähig ist und trotz der verminderten Expression die

Funktionen des Gdap1 zum Teil ersetzen kann. Die R161H- und R120W-Mutationen könnten im Gegensatz dazu zu einer toxischen Wirkung des GDAP1 für die Fruchtfliege führen.

Die Theorie, dass autosomal-rezessive Mutationen schwerere Formen der Krankheit auslösen, während autosomal-dominante Mutationen zum milderen Phänotyp führen (Zimoń et al., 2011), konnte einerseits anhand der autosomal-rezessiven Mutation R161H und der autosomal-dominanten Mutation P274L bestätigt werden, jedoch führte die autosomal-rezessive Mutation P153L anhand der Lebensspanne zu einem milderen Phänotyp und R120W, welche autosomal-dominant vererbt wird, zu einem stärkeren.

4.4.4 *Gdap1*-Knockout und *GDAP1*-Insertionen bewirken Veränderungen der negativen Geotaxis

Mithilfe der Messung der negativen Geotaxis sollte im nächsten Schritt die muskuläre Funktion der verschiedenen Fliegenlinien ermittelt werden, um die Folgen des Gdap1-Verlustes sowie die Funktionsfähigkeit der verschiedenen mutierten Proteine zu beurteilen. Die Messungen erfolgten bei jungen, 1 - 3 Tage alten Fliegen sowie bei älteren Fliegen im Alter von 22 - 24 Tagen und sind in der folgenden Abb. 27 dargestellt.

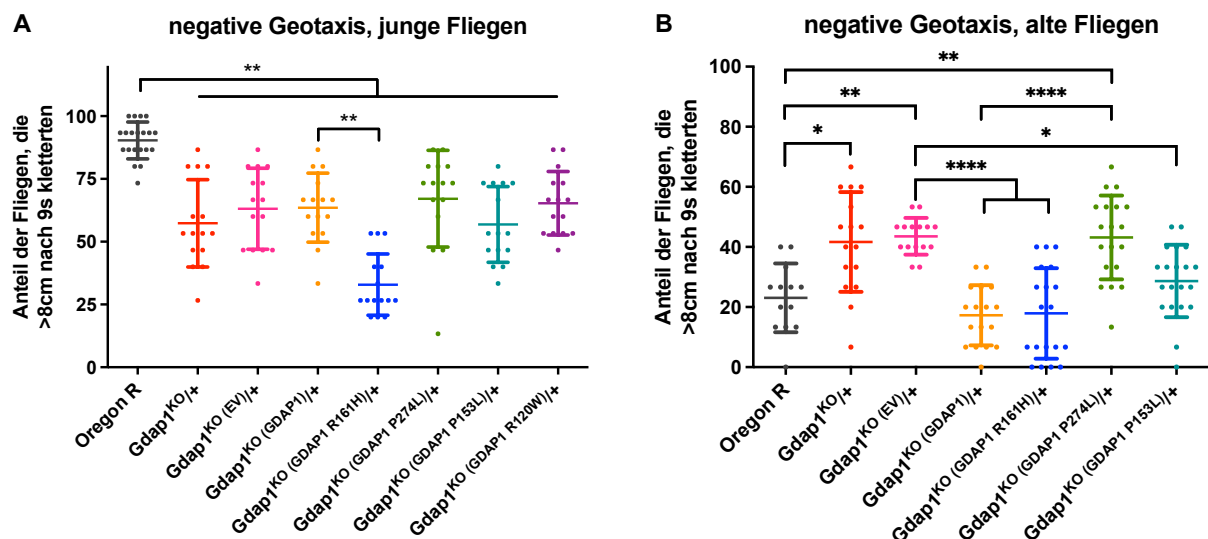


Abbildung 27: **Negative Geotaxis der *Gdap1*-Knockout-Fliegen.** Dargestellt ist die Fähigkeit zur negativen Geotaxis von *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien im Vergleich zur Wildtypfliege „Oregon R“. Es wurde der Anteil an Fliegen gemessen, der durch Klettern nach 9 s eine 8 cm-Grenze des Röhrchens überschritt. Zunächst erfolgte die Messung mit „jungen“ Fliegen im Alter von 1 - 3 Tagen. Sie wurde mit denselben Fliegen nach 3 Wochen wiederholt, sodass die als „alt“ bezeichneten Fliegen ein Alter von 22 - 24 Tagen hatten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparisons-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

Während anhand der Messung der negativen Geotaxis bei jungen Fliegen, welche in Abb. 27 A dargestellt ist, bei allen Knockout-Linien im Vergleich zur Wildtypfliege eine Verlangsamung festgestellt werden kann, ist besonders die R161H-Mutation-tragende Linie in ihrer Geschwindigkeit beeinträchtigt. Abb. 27 B zeigt die Geschwindigkeit der älteren Fliegen, wobei interessanterweise mehrere Knockout-Linien schneller kletterten als die Wildtypfliege. Fliegen mit Wildtyp-*GDAP1*, der R161H-Mutation sowie der P153L-Mutation zeigen sich langsamer als die Linie *Gdap1*^{KO (EV)}/+. Fliegen der Linie *Gdap1*^{KO (GDAP1 P274L)}/+ kletterten schneller als die der Linie *Gdap1*^{KO (GDAP1)}/+. *GDAP1* scheint also in Muskelzellen mit P274L-Mutation funktionsfähiger zu sein als mit den Mutationen R161H, P153L oder als Wildtypform.

Durch Messung der Lebensspanne und negativen Geotaxis fiel besonders das Fliegenmodell mit der Mutation R161H durch einen stark beeinträchtigten Phänotyp auf. Diese Mutation führt auch im Menschen zu einer schweren Verlaufsform der Erkrankung CMT4A (Baxter et al., 2002). Deshalb wurde dieses Modell ausgewählt, um im Folgenden Näheres über dessen Wirkungen auf *Drosophila melanogaster* zu erfahren.

4.4.5 *Gdap1*-Knockout-Fliegen weisen keine signifikant veränderte ATP-Konzentration auf

Mittels Messung der ATP-Konzentration von *Gdap1*-Knockout-Fliegenstämmen sollte dessen Funktionsfähigkeit zur Energiegewinnung analysiert werden. *GDAP1* wurde bereits in bisherigen Forschungsergebnissen mit einer Förderung der ATP-Konzentration in Verbindung gebracht (Cassereau et al., 2009; López Del Amo et al., 2015), sodass Mutationen des *GDAP1* diese beeinträchtigen könnten.

Auch in dieser Arbeit stellte sich bereits am *elav>Gdap1-RNAi* Modell eine verminderte ATP-Konzentration im Thorax heraus (Abb. 13). Deshalb wurde die im folgenden dargestellte ATP-Messung ebenfalls am Thorax durchgeführt. Aufgrund des bisher aufgewiesenen stark beeinträchtigten Phänotyps der Fliegen mit R161H-Mutation wurde dieses Modell für die ATP-Messung ausgewählt. Als weitere Gruppen wurden *Gdap1*^{KO (GDAP1)}/+ sowie „Oregon R“ als Kontrolle verwendet.

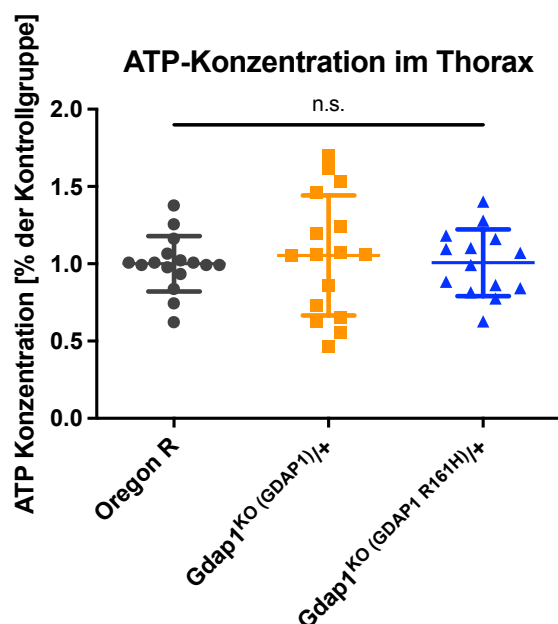


Abbildung 28: **ATP-Konzentration in Thoraces von R161H-Mutation-tragenden Fliegen.** Die Abbildung zeigt den prozentualen ATP-Gehalt der Fliegenlinien $Gdap1^{KO (GDAP1)}/+$ und $Gdap1^{KO (GDAP1 R161H)}/+$ im Vergleich zur Wildtypfliege „Oregon R“ im Thorax. Die Messungen wurden mit dem ATP Bioluminescence Assay Kit HSII von Roche und dem *Tecan Infinite® Spark* durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (MW \pm SD). Die statistische Auswertung erfolgte mit one way ANOVA und Tukey's multiple comparisons-Test (n.s. $p > 0,05$).

Abb. 28 zeigt, dass kein signifikanter Unterschied des ATP-Gehaltes zwischen den drei Fliegenmodellen besteht. Der Austausch von *Gdap1* zu *GDAP1* als Wildtypform oder R161H-mutierte Form auf einem Allel scheint also keine starken Veränderungen der ATP-Synthese im Thorax zu bewirken, obwohl *GDAP1* nur wenig in den Fliegenlinien exprimiert wird. Verglichen mit der verminderten ATP-Konzentration im Thorax des *Gdap1*-Knockdown-Modells (Abb. 13), kann dieses Ergebnis auf eine teilweise Funktionsfähigkeit des Wildtyp- bzw. R161H-mutierten *GDAP1* hinweisen.

4.4.6 *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien mit *GDAP1*-Insertionen reagieren nicht sensibler auf Rotenon und Tunicamycin

In Kapitel 4.1.5 stellten sich bereits anhand der Lebensspanne sensiblere Reaktionen von Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown auf Behandlungen mit Rotenon und Tunicamycin heraus. Auch an den Knockout-Linien sollten die Toxine dazu verwendet werden, um deren Widerstandsfähigkeit auf mitochondrialen bzw. ER-Stress zu testen.

Als Modell für CMT4A wurde die Mutation R161H gewählt, da diese bei Messung der Lebensspanne und negativen Geotaxis die stärkste Beeinträchtigung aufwies. Als Kontrollgruppen fungierten die Linien „Oregon R“, $Gdap1^{KO (EV)}/+$ und $Gdap1^{KO (GDAP1)}/+$.

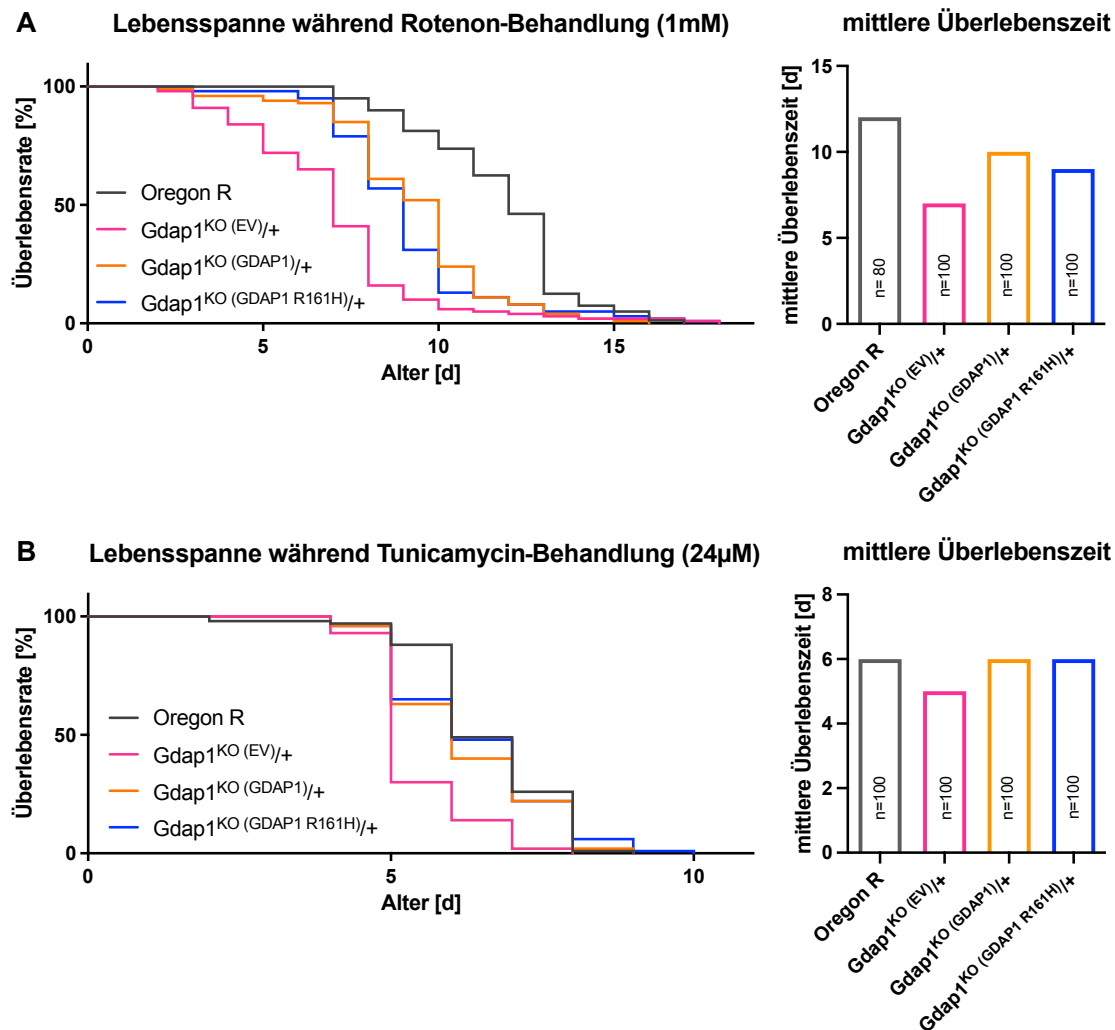


Abbildung 29: **Lebenserwartungen der *Gdap1*-Knockout-Linien während täglicher Gabe einer Saccharose-Toxin-Lösung.** Die Abbildungen zeigen die Lebenserwartungen und mittleren Überlebenszeiten von mehreren Knockout-Linien und der Wildtypfliege „Oregon R“ bei täglicher Gabe der Toxine. Während die Haltung der Fliegen bei 25°C erfolgte, wurde täglich 0,1 ml einer Nährlösung mit 5% Saccharose und 1 mM Rotenon bzw. 24 µM Tunicamycin verabreicht. Abbildung **A** zeigt die Lebensspannen und mittleren Überlebenszeiten der Linien während täglicher Gabe der Rotenon-Saccharose-Lösung. In Abbildung **B** sind die Lebensspannen und die mittleren Überlebenszeiten der Knockout-Linien abgebildet, während ihnen täglich die Tunicamycin-Saccharose-Lösung gegeben wurde.

Abb. 29 A stellt die Lebenserwartungen der verschiedenen Fliegenlinien bei täglicher Gabe einer Rotenon-Saccharose-Lösung dar und Abb. 29 B zeigt diese bei Gabe einer Tunicamycin-Saccharose-Lösung.

In Abb. 29 A ist erkennbar, dass alle drei Knockout-Linien bei Behandlung mit Rotenon eine kürzere Lebenserwartung haben als die Wildtypfliege „Oregon R“.

Während „Oregon R“ Fliegen bei alleiniger Fütterung mit 5%-iger Saccharose-Lösung eine mittlere Überlebenszeit von 34 Tagen haben (Daten zur Saccharose-Behandlung sind in Abb. 30 dargestellt), führt die Beimischung von Rotenon zur Reduktion der mittleren Überlebenszeit um ca. 65%. Die mittlere Überlebenszeit von Fliegen mit

Wildtyp-*GDAP1* reduziert sich um ca. 66% und die der R161H-Mutation-tragenden Linie um 70%.

Auch bei Behandlung mit Tunicamycin weisen die drei Knockout-Linien eine kürzere Lebenserwartung auf als die Wildtypfliege, was in Abb. 29 B dargestellt ist. Die Beimischung von Tunicamycin zur Saccharose-Lösung führt bei „Oregon R“ Fliegen zur ca. 82%-igen Reduktion der mittleren Überlebenszeit. Beide *GDAP1*-tragenden Linien *Gdap1*^{KO (GDAP1)}/+ und *Gdap1*^{KO (GDAP1 R161H)}/+ reagieren mit einer ca. 80%-igen Reduktion dieser.

Die prozentuale Reduktion der mittleren Überlebenszeit ist also sowohl bei Tunicamycin- als auch Rotenon-Behandlung bei den Knockout-Linien ähnlich der Kontrolllinie. Das zeigt, dass die *GDAP1*-tragenden Linien verglichen mit der Wildtypfliege nicht sensibler auf die Toxine reagieren.

4.4.7 J147 und CMS121 verlängern nicht die Lebenserwartungen der *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien, aber die der Wildtypfliege

In Kapitel 4.1.6 wurden bereits die beiden Wirkstoffe J147 und CMS121 an *Gdap1*-Knockdown-Fliegen getestet. Während J147 kein Effekt auf die Lebenserwartung aufwies, führte die Gabe von CMS121 sogar zu einer Verkürzung dieser. Im nächsten Schritt sollten die Stoffe auch an R161H-Mutation-tragenden Fliegen als Modell für CMT4A getestet werden. „Oregon R“ und *Gdap1*^{KO (GDAP1)}/+ dienen dabei als Kontrollgruppen.

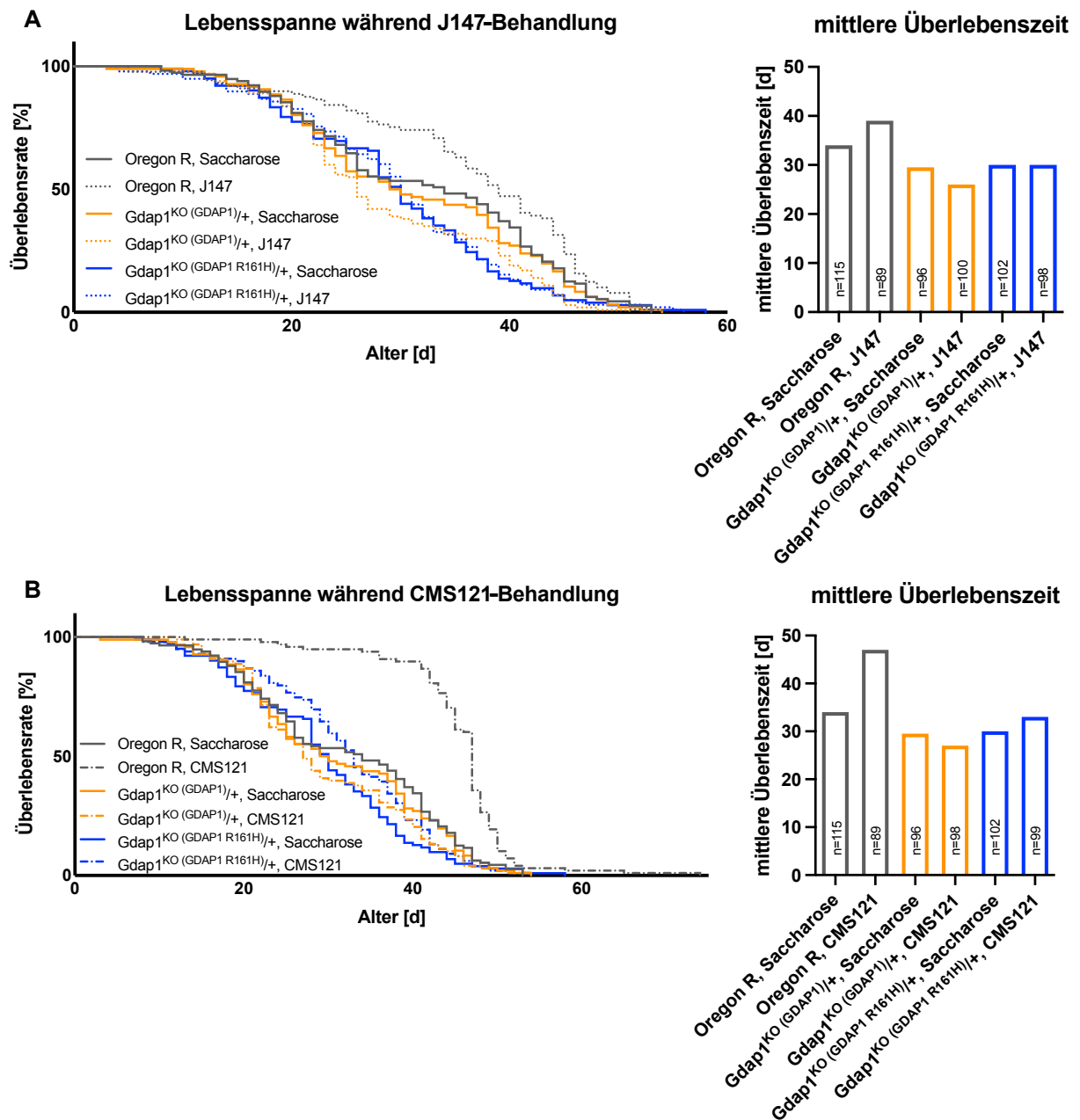


Abbildung 30: **Einfluss von J147 und CMS121 auf die Lebenserwartungen der *Gdap1*-Knockout-Fliegen.** Die Abbildungen zeigen die Lebenserwartungen der *Gdap1*-Knockout-Linien im Vergleich zur Wildtypfliege „Oregon R“. Den Fliegen wurde täglich 0,1 ml einer 5%-igen Saccharose-Lösung gegeben, die 2 μ M des Stoffes J147 (Abbildung **A**) bzw. CMS121 (Abbildung **B**) enthielt. Als Kontrolle wurden die Linien mit einer reinen 5%-igen Saccharose-Lösung behandelt. Die Haltung der Fliegen erfolgte bei Raumtemperatur.

Abb. 30 A zeigt den Einfluss von J147 auf die Lebenserwartung der Fliegen, während Abb. 30 B den Einfluss von CMS121 darstellt. An R161H-Mutation-tragenden Fliegen ist kein positiver Effekt auf die Lebenserwartung durch J147 und nur eine leichte Verlängerung dieser durch CMS121 erkennbar. Die Wildtyp-*GDAP1*-tragenden Fliegen haben durch Behandlung mit beiden Stoffen sogar ein leicht verkürztes Leben. Im Gegensatz dazu reagiert die Wildtypfliege auf beide Stoffe mit einer verlängerten

Lebensspanne, was mit dem bereits bekannten lebensverlängernden Effekt auf Wildtypfliegen korrespondiert (Goldberg et al., 2018; Kepchia et al., 2021). Vor allem bei Behandlung mit CMS121 ist dieser Effekt sehr stark nachweisbar.

4.4.8 J147 und CMS121 verbessern nicht die negative Geotaxis der *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien und Wildtypfliegen

Durch Messung der negativen Geotaxis sollte als Nächstes untersucht werden, ob sich die muskuläre Funktion des *Gdap1*-Knockout-Fliegenmodells mittels J147 und CMS121 verbessert.

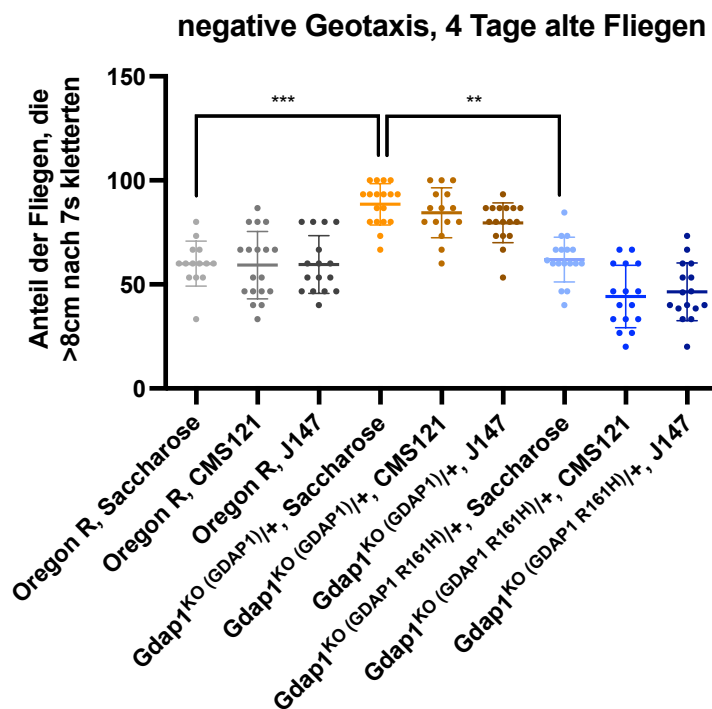


Abbildung 31: **Einfluss von J147 und CMS121 auf die negative Geotaxis der *Gdap1*-Knockout-Fliegen.** Dargestellt ist die Fähigkeit zur negativen Geotaxis von 4 Tage alten *Gdap1*-Knockout-Fliegenlinien im Vergleich zur Wildtypfliege „Oregon R“, nachdem diese täglich mit einer 5%-igen Saccharose-Lösung, die 2 μ M CMS121 bzw. J147 enthielt, behandelt wurden. Die Kontrollgruppen erhielten täglich eine reine 5%-ige Saccharose-Lösung. Es wurde der Anteil an Fliegen gemessen, der durch Klettern nach 7 s eine 8 cm-Grenze des Röhrchens überschritt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison-Test (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Abb. 31 zeigt die Fähigkeit zur negativen Geotaxis von 4 Tage alten Fliegen mit Wildtyp-*GDAP1* und R161H-mutiertem *GDAP1* im Vergleich zur Wildtypfliege, nachdem sie 4 Tage lang mit J147 oder CMS121 behandelt wurden. Auf die negative Geotaxis der Wildtypfliege und der Wildtyp-*GDAP1*-tragenden Linie haben weder J147 noch CMS121 signifikante Auswirkungen, während beide Wirkstoffe bei R161H-

Mutation-tragenden Fliegen zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten, Verlangsamung führen.

Zusammenfassend scheinen J147 und CMS121 weder einen deutlichen lebensverlängernden Effekt noch eine verbessernde Wirkung auf die muskuläre Funktion bei sowohl Wildtyp-*GDAP1*-tragenden als auch R161H-Mutation-tragenden Fliegen zu haben. Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.6, bei denen ebenfalls an *elav>Gdap1-RNAi*-Fliegen kein positiver Effekt durch J147 und CMS121 festgestellt werden konnte, sprechen die Wirkungen auf R161H-Mutation-tragende Fliegen gegen eine Gabe der Stoffe bei CMT4A-Patienten.

Auffällig ist jedoch, dass Fliegen mit Wildtyp-*GDAP1* in Abb. 31 eine insgesamt schnellere negative Geotaxis aufweisen als Wildtypfliegen. Bei Gabe eines Nährbreis zeigte sich dies bei 1 - 3 Tage alten Fliegen derselben Genotypen gegenteilig (Abb. 27). Während Fliegen mit R161H-Mutation nach einer Behandlung mit Saccharose gleich schnell klettern wie Wildtypfliegen, sind sie nach Ernährung durch einen Nährbrei langsamer als diese (Abb. 27). Diese Beobachtung korrespondiert mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.7, bei denen sich ebenfalls ein positiver Effekt auf *Gdap1*-Knockdown-Fliegen durch reine Saccharose-Gabe im Vergleich zur Gabe eines Nährbreis herausstellte. Deshalb soll im nächsten Schritt auch am Knockout-Fliegenmodell die Gabe unterschiedlichen Futters analysiert werden.

4.4.9 Saccharose verkürzt die Lebenserwartung von Wildtypfliegen, jedoch nicht von *Gdap1*-Knockout-Fliegen

Da in Kapitel 4.1.7 ein unterschiedlicher Einfluss verschiedenen Futters auf die Lebensspannen von *Gdap1*-Knockdown- und Kontrollfliegen nachgewiesen werden konnte und sich auch in Kapitel 4.4.7 Hinweise auf einen solchen Einfluss anhand der negativen Geotaxis von *Gdap1*-Knockout-Linien ergaben, sollte dies im Folgenden anhand der Lebensspanne R161H-Mutation-tragender Fliegen überprüft werden.

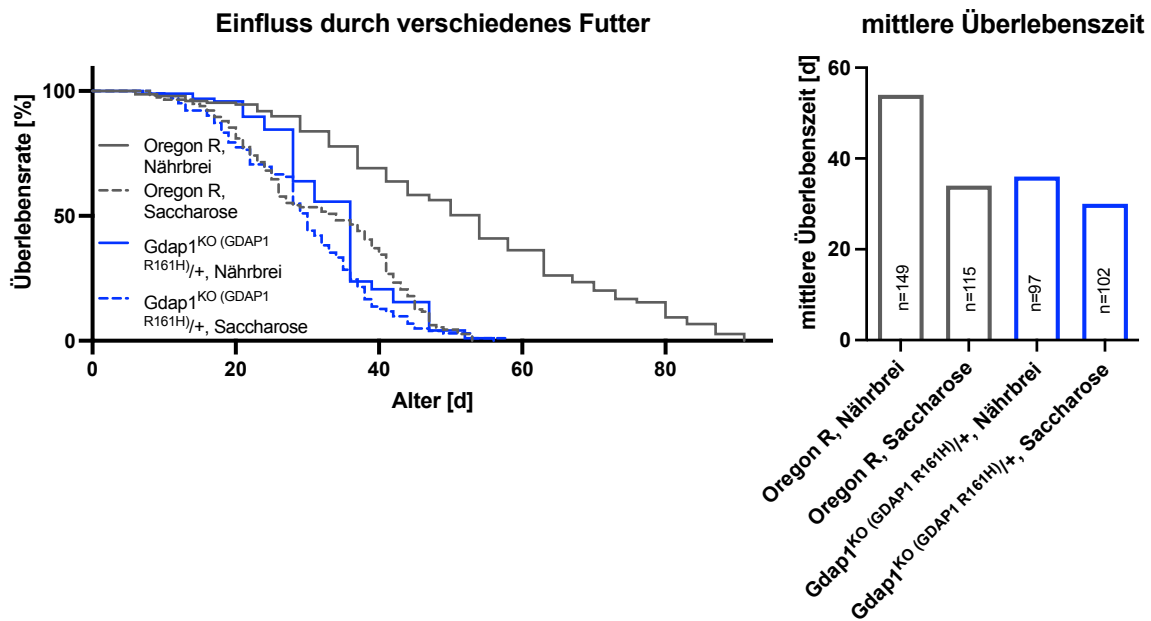


Abbildung 32: **Einfluss verschiedenen Futters auf die Lebenserwartung der R161H-Mutationstragenden Fliegen.** Dargestellt sind die Lebensspannen und mittleren Überlebenszeiten der Linien „Oregon R“ und $Gdap1^{KO} (GDAP1^{R161H})/+$ bei dauerhafter Haltung in Röhrcchen mit beinhaltenem Nährbrei im Vergleich zu einer Haltung in Röhrcchen mit Filterpapier und täglicher Gabe einer 5%-igen Saccharose-Lösung. Die Haltung der Fliegen mit Nährmedium erfolgte bei 25°C und die der mit Saccharose-Lösung gefütterten Fliegen bei Raumtemperatur.

In Abb. 32 lässt sich eine starke Verkürzung der Lebenserwartung der Wildtyplinie „Oregon R“ durch Gabe einer Saccharose-Lösung anstelle des Nährmediums erkennen. Fliegen mit R161H-Mutation reagieren ebenfalls mit einer Reduktion der Lebenserwartung, jedoch in einem kleineren Ausmaß. Während sich die mittlere Überlebenszeit von „Oregon R“ um ca. 37% reduziert, wird die der R161H-Mutationstragenden Fliegen nur um ca. 17% gesenkt. Der unterschiedliche Effekt des Futters auf das CMT4A-Fliegenmodell und die Kontrolllinie, der in 4.1.7 festgestellt wurde, kann somit anhand des R161H-Modells bestätigt werden. Die Gabe reiner Saccharose-Lösung kann jedoch das Leben der R161H-Mutationstragenden Fliegen im Gegensatz zur *Gdap1*-Knockdown Fliege (Abb. 16) nicht verlängern.

5 Diskussion

5.1 Gdap1 und GDAP1 am Modell der *Drosophila melanogaster*

GDAP1 gehört zur Familie der Glutathion-S-Transferasen (Nelis et al., 2002), wird vor allem in Neuronen exprimiert (Pedrola et al., 2005) und ist primär an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005). Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* besitzt ein dem humanen GDAP1 äquivalentes Protein, welches als Gdap1 bezeichnet und vom Gen CG4623 bzw. *Gdap1* codiert wird (López Del Amo et al., 2015; Marco, Cuesta, Pedrola, Palau, & Marín, 2004).

In dieser Arbeit konnten die Funktionen des Gdap1 durch gezielten Knockdown in verschiedenen Geweben mittels des Gal4/UAS-Systems untersucht werden. Auf der anderen Seite dienten Linien mit heterozygotem *Gdap1*-Knockout sowie mit humanem Wildtyp-GDAP1 der weiteren Analyse des Gdap1 und GDAP1. Linien mit mutiertem GDAP1 anstelle des *Gdap1* wurden als Modelle für die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit verwendet.

Durch Knockdown mittels Gdap1-RNAi konnte validiert werden, dass das Protein der Fliege vor allem in Neuronen von großer Bedeutung ist. Dafür sprechen die verkürzte Lebenserwartung, die verlangsamte negative Geotaxis, die verminderte thorakale ATP-Konzentration und die sensiblere Reaktion auf Rotenon und Tunicamycin von *elav>Gdap1-RNAi*-Fliegen im Vergleich zur Kontrolllinie (Kapitel 4.1.2 - 4.1.5). Auch der heterozygote Knockout des *Gdap1* führte zu einer verkürzten Lebenserwartung und verlangsamten negativen Geotaxis (Kapitel 4.4.3 - 4.4.4).

Während López et al. mittels des Ac5C-Gal4 Transkriptionsfaktors Fliegen mit einem ubiquitären heterozygoten *Gdap1*-Knockdown herstellen konnten, welche eine verkürzte Lebenszeit, verlangsamte negative Geotaxis sowie einen veränderten Energiestoffwechsel aufwiesen (López Del Amo et al., 2017), führte in dieser Arbeit der ebenfalls ubiquitär wirkende tubP-Gal4 Transkriptionsfaktor zusammen mit UAS-Gdap1-RNAi zur Letalität auf Entwicklungsstufe der Puppe. Ursächlich dafür könnte ein stärkerer Knockdown durch tubP-Gal4 im Vergleich zu Ac5C-Gal4 sein. Im Gegensatz dazu überlebten Fliegen mit neuronalem Knockdown, was Hinweise darauf gibt, dass das Protein nicht nur in Neuronen zum Überleben und zur Entwicklung wichtig ist, sondern auch in anderen Geweben, wozu z.B. das Muskelgewebe zählt.

Während bereits López Del Amo et al. eine veränderte Mitochondrien-Morphologie bei *Gdap1*-Knockdown im Muskelgewebe der *Drosophila melanogaster* mittels des Transkriptionsfaktors Mhc-Gal4 beobachteten (López Del Amo et al., 2015), stellten sich in dieser Arbeit eine leicht verkürzte Lebenserwartung und Verlangsamung in der negativen Geotaxis bei 22 - 24 Tage alten *mef2>Gdap1*-RNAi-Fliegen heraus (Kapitel 4.1.2 - 4.1.3). Auch in Schwann-Zellen, in denen bereits eine Expression des *GDAP1* nachgewiesen werden konnte (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005), könnte das Protein wichtige Funktionen aufweisen.

Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Muskelzellen wiesen in dieser Arbeit eine weniger stark eingeschränkte negative Geotaxis auf als Fliegen mit demselben Knockdown in Neuronen (Kapitel 4.1.3). Die muskuläre Dysfunktion von CMT-Fliegenmodellen resultiert also vor allem durch die fehlende Innervation durch zugrunde gehende Neuronen. Ein Teil könnte jedoch auch durch direkte Beeinträchtigung der Muskelzellen durch verändertes *Gdap1* verursacht sein, wofür die verkürzte Lebenszeit und leicht verlangsamte negative Geotaxis von 22 - 24 Tage alten *mef2>Gdap1*-RNAi-Fliegen spricht. Im Gegensatz dazu spielt *GDAP1* in menschlichen Muskelzellen keine Rolle, da es dort nicht exprimiert wird (Pedrola et al., 2005).

Die Beobachtung von López Del Amo et al., dass humanes *GDAP* das *Gdap1* der *Drosophila melanogaster* funktionell ersetzen kann (López Del Amo et al., 2015), konnte in dieser Arbeit unter normalen Lebensbedingungen in den Kapiteln 4.4.2 - 4.4.4 nicht validiert werden. Das Ersetzen des *Gdap1* durch *GDAP1* auf beiden Allelen der Fliege resultierte bei allen Knockout-Fliegenlinien in Letalität. Fliegen, die heterozygot *GDAP1* an Stelle des *Gdap1* tragen, zeigten außerdem keine längere Lebenserwartung oder schnellere negative Geotaxis als das heterozygote *Gdap1*-Knockout-Modell. Die Beobachtungen könnten damit zusammenhängen, dass die Expression des Transgens nur eingeschränkt funktioniert. In Kapitel 4.4.1 stellte sich heraus, dass *GDAP1* nur zu ca. 8% der erwarteten Expressionsstärke exprimiert wird. Jedoch zeigten Linien mit P274L- und P153L-Mutation im Vergleich zum Knockout-Modell eine verlängerte Lebenserwartung, was auf eine gewisse Funktionsfähigkeit der veränderten Proteine trotz niedriger Expression hinweist. Auch die verlängerte Lebenserwartung von Fliegen mit *GDAP1* als Wildtyp-Form und R161H-mutierte Form verglichen zu der *Gdap1*-Knockout-Linie bei Behandlung mit den Toxinen Rotenon

und Tunicamycin (Kapitel 4.4.5) spricht dafür, dass GDAP1 im Fliegenmodell auch in niedriger Konzentration vor mitochondrialem bzw. ER-Stress schützen kann.

Die Funktion des GDAP1 in der Fruchtfliege hängt also von den Lebensumständen und von der genetischen Variante des Proteins ab. Während GDAP1 mit den Mutationen P274L und P153L die Lebenserwartung verlängert, führt die R161H-mutierte Form zur weiteren Verkürzung der Lebenszeit und zur verlangsamten negativen Geotaxis verglichen mit dem heterozygoten *Gdap1*-Knockdown ohne *GDAP1*-Insertion. Dies könnte durch eine toxische Wirkung des R161H-mutierten GDAP1 in der Fruchtfliege begründet sein. GDAP1 mit P274L-Mutation könnte sogar in der Fruchtfliege eine bessere Funktion aufweisen als die Wildtypform, da diese Mutation in dieser Arbeit zu einer längeren Lebenserwartung (Abb. 26 B) sowie zu einer schnelleren negativen Geotaxis bei 22 - 24 Tagen alten Fliegen (Abb. 27 B) führte.

Zusammenfassend scheinen unterschiedliche Formen des GDAP1 Lebenserwartung und Kletterfähigkeit der Fruchtfliege trotz der verminderten Expression verschieden zu beeinflussen.

5.2 Funktionen und Wirkungsweisen von *Gdap1* und GDAP1

Zu den bereits bekannten Funktionen des GDAP1 gehören unter anderem die Wirkung als mitochondrialer Fissionsfaktor (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005), die Erhöhung der Glutathionkonzentration (López Del Amo et al., 2015) sowie die Mitwirkung an der zellulären Calciumhomöostase (Pla-Martín et al., 2013; Wolf et al., 2021). Es wird vermutet, dass diese Wirkungen auf Interaktionen von GDAP1 mit verschiedenen Proteinen der Zelle, wie z.B. F-Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts, zurückzuführen sind (Wolf et al., 2021).

Wie schon vorherige Studien am Zellmodell zeigten, scheint das Protein sowohl mit Mitochondrien als auch mit dem ER zu interagieren und deren Wechselwirkungen zu unterstützen (Pla-Martín et al., 2013; Wolf et al., 2021). In dieser Arbeit reagierten Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl auf das mitochondrialen Stress verursachende Toxin Rotenon als auch auf Tunicamycin, welches ER-Stress verursacht, mit einer stärkeren prozentualen Reduktion der Lebenserwartung (Kapitel 4.1.5). Dies bestätigt am Fliegenmodell, dass

Gdap1 in Neuronen sowohl mit Mitochondrien als auch mit dem ER in funktioneller Verbindung steht.

Ein *Gdap1*-Knockdown in Neuronen führte zu einer Verminderung der ATP-Konzentration im Thorax, aber nicht in Köpfen (Kapitel 4.1.4). Dies könnte zum einen auf die mitochondriale Beeinträchtigung und die dadurch gehemmte ATP-Produktion in den im Thorax befindlichen Neuronen wie z.B. α -Motoneuronen zurückzuführen sein, zum anderen könnte die ATP-Verminderung auch durch beschädigte Neurone und der damit einhergehenden verminderten Innervation und Muskelatrophie erklärt werden. Die unveränderte ATP-Konzentration in Köpfen mit *Gdap1*-Knockdown könnte dadurch bedingt sein, dass Neurone des Gehirns durch Verlust des Proteins weniger geschädigt werden als die im Thorax befindlichen Neuronen. In den Knockout-Linien konnte im Gegensatz zu den Knockdown-Linien kein Unterschied in Thoraces festgestellt werden (Kapitel 4.4.5).

Die verminderte ATP-Konzentration bei neuronalem *Gdap1*-Knockdown korrespondiert mit Ergebnissen von López Del Amo et al. und Cassereau et al. Erstere zeigten ebenso an *Drosophila melanogaster* eine verminderte ATP-Konzentration bei *Gdap1*-Knockdown in Muskelzellen durch den Transkriptionsfaktor Mhc-Gal4 (López Del Amo et al., 2015). Somit scheint *Gdap1* am Fliegenmodell sowohl in Neuronen als auch in Muskelzellen die ATP-Produktion zu fördern. Cassereau et al. konnten an Fibroblasten von Patienten mit CMT2K eine erniedrigte ATP-Konzentration nachweisen (Cassereau et al., 2009). Als Ursache sehen sie den Komplex I der Atmungskette, der eine um 40% verminderte Aktivität im Vergleich zu Kontrollfibroblasten aufwies, während Komplexe II – V und die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung unbeeinträchtigt waren (ebd.). Die Beeinträchtigung der ATP-Produktion könnte ebenfalls auf eine gestörte Calciumhämostasie der Mitochondrien durch den verminderten SOCE zurückzuführen sein, welcher aufgrund der verminderten Wechselwirkungen von ER und Mitochondrium entsteht, denn Calcium fördert die ATP-Synthese durch Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung sowie des Citratzyklus (Brookes, Yoon, Robotham, Anders, & Sheu, 2004).

Beeinträchtigungen im Komplex I der mitochondrialen Atmungskette werden mit einer erhöhten Produktion von ROS in Verbindung gebracht (Kushnareva, Murphy, & Andreyev, 2002). Ein Toxin, welches ebenfalls Komplex I der Atmungskette hemmt und zur Entstehung von Superoxidradikalen führt, ist Rotenon (ebd.). Fliegen mit

Gdap1-Knockdown in Neuronen reagierten in dieser Arbeit mit ihrer Lebensspanne sensibler auf das Toxin als die Kontrollgruppe, was auf einen fehlenden zellulären Schutz durch *Gdap1* vor oxidativem Stress zurückgeführt werden könnte (Kapitel 4.1.5). Noack et al. führen diesen Schutz auf die Erhöhung von Glutathion und die verminderte Produktion von ROS durch Stabilisierung des Membranpotentials und der Atmungskettenaktivität der Mitochondrien durch GDAP1 zurück (Noack et al., 2012). Es konnten bereits an älteren Fruchtfliegen mit *Gdap1*-Knockdown Veränderungen von Glutathion und ROS nachgewiesen werden (López Del Amo et al., 2015).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit anhand *elav>Gdap1*-RNAi-Linien und heterozygoten *Gdap1*-Knockout-Fliegen nachgewiesen werden, dass das *Gdap1* der *Drosophila melanogaster* wichtige Funktionen zur ATP-Produktion aufweist und im Schutzmechanismus vor ROS beteiligt ist. Die Calciumhomöostase, ATP-Produktion und ROS beeinflussen sich gegenseitig (Brookes, Yoon, Robotham, Anders, & Sheu, 2004). Da GDAP1 ebenfalls mit der Calciumhomöostase in Verbindung gebracht wird, ist unklar, ob GDAP1 unabhängig auf alle drei Faktoren wirkt oder ob eine der drei ursächlich für die jeweils anderen Faktoren ist. Somit könnte z.B. der Einfluss des Proteins auf die Calciumhomöostase ursächlich für die veränderte zelluläre ATP- und ROS-Konzentration sein. Diese Wirkungen könnten die verkürzte Lebenserwartung und muskuläre Beeinträchtigung der *Gdap1*-Knockdown/-Knockout-Fliegen bewirken. Insgesamt korrespondieren die in dieser Arbeit ermittelten Funktionen des *Gdap1* mit denen des humanen GDAP1.

5.3 Einfluss von *Gdap1* und GDAP1 auf den Stoffwechsel

Veränderungen in der Energiegewinnung könnten eine wichtige Rolle bei der Entstehung von CMT4A spielen (Wolf et al., 2021). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Saccharose im Vergleich zur Gabe eines Nährmediums einen lebensverlängernden Effekt auf *elav>Gdap1*-RNAi-Fliegen aufweist, während die Kontrollgruppe mit einer verkürzten Lebensspanne reagiert (Kapitel 4.1.7). An Knockout-Fliegen erwies sich ein ähnliches Ergebnis: Während sich die Gabe der 5%-igen Saccharose-Lösung anstelle des Nährmediums stark verkürzend auf die Lebensspanne der Wildtyp-Fliegen auswirkte, beeinflusste sie kaum die Lebensspanne von Fliegen mit R161H-Mutation (Kapitel 4.4.8).

Gdap1-Knockdown/-Knockout-Fliegen scheinen also von einer Ernährung mit reiner Saccharose eher zu profitieren, während Wildtyp-Fliegen eine ausgewogene Ernährung durch den Nährbrei benötigen und durch alleinige Ernährung mit Saccharose beeinträchtigt werden. Der lebensverlängernde Effekt durch Saccharose am Fliegenmodell könnte somit einen Hinweis auf eine mögliche Therapieoption für CMT4A-Patienten mittels Modulation der Ernährung geben und bedarf weiterer Forschung.

Das Ergebnis unterstützt außerdem die Hypothese von Wolf et al., dass ein GDAP1-Funktionsverlust den zellulären Energiestoffwechsel beeinflusst. Sie fanden heraus, dass die erniedrigte mitochondriale Calciumkonzentration durch GDAP1-Funktionsverlust zu einer verminderten Funktionsfähigkeit des PDC führt und deshalb auf andere Stoffwechselwege mit Beteiligung von Glutamin und Fettsäuren ausgewichen wird (Wolf et al., 2021). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ebenfalls López Del Amo et al.: Am Modell der *Drosophila melanogaster* entdeckten sie bei Hoch- und Herunterregulation von *Gdap1* eine Akkumulation von Kohlenhydraten, eine verstärkte β -Oxidation von Lipiden sowie eine Inaktivierung des Insulin-Signalwegs (López Del Amo et al., 2017). Sie vermuten als Ursache eine Herunterregulation des PDC durch Veränderung der *Gdap1*-Expression (ebd.).

Die Beobachtung, dass Kontrollfliegen, aber nicht *Gdap1*-Knockdown- oder R161H-Mutation-tragende Fliegen, auf reine Saccharose-Gabe mit einer starken Verkürzung der Lebensspanne reagieren, könnte also auf Veränderungen im Stoffwechsel durch *Gdap1*-Knockdown/-Knockout zurückzuführen sein. Die 5%-ige Saccharose-Lösung könnte den zellulären Energiestoffwechsel in ähnlicher Weise beeinträchtigen wie ein Funktionsverlust des *Gdap1*. Während der Funktionsverlust des Proteins zu einer Hemmung des PDC führt (Wolf et al., 2021) und mit einer verminderten Konzentration der Pyruvatkinase assoziiert ist (López Del Amo et al., 2017), könnte die alleinige Gabe von Saccharose ebenfalls zu einer Hemmung dieser bzw. im Energiestoffwechsel vor- oder nachgeschalteter Enzyme führen. Dafür sprächen auch die bereits bekannten Veränderungen im Energiestoffwechsel der *Drosophila melanogaster* durch eine hoch dosierte Saccharose-Gabe: Rovenko et al. stellten fest, dass sich die Konzentrationen von Lipiden, Glykogen, Proteinen sowie der Wassergehalt im Körper ab 4%-iger Saccharose-Gabe ändern und zu einer erhöhten Mortalität führen (Rovenko et al., 2015). Wird *Gdap1*-Knockdown-Fliegen hochprozentige Saccharose-Lösung gegeben, könnten die Enzyme bereits durch den Proteinverlust so stark beeinträchtigt

besonders im höheren Alter eine Bedeutung zuzuschreiben sein. Im Gegensatz dazu führt der muskuläre Knockdown schon bei jungen Fliegen zur starken Ausprägung eines Phänotyps. BNIP3 weist also in Muskelzellen eine höhere Relevanz auf als in Neuronen.

Bei Behandlung mit dem Toxin Rotenon, welches mitochondrialen Stress und ROS verursacht, stellte sich bei Fliegen mit neuronalem *BNIP3*-Knockdown eine höhere Lebenserwartung als bei Kontrollfliegen heraus, während es sich bei normaler Haltung gegensätzlich verhielt (Kapitel 4.2.4). Dieses Ergebnis lässt eine Förderung der Anfälligkeit gegenüber mitochondrialem Stress bzw. ROS durch BNIP3 vermuten. Während eine aktivierende Wirkung durch ROS auf BNIP3 bereits von Kubli et al. beschrieben wurde (Kubli, Quinsay, Huang, Lee, & Gustafsson, 2008), gibt es in der Literatur bisher keine Hinweise auf eine Aktivierung in die entgegengesetzte Richtung.

5.5 Verbindung zwischen *Gdap1* und *BNIP3*

Während Mitglieder unserer Arbeitsgruppe an Zellen mit *GDAP1*-Knockdown bereits feststellten, dass die Konzentration von BNIP3 erhöht ist (unpublizierte Daten), erwies sich auch in dieser Arbeit an Fliegenmodellen mit *Gdap1*-Knockdown in Neuronen eine Konzentrationserhöhung der *BNIP3*-mRNA, welche jedoch nicht signifikant ist. Die Erhöhung des BNIP3 könnte dadurch bedingt sein, dass ein Verlust des *Gdap1* Signalprozesse einleitet, die zu einer erhöhten BNIP3-Transkription führen. Im Gegensatz dazu stellte sich bei muskulärem *Gdap1*-Knockdown kein Unterschied zu der Kontrollgruppe heraus (Kapitel 4.3.1).

Anhand der Messung der Lebensspanne konnte außerdem in Kapitel 4.3.2 nachgewiesen werden, dass Fliegen mit *Gdap1*- und *BNIP3*-Knockdown eine kürzere Lebenserwartung haben als welche mit *Gdap1*- und Kontroll-Knockdown. Auch im Vergleich zu *BNIP3*-Knockdown-Fliegen war sie verkürzt. Die Verminderungen von *Gdap1*- und *BNIP3*-Expression haben also zu einem synergistischen, lebenserwartungsverkürzenden Effekt auf die Fruchtfliege. Dies weist darauf hin, dass BNIP3 eine wichtige Rolle bei einem Funktionsverlust des *Gdap1* spielt, welches durch seine aktivierende Wirkung auf Autophagie (Daido et al., 2004) und Mitophagie (Zhang et al., 2016) bedingt sein könnte. Am Mausmodell mit *GDAP1*-Knockdown konnten Barneo-Muñoz et al. bereits nachweisen, dass die Anzahl von Autophagosomen in Neuronen erhöht ist (Barneo-Muñoz et al., 2015). Die gesteigerte Autophagie könnte

durch BNIP3 eingeleitet sein, sodass die durch fehlendes *Gdap1* geschädigten Mitochondrien abgebaut und stattdessen neue, gesunde Zellorganellen hergestellt werden könnten. Auch die fördernde Wirkung auf die ATP-Produktion und eine wiederherstellende Funktion auf die mitochondriale Morphologie, welche bereits an einem Modell mit M. Parkinson beschrieben wurden (Zhang et al., 2016), könnten die Relevanz des BNIP3 an *Gdap1*-Knockdown-Fliegen erklären, da ein Verlust von GDAP1 sowohl die mitochondriale Morphologie als auch die ATP-Produktion stört (Niemann, Ruegg, La Padula, Schenone, & Suter, 2005; Cassereau et al., 2009). Diese Theorie würde erklären, warum sich die Konzentration von BNIP3 in einem GDAP1-Knockdown-Zellmodell unserer Arbeitsgruppe als erhöht herausstellte (unpublizierte Daten).

Zusammenfassend ergab sich in dieser Arbeit eine nicht signifikante Erhöhung der BNIP3-mRNA-Konzentration bei *Gdap1*-Knockdown in Neuronen, jedoch nicht bei Knockdown in Muskelzellen. BNIP3 scheint wichtige Funktionen zu besitzen, um das Überleben der Neurone bei Zellschädigungen, die durch eine verminderte *Gdap1*-Konzentration bedingt sind, zu verbessern.

5.6 Potenzielle Therapiemöglichkeiten für CMT4A-Patienten

J147 und CMS121 binden an die ATP-Synthase der Mitochondrien (Goldberg et al., 2018; Currais et al., 2019) und zeigten bereits an Zell- und Tiermodellen mit M. Alzheimer neuroprotektive Wirkungen (Chen et al., 2011; Ates, Goldberg, Currais, & Maher, 2020). In den Kapiteln 4.1.6, 4.4.7 und 4.4.8 wurden die beiden Wirkstoffe an verschiedenen Fliegenlinien getestet. Während die bereits bekannten lebensverlängernden Effekte von J147 und CMS121 auf Wildtyp-Fliegen (Goldberg et al., 2018; Kepchia et al., 2021) in dieser Arbeit anhand der „Oregon R“-Fliege validiert werden konnten, stellten sich kaum positive Effekte auf Fliegen mit *Gdap1*-Knockdown oder mit R161H-mutiertem *GDAP1* heraus.

Die Wildtypfliege „Oregon R“ reagierte durch Gabe von CMS121 bzw. J147 mit einer verlängerten Lebenserwartung, welche im Gegensatz dazu in *elav>Kontroll-RNAi*-Fliegen, die ebenfalls eine Kontrollgruppe darstellen, nicht nachgewiesen werden konnte.

Sowohl *elav>Gdap1-RNAi*-Fliegen als auch R161H-Mutation-tragende Fliegen zeigten keine Veränderung der Lebensspanne durch J147, während sich die der Wildtyp-*GDAP1*-tragenden Fliegen sogar leicht verkürzte. Dies könnte bedeuten, dass das Fehlen des *Gdap1* bzw. der Funktionsverlust des Proteins die Zelle oder das Mitochondrium in so einer Weise beeinflusst, dass J147 schlechter an seine Zielstruktur binden oder seine Wirkung dort nicht richtig entfalten kann.

Bei Gabe von CMS121 verkürzte sich die Lebenserwartung von Fliegen mit neuronalem *Gdap1*-Knockdown und die der R161H-Mutation-tragenden Fliegen verlängerte sich nur leicht. Da sich die lebensverlängernde Wirkung auf R161H-Mutation-tragende Fliegen im Vergleich zur Wildtypfliege sehr schwach erwies, könnte dies ebenfalls bedeuten, dass das veränderte oder fehlende *Gdap1* zur verminderten Bindung oder Wirkungsfähigkeit des CMS121 führt.

Ursächlich für die Wirkungslosigkeit von J147 und CMS121 auf *Gdap1*-Knockdown- oder R161H-Mutation-tragende Fliegenlinien könnte z.B. der verminderte Eintritt des Stoffes in das Mitochondrium durch dessen veränderte Morphologie sein. Auch Veränderungen im Stoffwechsel, die bereits in Kapitel 5.3 erörtert wurden, könnten ein Grund für den Wirkungsverlust sein. Ein Knockdown des *GDAP1* führt am Zellmodell zu einer verminderten Funktionsfähigkeit des PDC (Wolf et al., 2021) und erhöht dadurch die Konzentration von Pyruvat. Die Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase I durch J147 bzw. CMS121 führt währenddessen zur Akkumulation von Acetyl-CoA (Currais et al., 2019), welches aus Pyruvat hergestellt wird. Somit könnte die erhöhte Acetyl-CoA Konzentration die Erhöhung der Pyruvatkonzentration verstärken und die Zelle damit weiter schädigen.

Der hemmende Effekt von J147 und CMS121 auf die Acetyl-CoA-Carboxylase I könnte nicht nur durch Erhöhung von Acetyl-CoA die Zelle beschädigen, sondern diese auch bei anderen Stoffwechselwegen einschränken. *Gdap1*-Knockdown-Fliegen sind aufgrund der beeinträchtigten Funktion des PDC auf andere Stoffwechselwege angewiesen, wozu unter anderem die Energiegewinnung aus Fettsäuren durch β -Oxidation gehört (Wolf et al., 2021). J147 und CMS121 senken die Konzentration der Fettsäuren ebenfalls durch die hemmende Wirkung auf die Acetyl-CoA-Carboxylase I, das Schrittmacherenzym der Fettsäure-Biosynthese (siehe Abbildung 8). Die niedrige Fettsäure-Konzentration durch verstärkte β -Oxidation und zusätzliche Hemmung der Fettsäure-Biosynthese könnte für die Fruchtfliege schädlich sein.

Zusammenfassend wirken J147 und CMS121 zwar auf Wildtypfliegen lebensverlängernd, wiesen in dieser Arbeit jedoch keine positiven Effekte auf CMT4A-Fliegenmodelle auf.

Die Möglichkeit der Modulation des Energiestoffwechsels scheint jedoch bei einer Therapie der CMT4A-Patienten aufgrund der gehemmten PDC und Pyruvatkinase durch GDAP1-Funktionsverlust vielversprechend zu sein. Stoffe, die die Zelle bei der Energiegewinnung aus Fettsäuren und Glutamin unterstützen, könnten im Gegensatz zu J147 und CMS121 positive Wirkungen zeigen und bedürfen weiterer Forschung.

6 Zusammenfassung

Die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit ist mit einer Häufigkeit von 1:2500 die häufigste vererbte Neuropathie (Skre, 1974). CMT4A ist eine überwiegend rezessiv vererbte Unterform, die durch Mutationen des *GDAP1* und dem damit einhergehenden Funktionsverlust des Proteins entsteht (Pedrola et al., 2005).

GDAP1 ist ein mitochondrialer Fissionsfaktor, dessen genaue Wirkungsweise bisher nicht genau bekannt ist. Ein äquivalentes Protein ist in *Drosophila melanogaster* vorhanden und wird als Gdap1 bezeichnet (Marco, Cuesta, Pedrola, Palau, & Marín, 2004). Das Protein BNIP3 ist bei der Aktivierung des Zelltodes und der Autophagie beteiligt (Velde et al., 2000; Kim, Cho, Ha, & Park, 2002; Daido et al., 2004). Bisherige Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe geben Hinweise auf eine funktionelle Verbindung zwischen BNIP3 und GDAP1 (unpublizierte Daten).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster* zur weiteren Analyse der Funktionen des Gdap1 und BNIP3 in verschiedenen Geweben sowie der Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen.

Es konnte validiert werden, dass Gdap1 besonders in Neuronen, aber auch in anderen Geweben wie Muskelzellen eine wichtige Rolle spielt und die muskuläre Funktion unterstützt. Es fördert die mitochondriale ATP-Produktion, kann vor ER-Stress sowie ROS schützen und beeinflusst den Energiestoffwechsel. BNIP3 scheint ein essentielles Protein zu sein, um die Zelle vor Verlust des Gdap1 zu schützen und wird bei neuronalem Gdap1-Verlust hochreguliert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden *Gdap1*-Knockout-Fliegenmodelle mit verschiedenen Mutationen des humanen *GDAP1* untersucht. Unter den Mutationen R161H, P153L, P274L und R120W führte besonders die erstgenannte zu einem ausgeprägten Phänotyp und es konnten dessen negative Einflussnahme auf Lebensspanne, muskuläre Funktion und Energiestoffwechsel nachgewiesen werden. Zuletzt wurden in dieser Arbeit potenzielle Therapiemöglichkeiten für CMT4A-Patienten erörtert, indem die Wirkstoffe J147 und CMS121 getestet wurden und der Einfluss der Nahrung auf das Fliegenmodell analysiert wurde. Während J147 und CMS121 an Wildtypfliegen eine bereits bekannte lebensverlängernde Wirkung aufzeigten, stellte sich diese an CMT4A-Fliegenmodellen nicht heraus. Da sich jedoch Veränderungen der Lebensspanne durch unterschiedliche Ernährung ergaben, scheinen Modulationen im Energiestoffwechsel eine potenzielle Therapieoption für CMT4A-Patienten zu sein.

Literaturverzeichnis

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., . . . George, R. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, *287*(5461), S. 2185-2195.
- Ates, G., Goldberg, J., Currais, A., & Maher, P. (2020). CMS121, a fatty acid synthase inhibitor, protects against excess lipid peroxidation and inflammation and alleviates cognitive loss in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Redox biology*, *36*, S. 101648.
- Auer-Grumbach, M., Fischer, C., Papić, L., John, E., Plecko, B., Bittner, R. E., . . . Janecke, A. R. (2008). Two novel mutations in the GDAP1 and PRX genes in early onset Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Neuropediatrics*, *39*(1).
- Baena-Lopez, L. A., Alexandre, C., Mitchell, A., Pasakarnis, L., & Vincent, J. P. (2013). Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development*, *140*(23), S. 4818-4825.
- Balaban, & S., R. (2002). Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *34*(10), S. 1259-1271.
- Barneo-Muñoz, M., Juárez, P., Civera-Tregón, A., Yndriago, L., Pla-Martin, D., Zenker, J., . . . Palau, F. (2015). Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genetics*, *11*(4), S. e1005115.
- Baxter, R. V., Othmane, K. B., Rochelle, J. M., Stajich, J. E., Hulette, C., Dew-Knight, S., . . . Vance, J. M. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nature genetics*, *30*(1), S. 21-22.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology*, *29*(10), S. 2570-2581.
- Binięda, K., Rzepnikowska, W., Kolakowski, D., Kaminska, J., Szczepankiewicz, A. A., Nieznańska, H., . . . Kabzińska, D. (2021). Mutations in GDAP1 Influence Structure and Function of the Trans-Golgi Network. *International journal of molecular sciences*, *22*(2), S. 914.
- Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M. J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S. A. (2003). Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Current opinion in cell biology*, *15*(6), S. 706-716.
- Boyd, J. M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L. K., Schaeper, U., Elangovan, B., . . . Chinnadurai, G. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell*, *79*(2), S. 341-351.

- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(4), S. C817-C833.
- Cantarero, L., Juárez-Escoto, E., Civera-Tregón, A., Rodríguez-Sanz, M., Roldán, M., Benítez, R., . . . Palau, F. (2020). Mitochondria-lysosome membrane contacts are defective in GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Human molecular genetics*, 29(22), S. 3589-3605.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Bonneau, D., Verny, C., Procaccio, V., Reynier, P., & Ferré, M. (2011). A locus-specific database for mutations in GDAP1 allows analysis of genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth diseases type 4A and 2K. *Orphanet journal of rare diseases*, 6(1), S. 1-8.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Codron, P., Goizet, C., Gueguen, N., Verny, C., . . . Procaccio, V. (2020). Oxidative stress contributes differentially to the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2K. *Experimental neurology*, 323, S. 113069.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Malinge, M. C., Letournel, F., Nicolas, G., . . . Reynier, P. (2009). Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics*, 10(2), S. 145-150.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, S. 79-99.
- Charcot, J. M., & Marie, P. (1886). Sur une forme particuliere d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, debutante par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Med Parie*, 6, S. 97-138.
- Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R. C., . . . Greenberg, A. H. (1997). The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 186(12), S. 1975-1983.
- Chen, Q., Prior, M., Dargusch, R., Roberts, A., Riek, R., Eichmann, C., . . . Schubert, D. (2011). A novel neurotrophic drug for cognitive enhancement and Alzheimer's disease. *PloS one*, 6(12), S. e27865.
- Chung, K. W., Kim, S. M., Sunwoo, I. N., Cho, S. Y., Hwang, S. J., Kim, J., . . . Choi, B. O. (2008). A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of human genetics*, 53(4), S. 360-364.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), S. 1047-1058.
- Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., de Munain, A. L., Berciano, J., Cuesta, A., . . . Palau, F. (2005). Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *Journal of medical genetics*, 42(4), S. 358-365.
- Crimella, C., Tonelli, A., Airoidi, G., Baschiroto, C., d'Angelo, M. G., Bonato, S., . . . Bassi, M. T. (2010). The GST domain of GDAP1 is a frequent target of

- mutations in the dominant form of axonal Charcot Marie Tooth type 2K. *Journal of medical genetics*, 47(10), S. 712-716.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., . . . Palau, F. (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nature genetics*, 30(1), S. 22-25.
- Currais, A., Goldberg, J., Farrokhi, C., Chang, M., Prior, M., Dargusch, R., . . . Schubert, D. (2015). A comprehensive multiomics approach toward understanding the relationship between aging and dementia. *Aging (Albany NY)*, 7(11), S. 937.
- Currais, A., Huang, L., Goldberg, J., Petrascheck, M., Ates, G., Pinto-Duarte, A., & Maher, P. (2019). Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging. *Elife*, 8, S. e47866.
- Daido, S., Kanzawa, T., Yamamoto, A., Takeuchi, H., Kondo, Y., & Kondo, S. (2004). Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer research*, 64(12), S. 4286-4293.
- Dubourg, O., Tardieu, S., Birouk, N., Gouider, R., Léger, J. M., Maisonobe, T., . . . LeGuern, E. (2001). The frequency of 17p11. 2 duplication and Connexin 32 mutations in 282 Charcot-Marie-Tooth families in relation to the mode of inheritance and motor nerve conduction velocity. *Neuromuscular Disorders*, 11(5), S. 458-463.
- Dyck, P. J. (1993). Hereditary motor and sensory neuropathies. *Peripheral neuropathy*, S. 1094-1136.
- Dyck, P. J., & Lambert, E. H. (1968a). Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Archives of neurology*, 18(6), S. 603–618.
- Dyck, P. J., & Lambert, E. H. (1968b). Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Archives of neurology*, 18(6), S. 619–625.
- Eijkenboom, I., Vanoevelen, J. M., Hoeijmakers, J. G., Wijnen, I., Gerards, M., Faber, C. G., & Smeets, H. J. (2019). A zebrafish model to study small-fiber neuropathy reveals a potential role for GDAP1. *Mitochondrion*, 47, S. 273-281.
- Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P., & Grotewiel, M. S. (2005). Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental gerontology*, 40(5), S. 386-395.
- Goldberg, J., Currais, A., Prior, M., Fischer, W., Chiruta, C., Ratliff, E., . . . Schubert, D. (2018). The mitochondrial ATP synthase is a shared drug target for aging and dementia. *Aging cell*, 17(2), S. e12715.

- González-Sánchez, P., Satrustegui, J., Palau, F., & Del Arco, A. (2019). Calcium deregulation and mitochondrial bioenergetics in GDAP1-related CMT disease. *International journal of molecular sciences*, 20(2), S. 403.
- Googins, M. R., Woghiren-Afegbua, A. O., Calderon, M., St. Croix, C. M., Kiselyov, K. I., & VanDemark, A. P. (2020). Structural and functional divergence of GDAP1 from the glutathione S-transferase superfamily. *The FASEB Journal*, 34(5), S. 7192-7207.
- Hanna, R. A., Quinsay, M. N., Orogo, A. M., Giang, K., Rikka, S., & Gustafsson, Å. B. (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), S. 19094-19104.
- Hansford, R. G., & Zorov, D. (1998). Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Molecular and cellular biochemistry*, 184(1), S. 359-369.
- Harding, A. E., & Thomas, P. K. (1980a). The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain: a journal of neurology*, 103(2), S. 259-280.
- Harding, A. E., & Thomas, P. K. (1980b). Hereditary distal spinal muscular atrophy. A report on 34 cases and a review of the literature. *Journal of the neurological sciences*, 45(2-3), S. 337-348.
- Huber, N., Bieniossek, C., Wagner, K. M., Elsässer, H. P., Suter, U., Berger, I., & Niemann, A. (2016). Glutathione-conjugating and membrane-remodeling activity of GDAP1 relies on amphipathic C-terminal domain. *Scientific reports*, 6, S. 36930.
- Huber, N., Guimaraes, S., Schrader, M., Suter, U., & Niemann, A. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO reports*, 14(6), S. 545-552.
- Kabzińska, D., N., A., D., H., H. N., Potulska-Chromik, A., Hausmanowa-Petrusewicz, I., . . . Kocharński, A. (2011). A new missense GDAP1 mutation disturbing targeting to the mitochondrial membrane causes a severe form of AR-CMT2C disease. *Neurogenetics*, 12(2), S. 145-153.
- Kabzińska, D., Saifi, G. M., Drac, H., Rowińska-Marcińska, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Kocharński, A., & Lupski, J. R. (2007). Charcot-Marie-Tooth disease type 4C4 caused by a novel Pro153Leu substitution in the GDAP1 gene. *Acta Myologica*, 26(2), S. 108.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I. M., Kondo, Y., & Kondo, S. (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*, 24(6), S. 980-991.
- Kasahara, A., & Scorrano, L. (2014). Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends in cell biology*, 24(12), S. 761-770.

- Kepchia, D., Currais, A., Dargusch, R., Finley, K., Schubert, D., & Maher, P. (2021). Geroprotective effects of Alzheimer's disease drug candidates. *Aging (Albany NY)*, 13(3), S. 3269.
- Kim, J. Y., Cho, J. J., Ha, J., & Park, J. H. (2002). The carboxy terminal C-tail of BNip3 is crucial in induction of mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 398(2), S. 147-152.
- Kubli, D. A., Quinsay, M. N., Huang, C., Lee, Y., & Gustafsson, A. B. (2008). Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295(5), S. H2025-H2031.
- Kushnareva, Y., Murphy, A. N., & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD (P)⁺ oxidation–reduction state. *Biochemical Journal*, 368(2), S. 545-553.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), S. 680-685.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., & Robinson, J. P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), S. 8516-8525.
- Lieber, T., Jeedigunta, S. P., Palozzi, J. M., Lehmann, R., & Hurd, T. R. (2019). Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. *Nature*, 570(7761), S. 380-384.
- Liu, H., Nakagawa, T., Kanematsu, T., Uchida, T., & Tsuji, S. (1999). Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *Journal of neurochemistry*, 72(5), S. 1781-1790.
- López Del Amo, V., Palomino-Schätzlein, M., Seco-Cervera, M., García-Giménez, J. L., Pallardó, F. V., Pineda-Lucena, A., & Galindo, M. I. (2017). A Drosophila model of GDAP1 function reveals the involvement of insulin signalling in the mitochondria-dependent neuromuscular degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(3), S. 801-809.
- López Del Amo, V., Seco-Cervera, M., García-Giménez, J. L., Whitworth, A. J., Pallardó, F. V., & Galindo, M. I. (2015). Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: implications for the Charcot–Marie–Tooth neuropathy. *Human molecular genetics*, 24(1), S. 21-36.
- Manganelli, F., Tozza, S., Pisciotta, C., Bellone, E., Iodice, R., Nolano, M., . . . Santoro, L. (2014). Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a Southern Italy population. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 19(4), S. 292-298.
- Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., & Marín, I. (2004). Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease,

- characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Molecular biology and evolution*, 21(1), S. 176-187.
- Morena, J., Gupta, A., & Hoyle, J. C. (2019). Charcot-marie-tooth: from molecules to therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(14), S. 3419.
- Morgan, T. H. (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32(812), S. 120-122.
- Nelis, E., Erdem, S., Van den Bergh, P. Y., Belpaire–Dethiou, M. C., Ceuterick, C., Van Gerwen, V., . . . Verellen, C. (2002). Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology*, 59(12), S. 1865-1872.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., & Suter, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *The Journal of cell biology*, 170(7), S. 1067-1078.
- Niemann, A., Wagner, K. M., Ruegg, M., & Suter, U. (2009). GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiology of disease*, 36(3), S. 509-520.
- Noack, R., Frede, S., Albrecht, P., Henke, N., Pfeiffer, A., Knoll, K., . . . Summer, H. (2012). Charcot–Marie–Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Human molecular genetics*, 21(1), S. 150-162.
- Pareyson, D., & Marchesi, C. (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot–Marie–Tooth disease. *The Lancet Neurology*, 8(7), S. 654-667.
- Pareyson, D., Scaiola, V., & Laura, M. (2006). Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine*, 8(1), S. 3-22.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M. E., & Palau, F. (2005). GDAP1, the protein causing Charcot–Marie–Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Human molecular genetics*, 14(8), S. 1087-1094.
- Pla-Martín, D., Rueda, C. B., Estela, A., Sánchez-Piris, M., González-Sánchez, P., Traba, J., . . . Satrústegui, J. (2013). Silencing of the Charcot–Marie–Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiology of disease*, 55, S. 140-151.
- Prior, M., Chiruta, C., Currais, A., Goldberg, J., Ramsey, J., Dargusch, R., . . . Schubert, D. (2014). Back to the future with phenotypic screening. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(7), S. 503-513.
- Prior, M., Dargusch, R., Ehren, J. L., Chiruta, C., & Schubert, D. (2013). The neurotrophic compound J147 reverses cognitive impairment in aged Alzheimer's disease mice. *Alzheimer's research & therapy*, 5(3), S. 1-19.

- Prokop, A., & Root, J. (2013). A rough guide to *Drosophila* mating schemes. *J. Root & A. Prokop (Eds.) G*, 3, S. 353-358.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome research*, 11(6), S. 1114-1125.
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 234(4774), S. 364-368.
- Rovenko, B. M., Kubrak, O. I., Gospodaryov, D. V., Perkhulyn, N. V., Yurkevych, I. S., Sanz, A., . . . Lushchak, V. I. (2015). High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, S. 42-54.
- Rzepnikowska, W., & Kochanski, A. (2018). A role for the GDAP1 gene in the molecular pathogenesis of Charcot Marie Tooth disease. *Acta Neurobiol. Exp*, 78, S. 1-13.
- Schröder, J. M. (2006). Neuropathology of Charcot-Marie-Tooth and related disorders. *Neuromolecular medicine*, 8(1), S. 23-42.
- Senderek, J., Bergmann, C., Ramaekers, V. T., Nelis, E., Bernert, G., Makowski, A., . . . Schröder, J. M. (2003). Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, 126(3), S. 642-649.
- Sevilla, T., Cuesta, A., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., Pedrola, L., Palau, F., & Vílchez, J. J. (2003). Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain*, 126(9), S. 2023-2033.
- Shield, A. J., Murray, T. P., & Board, P. G. (2006). Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochemical and biophysical research communications*, 347(4), S. 859-866.
- Sivera, R., Espinós, C., Vílchez, J. J., Mas, F., Martínez-Rubio, D., Chumillas, M. J., . . . Sevilla, T. (2010). Phenotypical features of the p. R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *15(4)*, S. 334-344.
- Skre, H. (1974). Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clinical genetics*, 6(2), S. 98-118.
- Thomas, P. K., Calne, D. B., & Stewart, G. (1974). Hereditary motor and sensory polyneuropathy (peroneal muscular atrophy). *Annals of human genetics*, 38(2), S. 111-153.
- Timmerman, V., Strickland, A. V., & Züchner, S. (2014). Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease within the frame of the human genome project success. *Genes*, 5(1), S. 13-32.

- Tkacz, J. S., & Lampen, J. O. (1975). Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. *Biochemical and biophysical research communications*, 65(1), S. 248-257.
- Tooth, H. H. (1886). The peroneal type of progressive muscular atrophy. *London: Lewis*.
- Vasagiri, N., & Kutala, V. K. (2014). Structure, function, and epigenetic regulation of BNIP3: a pathophysiological relevance. *Molecular biology reports*, 41(11), S. 7705-7714.
- Velde, C. V., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., . . . Greenberg, A. H. (2000). BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular and cellular biology*, 20(15), S. 5454-5468.
- Wagner, K. M., Rüegg, M., Niemann, A., & Suter, U. (2009). Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS one*, 4(4), e5160., 4(4), S. e5160.
- White-Cooper, H., Leroy, D., MacQueen, A., & Fuller, M. T. (2000). Transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes depends on a conserved chromatin associated protein, whose nuclear localisation is regulated. *Development*, 127(24), S. 5463-5473.
- Wolf, C., Pouya, A., Bitar, S., Pfeiffer, A., Bueno, D., Arndt, S., . . . Methner, A. (2021). GDAP1 loss of function inhibits the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex by altering the actin cytoskeleton. *bioRxiv*.
- Yasuda, M. T. (1998). Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), S. 12415-12421.
- Yasuda, M., Theodorakis, P., Subramanian, T., & Chinnadurai, G. (1998). Adenovirus E1B-19K/BCL-2 interacting protein BNIP3 contains a BH3 domain and a mitochondrial targeting sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), S. 12415-12421.
- Zhang, J., & Ney, P. A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death & Differentiation*, 16(7), S. 939-946.
- Zhang, T., Xue, L., Li, L., Tang, C., Wan, Z., Wang, R., . . . Zhang, Z. (2016). BNIP3 protein suppresses PINK1 kinase proteolytic cleavage to promote mitophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 291(41), S. 21616-21629.
- Zimoń, M., Baets, J., Fabrizi, G. M., Jaakkola, E., Kabzińska, D., Pilch, J., . . . Jordanova, A. (2011). Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology*, 77(6), S. 540-548.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei [REDACTED] bedanken, der mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu erarbeiten und mich währenddessen stets gefördert und unterstützt hat.

Des Weiteren danke ich [REDACTED] für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der [REDACTED], die mich herzlich in ihr Team aufgenommen haben und mir bei Fragen immer geholfen haben. Ein besonderer Dank geht an [REDACTED], ohne deren außerordentliche Unterstützung diese Arbeit nicht gelungen wäre. Sie hat mich ausführlich und mit viel Geduld in die Arbeit mit Fruchtfliegen eingearbeitet und mich jederzeit bei meiner Arbeit unterstützt. Vielen Dank für die zahlreichen Erklärungen, Tipps und Antworten auf meine Fragen zu jeder Tageszeit und auch am Wochenende.

Ebenfalls danke ich meinem Partner, meinen Freunden und Kommilitonen, die während meiner Arbeit immer ein offenes Ohr für mich hatten und für Ausgleich gesorgt haben.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während meines gesamten Studiums jederzeit unterstützt und an mich geglaubt hat.

Lebenslauf

Janina Kopetzky

*13.01.1998 in 64823 Groß-Umstadt

Bildungsweg

04/2017 – 05/2024

Studium der Humanmedizin

Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

05/2024: 3. Staatsexamen, Note: 1,0

04/2023: 2. Staatsexamen, Note: 2,0

09/2019: 1. Staatsexamen, Note: 2,0

08/2016 – 11/2016

Ausbildung Bankkauffrau

Stadt- und Kreissparkasse Darmstadt

06/2016

Abitur

Schulzentrum Marienhöhe, Darmstadt

Note: 1,1

Wissenschaftliches Engagement

09/2024

Promotion

„Die Rolle von GDAP1 und BNIP3 bei der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 4A am Modell der *Drosophila melanogaster*“

Institut für Molekulare Medizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, betreut von

Berufliche Erfahrungen

01/2019 – 12/2022

Werkstudentin

Merck Healthcare Germany GmbH,
Weiterstadt

07/2018 – 12/2018

Studentische Aushilfe

Staples, Darmstadt

2011 – 2019

Nachhilfe in Mathematik und Englisch

Praktika und Famulaturen

05/2023-05/2024

Praktisches Jahr

3. Terial: Innere Medizin, Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden

2. Terial: Wahlfach Radiologie, St. Josefs-Hospital Wiesbaden

1. Terial: Chirurgie, Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden

08/2022

Famulatur

Hautklinik, Klinikum Darmstadt

09/2021

Famulatur

Klinik für Radiologie, KBC Split, Kroatien

03/2021

Famulatur

Klinik für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie, Kreisklinik Groß-Umstadt

08/2020

Famulatur

Hausarztpraxis [REDACTED], Roßdorf

08/2017 – 09/2017

Pflegepraktikum

Agaplesion Elisabethenstift Darmstadt

01/2017 – 03/2017

Pflegepraktikum

Klinikum Darmstadt

Sprachkenntnisse

Deutsch – Muttersprache

Englisch – fließend

Latein - Latinum