

Charakterisierung des Lipidtröpfchen-assoziierten Proteins CG9186

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Werthebach

aus Siegen

Düsseldorf

Dezember 2017

aus dem Institut für Mathematische Modellierung Biologischer Systeme / Systembiologie
des Fettstoffwechsels der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller
2. Prof. Dr. Markus Kollmann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Energiehomöostase	6
1.2	Regulation des Energie-Stoffwechsels	7
1.3	<i>Drosophila melanogaster</i> in der metabolischen Forschung	8
1.4	Lipid Droplets (LDs)	10
1.5	Das <i>Drosophila</i> Protein CG9186	12
1.5.1	CG9186 ist eine evolutionär konservierte annotierte Lipase	13
1.5.2	CG9186 lokalisiert im ER und auf den LDs	14
1.5.3	Überexpression von CG9186 führt zur Aggregation von LDs	15
1.5.4	CG9186 Homologe in Maus und Mensch	17
1.5.4.1	<i>Mouse lipid droplet associated hydrolase</i> (mLDAH)	17
1.5.4.2	Das humane CG9186 Homolog C2orf43	18
1.6	Ziele dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien, Lösungen und Puffer	20
2.1.2	Kits	24
2.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe	24
2.1.4	Oligonukleotide	25
2.1.5	Plasmide	28
2.1.6	Antikörper	30
2.1.7	Nährmedien	31
2.1.8	Zelllinien	33
2.1.9	Fliegenlinien	33
2.1.10	Geräte	34
2.1.11	Software	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Molekularbiologische und genetische Methoden	36
2.2.1.1	Herstellung komplementärer DNA (cDNA)	36
2.2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	36
2.2.1.3	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	37
2.2.1.4	Gateway™ Klonierung	37
2.2.1.5	Gen-Synthese	38
2.2.1.6	Transformation chemisch kompetenter Zellen	38
2.2.1.7	Extraktion genomischer DNA	38
2.2.1.8	Sequenzierung von DNA	38
2.2.1.9	Herstellung von CG9186 Nullallelen mittels CRISPR/Cas9	39
2.2.2	Biochemische Methoden	40
2.2.2.1	Messung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay	40
2.2.2.2	Messung von Triacylglycerolen (TAGs)	41
2.2.2.3	Messung von Glukose (Glu) und Glykogen (Gly)	41

2.2.2.4	Messung von Trehalose (Tre)	42
2.2.2.5	Cholesterol- und Cholesterolester-Messungen.....	43
2.2.2.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.2.2.7	Western Blot	45
2.2.2.8	Markierung und Aufreinigung aktiver Serin-Hydrolasen.....	45
2.2.2.9	Co-Immunpräzipitation	46
2.2.2.10	Massenspektrometrie	47
2.2.2.11	Herstellung delipidierter Hefe	47
2.2.2.12	Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie (TLC)	47
2.2.2.13	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBA-RS).....	48
2.2.2.14	Luciferase Komplementations-Experimente	49
2.2.3	Histologische Methoden und Mikroskopie.....	49
2.2.3.1	Herstellung von Präparaten aus Zellkulturzellen.....	49
2.2.3.2	Herstellung von Organpräparaten	50
2.2.3.3	Vermessung von Larven	50
2.2.3.4	Automatisierte Mikroskopie und Bildsegmentierung	50
2.2.4	Zellkultur	50
2.2.4.1	Kultivierung von <i>Drosophila</i> Zelllinien	50
2.2.4.2	Kultivierung von Säuger-Zelllinien	51
2.2.4.3	Transiente Transfektion.....	51
2.2.4.4	Herstellung stabil transfizierter polyklonaler Zelllinien.....	51
2.2.4.5	RNA Interferenz (RNAi) in Zellkulturzellen.....	52
2.2.5	Fliegentechniken	53
2.2.5.1	Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	53
2.2.5.2	Versuche zur Lebensspanne.....	53
2.2.5.3	Messung der Sensitivität adulter Tiere gegenüber oxidativem Stress.....	54
2.2.5.4	Messung der Sensitivität adulter Tiere gegenüber Hunger und Dehydration ..	55
2.2.5.5	Quantifizierung von Eiablage und Schlupfrate	55
2.2.5.6	Analyse der larvalen Entwicklung	55
2.2.5.7	Quantifizierung der Futteraufnahme	56
2.2.6	Bioinformatik und Statistik.....	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Die enzymatische Aktivität von CG9186	57
3.2	Interaktionspartner von CG9186	64
3.2.1	Identifikation von CG9186 Interaktionspartnern über Co-Immunpräzipitation	64
3.2.2	Bestätigung der identifizierten Protein-Protein Interaktionen	69
3.2.3	Lokalisation der Interaktoren in <i>Drosophila</i> Kc167 Zellen.....	71
3.2.4	Einfluss der Interaktoren auf die CG9186 induzierte LD-Aggregation	74
3.3	Ubiquitinierung von CG9186.....	80
3.3.1	Nachweis der Ubiquitinierung von CG9186	80
3.3.2	Bedeutung der Ubiquitinierung bei der CG9186 induzierten LD-Aggregation....	82
3.4	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Funktion von CG9186	88
3.4.1	Generierung von CG9186 Nullallelen mittels CRISPR/Cas9	88
3.4.2	Effekte des CG9186-Verlustes auf adulte Tiere	91
3.4.2.1	CG9186 beeinflusst die Lipidspeicher	91

3.4.2.2	Der Verlust von CG9186 verkürzt die Lebensspanne von Männchen.....	95
3.4.2.3	Der Verlust von CG9186 beeinflusst die Stressresistenz der Tiere.....	98
3.4.3	CG9186 und die Larvale Entwicklung	105
3.4.3.1	CG9186 beeinflusst larvale Speicheldrüsen-Lipid Droplets	105
3.4.3.2	CG9186 beeinflusst futterabhängig die larvale Entwicklung	106
3.4.3.3	CG9186 mutante Tiere zeigen Veränderungen im Insulin-Signalweg.....	111
4	Diskussion	114
4.1	Die enzymatische Funktion von CG9186	114
4.2	Interaktionspartner von CG9186	119
4.2.1	Hemomucin (Hmu).....	121
4.2.2	Glycoprotein 93 (Gp93)	123
4.2.3	Cytochrome P450 reductase (Cpr)	125
4.2.4	PDGF- and VEGF-receptor related (PVR)	126
4.3	Ubiquitinierung von CG9186.....	129
4.4	Generierung und Analyse einer CG9186 <i>loss-of-function</i> Mutante.....	133
4.4.1	CG9186 Verlust in adulten Tieren.....	134
4.4.1.1	CG9186 mutante Fliegen weisen niedrigere Lipid-Spiegel auf	134
4.4.1.2	CG9186 beeinflusst geschlechtsspezifisch die Lebensspanne	137
4.4.1.3	CG9186 beeinflusst die Stressresistenz männlicher und weiblicher Fliegen.....	141
4.4.2	CG9186 Verlust und die larvale Entwicklung	142
4.4.2.1	CG9186 mutante Larven weisen keine veränderten Lipid-Spiegel auf.....	142
4.4.2.2	CG9186 beeinflusst Nährstoffabhängig die larvale Entwicklung	143
4.4.2.3	CG9186 und <i>target of brain insulin (tobi)</i>	144
4.5	Ausblick	146
5	Zusammenfassung	147
6	Anhang	150
	Abkürzungsverzeichnis.....	167
	Literaturverzeichnis.....	169
	Danksagungen	185
	Vorveröffentlichungen der Dissertation.....	186
	Eidesstattliche Erklärung.....	187

1 Einleitung

1.1 Energiehomöostase

Eine Notwendigkeit des Lebens und damit eine Gemeinsamkeit aller Organismen ist die Fähigkeit, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Lehrbuch Campbell und Reece, 2009). Hierfür werden sowohl äußere als auch innere Reize wahrgenommen und prozessiert, um eine der neuen Situation angemessene Reaktion einleiten zu können. Benötigt ein Organismus zum Beispiel Energie für Wachstum, Fortpflanzung und die Aufrechterhaltung seiner Funktion, wird er danach streben Nährstoffe aufzunehmen. Er steht dabei vor der Herausforderung, dass Nährstoffangebot und -bedarf selten genau übereinstimmen. Um also langfristig eine ausgeglichene Energiebilanz zu gewährleisten, müssen Lebewesen in Zeiten hohen Nahrungsangebots zusätzliche Energie speichern, auf die sie in Mangelsituationen zurückgreifen können. Dieses regulierte Wechselspiel aus Energieverbrauch, -aufnahme und -speicherung wird als Energiehomöostase bezeichnet (Übersichtsartikel Nadal *et al.*, 2017). Häufig werden für die Speicherung von Energie parallel Verbindungen unterschiedlicher chemischer Klassen genutzt. Betrachtet man einen durchschnittlichen Mann, wie er in ernährungswissenschaftlichen Fachbüchern definiert ist, speichert dieser bei einem Körpergewicht von 75 kg insgesamt 450 g Kohlenhydrate in der Leber und den Muskeln (hauptsächlich in Form des Polysaccharids Glykogen). Bei völlig ausbleibender Nahrungszufuhr würde die hier gespeicherte Energie weniger als einen Tag ausreichen, um den Bedarf zu decken (Lehrbuch Elmadfa und Leitzmann, 2004). Quantitativ bedeutender ist die Einlagerung von Lipiden in Form von Triacylglycerolen (TAGs) in die Adipozyten des weißen Fettgewebes (Übersichtsartikel Luo und Liu, 2016). Mit einer durchschnittlichen Menge von 9.000 g liefern diese Lipide fast 50-mal mehr Energie als das gespeicherte Glykogen (Lehrbuch Elmadfa und Leitzmann, 2004). Da der Mensch auch Aminosäuren zur Energiegewinnung nutzt, können im Bedarfsfall körpereigene Proteine (z.B. aus dem Muskelgewebe) abgebaut und verstoffwechselt werden. Hierbei handelt es sich aber nicht um einen Energiespeicher im klassischen Sinn, da die genutzten Proteine primär eine andere Funktion als die der Energiebereitstellung besitzen (Lehrbuch Voet *et al.*, 2008). Die Fähigkeit, unterschiedliche Substrate zur Energiegewinnung nutzen zu können, verschafft dem Organismus größere Flexibilität bei der Verwertung chemisch komplexer Nahrung. Gleichzeitig erhöht sich allerdings die Anzahl und Komplexität der benötigten Stoffwechselwege und damit die Notwendigkeit einer engen Regulation.

1.2 Regulation des Energie-Stoffwechsels

Der Stoffwechsel lässt sich in aufbauende (anabole) und abbauende (katabole) Prozesse unterteilen. Selbst einfachste Organismen wie Hefezellen müssen diese gegenläufigen Stoffwechselwege eng regulieren, um eine flexible Anpassung an veränderte intrinsische und extrinsische Bedingungen zu gewährleisten (Übersichtsartikel Saldanha *et al.*, 2004). Noch komplizierter stellt sich die Situation in mehrzelligen Organismen dar. Hier müssen spezialisierte Zellen und Gewebe untereinander Informationen austauschen. Darüber hinaus unterscheiden sich viele Gewebe und Organe im Hinblick auf ihren Energiestoffwechsel. Das menschliche Gehirn z.B. metabolisiert bevorzugt Glukose und stellt seinen Stoffwechsel erst nach längerem Glukosemangel auf Ketonkörper um. Das Muskelgewebe nutzt neben Glukose auch Fettsäuren zur Energiegewinnung. Im Hinblick auf die Energiehomöostase des Menschen ist der Regelkreis aus Insulin- und Glucagon-Signalwegen integral (Lehrbuch Löffler *et al.*, 2007). Wird Nahrung aufgenommen, führt die steigende Glukosekonzentration im Blut zur Ausschüttung von Insulin durch die Beta-Zellen des Pankreas. Insulin induziert die Aufnahme der zirkulierenden Glukose in die Zellen des Muskelgewebes und der Adipozyten. Gleichzeitig inhibiert es die Glukoneogenese (Synthese von Glukose z.B. aus Pyruvat) und Glykogenolyse (Abbau von Glykogen zur Gewinnung von Glukose) in der Leber. Die in die Zellen aufgenommene Glukose kann nun zur Bildung von Energiespeichern in Form von Glykogen (in Muskelzellen) oder TAGs (in Adipozyten) genutzt werden (Lehrbuch Voet *et al.*, 2008). Als Gegenspieler von Insulin gilt das Hormon Glucagon. Sinkt die Blutglukosekonzentration, führt die Ausschüttung von Glucagon zu einer gesteigerten Glykogenolyse und Lipolyse und damit zur Freisetzung von Glukose und freien Fettsäuren als Energiesubstrate (Lehrbuch Voet *et al.*, 2008). Über Insulin und Glucagon hinaus wird die Energiehomöostase von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dies kann zum Beispiel die Steuerung von Hunger und Sättigung durch Hormone wie Leptin (Zhang *et al.*, 1994) und Ghrelin (Nakazato *et al.*, 2001) oder Neurotransmitter wie Serotonin (Übersichtsartikel Voigt und Fink, 2015) sein. Auch verschiedene Steroid- und Stresshormone beeinflussen die Energiehomöostase (Übersichtsartikel de Guia *et al.*, 2014). Insgesamt handelt es sich um ein komplexes Netzwerk aus Stoffwechsel- und Signaltransduktionskaskaden, deren Fehlregulation drastische gesundheitliche Folgen haben kann. Dies zeigt sich zum Beispiel in der weltweit steigenden Mortalität als Folge des metabolischen Syndroms. Mit diesem Begriff ist das gleichzeitige Vorhandensein von anormalen Blutlipidwerten, Adipositas, hohem Blutdruck und Insulinresistenz gemeint. Das metabolische Syndrom ist der Haupt-Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, der weltweit häufigsten Todesursache (World Health Organization, 2016). Auch Stressresistenz, Entwicklungsprozesse und die Lebensspanne wird durch die Regelkreise beeinflusst, die der Energiehomöostase zugrunde liegen (Enell *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2016). In einer

Vielzahl von Modellorganismen sowie im Menschen wurde zum Beispiel gezeigt, dass eine Drosselung der Nahrungszufuhr (engl.: *dietary restriction*) eine lebensverlängernde Wirkung hat. Wichtige Mediatoren dieses Effektes sind Nährstoff-sensitive Signalwege wie mTOR (engl.: *mechanistic Target Of Rapamycin*) und der Insulin-Signalweg (Übersichtsartikel Kapahi *et al.*, 2016). Aufgrund ihrer physiologischen Bedeutung sind die Komponenten des Energie-Metabolismus Gegenstand intensiver Forschung.

1.3 *Drosophila melanogaster* in der metabolischen Forschung

Viele der im menschlichen Stoffwechsel ablaufenden Prozesse und pathologischen Veränderungen wurden durch Studien an Modellorganismen entschlüsselt. Ein prominentes Beispiel ist die Entdeckung des Hormons Leptin in der Maus (Zhang *et al.*, 1994), durch das ein weiterer Grundstein im Verständnis für die Entstehung von Adipositas gelegt wurde. Neben den Säuger-Modellen wie Maus und Ratte gewinnen Invertebraten wie die Schwarzbäuchige Taufliege (*Drosophila melanogaster*, im Folgenden *Drosophila* genannt) für die metabolische Forschung immer mehr an Bedeutung (z.B. Beshel *et al.*, 2017; Na *et al.*, 2013; Regalado *et al.*, 2017; Stahl *et al.*, 2017). *Drosophila* bietet den Vorteil kurzer Generationszeiten und einfacher Haltung (Übersichtsartikel Hales *et al.*, 2015). Außerdem sind eine Vielzahl genetischer Werkzeuge vorhanden (z.B. Brand und Perrimon, 1993; Kondo und Ueda, 2013). Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Fliege ein offenes Kreislaufsystem, in dem die Hämolymphe die Funktion des Blutes einnimmt. Trotz der geringeren organismischen Komplexität und dem Fehlen von Organen wie dem Pankreas, sind viele Gewebe und Organe vorhanden, die in ähnlicher Form auch im Menschen zu finden sind oder eine zu menschlichen Organen analoge Funktion besitzen (Übersichtsartikel Baker und Thummel, 2007). Der Fettkörper zum Beispiel speichert Lipide und Glykogen, dient aber auch als sekretorisches Organ. Er nimmt eine Funktion ähnlich der Leber und des Fettgewebes ein (Colombani *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005). Wie der Mensch besitzt auch *Drosophila* endokrine Regelmechanismen, um den Stoffwechsel zu steuern. Mit dem Zytokin Unpaired 2 (Upd 2) lässt sich in den Fliegen zum Beispiel ein funktionelles Leptin-Homolog finden (Rajan und Perrimon, 2012). Ein weiteres Beispiel ist das Glucagon-ähnliche adipokinetische Hormon (AKH), welches durch neurosekretorischen Zellen (*Corpora cardiaca*, CC) ausgeschüttet wird (Lee und Park, 2004; Schaffer *et al.*, 1990). Das Modell in Abbildung 1 zeigt wie AKH an der Stoffwechselregulation beteiligt ist. Besteht Nahrungsmangel, führt AKH zur Glykogenolyse und damit zu einem Anstieg der Trehalosekonzentration in der Hämolymphe (Lee und Park, 2004). Wie Glukose beim Menschen, stellt Trehalose in Insekten im Hinblick auf Kohlenhydrat-Verbindungen die

quantitativ bedeutendste Transportform von Energie dar. Neben Trehalose enthält die Hämolymphe aber auch Glukose (Wyatt und Kale, 1957). Fehlen die AKH-sekretierenden Zellen oder das AKH-kodierende Gen, hat dies eine Dysregulation des Glukose- und Lipid-Stoffwechsels sowie eine verminderte Stressresistenz zur Folge (Gáliková *et al.*, 2015; Lee und Park, 2004). Hier zeigen sich deutliche Effekte allerdings nur in den adulten Tieren und nicht während der larvalen und embryonalen Entwicklung (Gáliková *et al.*, 2015).

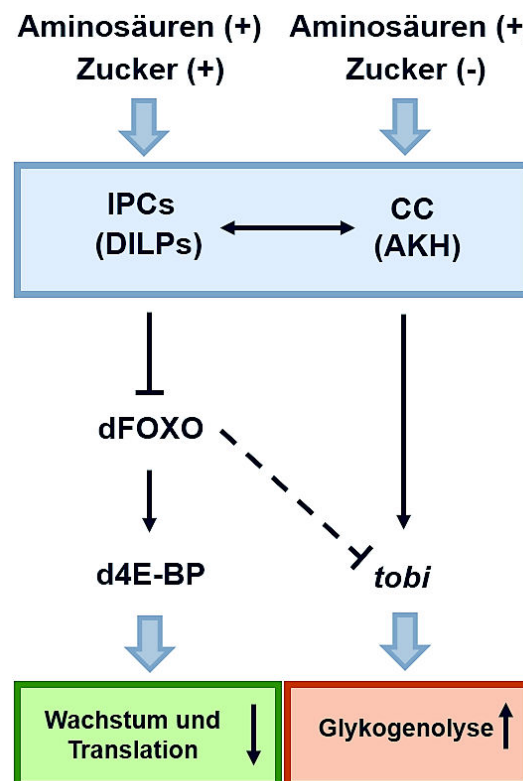


Abbildung 1: Modell des Zusammenspiels der *Drosophila insulin like peptides* (DILPs) mit dem Glucagon-ähnlichen adipokinetischen Hormon (AKH). Dargestellt ist die Reaktion auf veränderte Nahrungsbedingungen am Beispiel der Regulation der alpha-1,4 Glucosidase *target of brain insulin* (*tobi*). Aminosäuren in der Nahrung aktivieren sowohl die Insulin produzierenden Zellen (engl.: *Insulin producing cells*, IPCs) des Gehirns als auch die neurosekretorische *Corpora cardiaca* (CC). IPC-Signale als Reaktion auf eine hohe Zuckerverfügbarkeit hemmen die Aktivität des Transkriptionsfaktors dFOXO und darüber d4E-BP (*thor*). *Thor* ist an der Wachstumsregulation, Stressresistenz und dem Lipid-Metabolismus beteiligt. Ein geringer Zuckergehalt der Nahrung führt über AKH-Signale aus der CC zur Glykogenolyse und damit zur Mobilisierung von Glukose. Die IPC-CC Achse steuert in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Nahrung die Expression von *tobi*. Abbildung in Anlehnung an Buch *et al.* (2008).

Auch der Insulin-Signalweg sowie Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (engl.: *Insulin-like growth factors*, IGFs) finden sich in der Fliege (Abbildung 1). Insgesamt gibt es acht Insulin-ähnliche Peptide (engl.: *Drosophila Insulin-like Peptides*, DILPs), welche mit DILP1-8 bezeichnet werden (Übersichtsartikel Nässel und Vanden Broeck, 2016). Diese werden im *Insulin/Insulin-like growth factor* Signalweg (IIS) zusammengefasst. DILP2,

DILP3 und DILP5 werden von Insulin produzierenden Zellen (engl.: *Insulin producing cells*, IPCs) des Gehirns sezerniert (Broughton *et al.*, 2010). Das genetische Entfernen dieser Zellen (über das *Drosophila* Gen *reaper*) führt zu erhöhten Glukose-Spiegeln in der Hämolymphe und zu einer verlängerten Lebensspanne (Broughton *et al.*, 2005). Die DILP-Signale in *Drosophila* werden teilweise durch den Transkriptionsfaktor dFOXO vermittelt (Abbildung 1). Dieser führt zur Expression des *Drosophila* Insulin Rezeptors (*dInR*) und des translationalen Regulators d4E-BP (*thor*) (Wessells *et al.*, 2009). Thor ist an der Wachstumsregulation (Miron *et al.*, 2001), Stressresistenz und dem Lipid-Metabolismus (Teleman *et al.*, 2005) der Tiere beteiligt. Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, stellt die alpha-1,4 Glucosidase *target of brain insulin (tobi)* ein weiteres peripheres Ziel der DILP- und AKH-Signale dar (Buch *et al.*, 2008). Fehlen IPCs, die CC oder deren Signale, führt dies zu einem fast völligen Ausbleiben der *tobi*-Expression (Buch *et al.*, 2008). Die Expression von *tobi* reagiert außerdem auf die Zusammensetzung der Nahrung. Erhalten die Fliegen ein Futtermedium, das sehr reich an Zucker und arm an Protein ist, wird *tobi* nur schwach exprimiert. Ist das Futter hingegen arm an Zucker und reich an Protein, induziert dies die *tobi* Expression (Buch *et al.*, 2008). Bei den hier vorgestellten Regelkreisen handelt es sich nur um einen kleinen Ausschnitt aus den komplexen neuronalen und endokrinen Netzwerken, mit deren Hilfe die Fliegen ihren Stoffwechsel regulieren. Wie im Menschen wird auch in *Drosophila* Energie in Abhängigkeit von Bedarf und Angebot in spezialisierten Geweben gespeichert oder aus diesen remobilisiert. Der Regulation der Energiehomöostase dienen dabei evolutionär hoch konservierte Signalwege (Übersichtsartikel Baker und Thummel, 2007).

1.4 Lipid Droplets (LDs)

Wie im Menschen dienen auch in *Drosophila* TAGs als zentrale Moleküle für die Speicherung von Energie (Übersichtsartikel Kühnlein, 2011). Auf zellulärer Ebene findet diese Speicherung von Lipiden in sogenannten Lipidtröpfchen (engl.: *Lipid Droplets*, LDs) statt. Hierbei handelt es sich um Lipid-Speicherorganellen, zu deren Bildung nahezu alle Zellen und Organismen befähigt sind (Übersichtsartikel Walther und Farese, 2012). Sie finden sich in Einzellern wie Bakterien (Ding *et al.*, 2012), Pflanzen (Bi *et al.*, 2016) sowie im Menschen (Riva *et al.*, 1985). Die Größe, Anzahl, und zelluläre Positionierung der LDs kann dabei stark zwischen unterschiedlichen Zelltypen aber auch innerhalb eines Zelltyps variieren. So können LDs in Adipozyten des weißen Fettgewebes von Säugetieren einen Durchmesser von über 100 μM besitzen. In Hefezellen lassen sich aber auch LDs nachweisen, die kleiner als 0,4 μM sind (z.B.: Cushman, 1970; Herms *et al.*, 2013; Krahmer *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2015). LDs interagieren mit vielen anderen Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), den Mitochondrien und Peroxisomen

(Abbildung 2, Übersichtsartikel Brasaemle und Wolins, 2012). Alle LDs zeigen den gleichen stereotypen Aufbau (Abbildung 2): Sie besitzen einen lipophilen Kern aus Neutrallipiden wie TAGs und Sterol-Estern (Bartz *et al.*, 2007; Czabany *et al.*, 2008), der von einer Phospholipid-Einzelmembran umgeben ist (Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Mit dieser Membran sind verschiedene Proteine assoziiert (z.B. Beller *et al.*, 2006; Cermelli *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2013).

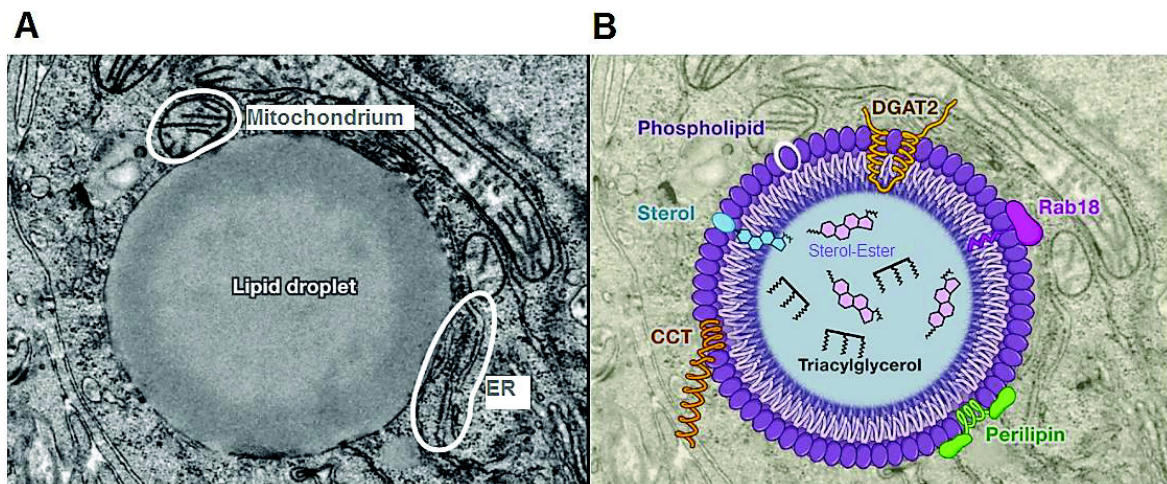


Abbildung 2: Aufbau von Lipid Droplets (LDs). (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines LDs aus einer kultivierten Leberkarzinom-Zelle. Zu erkennen ist die Phospholipid-Einzelschicht des LDs sowie die Assoziation mit Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und den Mitochondrien. (B) Gezeigt ist ein Modell des LD-Aufbaus. Der Kern besteht aus Neutrallipiden (Triacylglycerol und Sterol-Ester) und wird von einer Phospholipid-Einzelmembran umgeben. Mit dieser Membran sind verschiedene Proteine assoziiert. Beispiele hierfür sind DGAT2 (Diacylglycerol-O-acyltransferase 2; beteiligt an der TAG-Synthese) und CCT (CTP:phosphocholin cytidyltransferase; Schlüsselenzym der Phosphatidylcholin-Synthese). Proteine können auf unterschiedliche Weise mit der LD Membran assoziiert sein, so zum Beispiel durch amphipatische alpha Helices, hydrophobe Domänen im Protein sowie Protein-Protein Interaktionen (Letztere nicht dargestellt). Abbildung modifiziert aus Farese und Walther (2009).

Neben der Speicherung von Neutrallipiden als Energieträger besitzen LDs eine Reihe weiterer Funktionen (Übersichtsartikel Welte, 2015). Sie erlauben Zellen zum Beispiel die sichere Lagerung lipophiler Verbindungen, die ansonsten in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken könnten (Plötz *et al.*, 2016; Valachovic *et al.*, 2016). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass LDs zelluläre und metabolische Prozesse beeinflussen, indem sie an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind oder diese beeinflussen (Arrese *et al.*, 2014). Im Rahmen immunologischer Prozesse sind sie zum Beispiel an der Bildung lipophiler Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen beteiligt, speichern antivirale und antibakterielle Peptide, oder werden von Pathogenen wie Hepatitis C- und Dengue-Viren zur Selbstassemblierung genutzt (Übersichtsartikel Saka und Valdivia, 2012; Welte, 2015). In steroidbildenden (steroidogenen) Zellen befinden sich LDs, die besonders reich an Cholesterolestern sind und zur Bildung von Steroidhormonen beitragen (Servetnick *et al.*, 1995). Auch die Verfügbarkeit zahlreicher zellulärer Proteine

wird von LDs beeinflusst. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass LDs an der ER-assoziierten Degradation (ERAD) von ApoB100 (Ohsaki *et al.*, 2008) und dem Enzym HMG-CoA Reduktase (Hartman *et al.*, 2010) beteiligt sind. Wie in *Drosophila* Embryonen gezeigt wurde, können LDs Histone im Cytosol binden und gewährleisten so eine eng regulierte Stöchiometrie dieser Proteine im Zellkern (Li *et al.*, 2014). Die Vielfalt der LD-Funktionen wird maßgeblich von den Proteinen bestimmt, die mit ihrer LD-Membran assoziiert sind. Um zum Beispiel Histone binden zu können, benötigen die embryonalen LDs auf ihrer Oberfläche das Protein Jabba (Li *et al.*, 2014). Die Sterol-induzierte Ubiquitinierung und der Abbau der HMG-CoA Reduktase wird ermöglicht, indem das Protein AUP1 (ancient ubiquitous protein 1) Ubiquitin-konjugierende Enzyme auf die LDs rekrutiert (Jo *et al.*, 2013). Proteom-Analysen mit aufgereinigten LDs haben gezeigt, dass sich das LD-Subproteom durch eine hohe Diversität auszeichnet. In diesen Studien wurden mehrere hundert LD-assoziierte Proteine entdeckt, von denen viele nicht direkt mit dem Lipid-Metabolismus zusammenhängen (wie z.B. Jabba) oder bislang kaum beschrieben sind (Beller *et al.*, 2006; Cermelli *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2012a, 2012b; Schmidt *et al.*, 2013).

1.5 Das *Drosophila* Protein CG9186

Das *Drosophila* Gen *CG9186* befindet sich auf dem linken Arm des dritten Chromosoms an Position 61F6 (3L:1,311,719..1,313,377 [-]). Wie Microarray, RNASeq und *in situ* Hybridisierungs-Daten zeigen, wird *CG9186* auf Transkript-Ebene in allen Entwicklungsstadien exprimiert (Celniker *et al.*, 2009; Chintapalli *et al.*, 2007; Thiel *et al.*, 2013). Sowohl in den larvalen Stadien als auch in adulten Tieren zeigt sich eine besonders starke Expression in Lipid-speichernden Organen (z.B. Fettkörper und Mitteldarm) sowie in den Speichel- und akzessorischen Drüsen (Chintapalli *et al.*, 2007). Es sind zwei Transkript-Varianten bekannt (*CG9186*-RA und -RB). Beide codieren für das gleiche 307 Aminosäuren lange Polypeptid (FlyBase Version FB2017_02, www.flybase.org). Bis vor etwas mehr als einem Jahrzehnt war kaum etwas über *CG9186* bekannt. Im Jahr 2006 wurde das *CG9186* Protein dann bei Proteom-Analysen aufgereinigter LDs aus Embryonen (Cermelli *et al.*, 2006) und larvalen Fettkörpern (Beller *et al.*, 2006) identifiziert. Eine erste Charakterisierung fand in der Arbeitsgruppe (AG) Beller statt und mündete im Jahr 2013 in der bislang einzigen Veröffentlichung, die sich ausschließlich mit *CG9186* beschäftigt (Thiel *et al.*, 2013). Im Folgenden werden einige Erkenntnisse aus dieser Studie vorgestellt.

1.5.1 CG9186 ist eine evolutionär konservierte annotierte Lipase

CG9186 ist evolutionär hoch konserviert und besitzt Homologe in einer Vielzahl von Organismen, darunter auch in Säugetieren wie Maus und Mensch (Thiel *et al.*, 2013). Abbildung 3 zeigt einen Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von CG9186 und ausgewählten Homologen.

<i>Drosophila melanogaster</i> CG9186	1	-----MQAYVNINSIPTHFTWRWI-----EETIT-E	28
<i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ007464	1	-----MQSYPPVGVKVPHTLTWKWI-----EESLNDQ	29
<i>Aedes aegypti</i> AAEL000412	1	-----MQSYPPVGVNVPHTLTWKWI-----EESLGDH	29
<i>Anopheles gambiae</i> AGAP004435	1	MYCKLFCGVARRAHLTAASVRSTFTPYRQTGNTASIMQSYPPVIAKVPTHLTWKWI-----EESLGDQ	65
<i>Mus musculus</i> MGI:1916082	1	-----MASEVEEQIPVREFFLCGGVETKIKCPWTNLFKQDVSKEP	43
<i>Homo sapiens</i> C2orf43	1	-----MDSELKEEIPVHEFILCGGAEIQVLCQPTDLFHDQSVKRP	43
<i>Drosophila melanogaster</i> CG9186	29	KEIVICITGNPGLPGFYTEAGTLQKELG-DLPYVWIGHAGHDDPPEASIR-EVQLSGH-----ELFN	91
<i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ007464	30	KEIVICITGNPGLPGFYTQLSTIHECLNKELPYVWIGHAGHDEEQDGPYKRLPLEGN-----SLYS	94
<i>Aedes aegypti</i> AAEL000412	30	KEIVLCITGNPGLPGFYTKLSTVHECLNKEMPYVWIGHAGHDEARDSPYKPPVPIEK-----HLYN	94
<i>Anopheles gambiae</i> AGAP004435	66	KEIVLCITGNPGLPGFYTKLSTVYECLNKELPYVWIGHAGHDEADESPYKPPVPLKGN-----EMFN	130
<i>Mus musculus</i> MGI:1916082	44	KLIFIPGNPGYSAFYVPAAKALYTLMKSRFPYWIISNAGFSVTPKDKKVLAAQEESSAQKIDVYG	112
<i>Homo sapiens</i> C2orf43	44	KLIFIPGNPGYSAFYVPAAKALYSLTNRFPYWTISNAGHALAPKDKKILTTSEDSAQEKIDYIG	111
<i>Drosophila melanogaster</i> CG9186	92	LDQIRHKIAIEKYVPSDVKIHLSHSIGAWMIQLENERISRIQKCYMFPFVERMMESPNGWVF	160
<i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ007464	95	LDQQLQHKVDFIRKYVPSDVKIHLSHSIGAYLALCLKIPDISDRVQHCYMLFPTIERMNTKNGFIL	163
<i>Aedes aegypti</i> AAEL000412	95	LDQQLQHKIDFIRKYVPAOVKIHLSHSIGCYLALCLKIPDISRIQHCYFLFPTIERHADARNGFIL	163
<i>Anopheles gambiae</i> AGAP004435	131	LDQQLQHKIEFIRKYVPEOVKIHLSHSIGAYMALCLKVPDISDRVQHCYFLFPTIERMAKSRNGFIV	199
<i>Mus musculus</i> MGI:1916082	113	LDQIEHKIALRAHVPKDKKILLSHSVGTMTVMKRVPELP-VAHAFLLFPTIERMSSESPNGKFA	180
<i>Homo sapiens</i> C2orf43	112	LDQIEHKIALLSHVPKDKKILLSHSVGSYFTQMKRVPELP-VIRAFLLFPTIERMSSESPNGRIA	179
<i>Drosophila melanogaster</i> CG9186	161	TKVAMPLYSVFGYIFFSFNPLPVWLRLMLQIYFLIFSIPROFLGTALKYSKPSVAEKVVFLADDEMA	229
<i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ007464	164	TRIVKPFYFLV-QWFYHCFALLPTVVKVWIYAYFVVSRTPKHFLGTGLKYTNPAVHHKVVMTALDEME	231
<i>Aedes aegypti</i> AAEL000412	164	TKIINPIYRVV-QWFYRCALLPTIIVKWIYCYFLVTGTPKHFLGTALKYTNPAVIDKVWFMALDEME	231
<i>Anopheles gambiae</i> AGAP004435	200	TRIINPMWCYV-QWFYRM-DMLPLFIPTWIIYMYLVDGIRKYLLGTGLKYNMPSVIDKIWFLAIDEME	267
<i>Mus musculus</i> MGI:1916082	181	TPFLCQFRYLLYATSLLLKPCPEVIKSFILQKLMGQMIKLELP--LTDILQPFCLANAAYLGSGEMV	247
<i>Homo sapiens</i> C2orf43	180	PLLCWFRYVLYVTGILLKPCPETIKSLLRRGLQVMNLENEFS--PNIILEFCLANAAYLGGEEM	246
<i>Drosophila melanogaster</i> CG9186	230	RIRGIQREIVEQNLDLKFYYGTTDQWVFISYDQLKKDYKVDAAQDTKKIDHAFVLRHSQPPAVIR	298
<i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ007464	232	KVRELQVENIKANKHRLKFYYGTTDQWVVKFVRLMEAVDVDAELCTRKYEHAFVLSASQMGFMVG	300
<i>Aedes aegypti</i> AAEL000412	232	KVRNLDLNTIEQNKHRLKFYYGTTDQWVVKYKELRQKVPDADAELCTRKIEHAFVLSAAQMGFMVG	300
<i>Anopheles gambiae</i> AGAP004435	268	KIKDLTDTLTKNKQRIKLYYGSKDQWVQVYHDLKQRIPIIDAECTRNYEHAFVLSAAQMGFSVG	336
<i>Mus musculus</i> MGI:1916082	248	QIVKRDDIIEKEFLPKIKFYGKTQDQWVVKYEDMKKDFEGNIYCEKGIHAFVLDQSQAETIIVA	316
<i>Homo sapiens</i> C2orf43	247	EIVKRDETIEKELCKTFYYGTTDQWVKEVYEDIKKDFEGNIRCEKNIPHAFITHFNEQADMIA	315
<i>Drosophila melanogaster</i> CG9186	299	DMIQHRRV-----	307
<i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ007464	301	EWLKYRV-----	308
<i>Aedes aegypti</i> AAEL000412	301	EWLKHRRVVM-----	310
<i>Anopheles gambiae</i> AGAP004435	337	EWLKYRA-----	344
<i>Mus musculus</i> MGI:1916082	317	EWLNN-----RPPRK-----	326
<i>Homo sapiens</i> C2orf43	316	DSLKDDLSKIGNPSWHYHSLRTMRCPSAQLKPPDERFGSDLLPTYWKNQISR	370

Abbildung 3: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von CG9186 und ausgewählten Homologen. Die annotierte katalytische Triade (gebildet aus Serin, Aspartat und Histidin) mit der Lipase-Domäne ist orange hervorgehoben. Homologe Sequenzen in fünf oder sechs Spezies sind dunkellila hervorgehoben, homologe Sequenzen in vier bzw. zwei oder drei Spezies in helleren lila Tönen. Abbildung aus Thiel *et al.* (2013).

Wie in der Abbildung farblich hervorgehoben wurde, gibt es bestimmte Bereiche bzw. einzelne Aminosäuren in CG9186, die in ähnlicher Position auch in allen anderen Homologen vorhanden sind (dunkellila). Besonders zu nennen ist hier ein stark konservierter Serin (S)-Rest (in *Drosophila* an Position 119) sowie ein Aspartat (D)- und Histidin (H)-Rest (Positionen 254 und 283). Durch Homologie-Modellierung konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäuren im gefalteten Protein wahrscheinlich eine sogenannte katalytische Triade bilden, die eine Aktivität als Serin-Hydrolase ermöglicht (Thiel *et al.*, 2013). Das katalytisch aktive Serin liegt dabei eingebettet in einer GX SXG Sequenz (G = Glycin, X = beliebige Aminosäure). Dieses Motiv ist innerhalb der Serin-Hydrolasen

typisch für Lipasen (Holm *et al.*, 1994; Vishnu Varthini *et al.*, 2015). Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften ist CG9186 daher auch als Lipase annotiert (FlyBase Version FB2017_02, www.flybase.org). Wie Thiel *et al.* (2013) *in vivo* zeigen konnten, führt ein RNAi vermittelter *knock down* von CG9186 in adulten Fliegen jedoch zu verminderten TAG-Spiegeln. Dieses Ergebnis war so nicht zu erwarten, da der *knock down* einer Lipase eher einen Anstieg der Speicherlipide erwarten lassen würde, wie er zum Beispiel in einer Studie zur Lipase Brummer beobachtet wurde (Grönke *et al.*, 2005). Die Überexpression von CG9186 in der embryonalen *Drosophila* Zelllinie Kc167 hatte keine veränderte TAG-Menge zur Folge. Unter Verwendung von artifiziellen Substraten konnten Thiel *et al.* im Rahmen von *in vitro* Versuchen auch keine lipolytische Aktivität gegenüber Trioleoyl-Glycerol, Dioleoyl-Glycerol und Monooleoyl-Glycerol messen. Insgesamt sprechen die Daten von Thiel *et al.* (2013) gegen eine quantitativ bedeutende lipolytische Aktivität von CG9186. Die genaue molekulare Funktion des Proteins bleibt also ungeklärt.

1.5.2 CG9186 lokalisiert im ER und auf den LDs

In Zellkulturversuchen untersuchten Thiel *et al.* (2013) die subzelluläre Lokalisation von CG9186. Hierfür, wurde ein eGFP markiertes Fusionsprotein in *Drosophila* ML-DmBG3-c2 Zellen zur Expression gebracht und die zelluläre Bildung von LDs durch Zugabe von 400 μ M Ölsäure (engl.: *oleic acid*, OA) zum Medium induziert. Wie Abbildung 4 zeigt, lokalisiert das Konstrukt auf den mit dem Farbstoff HCS LipidTOX gegengefärbten LDs (Thiel *et al.*, 2013).

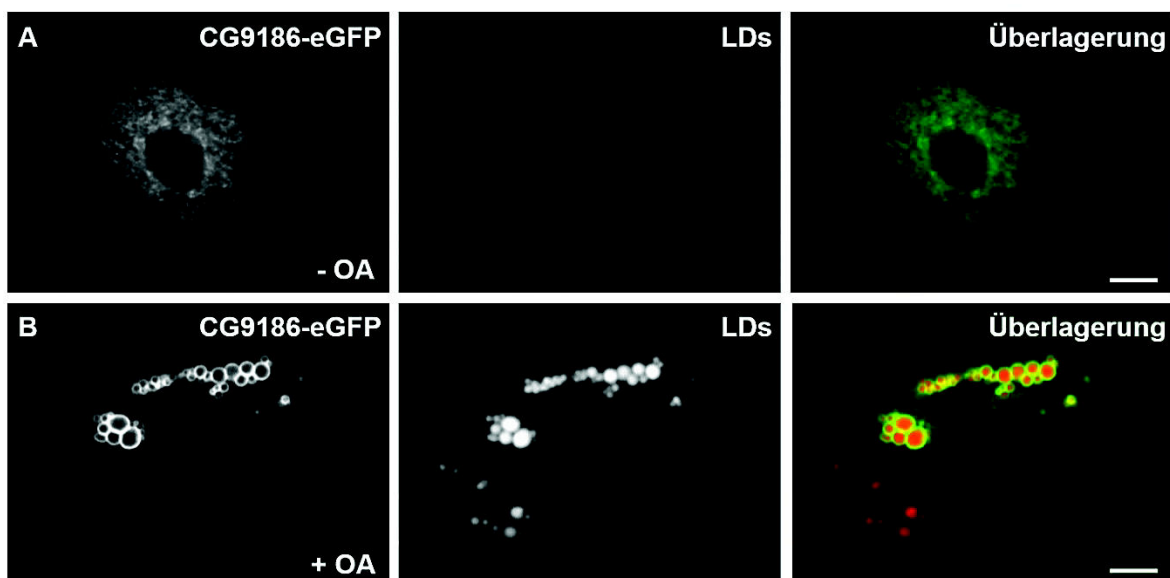


Abbildung 4: CG9186-eGFP lokalisiert auf den LDs. Gezeigt sind *Drosophila* ML-DmBG3-c2 Zellen, die CG9186-eGFP exprimieren. (A) Befindet sich keine Ölsäure (engl.: *oleic acid*, OA) im Zellkulturmedium, zeigt CG9186-eGFP eine retikuläre Lokalisation. (B) Nach Zugabe von OA lokalisiert das Konstrukt auf den entstehenden LDs (gegengefärbt mit HCS LipidTOX). Die Bilder zeigen Maximum Intensitäts-Projektionen (MIPs) von Z-Stapeln. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ M. Abbildung übersetzt aus Thiel *et al.* (2013).

Wird keine Ölsäure zum Zellkulturmedium gegeben, befinden sich kaum LDs in den ML-DmBG3-c2 Zellen und CG9186 lokalisiert im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Thiel *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde durch Thiel *et al.* (2013) ein CG9186 spezifischer Antikörper generiert und mit diesem die Lokalisation von endogenem CG9186 untersucht. Antikörperfärbungen larvaler Speicheldrüsen und Fettkörper sowie der embryonalen Zelllinie Kc167 lassen die Anwesenheit von endogenem CG9186 auf den LDs dieser Gewebe bzw. Zellen erkennen. Innerhalb von CG9186 sind die Aminosäuren 141-200 für die Lokalisation auf den LDs verantwortlich.

Durch Homologie-Modellierung wurde gezeigt, dass dieser Bereich auf der Oberfläche des gefalteten CG9186 Protein liegt und wahrscheinlich eine amphipatische Helix ausbildet, über die das Protein auf den LDs lokalisieren kann. Fehlt dieser Bereich, akkumuliert CG9186 im Zytoplasma (Thiel *et al.*, 2013).

1.5.3 Überexpression von CG9186 führt zur Aggregation von LDs

CG9186 beeinflusst die Morphologie und zelluläre Lokalisation von LDs. Während Kc167 Zellen nach Inkubation mit 400 μM Ölsäure dispers verteilte LDs aufweisen, führt eine gleichzeitige transiente Überexpression von CG9186-eGFP zur Bildung von Aggregaten aus vielen kleinen LDs (siehe Abbildung 5).

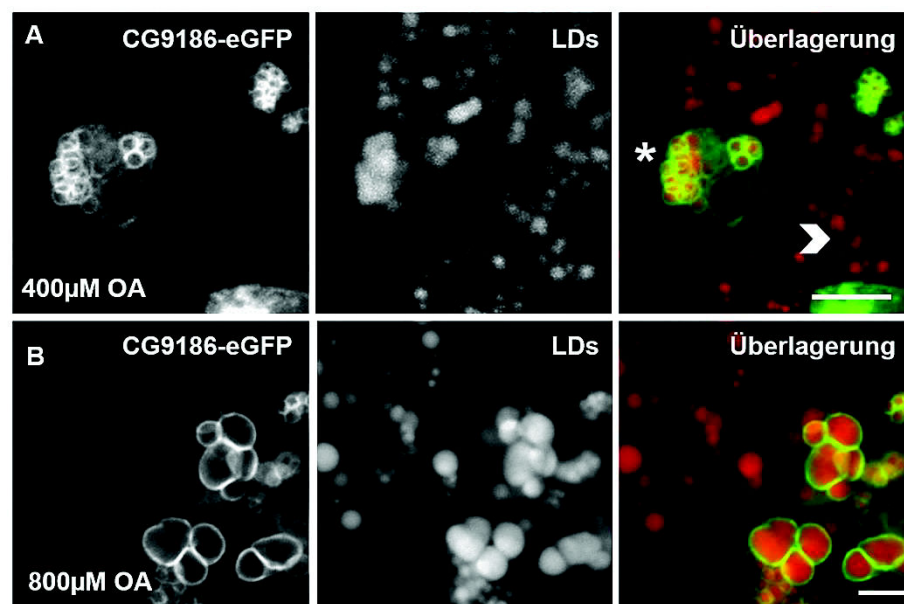


Abbildung 5: Induktion der Aggregation von LDs durch Überexpression von CG9186. (A) Überexpression von CG9186-eGFP in *Drosophila* Kc167 Zellen führt zu einer Aggregation zellulärer LDs (Asterisk), während LDs in untransfizierten Zellen dispers verteilt vorliegen (Pfeil). (B) Wird die OA-Konzentration auf 800 μM erhöht, zeigen CG9186-eGFP exprimierende Zellen irregulär geformte fusionierte LDs. Die Bilder zeigen MIPs von Z-Stapeln. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μM . Abbildung aus Thiel *et al.* (2013).

Wird die OA-Konzentration auf 800 μM gesteigert, zeigen sich bei den transfizierten Zellen fusionierte LDs mit unregelmäßiger Form (Abbildung 5 B). Es scheint also, dass Zellen unter CG9186 Überexpression Probleme haben, erhöhte Mengen an Lipid in LDs zu speichern (Thiel *et al.*, 2013).

Um zu überprüfen, ob die für CG9186 vorausgesagte katalytische Triade an der Ausbildung dieses Phänotyps beteiligt ist, wurde eine mutierte Variante des Proteins generiert, bei der das zentrale Serin im GXSXG Motiv gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Die Überexpression dieses Konstruktes hatte entgegen der Erwartungen einen noch stärkeren Aggregations-Phänotyp zur Folge als die Überexpression des Wildtyp-Proteins (Thiel *et al.*, 2013). Diese Daten legen nahe, dass die bislang ungeklärte enzymatische Funktion von CG9186 dem LD-Aggregations-Phänotypen des Proteins entgegenwirkt (*contra* LD-Aggregation). Unter Verwendung von Deletionskonstrukten (verkürzte Formen von CG9186) konnten Thiel *et al.* (2013) außerdem zeigen, dass das C-Terminale Ende des Proteins für die Ausbildung des Aggregations-Phänotypen notwendig ist. Diese Erkenntnisse sind in dem Schema in Abbildung 6 zusammengefasst:

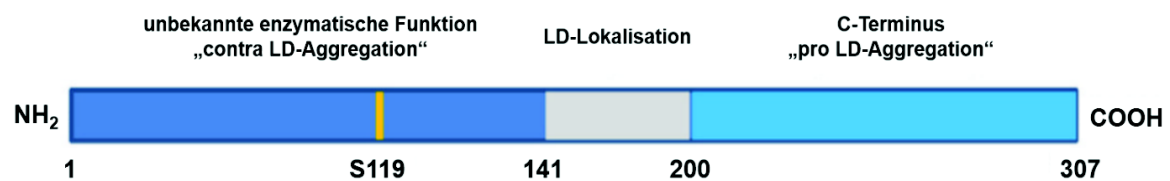


Abbildung 6: Schematische Darstellung der CG9186 Sequenz und der Funktion einzelner Sequenzabschnitte. Die Primärstruktur des CG9186 Proteins wird von 307 Aminosäuren gebildet. Das Serin an Position 119 als Teil der katalytischen Triade ist gelb hervorgehoben. Die bislang unbekannte enzymatische Funktion wirkt dem LD Aggregations- Phänotypen entgegen. Der Sequenzbereich von Aminosäure 141 bis 200 dient der Lokalisation von CG9186 auf den LDs. Das C-Terminale Ende des Proteins (Aminosäuren 200-307) ist essentiell für die Ausbildung des LD Aggregations-Phänotypen (Thiel *et al.*, 2013).

Bislang ist allerdings nicht klar, welche Rolle die enzymatische Funktion von CG9186 bei der LD-Aggregation spielt, und warum gerade der C-Terminale Bereich des Proteins dafür wichtig ist. In ihrer Veröffentlichung diskutieren Thiel *et al.*, dass CG9186 entweder direkt oder indirekt über Protein-Protein Interaktionen die Phospholipid-Zusammensetzung und damit die physikalischen Eigenschaften der Membran beeinflussen könnte (Thiel *et al.*, 2013).

1.5.4 CG9186 Homologe in Maus und Mensch

1.5.4.1 *Mouse lipid droplet associated hydrolase* (mLDAH)

Das murine Homolog von CG9186, genannt *Mouse lipid droplet associated hydrolase* (mLDAH oder LDAH), wurde initial in einer Studie von Goo *et al.* im Jahr 2014 charakterisiert. Die Primärsequenz des Proteins umfasst 326 Aminosäuren. Wie CG9186 bildet LDAH mit den drei Aminosäuren Serin (Position 140), Aspartat (272) und Histidin (291) höchstwahrscheinlich eine katalytische Triade aus, die für eine Funktion als Serin-Hydrolase spricht. Auch in LDAH befindet sich das zentrale Serin dabei innerhalb eines GXSXG Motivs (Goo *et al.*, 2014; Thiel *et al.*, 2013). Um zu bestätigen, dass es sich bei LDAH um eine aktive Serin-Hydrolase handelt, wurden im Rahmen der Studie von Goo *et al.* Experimente mit einer metabolischen Sonde durchgeführt. Bei der verwendeten Sonde handelt es sich um ein mit Desthiobiotin markiertes Fluorophosphonat („ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase probe“, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Fluorophosphonat- und Fluorophosphat-Derivate binden enzymatisch aktive Serin-Hydrolasen, indem sie mit der freien OH-Gruppe des zentralen nukleophilen Serins reagieren und kovalent an dieses gebunden werden (Liu *et al.*, 1999). Über das angehängte Desthiobiotin kann die Sonde samt gebundenen Serin-Hydrolasen mit Streptavidin-Agarose beads (engl.: ‚Kügelchen‘) präzipitiert werden. In einem solchen Versuchsaufbau konnten Goo *et al.* nachweisen, dass LDAH eine Aktivität als aktive Serin-Hydrolase besitzt. Nach einem Serin-zu-Cystein Austausch an Position 140 (S140C) fand keine Bindung der Sonde statt (Goo *et al.*, 2014). Unter Verwendung von ¹⁴C-markiertem Cholesterolester wiesen Goo *et al.* *in vitro* eine schwache Cholesterolesterase Aktivität für LDAH nach. Die katalytisch inaktive S140C Variante von LDAH zeigte diese Aktivität nicht (Goo *et al.*, 2014). Darüber hinaus zeigen die Autoren einen Einfluss von LDAH auf den Cholesterol- und Cholesterolester Haushalt von Makrophagen und damit eine Relevanz im Hinblick auf Arteriosklerose. So wurden RAW 264.7 Makrophagen mit acetyliertem LDL (engl: *low density lipoprotein*) behandelt und so der zelluläre Cholesterol- und Cholesterolester Gehalt erhöht. Wird zeitgleich LDAH zur Überexpression gebracht, fällt die Akkumulation etwas geringer aus, nach einem *knock down* durch RNAi etwas höher. Werden die Zellen nicht mit acetyliertem LDL behandelt, zeigt sich auf Cholesterol- und Cholesterolester Ebene kein Effekt der LDAH Überexpression (Goo *et al.*, 2014). Gegen eine quantitativ bedeutende Rolle von LDAH als Cholesterolesterase sprechen jüngste Erkenntnisse aus einer 2017 erschienenen *in vivo* Studie (Kory *et al.*, 2017). Im Rahmen dieser Studie wurde eine LDAH *knock out* Maus generiert. In Anlehnung an die Versuche von Goo *et al.* wurden Makrophagen aus *knock out*- und Wildtyp-Mäusen isoliert und mit acetyliertem LDL behandelt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied im Cholesterolester Gehalt. Bei der Messung der Cholesterolesterase Aktivität unter Verwendung von Lysaten aus weißem Fettgewebe und

der Leber zeigte sich kein Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle (Kory *et al.*, 2017). Des Weiteren konnten in den mutanten Tieren weder unter Standardbedingungen noch nach Gabe von fettreichem Futter veränderte Cholesterol-, HDL (engl: *high density lipoprotein*) -, LDL- und TAG-Parameter im Serum festgestellt werden. Auch im Hinblick auf Körpermasse und -zusammensetzung, Glukosetoleranz und Lipidzusammensetzung verschiedener Gewebe zeigten die LDAH-mutanten Tiere keine Auffälligkeiten (Kory *et al.*, 2017). Die Autoren schließen eine hydrolytische Aktivität gegenüber Cholesterolestern und TAGs grundsätzlich aus. Sie diskutieren allerdings, dass LDAH wenig abundante oder schwer zu detektierende Lipide hydrolysieren könnte (Kory *et al.*, 2017).

1.5.4.2 Das humane CG9186 Homolog C2orf43

Wie sein Homolog in *Drosophila* ist auch das humane Gen C2orf43 kaum charakterisiert. Es gibt keine Studie, die sich der Untersuchung von C2orf43 (auch LDAH oder hLDAH genannt) im Detail widmet. Allerdings wurde das Gen im Rahmen verschiedener *Genome Wide Association Studies* (GWAS) im Zusammenhang mit Prostatakrebs identifiziert. Im Jahr 2010 konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) im nichtcodierenden Bereich (Intron) von C2orf43 signifikant mit dieser Krebsform assoziiert ist (Takata *et al.*, 2010). In der Studie wurden 4.584 japanische Prostatakrebs-Patienten mit 8.801 Kontroll-Subjekten verglichen. Die Prostatakrebs-Assoziation des entdeckten SNP (rs13385191) wurde später in einer GWAS Studie mit Prostatakrebs-Patienten europäischer Abstammung sowie in Studien an zwei Populationen chinesischer Patienten bestätigt (Lindström *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Dabei scheint rs13385191 nur mit den frühen Stadien der Krankheit signifikant assoziiert zu sein (Lindström *et al.*, 2012). Eine FastSNP Analyse (*Function Analysis and Selection Tool for Single Nucleotide Polymorphisms*) legte den Verdacht nahe, dass sich der SNP in einer im Intron 6 gelegenen Enhancer Region befindet (Long *et al.*, 2012). Tatsächlich konnten eQTL (*expression quantitative trait locus*) Analysen nachweisen, dass rs13385191 stark mit der Expressionsstärke von C2orf43 assoziiert ist (Du *et al.*, 2016). Außerdem zeigen RNA-Seq Daten, dass C2orf43 in Prostatakrebsgewebe eine im Vergleich zu gesundem Gewebe um mehr als das Zweifache verringerte Expression aufweist (Du *et al.*, 2016). Neben der mehrfach bestätigten Assoziation zu Prostatakrebs konnte in einer einzelnen Studie auch eine Verbindung zwischen C2orf43 und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hergestellt werden (Huang *et al.*, 2015). Die hier vorgestellten Studien zu C2orf43 beschreiben Assoziationen und keine kausalen Zusammenhänge. Genauere Untersuchungen zu pathophysiologischen Ursachen oder detaillierte Funktionsuntersuchungen zu C2orf43 gibt es bislang nicht.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Das *Drosophila* Protein CG9186 wurde 2006 bei der Analyse des Proteoms von LDs aus larvalen Fettkörpern identifiziert (Beller *et al.*, 2006). In einer 2013 veröffentlichten Studie der AG Beller fand eine erste Charakterisierung des Proteins statt (Thiel *et al.*, 2013). Obwohl das CG9186 Protein als Lipase annotiert ist, zeigte es in der Studie bei *in vitro* Versuchen mit verschiedenen artifiziellen Substraten keine lipolytische Aktivität. Wie allerdings nachgewiesen wurde, hat eine Herunterregulation von CG9186 durch RNAi in adulten Tieren verringerte Lipidspeicher zur Folge (Thiel *et al.*, 2013). Wird CG9186 überexprimiert, führt dies sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Aggregation der LDs (Thiel *et al.*, 2013). Thiel *et al.* konnten in ihrer Studie somit zeigen, dass CG9186 ein Vertreter einer evolutionär konservierten Familie von Proteinen ist, und Einfluss auf Lipidspeicherung und die zelluläre Lokalisation von LDs nimmt. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, CG9186 aufbauend auf den bislang in der AG Beller gemachten Erkenntnissen weiter zu charakterisieren. So ist zum Beispiel nicht bekannt, welche Mechanismen und strukturellen Eigenschaften des Proteins bei der Induktion der LD Aggregation eine Rolle spielen. Darüber hinaus sind bislang weder die gesamtorganismische Bedeutung von CG9186 noch dessen genaue enzymatische Aktivität zweifelsfrei entschlüsselt. Für die Untersuchung dieser Fragen wurden zwei Ansätze gewählt: Zum einen sollten durch *in vivo* Experimente Erkenntnisse zur molekularen Funktion von CG9186 gesammelt sowie mögliche Interaktionspartner von CG9186 identifiziert werden. Zum anderen sollte eine CG9186 mutante Fliegenlinie generiert werden. Mit dieser Fliegenlinie sollten die bereits mit RNAi gemachten Beobachtungen bestätigt und darüber hinaus weitere Hinweise auf die physiologische Bedeutung von CG9186 gesammelt werden. Im Jahr 2010 wurde zum Beispiel gezeigt, dass SNPs im humanen Homolog von CG9186 (genannt C2orf43) signifikant mit Prostatakrebs assoziiert sind (Takata *et al.*, 2010). Das CG9186 Transkript wird in den akzessorischen Drüsen exprimiert, einem paarigen Organ mit Prostata-ähnlicher Funktion (Chintapalli *et al.*, 2007). Mithilfe der CG9186 mutanten Fliegenlinie sollte daher überprüft werden, ob der Verlust von CG9186 einen Effekt auf die Fertilität und Lebensspanne der Tiere hat. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob CG9186 neben dem Lipidstoffwechsel auch andere Komponenten des Energiestoffwechsels beeinflusst. Ziel dieser Dissertation war es, CG9186 mithilfe der gesammelten Phänotypen einem Stoffwechsel- oder Signaltransduktionsweg zuordnen zu können und so einen Grundstein für die Entschlüsselung seiner Funktion sowie die seiner Homologe zu legen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Chemikalien in der höchstmöglichen Reinheit (p.a. = *pro analysis*) von folgenden Herstellern bezogen: Abgent (San Diego, USA), Applichem (Darmstadt), BD Biosciences (Franklin Lakes, USA), Carl Roth (Karlsruhe), Chemsolute (Renningen), Colgate-Palmolive (New York City, USA), Fisher Chemical/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Gibco/Life Technologies (Carlsbad, USA), Grüssing GmbH Analytika (Filsum), Merck/Calbiochem (Darmstadt), Roche Diagnostics (Basel, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim), VWR International (Radnor, USA). Enzyme für molekularbiologische und biochemische Experimente wurden bezogen von: New England Biolabs (Ipswich, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Zum Ansetzen wässriger Lösungen und Puffer wurde vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) verwendet. Die Lösungen und Puffer wurden ggf. autoklaviert oder sterilfiltriert.

APS, 10 %, 10 ml

1 g Ammonium-Peroxidsulfat
auf 10 ml mit H₂O auffüllen

BBT, 10x, 1 l

20 mM Glukose
40 mM KCl
7 mM MgCl₂
55 mM NaCl
50 mM Saccharose
10 mM Tris
Auf 1 l mit H₂O auffüllen, pH 6,95

Vor Verwendung zu der auf 1x verdünnten Lösung geben:

0,1 % BSA
0,1 % TWEEN20

Bleichlösung

50 % DakKlorix in H₂O

Laufpuffer (für Polyacrylamid-Gelelektrophorese), 10x, 1 l

30,3 g Tris/HCl

144 g Glyzin

1 % SDS

Auf 1 l mit H₂O auffüllen

Lysepuffer, 20 ml

10 % Glycerol

50 mM HEPES, pH 7,5

150 mM NaCl

0,5 % Triton X-100

1,5 mM MgCl₂

1 mM EGTA

mit H₂O auf 20 ml auffüllen

Mowiol++, 50 ml

12 g Glyzerol

4,8 g Mowiol 40-88

12 ml H₂O

24 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8,5)

2,5 mg DABCO/ml Mowiol

2 mg Gallate/ml (bis zu 8 % (w/v))

PBS, 10x, 1 l

80 g NaCl

2,0 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

Auf 1 l mit H₂O auffüllen, pH 7,4

PBT

1x PBS

0,1 % TWEEN20

RNA-Fixierer, 10x, 1 l

100 ml 10x PBS
100 ml 0,5 M EGTA (pH 8,0)
700 ml H₂O
100 g Paraformaldehyd
auf 1 l mit H₂O auffüllen, pH 7,0

SB-Puffer („squishing buffer“), 10 ml

10 mM Tris/HCl, pH 8,2
25 mM NaCl
1 mM EDTA
mit H₂O auf 10 ml auffüllen

200 µg/ml Proteinase K (vor Benutzung hinzufügen)

SDS-PAGE Probenpuffer, 5x, 10 ml

500 mM DTT (Dithiothreitol)
250 mM Tris/HCl (pH 6,8)
10 % SDS
0,5 % Bromphenolblau
5 ml Glyzerol
mit H₂O auf 10 ml auffüllen

SDS-PAGE Sammelgel, 2 ml

1,4 ml H₂O
0,33 ml Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1))
0,25 ml 1 M Tris (pH 6,8)
20 µl 10 % SDS
20 µl 10 % APS
2 µl ml TEMED

SDS-PAGE Trenngel, 10 %, 10 ml

4 ml H₂O
3,3 ml Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1))
2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
0,1 ml 10 % SDS
0,1 ml 10 % APS
0,004 ml TEMED

TAE Puffer, 50x, 1 l

242 g TRIS base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Auf 1 l mit H₂O auffüllen

TLC-Nachweisreagenz, 200 ml

- 20 g CuSO₄ (entspricht 10 % w/v)
- 23,53 ml 85 prozentige Phosphorsäure (entspricht 10 % v/v)
- Auf 200 ml mit H₂O auffüllen

Transferpuffer, 10x, 1 l

30,3 g Tris/HCl
144 g Glyzin
auf 1 l mit H₂O auffüllen
Vor Verwendung zu der auf 1x verdünnten Lösung geben:
20 % Methanol

Trehalose Puffer, 1x, 100 ml

5 mM TRIS pH 6,6
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
Auf 100 ml mit H₂O auffüllen
Für Trehalose (+) Puffer 3 µl Trehalase (Sigma Aldrich, Steinheim) auf 1 ml
Trehalose Puffer geben

2.1.2 Kits

Tabelle 1: Kits

Name	Hersteller
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Effectene Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
Glucose (GO) Assay Kit	Sigma Aldrich (Steinheim)
GoTaq qPCR Master Mix	Promega (Madison, Wisconsin, USA)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Qiagen Plasmid Mini Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
SuperSignal TM West Pico Chemiluminescent Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Triglycerides	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2: Fluoreszenzfarbstoffe

Name	Hersteller	Verwendung
BODIPY 493/503	Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Verdünnung 1:2000 in PBS Anregung: 488 nm, detektierter Emissionsbereich: 493-598 nm
HCS LipidTOX DeepRed neutral lipid stain	Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	Verdünnung 1:250 in PBS Anregung: 633 nm, detektierter Emissionsbereich: 638-759 nm
Hoechst33258/Bisbenzimid	Sigma Aldrich (Steinheim)	Verdünnung 1:500 in PBS (Ursprungskonzentration: 1 mg/ml), Anregung: 405 nm, detektierter Emissionsbereich: 410-496 nm
AUTOdot/Monodansylpentan	Abgent (San Diego, USA)	Verdünnung 1:1000 in PBS Anregung: 405 nm, detektierter Emissionsbereich: 410-496 nm

2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG/Eurofins (Ebersberg) synthetisiert. Außerdem wurden Oligonukleotide vom CRISPR Resource Center (Harvard Medical School, USA) oder von Qiagen (Hilden) bezogen.

Tabelle 3: Oligonukleotide

Gen	Sequenz	V/R ¹	Verwendung	ID ² intern	Quelle (externe ID)
CG9186	CCAAGAAGATCGACCACGCTT	V	CRISPR ³	MBD779	Harv. CRISPR Resource
CG9186	CAAACACGTCTGTGCTGCTGG	R	CRISPR	MBD780	Harv. CRISPR Resource
CG9186	TTCGCGGGATTCAAAGGGAG	V	CRISPR	MBD781	Harv. CRISPR Resource
CG9186	AGCTGGTCATAGTAGGAGATTGG	R	CRISPR	MBD782	Harv. CRISPR Resource
CG9186	CGCCTGATGCTGATACAGATCTAC	V	CRISPR	MBD783	Harv. CRISPR Resource
CG9186	GGAAGACCACCTTCTCCGCT	R	CRISPR	MBD784	Harv. CRISPR Resource
CG9186	GTGCCAAGTGATGTCAAGATCC	V	Mutagenese	MBD785	Diese Arbeit
CG9186	AGCACTTTTGGATGCGACTC	R	Mutagenese	MBD786	Diese Arbeit
fabp	gtaatacgactcactataggGCAGAGCTTTTC ATTCGCTC	V	dsRNA Herstellung	MBD824	DRSC (40350_S)
fabp	gtaatacgactcactataggTTTGGCAACTTA CCCAGCTC	R	dsRNA Herstellung	MBD825	DRSC (40350_R)
fabp	gtaatacgactcactataggGCTGACTTAGGA ATGCTGCC	V	dsRNA Herstellung	MBD826	DRSC (40349_S)
fabp	gtaatacgactcactataggTAACACCCAGTC AGCATGGA	R	dsRNA Herstellung	MBD827	DRSC (40349_R)
CG9186	CTT TTG TGT CCA CTT GCT CCC	V	Sequenzierung	MBD838	Diese Arbeit
CG9186	CTTTTGTGTCCACTTGCTCCC	V	Sequenzierung	MBD838	Diese Arbeit
CG9186	ACC GAA AGC GAT AAC GAT GGA	R	Sequenzierung	MBD839	Diese Arbeit
CG9186	ACCGAAAGCGATAACGATGGA	R	Sequenzierung	MBD839	Diese Arbeit
CG9186	GTC AAG CTT TCG ATG GGT GT	V	Sequenzierung	MBD840	Diese Arbeit
CG9186	CGA AAG CGA TAA CGA TGG AGC	R	Sequenzierung	MBD841	Diese Arbeit
Hmu	gcttgccgcccaccATGGGCCTGCTATA TGCGCTGCG	V	ORF Amplifikation ⁴	MBD860	Diese Arbeit
Hmu	gcaaggcgccgcccTTAAAGCTCCACATTGA CGCCTTGC	R	ORF Amplifikation	MBD861	Diese Arbeit
Hmu	gcaaggcgccgcccAAGCTCCACATTGACG CCTTGCTTG	R	ORF Amplifikation	MBD862	Diese Arbeit
Gp93	gcttgccgcccaccATGAAGTACTTTTTG CTGGTGCGC	V	ORF Amplifikation	MBD863	Diese Arbeit

Gen	Sequenz	V/R ¹	Verwendung	ID ² intern	Quelle (externe ID)
Gp93	gcaaggcgcgccTTACAGCTCGTCGTGC TGCTGC	R	ORF Amplifikation	MBD864	Diese Arbeit
Gp93	gcaaggcgcgcccCAGCTCGTCGTGCTG CTGCTCC	R	ORF Amplifikation	MBD865	Diese Arbeit
Cpr	gcttgcgggccgccaccATGGCCAGCGAGCA AACGATTGAT	V	ORF Amplifikation	MBD866	Diese Arbeit
Cpr	gcaaggcgcgccTTAGCTCCAGACATCG GCCG	R	ORF Amplifikation	MBD867	Diese Arbeit
Cpr	gcaaggcgcgcccGCTCCAGACATCGGC CGAGTA	R	ORF Amplifikation	MBD868	Diese Arbeit
Pvr	gcttgcgggccgccaccATGGCGATGCTTCC GCGGTTG	V	ORF Amplifikation	MBD869	Diese Arbeit
Pvr	gcaaggcgcgccCTAATACCTTCGTTGCT CCTTCTCG	R	ORF Amplifikation	MBD870	Diese Arbeit
Pvr	gcaaggcgcgcccATACCTTCGTTGCTCC TTCTCGTTG	R	ORF Amplifikation	MBD871	Diese Arbeit
Hmu	gtaatacgactcactataggTCCAGAGCCTTC TAAACCGA	R	dsRNA Herstellung ⁵	MBD872	DRSC (41044_R)
Hmu	gtaatacgactcactataggAACATATAAAGC GTTGCCCG	V	dsRNA Herstellung	MBD873	DRSC (41044_S)
Hmu	gtaatacgactcactataggGCGATGCGTCTG ACAAAGTA	R	dsRNA Herstellung	MBD874	DRSC (28454_R)
Hmu	gtaatacgactcactataggGGAAGTCCAGGA CGTGTGAT	V	dsRNA Herstellung	MBD875	DRSC (28454_S)
Gp93	gtaatacgactcactataggAAGGAGATCTTC CTGCGTGA	R	dsRNA Herstellung	MBD876	DRSC (27798_R)
Gp93	gtaatacgactcactataggCTGTTTGTGCTC GTTGTGCT	V	dsRNA Herstellung	MBD877	DRSC (27798_S)
Gp93	gtaatacgactcactataggTACTACATCGCT GGTGCCAA	R	dsRNA Herstellung	MBD878	DRSC (41225_R)
Gp93	gtaatacgactcactataggCGAAGGTGCTCT TTAGCGAC	V	dsRNA Herstellung	MBD879	DRSC (41225_S)
Cpr	gtaatacgactcactataggACTCCATCTCGT CGTCTGCT	R	dsRNA Herstellung	MBD880	DRSC (28411_R)
Cpr	gtaatacgactcactataggGCTTACGGCAAC CGAAGTAG	V	dsRNA Herstellung	MBD881	DRSC (28411_S)
Pvr	gtaatacgactcactataggCAGCAGCCGGG AGATAG	R	dsRNA Herstellung	MBD882	DRSC (03080_R)
Pvr	gtaatacgactcactataggGTCAGATCGGGA TTGATGTG	V	dsRNA Herstellung	MBD883	DRSC (03080_S)
Pvr	gtaatacgactcactataggTTTTTGCGCACA ATTACCAA	R	dsRNA Herstellung	MBD884	DRSC (36841_R)

Gen	Sequenz	V/R ¹	Verwendung	ID ² intern	Quelle (externe ID)
Pvr	gtaatacgactcactataggTGTGATCCTTAT CGAAGCCA	V	dsRNA Herstellung	MBD885	DRSC (36841_S)
CG9186	gcaaggcgcgcccAACACGTCTGTGCTGC TGGATCATG	R	ORF Amplifikation	MBD906	Diese Arbeit
CG9186	CTGAGCAATCGTTATCATGG	V	Sequenzierung ⁶	MBD927	Diese Arbeit
CG9186	CTGAGCAATCGTTATCATGG	V	Sequenzierung	MBD927	Diese Arbeit
CG9186	GCTATTACCGACTCAATGTG	R	Sequenzierung	MBD928	Diese Arbeit
CG9186	CACATTGAGTCGGTAATAGC	R	Sequenzierung	MBD928	Diese Arbeit
CG9186	GATGGGTGTTACCAAGGT	V	Sequenzierung	MBD929	Diese Arbeit
CG9186	GATGGGTGTTACCAAGGT	V	Sequenzierung	MBD929	Diese Arbeit
CG9186	GAACATAATTGCCACACAAAGG	R	Sequenzierung	MBD930	Diese Arbeit
CG9186	CCTTTGTGTGGCAATTAGTTC	R	Sequenzierung	MBD930	Diese Arbeit
CG9186	Unbekannt (Dm_CG9186_1_SG)	-	qRT-PCR ⁷	MBD931	Qiagen
CG9186	GCGCAGTTTGCCACGCCAAC	V	Sequenzierung	MBD935	Diese Arbeit
CG9186	GCGCAGTTTGCCACGCCAAC	V	Sequenzierung	MBD935	Diese Arbeit
CG9186	CCAGGAAGACCACCTTCTCCG	R	Sequenzierung	MBD936	Diese Arbeit
CG9186	CGGAGAAGGTGGTCTTCCTGG	R	Sequenzierung	MBD936	Diese Arbeit
dILP1	CGGAAACCACAACTCTGCG	V	qRT-PCR	MBD937	AG Beller
dILP1	CCCAGCAAGCTTTCACGTTT	R	qRT-PCR	MBD938	AG Beller
dILP2	AGCAAGCCTTTGTCCTTCATCTC	V	qRT-PCR	MBD939	AG Beller
dILP2	ACACCATACTCAGCACCTCGTTG	R	qRT-PCR	MBD940	AG Beller
dILP3	TGTGTGTATGGCTTCAACGCAATG	V	qRT-PCR	MBD941	AG Beller
dILP3	CACTCAACAGTCTTCCAGCAGGG	R	qRT-PCR	MBD942	AG Beller
dILP5	GAGGCACCTTGGGCCTATTC	V	qRT-PCR	MBD943	AG Beller
dILP5	CATGTGGTGAGATTCCG	R	qRT-PCR	MBD944	AG Beller
dILP6	CCCTTGGCGATGTATTTCCCAACA	V	qRT-PCR	MBD945	AG Beller
dILP6	CCGACTTGCAGCACAAATCGGTGA	R	qRT-PCR	MBD946	AG Beller
thor	Unbekannt (Dm_Thor_1_SG)	-	qRT-PCR	MBD963	Qiagen
Kr-h1	CCGAATACGACATAACAGCC	V	qRT-PCR	MBD966	AG Beller
Kr-h1	CGATTTCCGTGAATATGTTCT	R	qRT-PCR	MBD967	AG Beller
tobi	CCACCAAGCGAGACATTTACC	V	qRT-PCR	MBD968	AG Beller
tobi	GAGCGGCGTAGTCCATCAC	R	qRT-PCR	MBD969	AG Beller
Akh	AGACCTCCAACGAAATGCTG	V	qRT-PCR	MBD970	AG Beller
Akh	GTGCTTGCAGTCCAGAAAGAG	R	qRT-PCR	MBD971	AG Beller

¹V/R = Vorwärts/Rückwärts (Orientierung), ²ID = Identifikationsnummer. ³siehe 2.2.1.9, ⁴siehe 2.2.1.2 und 2.2.1.4,

⁵siehe 2.2.4.5, ⁶siehe 2.2.1.8, ⁷siehe 2.2.1.3

2.1.5 Plasmide

Klonierungen erfolgen mit dem Gateway System (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Tabelle 4 zeigt die verwendeten „Entry“ und „Expressions-Vektoren“.

Tabelle 4: Vektoren für das Gateway-System

Bezeichnung	ID ¹	Quelle
pTGW	MBD150	<i>Drosophila</i> Genomics Resource Center, Bloomington, USA
pUbiP-EGFP-rfA	MBD151	A. Herzig, Abteilung H. Jäckle, MPIbpc Göttingen
pENTR/D-TOPO	MBD153	Invitrogen
pTWG	MBD187	<i>Drosophila</i> Genomics Resource Center, Bloomington, USA
pH-YFP-N	MBD212	Abteilung S. Hell, MPIbpc Göttingen
pUbiP-rfA-EGFP	MBD236	A. Herzig, Abteilung H. Jäckle, MPIbpc Göttingen
pUbiP-rfA-hGluc(1)	MBD413	AG Beller
pUbiP -hGluc(1)-rfA	MBD414	AG Beller
pUbiP-rfA-hGluc(2)	MBD419	AG Beller
pUbiP-mCherry-rfA	MBD493	AG Beller
pUbiP -hGluc(2)-rfA	MBD575	AG Beller

¹ID = Identifikationsnummer

Für Klonierungen in dieser Arbeit und bei Kolkhof *et al.*, (2017) wurden Zielsequenzen über *NotI*/*Ascl*-Schnittstellen in den modifizierten pENTR/D-TOPO „Entry“-Vektor ligiert und über Rekombinations-Reaktionen in die Expressionsvektoren kloniert. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die so erstellten Vektoren. Zusätzlich wurden Vektoren von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und GenScript (Piscataway, USA) bezogen.

Tabelle 5: Vektoren

Gen	Bezeichnung	ID ¹	Quelle
CG9186	pUbiP-EGFP-CG9186	33	Thiel <i>et al.</i> , 2013
Blasticidin S			Thermo Fisher Scientific,
deaminase	pCoBlast	188	Waltham, USA
CG9186	pUbiP-EGFP-CG9186(S119A)	223	Thiel <i>et al.</i> , 2013
CG9186	pUbiP-mCherry-CG9186	543	AG Beller
mLDAH	pUbi_myc_mDEU Isoform 1	553	Diese Arbeit
mLDAH	pUbiP-EGFP_mDEU Isoform 1	554	Diese Arbeit
CG9186(16K2R)	pUbiP-EGFP-CG9186(16K2R)	599	Diese Arbeit

Gen	Bezeichnung	ID ¹	Quelle
CG9186	pUbiP-hGLuc(2)-CG9186	600	AG Beller
CG9186(16K2R)	pUbiP-hGLuc(2)-CG9186(16K2R)	601	AG Beller
CG9186	pBFv-U6.2_DC26	602	GenScript, Piscataway, USA ²
CG9186	pBFv-U6.2_DC27	603	GenScript, Piscataway, USA ²
CG9186	pBFv-U6.2_DC28	604	GenScript, Piscataway, USA ²
CG9186	pENTR_CG9186(S119C)	700	Diese Arbeit
mLDAH	pENTR_MmCG9186(S140C)	701	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(H283A)	702	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(S119A,H283A)	703	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP_EGFP_CG9186(S119C)	704	Diese Arbeit
mLDAH	pUbiP-EGFP-MmCG9186(S140C)	705	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP_EGFP_CG9186(H283A)	706	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP_EGFP_CG9186(S119A,H283A)	707	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-hGLuc(1)-CG9186(delta1-140)	708	AG Beller
CG9186	pUbiP-hGLuc(1)-CG9186(delta141-307)	709	AG Beller
CG9186	pUbiP-hGLuc(1)-CG9186(delta201-307)	710	AG Beller
CG9186	pUbiP-hGLuc(1)-CG9186(aa141-200)	711	AG Beller
CG9186	pUbiP-hGLuc(1)-CG9186(S119A)	712	AG Beller
Hmu	pENTR_Hmu	713	Diese Arbeit
Hmu	pENTR_Hmu(noSt)	714	Diese Arbeit
Gp93	pENTR_Gp93	715	Diese Arbeit
Gp93	pENTR_Gp93(noSt)	716	Diese Arbeit
Cpr	pENTR_Cpr	717	Diese Arbeit
Cpr	pENTR_Cpr(noSt)	718	Diese Arbeit
Pvr	pENTR_Pvr(noStop)	719	Diese Arbeit
Pvr	pUbiP-Pvr-eGFP	720	Diese Arbeit
Cpr	pUbiP-Cpr-eGFP	721	Diese Arbeit
Gp93	pUbiP-Gp93-eGFP	722	Diese Arbeit
Hmu	pUbiP-Hmu-eGFP	723	Diese Arbeit
CG9186	pH-YFP-CG9186(S119A,H283A)	724	Diese Arbeit
CG9186	pH-YFP-CG9186(H283A)	725	Diese Arbeit
mLDAH	pH-YFP-MmG9186(S140C)	726	Diese Arbeit
CG9186	pH-YFP-CG9186(S119C)	727	Diese Arbeit
mLDAH	pH-YFP-MmG9186	728	Diese Arbeit
CG9186	pBFv-U6.2_MB2	735	GenScript, Piscataway, USA ²
CG9186	pENTR_CG9186(16K2R)_noStop	754	Diese Arbeit
CG9186	pTGW-eGFP-CG9186(16K2R)	758	Diese Arbeit
CG9186	pTWG-CG9186(16K2R)-eGFP	759	Diese Arbeit
CG9186	pUC57_CG9186(K271,280R)	760	GenScript, Piscataway, USA ²
CG9186	pUC_CG9186(K210,219,247,271,280R)	761	GenScript, Piscataway, USA ²
CG9186	pUC_CG9186(K210,213,219,247,266,267,271,279,280R)	762	GenScript, Piscataway, USA ²
CG9186	pUC_CG9186(K29,54,99,105,112,140,162,210,213,219,247,266,267,279R)	763	GenScript, Piscataway, USA ²

Gen	Bezeichnung	ID ¹	Quelle
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var1)_noStop	764	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var2)_noStop	765	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var3)_noStop	766	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var4)_noStop	767	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var1)	768	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var2)	769	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var3)	770	Diese Arbeit
CG9186	pENTR_CG9186(K2R_Var4)	771	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-CG9186(K2R_Var1)-eGFP	772	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-CG9186(K2R_Var2)-eGFP	773	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-CG9186(K2R_Var3)-eGFP	774	Diese Arbeit
CG9186	pUbi-CG9186(K2R_Var1)-mCherry	775	Diese Arbeit
CG9186	pUbi-CG9186(K2R_Var2)-mCherry	776	Diese Arbeit
CG9186	pUbi-CG9186(K2R_Var3)-mCherry	777	Diese Arbeit
CG9186	pUbi-CG9186(K2R_Var4)-mCherry	778	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-EGFP-CG9186(K2R_Var1)	779	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-EGFP-CG9186(K2R_Var2)	780	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-EGFP-CG9186(K2R_Var3)	781	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-EGFP-CG9186(K2R_Var4)	782	Diese Arbeit
CG9186	pUbiP-eGFP-CG9186(16K2R)	785	Diese Arbeit

¹ID = Identifikationsnummer

² Plasmid erstellt durch Gensynthese

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Eingesetzte	Quelle
	Verdünnung ¹	
Ratte anti-CG9186	1:2000	Thiel <i>et al.</i> , 2013
Maus anti-Tubulin	1:3000	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaninchen anti-GFP	1:2000	Torrey Pines Biolabs, Secaucus, USA
Ziege anti-Kaninchen HRP ² -gekoppelt	1:10.000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Esel anti-Maus HRP-gekoppelt	1:10.000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege anti-Ratte HRP-gekoppelt	1:10.000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

¹ in Western Blot Experimenten (siehe 2.2.2.7)

² HRP = Meerrettich Peroxidase, engl.: *Horseradish peroxidase*

2.1.7 Nährmedien

Die Futtermischungen der AG Klein (HHU, Düsseldorf) und AG Jäckle (MPIIbpc, Göttingen) unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung. Für die Haltung der Fliegenlinien und die Lebensspanne-Versuche wurde das Futter der AG Klein (folgend Medium 1 genannt) verwendet. Das Futter der AG Jäckle (im Folgenden Medium 2 genannt) diente als Basis für Experimente mit metabolischen Messungen. Hierfür wurden ggf. einzelne Inhaltsstoffe in ihrer Menge variiert oder dem Futter andere Substanzen zugegeben (siehe z.B. 3.4.3.2).

Tabelle 7: *Drosophila* Standardmedien

Zutaten	Medium 1 (AG Klein) ¹	Medium 2 (AG Jäckle) ^{1,2}
Agar	0,5 g	0,624 g
Polenta	7,1 g	8 g
Sojamehl	0,95 g	1 g
Trockenhefe	1,68 g	1,8 g
Rübensirup	4 g	2,2 g
Malzextrakt	4,5 g	8 g
Nipagin (10 % in 70 % EtOH)	1,5 ml	1,5 ml
Propionsäure	0,45 ml	0,63 ml

¹ Mengenangaben für 100 ml fertiges Futter

² für WH Medium bei ansonsten gleicher Zusammensetzung 0,18 g Trockenhefe

Apfelsaft-Agarplatten, 3 l

100 g Kristallzucker in 1 l Apfelsaft

85 g Agar

40 ml Nipagin (15 % in Ethanol)

Auf 3 l mit H₂O auffüllen

LB-Medium, 1 l

10 g Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)

5 g Bacto-Hefe Extrakt (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)

10 g NaCl

(15 g Agar für LB-Agarplatten)

Auf 1 l mit H₂O auffüllen (pH 7,5)

Ölsäure-Lösung, ca. 20 ml

- 2,8 g BSA (fettsäurefrei)
- 20 ml 0,1 M Tris (pH 8,0)
- 78 µl Ölsäure (Calbiochem/Merck, Darmstadt)

Bei 37°C für 1 h inkubieren, mit einem sterilen Filter (0,22 µm) in ein Gefäß abfüllen und bei 4°C lagern.

Die Zugabe von 32 µl/ml Medium ergibt eine Konzentration von 400 µM.

Schneider's *Drosophila* Komplettmedium

- 450 ml Schneider's *Drosophila* Medium (PAN-Biotech, Aidenbach)
- 50 ml hitzeinaktiviertes (30 min bei 56 °C) fötales Kälberserum, „FBS Premium, South Africa“ (PAN-Biotech, Aidenbach)
- 100 IE Penicillin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- 100 µg/ml Streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Für die Kultivierung von stabil-transfizierten Zellen zusätzlich:

- 10 µg/ml Blasticidin-S Hydrochlorid (AppliChem, Darmstadt)

SOB, 1 l

- 20 g Bacto-Trypton (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- 5 g Bacto-Hefe Extrakt (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- 10 mM NaCl
- 5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄

WZ (wenig Zucker) *Drosophila* Nährmedium

- 1 g Agar
- 8 g Trockenhefe
- 2 g Bacto-Hefe-Extrakt
- 2 g Bacto-Peptone
- 5,13 g Saccharose
- 2 mM MgSO₄
- 3,4 mM CaCl₂
- 1 ml Nipagin (10 % in 70 % Ethanol)
- 0,6 ml Propionsäure

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz	Quelle
Kc167	embryonale Zelllinie aus <i>D. melanogaster</i> mit Plasmatozyten-ähnlichem Expressionsmuster	Cherbas <i>et al.</i> (2011); Echalié und Ohanessian (1969)	M. Beller (Zelllinie aus Harvard)
HeLa	Menschliche Zelllinie, ursprünglich aus einem Cervixkarzinom	Scherer <i>et al.</i> , (1953)	K. Tschapalda

2.1.9 Fliegenlinien

Tabelle 9: Fliegenlinien

ID	Genotyp/Beschreibung	Verwendung	Quelle
MBD66	P{KK108771}VIE-260B	CG9186 RNAi Linie	VDRC (#105945)
MBD70	UAS-CG9186(S119A):eGFP/Sb	UAS Linie	Thiel <i>et al.</i> , 2013
MBD71	UAS-CG9186(S119A):eGFP/CyO	UAS Linie	Thiel <i>et al.</i> , 2013
MBD73	UAS-CG9186:eGFP	UAS Linie	Thiel <i>et al.</i> , 2013
MBD74	y1, w*; P{w[+mC]=Act5C-GAL4}25FO1/CyO, y[+]	GAL4 Linie, ubiquitär	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock center
MBD75	w*; P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/CyO	GAL4 Linie, ubiquitär	A. Herzig
MBD185	w[1118]	VDRC[1118] Kontrolllinie	VDRC
MBD187	pTGW-CG9186(S119A)	UAS Linie	Thiel <i>et al.</i> , 2013
MBD470	w1118;;	Kontrolllinie für CG9186 Deletionen	Diese Arbeit
MBD471	w1118;; CG9186 ^{35.2} / CG9186 ^{35.2}	CG9186 Deletion	Diese Arbeit
MBD472	w1118;; CG9186 ^{35.6} / CG9186 ^{35.6}	CG9186 Deletion	Diese Arbeit
MBD473	w1118;; CG9186 ^{35.7} / CG9186 ^{35.7}	CG9186 Deletion	Diese Arbeit
MBD476	w;esg-GAL4 tub-GAL80ts UAS-GFPnls/CyO;UAS-flp act>CD2>GAL4/TM6	Reporterlinie für akzessorische Drüse	Clive Wilson
MBD478	w1118;;CG9186 ^{35.1} / CG9186 ^{35.1}	CG9186 Deletion	Diese Arbeit
MBD496	w;lf/CyO;TM6b/+	Kontrolllinie für Deletionen	Diese Arbeit
MBD497	;esg-GAL4 UASsrc eGFP tubGAL80ts/CyO;MKRS/TM6b	Reporterlinie für akzessorische Drüse	AG Klein
MBD498	w;lf/CyO;TM6b/CG9186 ^{35.7}	CG9186 Deletion	Diese Arbeit
MBD499	w;lf/CyO;TM6b/ CG9186 ^{35.1}	CG9186 Deletion	Diese Arbeit

2.1.10 Geräte

Tabelle 10: Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bioruptor	Bioruptor™ Next Gen	Diagenode, Seraing, Belgien
Binokular	Leica EZ 4D	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Chromatograph	UltiMate 3000 RSLCnano system	Thermo Scientific, Dreieich
Gel Imager	Gel iX Imager	Intas Science Imaging, Göttingen
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Luminescent Image Analyzer	ImageQuant LAS4000 mini	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden
Zellzähl-Gerät	LUNA™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Massenspektrometer	Q Exactive plus hybrid quadrupole-orbitrap	Thermo Scientific, Bremen
Mehrkanalpipette	M300	BioHit, Helsinki, Finnland
Mikroskopsysteme	Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop Zeiss LSM 780 Konfokalmikroskop Cytation-3-Multidetektions-Reader	Carl Zeiss Microskopie GmbH, Jena Carl Zeiss Microskopie GmbH, Jena BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA
Mini-Zentrifuge	NeoLab-Mini-Zentrifuge Spectrafuge	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
NanoDrop	NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR Cycler	Arktik Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettierhilfe	Rota-Filler3000	Heathrow Scientific, York, England
Pipetten	Pipetman P10, P20, P200 P1000	Gilson, Inc., Middleton, USA
Plate Reader	SynergyMx	BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA
qPCR Cycler	CFX Connect™ Real-Time System	BioRad Laboratories, München
Rüttelzentrifuge	FastPrep FP120	Qbiogene, Illkirch, Frankreich
Schüttler	RS-OS 5	Phoenix Instrument, Garbsen
Tank-Blot-System	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories, München
Tischzentrifuge	Heraeus Fresco21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.11 Software

Tabelle 11: Besondere Software

Name	Version	Quelle
CellProfiler	2.2.0	Open source (cellprofiler.org)
CFX Manager	3.1	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
REST	2009	Pfaffl, 2001
SerialCloner	2.6.1	Open source (http://serialbasics.free.fr)
Zeiss ZEN	2011, 2012, lite	Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.2.1.1 Herstellung komplementärer DNA (cDNA)

Um cDNA aus *Drosophila* Embryonen zu gewinnen, wurden 200-300 w[1118]-Fliegen (MBD185) über Nacht in einem großen Käfig mit Apfelsaft-Agarplatte und Hefepaste gehalten. Die Embryonen auf der Platte wurden am folgenden Tag in ein Sieb überführt, mit PBT gewaschen und 3 min mit Bleichlösung dechorionisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Embryonen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen und die Embryonen bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Embryonen im Ultraschallbad homogenisiert und die RNA mit dem „*RNeasy Mini Kit*“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „*High Capacity mRNA-to-cDNA Mix*“ (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine Methode, DNA *in vitro* zu vervielfältigen (Saiki *et al.*, 1988). Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Identifikation der CG9186-Deletionsmutanten, für Klonierungen, zur Mutagenese sowie für die Herstellung von DNA Vorlagen für die *in vitro* Transkription von dsRNA angewendet.

Für einen 50 µl Standard PCR Ansatz wurde eine unit (engl. für Enzymeinheit, U) „*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*“ (New England Biolabs, Ipswich, USA), 1 µM Oligonukleotide (jeweils 0,5 µM, siehe Tabelle 3) und 0,5 µM dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingesetzt. Alle PCRs wurden in einem Arktik Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 98 °C. Die Elongationszeiten und Annealing Temperaturen richteten sich dabei nach der Größe des Amplifikats und den Eigenschaften der eingesetzten Oligonukleotide.

Um zielgerichtet Punktmutationen in CG9186 einzubringen, wurden Mutagenese-PCRs durchgeführt. Hierfür wurden ca. 34 Basen lange und zueinander komplementäre Oligonukleotid-Paare erstellt. In der Mitte dieser Oligonukleotide wurden in einzelnen Triplets Basen ausgetauscht, um so während der PCR zur Amplifikation einer mutagenisierten Variante der Vorlage zu führen. In einer 50 µl PCR Reaktion wurden 8 ng des zu mutagenisierenden Plasmids als Vorlage eingesetzt. Die PCR erfolgte analog zur Standard PCR unter Verwendung der „*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*“ (New England Biolabs, Ipswich, USA). Das PCR Produkt wurde anschließend für eine Stunde

bei 37 °C mit 5 U *DpnI* verdaut, um das durch die Bakterielle Vervielfältigung methylierte Ursprungs-Plasmid zu entfernen. Anschließend wurde *DpnI* für 5 min bei 80 °C inaktiviert und das überbleibende mutagenisierte Plasmid mit dem „*Qiagen Plasmid Mini Purification Kit*“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.2.1.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Für die Untersuchung der Gen-Expression wurden quantitative Echtzeit-PCRs (engl.: *quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die RNA aus den Köpfen sieben Tage alter Fliegen oder aus ganzen Larven isoliert. Für die Extraktion aus den Köpfen wurden die Tiere betäubt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Köpfe wurden durch starkes Schütteln der tiefgefrorenen Reaktionsgefäße von den Körpern getrennt. Pro Probe wurden 15 Köpfe mit einer Metallpistille in Trizol (Thermo Scientific, Bremen) homogenisiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde Chloroform hinzugegeben und intensiv mit der Probe gemischt. Durch Zentrifugation wurde die anschließende Phasentrennung des Gemischs erleichtert und die obere wässrige Phase mit dem RLT Puffer des „*RNeasy Mini Kits*“ (Qiagen, Hilden) vermischt. Anschließend wurde die RNA nach Herstellerangaben aus dem Gemisch isoliert, mit RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration mit einem NanoDrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Anzahl an verwendeten Larven richtete sich nach den Futterkonditionen. Für Versuche auf Standard- oder WZ Medium wurde die RNA von fünf Larven, für Versuche auf WH Medium die von 20 Larven extrahiert. Hierfür wurden die Tiere in RLT Puffer mit DTT homogenisiert und die RNA nach Herstellerangaben mit dem „*RNeasy Mini Kit*“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die cDNA Synthese erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „*QuantiTect Reverse Transcription Kit*“ (Qiagen, Hilden) unter Verwendung von 1 µg RNA. Die eigentliche qRT-PCR wurde in einem CFX Connect™ Real-Time System (BioRad Laboratories, München) unter Verwendung eines „*GoTaq qPCR Master Mix*“ (Promega, Madison, Wisconsin, USA) und den in 2.1.4 aufgeführten Oligonukleotiden verwendet. Die Analyse der Daten fand mit der Software CFX-Manager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und REST (Pfaffl, 2001) statt.

2.2.1.4 Gateway™ Klonierung

Die Klonierung von Expressionsvektoren erfolgte nach dem „*Invitrogen Gateway System*“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Zunächst wurden „Entry“-Vektoren generiert, indem der gewünschte ORF (engl.: *open reading frame*) auf Basis von cDNA (siehe 2.2.1.1) per PCR amplifiziert wurde. Hierfür wurden Oligonukleotidpaare verwendet, die jeweils einen Überhang mit *NotI* oder *AscI* Schnittstelle besitzen (siehe 2.1.4). Das

Amplikon wurde nun mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *AscI* verdaut und über diese beiden Schnittstellen in ein pENTR/D-TOPO™-Plasmid ligiert.

Im Rahmen einer Rekombinationsreaktion wurden die ORFs dann in Expressionsvektoren (Destinations-Vektoren) kloniert. Hierfür wurde der „GatewayLR Clonase II enzyme mix“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet und die Reaktion nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.5 Gen-Synthese

Bestimmte Vektoren (siehe Tabelle 5) wurden von der Firma Genscript (Piscataway, USA) durch Gensynthese erzeugt. Die pBFv-U6.2 Vektoren für Erstellung von CG9186 Nullallelen mittels CRISPR/Cas9 wurden zunächst vervielfältigt (siehe 2.2.1.6) und anschließend wie in 2.2.1.9 beschrieben verwendet. CG9186 Konstrukte mit Lysin zu Arginin Austausch-Mutationen wurden wie in 2.2.1.2 beschrieben amplifiziert und anschließend über Gateway™ Klonierung (siehe 2.2.1.4) in Expressionsvektoren kloniert.

2.2.1.6 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden zunächst aus den *E. coli* Stämmen DH5α und ccdB Survival 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Sambrook und Russell (2006) mit CaCl₂ chemisch kompetente Zellen generiert. Für die Transformation wurden 50-100 µl einer Glycerinkultur der jeweiligen Zellen eingesetzt. Die DNA wurde zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90-sekündigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis gestellt und anschließend 900 µl SOB Medium (siehe 2.1.7) zu den Zellen gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurden 100 - 200 µl der Zellsuspension auf LB Agarplatten mit Selektionsantibiotika (z.B. Ampicillin bei pUbi-Plasmiden oder Kanamycin bei pENTR Plasmiden) ausgestrichen.

2.2.1.7 Extraktion genomischer DNA

Die Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus *Drosophila* erfolgte nach einem Protokoll von Gloor *et al.* (1993). Hierfür wurde eine einzelne Fliege in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit einer elektrischen Pistille in 50 µl Squishing Puffer (siehe 2.1.1) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 25 min bei 37 °C inkubiert und die im Puffer enthaltene Proteinase K anschließend für 2 min bei 95°C inaktiviert. 1 µl dieses Homogenates wurde als Template für eine 20 µl PCR Reaktion eingesetzt.

2.2.1.8 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sowie Source BioScience (Nottingham, England) durchgeführt. Für die Sequenzierung von Genen in pENTR-Vektoren wurden die von den Firmen bereitgestellten M13

Oligonukleotide verwendet. Für die Sequenzierung der CG9186 Nullallele (siehe 2.2.1.9) wurden Oligonukleotide entworfen, die die vorausgesagten Läsionen flankieren. Mit diesen Oligonukleotiden wurden auf Basis genomischer DNA mittels PCR Amplifikate erstellt und diese nach Aufreinigung mit dem „*QIAquick PCR Purification Kit*“ (Qiagen, Hilden) eingesendet.

2.2.1.9 Herstellung von CG9186 Nullallelen mittels CRISPR/Cas9

Die Generierung von CG9186 Nullallelen erfolgte mit dem CRISPR/Cas9 System in Anlehnung an Kondo und Ueda (2013). Die CRISPR/Cas9 Technik beruht auf dem in Bakterien entdeckten antiviralen Abwehrmechanismus CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) und der Endonuklease Cas9 (*CRISPR associated endonuclease 9*). Unter Verwendung spezifischer gRNA (guide RNA) kann diese Endonuklease zu festgelegten Zielen im Genom geleitet werden und dort Doppelstrangbrüche (DSBs) erzeugen (Übersichtsartikel Doudna und Charpentier (2014)). Potentielle gRNA Sequenzen innerhalb von CG9186 wurden mithilfe des *DRSC Find CRISPR* (Version 2) Werkzeugs (<http://www.flyrnai.org/crispr2/>) identifiziert. Um eine mit PCR detektierbare Deletion innerhalb des CG9186 Gens zu erzeugen, wurden zwei gRNA Sequenzen und damit zwei potentielle DSBs gewählt. Eine der Sequenzen liegt in Position 3L:1311958..1311980 (+ Strang) (TCTCTTACGATTACAGCCATAGG) innerhalb des ORFs) von CG9186, die andere im untranslatierten Bereich (engl.: *untranslated region*, UTR) in Position 3L:1313094..1313116 (- Strang) (TTTATCAGAGCTATCAACCCTGG).

Oligonukleotide für diese beiden Sequenzen wurden in pBFv-U6.2 Vektoren (siehe Abbildung 7) kloniert und diese in >200 Embryonen einer Fliegenlinie injiziert, welche die Endonuklease Cas9 spezifisch in der Keimbahn exprimiert (yw;attP40{nos-Cas9}/CyO). Die Injektion wurde von der Firma BestGene (Chino Hills, CA, USA) durchgeführt. Insgesamt 36 der injizierten Embryonen entwickelten sich zu adulten Tieren und wurden einzeln mit einer Fliegenlinie mit Balancierchromosomen (w-;lf/CyOwg-lacZ;MKRS(Sb)/TM6b(Hu,Tb,e)) gekreuzt (Kreuzung I: #1 bis #36). Aus dieser Generation wurden nun 6-7 Tiere erneut mit der Balancierchromosomen-Linie gekreuzt (z.B.: Kreuzung II: #1.1 bis #1.6) und die Nachkommen mit PCR auf eine Mutation hin untersucht. Für die PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die die vorausgesagte 1,6 kb große Läsion flankieren (siehe 2.1.4) und in einer Wildtypsituation zu einem Amplikon in der Größe von 2857 bp führen. Von den 36 gekreuzten Tieren besaßen 2 Tiere aus Kreuzung I CG9186-Mutationen in ihrer Keimbahn (#6 und #35) und produzierten in Kreuzung II mutante Nachkommen (z.B.: 35.1, 35.2, usw...). Die mutanten Tiere wurden mit einer w-;MKRS(Sb)/TM6b(Hu,Tb,e) Linie gekreuzt, um die Marker von Chromosom 2 zu entfernen. Das Balancier-Chromosom TM6b wurde in einem anschließenden

Kreuzungsschritt mit w-;;+/TM3(Sb) Tieren ausgetauscht und die Stämme nach einer weiteren Generation auf Homozygotie untersucht. Lediglich die Nachkommen des Tieres #35 waren homozygot lebensfähig. Mit ihnen wurden mehrere homozygote Stämme etabliert und für weitere Experimente verwendet.

Um zu bestätigen, dass es sich auch auf Proteinebene um Nullmutanten handelt, wurden Western Blots mit einem CG9186 spezifischen Antikörper durchgeführt. Außerdem wurden die CG9186-Läsionen der Allele 35.2 und 35.7 sequenziert (siehe Kapitel 3.4.1).

pBFv-U6.2

attB: 7-290
 vermilion: 469-1962
 U6 promoter: 2207-2605
 gRNA: 2627-2707
 Amp^R: 3987-4847

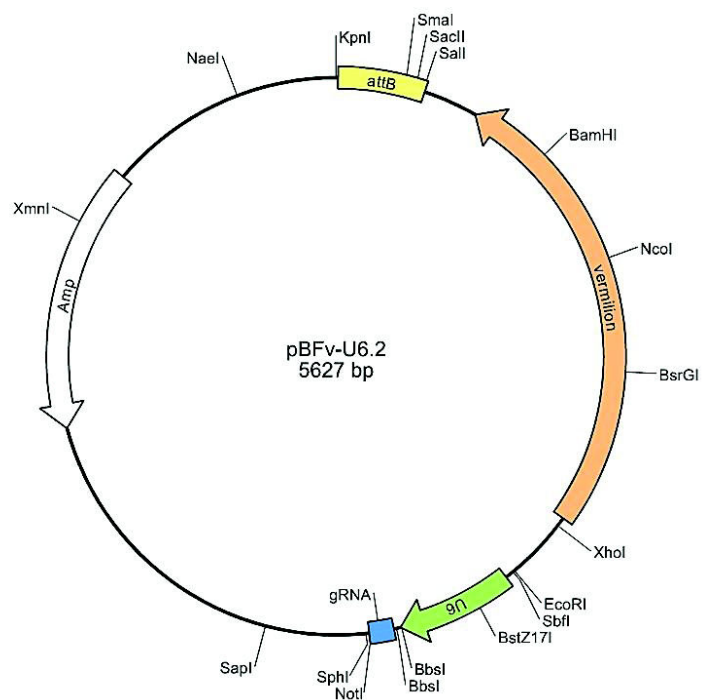


Abbildung 7: Vektorkarte des pBFv-U6.2 Vektors (Kondo und Ueda, 2013)

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Messung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay

Die Proteinkonzentration wurde bestimmt, um die Ergebnisse aus Messungen verschiedener metabolischer Parameter (siehe z.B. 2.2.2.2) zu normalisieren oder eine gleichmäßige Auftragung von Proben auf Proteingele (siehe 2.2.2.6) zu gewährleisten. Die Messungen wurden unter Verwendung des „Pierce BCA Protein Assay Kits“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip der Messung beruht auf der Biuret Reaktion, bei der in alkalischem Milieu Cu^{2+} von Peptidbindungen zu Cu^+ reduziert wird. Cu^+ wiederum bildet mit Bicinchoninsäure (engl.

bicinchoninic acid, BCA) einen violetten Komplex, der bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann (Smith *et al.*, 1985). Die Quantifizierung erfolgte über eine Standardreihe mit bovinem Serum Albumin (BSA).

2.2.2.2 Messung von Triacylglycerolen (TAGs)

Triacylglycerole (TAGs) sind Esterverbindungen aus einem Glycerol- und drei Fettsäure-Molekülen. Sie stellen in *Drosophila* einen integralen Bestandteil der Speicherung von Energie in Form von Lipiden dar (Carvalho *et al.*, 2012). Um Rückschlüsse auf die Menge an gespeicherten Lipiden zu ziehen, wurden TAGs - wie in Hildebrandt *et al.* (2011) beschrieben - unter Verwendung des „Infinity Triglycerides Reagent“ (ITR, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) quantifiziert.

Für die Messung wurden acht adulte Tiere (oder fünf L3 Larven) in 500 µl (Männchen) oder 1.000 µl (Weibchen bzw. L3 Larven) einer 0,05-prozentigen TWEEN 20 Lösung mit einer Stahl- bzw. Keramikkugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel gegeben und in einer BIO101/Savant FastPrep FP120 Cell disruptor Rüttelzentrifuge (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) homogenisiert. Pro Genotyp, Geschlecht und Versuchskondition wurden zwischen 3 und 5 Reaktionsgefäße mit Tieren eingesetzt. Im Homogenat enthaltene endogene Enzyme wurden durch eine fünfminütige Inkubation der Proben im Wasserbad bei 70 °C inaktiviert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Proben für eine Minute bei 5.000 rpm zentrifugiert, 400 µl des Überstandes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 14.800 rpm für weitere 3 min zentrifugiert. Für die eigentliche Messung wurden 25 µl des Überstandes zusammen mit 25 µl der 0,05-prozentigen TWEEN 20 Lösung und 200 µl der ITR in eine klare 96-well Platte pipettiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die im ITR enthaltenen Enzyme spalten nun die Acylglycerole zu freien Fettsäuren und Glycerol, welches in weiteren enzymatischen Schritten unter Freisetzung von H₂O₂ umgesetzt wird. H₂O₂ reagiert mit 4-Aminoantipyrin und 3,5-Dichloro-2-Hydroxybenzen Sulfonat zu einem roten Farbstoff, der bei 510 nm in einem Synergy Mx Mikrotiter-Plattenlesegerät (BioTek Germany, Bad Friedrichshall) photometrisch gemessen werden kann. Für eine genaue Quantifizierung wurde mit reinem Glycerol eine Standardreihe angesetzt und die gemessenen Werte mithilfe der Proteinkonzentration der Proben (siehe 2.2.2.1) normalisiert. Bei der hier angewandten Methode werden neben TAGs auch andere Glycerolester wie Mono- und Diacylglycerol (MAG, DAG) sowie freies Glycerol gemessen. Diese können aber im Hinblick auf den gesamtorganismischen Lipidgehalt vernachlässigt werden (Hildebrandt *et al.*, 2011).

2.2.2.3 Messung von Glukose (Glu) und Glykogen (Gly)

Wie beim Menschen stellt das Polysaccharid Glykogen auch bei *Drosophila* die wichtigste Kohlenhydrat-basierte Speicherform von Energie dar. Als Transportform dient

hauptsächlich Trehalose und zu einem geringeren Teil auch Glukose (Wyatt und Kale, 1957). Die Messung der gesamtorganismischen Glukose- und Glykogen-Spiegel erfolgte in Anlehnung an Tennesen *et al.* (2014) unter Verwendung des „*Glucose (GO) Assay Kits*“ (Sigma Aldrich, Steinheim). Für die Messung wurden acht adulte Tiere (oder fünf L3 Larven) mit 500 µl (für Männchen) bzw. 1.000 µl (für Weibchen bzw. L3 Larven) einer eiskalten 0,05-prozentigen TWEEN 20 Lösung und einer Stahl- bzw. Keramik-Kugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel gegeben und in einer BIO101/Savant FastPrep FP120 Cell disruptor Rüttelzentrifuge (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) homogenisiert. Pro Genotyp, Geschlecht und Versuchskondition wurden zwischen 3 und 5 Reaktionsgefäße mit Tieren eingesetzt. Das Homogenat wurde für 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert und anschließend in einer auf 4°C vorgekühlten Tischzentrifuge bei 5.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Vom Überstand wurden 300 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und dieses für drei Minuten bei 14.800 rpm zentrifugiert. Um freie Glukose zu messen, wurden 30 µl des Überstandes zusammen mit 100 µl des GO-Reagents in eine klare 96-well Platte pipettiert und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Hierbei wird die in der Probe enthaltene Glukose unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid oxidiert. Das Wasserstoffperoxid reagiert in Anwesenheit einer Peroxidase mit der Substanz o-Dianisidine zu einem roten Farbstoff. Durch die Zugabe von 100 µl 12 N Schwefelsäure wird der Farbstoff stabilisiert und kann bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch gemessen werden. Für die Bestimmung von Glykogen wurden die Proben vorab 1:3 verdünnt und dem GO Reagent das Enzym Amyloglucosidase (Sigma Aldrich, Steinheim) hinzugegeben. Die zugefügte Amyloglucosidase spaltet das in der Probe enthaltene Glykogen zu freier Glukose, welche anschließend wie oben beschrieben in eine farbbgebende Reaktion eingeht. Gemessen wurde hier also die Gesamt-Glukose. Zur indirekten Bestimmung der Glykogen-Menge wurde bei der Auswertung der Wert der freien Glukose von der Gesamt-Glukose abgezogen. Für eine genaue Quantifizierung wurden außerdem mit reinem Glykogen und Glukose Standardreihen angesetzt und die gemessenen Werte mithilfe der Proteinkonzentration der Proben (siehe 2.2.2.1) normalisiert.

2.2.2.4 Messung von Trehalose (Tre)

Trehalose stellt den größten Anteil an Zuckern in der Hämolymphe von Insekten dar, Glukose hingegen einen geringeren Teil (Thorat *et al.*, 2012). Die Messung von Trehalose in adulten Fliegen erfolgte in Anlehnung an Tennesen *et al.*, 2014. Hierfür wurden acht adulte Tiere in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Trehalose Puffer (siehe 2.1.1) unter Verwendung einer elektrischen Pistille homogenisiert. Pro Genotyp, Geschlecht und Versuchskondition wurden zwischen 3 und 5 Reaktionsgefäße mit Tieren eingesetzt. Zum Homogenat wurden weitere 200 µl Trehalose Puffer gegeben und die Proben für 10 min bei 70°C im Wasserbad hitzeinaktiviert, um einen weiteren enzymatischen Abbau der

Trehalose zu verhindern. Die Proben wurden anschließend für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Von der Probe wurden nun jeweils 30 µl in zwei neue 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Zu einer der beiden Proben wurden weitere 30 µl Trehalose Puffer gegeben. Diese Probe diente zur Messung der freien Glukose. In das andere Reaktionsgefäß wurden 30 µl Trehalose (+) Puffer (siehe 2.1.1) pipettiert, der zusätzlich das Enzym Trehalase enthält. Die Trehalase baut die in der Probe enthaltene Trehalose zu freier Glukose ab. Gemessen wurde also die Gesamt-Glukose. Die Messung der Proben erfolgte - wie in 2.2.2.3 beschrieben - unter Verwendung des „*Glucose (GO) Assay Kits*“ (Sigma Aldrich, Steinheim). Anhand der Differenz aus Gesamt-Glukose und freier Glukose lässt sich so die enthaltene Trehalose berechnen.

Um die Trehalose-Konzentration in der Hämolymphe adulter Tiere zu messen, wurden jeweils 30 Fliegen mit CO₂ betäubt, mit einer Ultra-Micro Nadel (Wolfram, Durchmesser 0,12 mm) in den Thorax gestochen und zügig in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß mit kleinem Loch im Boden gegeben. Das 0,5 ml Reaktionsgefäß wurde in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, in das zuvor 50 µl eiskalter Trehalose Puffer pipettiert wurde. Die Gefäße wurden in einer gekühlten Tischzentrifuge für 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Das innere 0,5 ml Gefäß wurde verworfen, und das äußere Gefäß mit dem Trehalase Puffer und der extrahierten Hämolymphe wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Probe wurde für 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert und anschließend in einer 1:4 Verdünnung (15 µl Probe + 45 µl Puffer) mit Trehalose Puffer, Trehalose (+) Puffer oder PBS vermischt. Unter Verwendung dieser Proben wurden dann wie beschrieben Glukose, Trehalose und Protein bestimmt. Pro Genotyp, Geschlecht und Versuchskondition wurden zwischen 4 Reaktionsgefäße (insgesamt 120 Tiere) eingesetzt.

2.2.2.5 Cholesterol- und Cholesterolester-Messungen

Cholesterol ist ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen aller tierischen Zellen sowie ein Vorläufermolekül bei der Synthese von Steroidhormonen. Es liegt in freier Form sowie verestert mit Fettsäuren als sogenannte Cholesterolester vor (zusammengefasst in Cerqueira *et al.*, 2016). Für die Quantifizierung von Cholesterol und Cholesterolestern in *Drosophila* wurde das „*Amplex Red Cholesterol Assay Kit*“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Tennessen *et al.* (2014). Hierfür wurden 20 adulte Tiere (Männchen oder Weibchen) mit 500 µl 0,05 % TWEEN 20 in Wasser sowie einer Stahl- bzw. Keramikugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel gegeben und in einer BIO101/Savant FastPrep FP120 Cell disruptor Rüttelzentrifuge (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) zweimal für 20 s homogenisiert. Pro Genotyp, Geschlecht und Versuchskondition wurden zwischen 3 und 5 Reaktionsgefäße mit Tieren eingesetzt. Im Homogenat enthaltene Enzyme wurden für 5 min bei 70°C

inaktiviert. Um eventuell vorhandenen Schaum zu entfernen, wurden die Proben für 2 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, das entstandene Pellet allerdings durch Auf- und Abpipettieren wieder gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt. Vom Homogenat wurden 400 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der verbleibende Rest diente in einer Verdünnung von 1:10 zur Bestimmung von Protein und ggf. TAGs (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2). Zu den 400 µl Fliegen-Homogenat wurden 900 µl eines Chloroform Methanol Gemischs (2:1) gegeben und die enthaltenen Lipide durch eine 30-minütige Inkubation mit regelmäßigem Durchmischen extrahiert. Die Proben wurden für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, die untere (lipidhaltige) Phase in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt und die Lipide anschließend unter Stickstoffbegasung eingeengt. In das Reaktionsgefäß wurde nun eine Keramikugel und 500 µl des Amplex Red 1x Reaktionspuffers gegeben und die Lipide in der Rüttelzentrifuge (s.o.) in Lösung gebracht. Um die Solubilisierung zu erleichtern, wurden die Proben nun für 5 min bei 70 °C inkubiert, erneut in der Rüttelzentrifuge und anschließend im Ultraschallbad behandelt. Die Proben wurden nun zu jeweils 100 µl auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Um Cholesterolester zu spalten und so den Gesamt-Cholesterolgehalt zu bestimmen, wurde in eines der beiden Reaktionsgefäße 0,4 U einer Cholesterolesterase (Sigma-Aldrich, Steinheim) gegeben und alle Proben unter konstantem Schütteln für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 25 µl der Probe sowie 25 µl des Amplex Red 1x Reaktionspuffers in ein *well* einer schwarzen 96-*well* Platte vorgelegt und anschließend 90 µl des Reaktionsmixes hinzugegeben. Die im Mix enthaltene Cholesteroxidase verstoffwechselt Cholesterol zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid. Letzteres reagiert unter Anwesenheit einer Meerrettich Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) mit 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine zu Resorufin, welches fluorometrisch bestimmt werden kann (Ex. 530 nm, Em. 590 nm). Die Quantifizierung erfolgt mithilfe einer Cholesterol Standardreihe und den gemessenen Proteinkonzentrationen. Um die Cholesterolester zu bestimmen, wird der Wert des freien Cholesterols (Reaktionsgefäß ohne Cholesteroxidase) vom Wert des Gesamtcholesterols (Reaktionsgefäß mit Cholesteroxidase) subtrahiert.

2.2.2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein gelelektrophoretisches Verfahren, mit dem Proteine nach ihrer molekularen Masse getrennt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diskontinuierliche SDS-PAGEs nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Gele sowie des Lauf- und Probenpuffers ist unter 2.1.1 beschrieben.

2.2.2.7 Western Blot

Die Western Blot Methode wurde angewendet, um spezifisch Proteine in Proben nachzuweisen und ggf. zu quantifizieren. Die Durchführung richtete sich hierbei nach Standardprotokollen (Towbin *et al.*, 1979). Nach Auftrennung im Rahmen einer SDS-PAGE (siehe 2.2.2.6) wurden die Proteine für 45 min bei 150 mA (pro Gel) im Bio-Rad Mini-PROTEAN 2 Gelsystem (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) übertragen. Unbesetzte Bindestellen auf der Membran wurden über Nacht bei 4 °C mit 5 % Milchpulver in PBT blockiert. Nach einem Waschschrift in PBT wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper inkubiert, der zuvor mit 2,5 % Milchpulver in PBT verdünnt wurde. Für die angewendeten Verdünnungen siehe Tabelle 6. Nach drei Waschschriften mit PBT erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit den HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern. Die Membran wurde erneut drei Mal mit PBT gewaschen und anschließend mit 1 ml „*SuperSignal West Pico Substrat*“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) beträufelt. Die Detektion des entstehenden chemilumineszenten Signals erfolgte über eine CCD Kamera in einem ImageQuant LAS 4000 mini Systems (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden). Für den Nachweis weiterer Proteine wurden die Antikörper mit Restore „*Western Blot Stripping Buffer*“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) von der Membran entfernt und diese erneut über Nacht mit 5 % Milchpulver in PBT blockiert.

2.2.2.8 Markierung und Aufreinigung aktiver Serin-Hydrolasen

Die Markierung und Aufreinigung aktiver Serin-Hydrolasen wurde unter Verwendung der „*ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase probe*“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden hierfür zunächst stabil transfizierte polyklonale Zelllinien auf Basis von Kc167 Zellen erstellt, die eGFP markierte Varianten von CG9186 oder andere zu untersuchende Proteine exprimieren. Zellen aus jeweils einer dicht bewachsenen 75 cm² (T75) Zellkulturflasche wurden in eiskaltem PBS resuspendiert, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit eiskaltem PBS wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun in 100 µl „*Pierce IP*“ Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ohne die Zugabe von Protease-Inhibitoren für 30 min auf Eis lysiert und dabei gelegentlich gemischt. Die Proben wurden für 5 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben gemessen. Die Proteinkonzentration dieser Lysate wurde mit weiterem Lysepuffer auf 2 mg/ml eingestellt und 500 µl der Probe zusammen mit 10 µl der „*ActivX Desthiobiotin-FP Serine Hydrolase*“ Lösung (finale Konzentration 2 µM) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer 45-

minütigen Inkubationszeit, in welcher die Sonde an aktive Serin-Hydrolasen gebunden hat, wurden 500 µl Lysepuffer (auf 10 M mit Harnstoff versetzt) sowie 50 µl „*Pierce High Capacity Streptavidin Agarose*“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hinzugegeben und bei 4 °C für eine Stunde in einem Rotator inkubiert. Streptavidin Agarose bindet das mit den Sonden fusionierte Desthiobiotin und ermöglicht so das Aufreinigen der Sonden inklusive der gebundenen Serin-Hydrolasen. Hierfür wurden die Proben für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Pellet aus Streptavidin Agarose drei Mal mit kaltem Lysepuffer (5 M Urea) gewaschen. Um die Proteine zu eluieren, wurde das Pellet mit 2x SDS Probenpuffer in PBS (siehe 2.1.1) versetzt und für 5 min gekocht. Das Eluat wurde in einem SDS Gel (siehe 2.1) aufgetrennt und im Rahmen eines Western Blots (siehe 2.2.2.7) mit eGFP spezifischem Antikörper auf die Anwesenheit der Fusionsproteine hin untersucht.

2.2.2.9 Co-Immunpräzipitation

Co-Immunpräzipitations-Experimente (Co-IP, engl. = *co-immunoprecipitation*) wurden durchgeführt, um Interaktionspartner von CG9186 zu identifizieren. Hierfür wurden stabil transfizierte *Drosophila* Kc167 Zellen verwendet, die entweder eGFP alleine oder ein eGFP-CG9186 Fusionsprotein exprimieren (siehe 2.2.4.4). Die Zelllinien wurden entweder mit 400 µM Ölsäure oder ohne Ölsäure wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben kultiviert. Pro Zelltyp und Kondition wurden die Zellen aus jeweils einer dicht bewachsenen 75 cm² (T75) Zellkulturflasche in eiskaltem PBS resuspendiert, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in neuem kaltem PBS resuspendiert, und die Reaktionsgefäße erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit eiskaltem PBS wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun in 100 µl „*Pierce IP*“ Lysepuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren (cOmplete, EDTA-frei, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) für 30 min auf Eis lysiert und dabei gelegentlich gemischt. Die Proben wurden für 5 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand zusammen mit 300 µl frischem Lysepuffer in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Co-IP wurden GFP-Trap_A *beads* (engl.= Kügelchen) der Firma ChromoTek (Planegg-Martinsried, Germany) nach Herstellerangaben verwendet. Pro Zelllinie und Kondition wurden jeweils 25 µl der GFP-Trap_A Suspension zwei Mal in eiskaltem Verdünnungs-Puffer (10 mM Tris/Cl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA) gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff und einer Zentrifugation (2.500 x g für 2 min bei +4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Lysat (siehe oben) zu den *beads* gegeben. Die Bindung der Proteine an die GFP-Trap_A *beads* fand über Nacht bei 4°C statt. Die Reaktionsgefäße wurden dabei kontinuierlich invertiert, um eine stetige Durchmischung zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 2.500 x g für

2 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die *beads* mit den gebundenen Proteinen wurden nun drei Mal mit dem Verdünnungs-Puffer (siehe oben) gewaschen. Für die Proben der Zelllinien, die mit Ölsäure behandelt wurden, wurde nach dem ersten Waschschrift die Stringenz erhöht und die NaCl Konzentration des Puffers auf 200 mM angehoben. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand abgenommen und die Proteine durch Zugabe von 50 µl 0,2 M Glycin (pH 2,5, Inkubationszeit 30 s) eluiert. Die Proben wurden bei 2.500 x g für 2 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 5 µl 1M Tris-Base (pH 10,4) neutralisiert. Die Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.2.10 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde im Molecular Proteomics Laboratory (MPL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wie bei Kolkhof *et al.* (2017) beschrieben durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst in einem Polyacrylamid-Gel getrennt. Proteinhaltige Banden wurden nach einer Silberfärbung ausgeschnitten, entfärbt, gewaschen und die Proteine mit Dithiothreitol reduziert, mit Chloracetamid alkyliert, mit Trypsin verdaut und nach einer Peptidextraktion schließlich in 0,1 % Trifluoressigsäure resuspendiert. Anschließend wurden die Peptide mit einem Ultimate 3000 RSLCnano Flüssigchromatographie-System (Thermo Scientific, Dreieich) aufgetrennt über eine Nano-Elektrospray-Ionisationsquelle ionisiert und mit einem Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Bremen) Massenspektrometer analysiert (Kolkhof *et al.*, 2017).

2.2.2.11 Herstellung delipidierter Hefe

Hefen stellen sowohl unter natürlichen als auch unter Laborbedingungen eine zentrale Komponente der Ernährung von *Drosophila* dar und dienen den sterol auxotrophen Tieren als Quelle für Sterole und andere Lipide (Begg und Robertson, 1950). Um den Lipidgehalt der Hefe für die Herstellung eines Lipid-armen Mediums zu reduzieren, wurden 20 g Trockenhefe in einen Glasbecher mit 50 ml Chloroform gegeben und für 30 min unter gelegentlichem Rühren inkubiert. Nach dem Absetzen der Hefe wurde das Chloroform ausgetauscht und die Hefe für weitere 30 min inkubiert. Das Chloroform wurde erneut entfernt, ein Papiertuch über den Glasbecher gelegt und die Hefe für mindestens 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.2.12 Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie (TLC)

Für eine qualitative bzw. semi-quantitative Untersuchung der einzelnen Lipidklassen von Probenmaterial wurden die enthaltenen Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie (engl. *thin layer chromatography*, TLC) aufgetrennt. Für die

Untersuchung adulter Fliegen wurden zehn Tiere zusammen mit 1 ml Wasser und einer Keramikugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel gegeben und in einer BIO101/Savant FastPrep FP120 Cell disruptor Rüttelzentrifuge (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) für 20 s homogenisiert. 900 µl des Homogenats wurden in ein Glasröhrchen mit Schraubdeckel (8 ml) überführt und 4 ml eines Chloroform Methanol Gemischs (2:1) hinzugegeben. Um die Lipidzusammensetzung von Trockenhefe, delipidierter Hefe oder Bacto Yeast Extract (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) zu untersuchen, wurden für die Extraktion 100 mg Probe zunächst mit 500 µl Wasser vermischt und anschließend mit 4,5 ml des Chloroform Methanol Gemischs (2:1) in ein Glasröhrchen mit Schraubdeckel (8 ml) gegeben. Die Extraktion wurde bei 37°C für 30 min unter konstantem Schütteln durchgeführt. Anschließend wurden die Röhrchen für 5 min bei 1.250 rpm zentrifugiert, um die Phasen-Trennung des Gemischs zu beschleunigen. Die unterste (lipidhaltige) Phase wurde in ein kleineres Glasröhrchen mit Schraubdeckel (4 ml) gegeben und die enthaltenen Lipide unter einem konstanten Stickstoffstrom eingeengt. Die Lipide wurden in 400 µl Chloroform aufgenommen und 30 µl dieser Lösung auf eine Kieselgelplatte (Merck, Darmstadt) 1,5 cm über dem unteren Rand aufgetragen. Zur späteren Identifikation der Lipidbanden wurden außerdem 20 µl verschiedener Lipid-Standards (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) aufgetragen. Die Standards wurden zuvor auf 0,2 mg/ml in Chloroform verdünnt. Nach einstündiger Äquilibration der TLC Glaskammer mit dem Laufmittel wurde die Kieselgelplatte vorsichtig in das Laufmittel gestellt. Sobald die Laufmittelfront einen Abstand von ca. 2 cm zum oberen Rand der Platte erreicht hatte, wurde die Kieselgelplatte entfernt und für mindestens 45 min unter dem Abzug und anschließend für 1 h bei 37 °C getrocknet. Die Platte wurde mit einer wässrigen Lösung aus 10 % CuSO₄ (w/v) und 10 % H₃PO₄ (v/v) besprüht (siehe 2.1.1) und danach wieder für mindestens eine Stunde getrocknet. Die Lipidbanden wurden durch Veraschung der Kieselgelplatte bei 120 °C für 30-40 min visualisiert.

2.2.2.13 Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBA-RS)

Die TBA-RS (thiobarbituric acid reactive substances) Methode wird für den Nachweis von sekundären Reaktionsprodukten der ROS- induzierten Lipid-Peroxidation genutzt. So lässt sich indirekt nachweisen, ob oxidativer Stress vorliegt. Die Reaktionsprodukte der Lipidperoxidation reagieren mit TBA zu Trimethin-Farbstoffen, die photometrisch und fluorometrisch nachgewiesen werden können (Asakawa und Matsushita, 1979; Czerska *et al.*, 2015; Halliwell und Chirico, 1993). Für die Messung wurden 20 adulte Tiere in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und in 200 µl eiskaltem PBS mit einer elektrischen Pistille auf Eis homogenisiert. Pro Genotyp wurden vier Reaktionsgefäße (80 Tiere) eingesetzt. 125 µl des Homogenats wurde mit 187,5 µl Phosphorsäure (0,44 M) und 62,5 µl Thiobarbitursäure (0,6 %) in ein 2 ml Schraubdeckel-Röhrchen gegeben und für 40 min bei 100 °C inkubiert. Der Rest des Homogenats aus dem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde in

einer Verdünnung von 1:10 für die Proteinbestimmung genutzt (siehe 2.2.2.1). Für die TBA-RS Messung wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe mit TEP (1,1,3,3-Tetraethoxypropane, Sigma Aldrich) angefertigt und wie die Proben prozessiert. Für die Erstellung der Standardlösung wurde TEP in Ethanol:Wasser (1:1) in einer Konzentration von 10 μM gelöst. Um die Verdünnungsreihe zu erstellen, wurde der Standard 1:100 mit PBS verdünnt (0,1 μM) und diese Mischung weiterverdünnt. Als Leerprobe dienten 125 μl PBS. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben und Standards auf Eis abgekühlt und anschließend 375 μl 0,1 M NaOH (in Methanol) hinzugegeben und gründlich gemischt. 500 μl der Proben wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. 100 μl des Überstandes wurden in einer schwarze 96-*well* Platte überführt und die TBA-RS-Konzentration fluorometrisch bestimmt (Ex. 530 nm, Em. 555 nm).

2.2.2.14 Luciferase Komplementations-Experimente

Für die Identifikation bzw. Bestätigung von Protein-Protein Interaktionen wurden Luciferase-Komplementations-Experimente durchgeführt. Bei dieser Technik macht man sich die Fähigkeit des Enzyms Luciferase zunutze, bei Vorhandensein des Substrates Coelenterazin ein chemilumineszenz-Signal zu erzeugen. Im Rahmen der Experimente werden mögliche Interaktionen identifiziert, indem die beiden Proteine eines Interaktions-Paares jeweils mit einer Hälfte der Luciferase fusioniert zur Expression gebracht werden. Findet eine Interaktion zwischen statt, komplementieren die beiden Luciferase-Fragmente (Gluc(1) und Gluc(2)) und es wird messbar Licht emittiert. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Kolkhof *et al.*, (2017) beschrieben

2.2.3 Histologische Methoden und Mikroskopie

2.2.3.1 Herstellung von Präparaten aus Zellkulturzellen

Für die Untersuchung der Morphologie von LDs (siehe 3.3.2) oder der Lokalisation von Proteinen (3.2.3) wurden Kc176 Zellkulturzellen verwendet. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von idealerweise 70-80 % durch Auf- und Abpipettieren des Mediums vom Boden des Kulturgefäßes (z.B. 12-*well* Platte) gelöst und 400 μl dieser Zellsuspension auf ein Deckgläschen gegeben. Nachdem die Zellen für 30-40 min an das Deckgläschen adhären konnten, wurden 350 μl des Zellkulturmediums abgenommen und durch PBS ersetzt. Das PBS wurde gegen eine 1:1 Mischung aus RNA-Fixierer (siehe 2.1.1) und PBS ausgetauscht und die Zellen für genau 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal für jeweils 5 min mit BPS gewaschen und für 45-60 min gefärbt. Für die Färbung wurden die Farbstoffe zuvor in PBS verdünnt (siehe 2.1.3). Nach einem weiteren

Waschschritt wurden die Zellen in Mowiol ++ (siehe 2.1.1) eingebettet und bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von Organpräparaten

Für die mikroskopische Untersuchung von Organen wie dem Fettkörper oder der Speicheldrüse von Larven wurden die Tiere in eiskaltem PBS präpariert und die Organe anschließend für 20 min in einer 1:1 Mischung aus RNA-Fixierer (siehe 2.1.1) und PBS fixiert. Die Organe wurden in einem feinen Sieb zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und für mindestens 1 h oder über Nacht (bei 4 °C) gefärbt. Die verwendeten Verdünnungen sind unter 2.1.3 beschrieben. Die Organe wurden anschließend zwei Mal für jeweils 20 min mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger in Mowiol ++ (siehe 2.1.1) eingebettet und bei 4°C gelagert.

2.2.3.3 Vermessung von Larven

Um die Größe von Larven quantifizieren und vergleichen zu können, wurden Bilder der Tiere mit einem Zeiss SteREO Discovery.V8 Mikroskop mit ICc 5 AxioCam Kamera aufgenommen. Die Larven wurden anschließend in der Zeiss ZEN Blue (2012) Software händisch umrandet und die so von der Software ausgegebenen Oberflächen (mm²) miteinander verglichen. Siehe auch Kapitel 2.2.5.6.

2.2.3.4 Automatisierte Mikroskopie und Bildsegmentierung

Um den Einfluss verschiedener Gene auf die Morphologie von LDs zu untersuchen, wurde ein RNAi Experiment im 96-*well* Format durchgeführt (siehe 2.2.4.5). Die Zellen wurden fixiert und die Zellkerne und LDs mit Hoechst33258 und Bodipy^{493/503} gegengefärbt (siehe 2.2.3.1). Die Präparate wurden mit einem Cytation-3-Multidetektions-Reader (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA) mikroskopiert. Pro *well* wurden mit einem 20x Objektiv jeweils 16 Übersichtsaufnahmen gemacht. Die anschließende quantitative Analyse der Bilder erfolgte mit der Bildsegmentierungssoftware CellProfiler. Neben der Anzahl und Größe der LDs (in Pixel) wurden auch deren Nähe zueinander (Anzahl sich berührender LDs pro Zelle) sowie die Gesamtzahl der aufgenommenen Zellen analysiert (Werthebach *et al.*, 2016).

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Kultivierung von *Drosophila* Zelllinien

Die Kultivierung von *Drosophila* Zelllinien erfolgte nach den Protokollen des *Drosophila* RNAi Screening Centers (<http://fgr.hms.harvard.edu/protocols>). Die Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturgefäßen mit belüfteter Kappe in Schneider's *Drosophila* Medium (PAN-

Biotech, Aidenbach) mit 10 % fetalem bovines Serum (PAN-Biotech, Aidenbach) und Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) bei 25°C gehalten. Es erfolgte keine zusätzliche Zufuhr von CO₂. Für die Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien wurde Medium mit 10 µg/ml Blastidin-S Hydrochlorid (AppliChem, Darmstadt) verwendet. Die Zellen wurden dreimal pro Woche (Konfluenz 70-90 %) passagiert. Hierfür wurde der Zellrasen mit einer elektrischen Pipettierhilfe in frischem Medium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:5 in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden maximal bis zur vierzigsten Passage verwendet.

2.2.4.2 Kultivierung von Säuger-Zelllinien

Die Kultivierung von HeLa Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM Medium mit 4,5 % Glukose, 10 % fötalem Kälberserum, 1 % nicht essentiellen Aminosäuren, 1 % Natriumpyruvat und 1 % Streptomycin/Penicillin (alles von PAN-Biotech, Aidenbach).

2.2.4.3 Transiente Transfektion

Um Proteine *in vitro* zur Expression zu bringen, wurden Zellkulturzellen mit Expressionsvektoren (siehe Tabelle 5) transfiziert. Hierfür wurden Zellen bei einer Konfluenz von 70 bis 90 % resuspendiert und die Zelldichte mit frischem Medium auf 2-5 x 10⁵ Zellen je ml eingestellt. Für einen Transfektionsansatz in einer 6-*well* Platte wurden 2 ml dieser Zellsuspension in ein *well* pipettiert und die Zellen für mindestens 4 h, besser aber über Nacht, bei 25°C inkubiert. Für die Herstellung des Transfektionsmixes wurde das „*Qiagen Effectene Transfection Reagent*“ (Qiagen, Hilden) verwendet. 1 µg der Expressionskonstrukte (also z.B. 2x 500 ng bei Doppeltransfektionen) wurde mit EC-Puffer auf ein finales Volumen von 140 µl verdünnt. Nach Zugabe von 8 µl *Enhancer* und anschließendem Vortex-Schritt wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 10 µl *Effectene*, ein weiterer 15 s Vortex-Schritt und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden aus dem jeweiligen *well* 500 µl Medium entnommen, mit dem Transfektionsmix vermischt und alles zu den Zellen ins *well* gegeben. Je nach Experiment wurden die Zellen anschließend für 2-4 Tage bei 25°C inkubiert. Je nach Dauer der Inkubation wurde die initiale Zelldichte etwas höher oder niedriger gewählt.

2.2.4.4 Herstellung stabil transfizierter polyklonaler Zelllinien

Die Herstellung stabil transfizierter polyklonaler Zelllinien erfolgte in Anlehnung an das „*stable fly cell lines*“ Protokoll des *Drosophila* RNAi Screening Centers (DRSC, <https://fgr.hms.harvard.edu/stable-fly-cell-lines>). Zusätzlich zum Plasmid für die Expression des gewünschten Proteins wurden die Zellen hierbei mit einem Selektionsplasmid kotransfiziert.

Zunächst wurden 4 ml einer Kc167 Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml) in eine 25 cm² Zellkulturflasche vorgelegt und über Nacht bei 25°C inkubiert. Die Zellen wurden am Folgetag - wie unter 2.2.4.3 beschrieben - unter Verwendung des „*Qiagen Effectene Transfection Reagent*“ (Qiagen, Hilden) transfiziert und anschließend für 4 Tage bei 25°C inkubiert. Bei der Transfektion wurden 2 µg des Expressionsplasmids und 50 ng des Selektionsplasmids (pCoBlast, siehe Tabelle 5) eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und durch neues Medium ersetzt, dem 30 µg/ml Blasticidin-S Hydrochlorid zugegeben wurden. In erfolgreich transfizierten Zellen führt das Selektionsplasmid über die Expression des Enzyms Blasticidin-S-Deaminase zur Resistenz gegen Blastizidin. Anschließend wurde das Medium zusammen mit abgestorbenen Zellen alle 3-5 Tage abgesaugt und so lange durch neues Blasticidin haltiges Medium ersetzt, bis sich ein Rasen aus resistenten Zellen gebildet hatte. Zur Erhaltung der stabilen Transfektion wurde Medium mit einer Blasticidin-S Hydrochlorid Konzentration von 10 µg/ml verwendet.

2.2.4.5 RNA Interferenz (RNAi) in Zellkulturzellen

Der gezielte *knock down* von Genen mittels RNA Interferenz (RNAi) in *Drosophila* Zellkulturzellen erfolgte nach Protokollen des Harvard RNAi screening centers (<http://fgr.hms.harvard.edu/protocols>). Bei dieser als „*bathing*“ (engl.: baden) bezeichneten Methode werden die Zellen nach einem kurzen Hungerimpuls mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) inkubiert.

Für die Herstellung der dsRNA mussten zunächst über PCR Gen-spezifische DNA-Matrizen hergestellt werden. Passende Oligonukleotide wurden unter Verwendung der DRSC Website (<https://fgr.hms.harvard.edu/>) ermittelt. Zusätzlich zur Zielsequenz wurden die Oligonukleotide mit einem angehängten modifizierten T7 Promotor synthetisiert. Mittels *touch down* PCR wurden unter Verwendung genomischer DNA (siehe 2.2.1.7) Amplifikate hergestellt, um diese im Anschluss mittels *in vitro* Transkription in dsRNA umzuschreiben.

Ein 50 µl *in vitro* Transkriptions-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 µl Amplifikat (PCR Reaktion)
- 5 µl 100 mM DTT
- 0.5 µl NTP Mix (jeweils 100 mM)
- 0.5 µl RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- 2 µl T7 RNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- 10 µl 5 x transcription buffer
- 19.5 µl H₂O

Der Ansatz wurde über Nacht (12-16 h) bei 37°C inkubiert und die DNA am kommenden Tag durch Zugabe von 2 µl DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für 30-45 min verdaut. Im Anschluss wurde die dsRNA mit dem „*RNeasy Mini Kit*“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Pro Säule wurden 100 µl *in vitro* Transkriptions-Ansatz verwendet. Die dsRNA Konzentration wurde mit dem NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen und mit RNase-freiem Wasser auf 250 ng/µl eingestellt. Die Lagerung der dsRNA erfolgte bei -80°C. Im Folgenden ist die Vorgehensweise für eine RNAi im 96-*well* Format beschrieben: Die Handhabung der aufgereinigten dsRNA erfolgte stets unter Verwendung neuer Boxen mit Pipettenspitzen, vorab mit „*RNase Away*“ (Sigma Aldrich, Steinheim) gereinigter Geräte und sofern möglich auf Eis. In eine sterile 96-*well* Zellkultur Platte wurden 1-2 µg dsRNA pro *well* vorgelegt. Aus einer Zellkulturflasche mit *Drosophila* Kc167 Zellen (70-90 % konfluent) wurde das alte Medium (siehe 2.1.7) abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und mit einer „*Neubauer improved*“-Zählkammer oder einem LUNA *Automated cell counter* (Logos Biosystems, Anyang, Südkorea) gezählt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 2.500 rpm zentrifugiert und in einer Konzentration von $1,5\text{-}2 \times 10^6$ Zellen pro ml in Serum-freien Medium wiederaufgenommen. Jeweils 30 µl dieser Zellsuspension wurden in die *wells* der 96-*well* Platte zu der vorgelegten dsRNA gegeben (ca. 30.000 bis 40.000 Zellen pro *well*), die Platte versiegelt und für 45 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden in jedes *well* 100 µl Zellkulturmedium (mit Serum) pipettiert und die Platten für weitere 4-5 Tage inkubiert.

2.2.5 Fliegentechniken

2.2.5.1 Haltung von *Drosophila melanogaster*

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die *Drosophila* Stämme nach Standardmethoden nach Ashburner (1989) bei 25 °C mit einem 12 h hell/dunkel Rhythmus gehalten. Als Standardfutter diente ein Medium mit 1,68 g Hefe, 4 g Zuckerrübensirup und 4,5 g Malzextrakt pro 100 ml (Standardmedium der AG Klein, Medium 1). Experimente mit veränderten Nährstoffkonzentrationen oder der Zugabe von Farbstoff wurden auf Basis von Futter der AG Jäckle (Medium 2) sowie einer Futtermischung mit wenig Zucker (engl.: low sugar diet, LSD) durchgeführt (siehe 2.1.7).

2.2.5.2 Versuche zur Lebensspanne

Die Lebensspanne Versuche wurden nach einem Protokoll von Linford *et al.*, 2013 durchgeführt. Um synchronisierte Embryonen zu erhalten, wurden zunächst ca. 400 adulte Tiere in einen Legekäfig mit Apfelagar-Platte und Frischhefe gesetzt. Nach 22-24 h wurde eine neue Apfelagar-Platte angebracht und die alte verworfen. Nach weiteren 16-22 h wurden die Apfelagar-Platte vom Käfig entfernt und die gelegten Embryonen mit PBT

und einem Pinsel gelöst und anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Absetzen der Tiere auf dem Boden des Gefäßes wurde der PBT Überstand abgenommen und neues PBT hineingegeben. Um die Hefe zu entfernen, wurde dieser Vorgang so lange wiederholt, bis der Überstand keine Trübung mehr zeigte. Im letzten Schritt wurde hierbei PBS verwendet. Von den sich abgesetzten gewaschenen Embryonen wurden nun 33 µl mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein großes Futterröhrchen mit Standardfutter (Medium 1) überführt. Die Entwicklung der Tiere fand bei 25 °C statt. Die ersten adulten Tiere schlüpften an Tag 9-10 und wurden verworfen. Nach weiteren 24 h wurden die geschlüpften Tiere betäubt und in Gruppen mit jeweils ca. 50-60 Tieren (Männchen und Weibchen gemischt) auf kleine Futterröhrchen aufgeteilt. Nach weiteren 48 h, in denen die Tiere kopulieren konnten, wurden Männchen und Weibchen getrennt und in Gruppen von jeweils genau 30 Tieren auf neue Futterröhrchen gesetzt. Die Tiere wurden in einem festen Rhythmus alle zwei bis drei Tage (Montag, Mittwoch, Freitag) auf neues Futter gesetzt und gestorbene Fliegen dabei ausgezählt. Bei den Experimenten wurden je Geschlecht und Genotyp mindestens fünf Röhrchen eingesetzt.

2.2.5.3 Messung der Sensitivität adulter Tiere gegenüber oxidativem Stress

Um die Stressresistenz der Fliegen zu untersuchen, wurden Lebensspanne Versuche unter Verwendung von Methylviologen (Paraquat) durchgeführt. Paraquat wirkt aufgrund seiner starken prooxidativen Eigenschaften toxisch (Stokes und Walker, 1970) und wird standardmäßig in verschiedensten Modellorganismen zur Induktion von oxidativem Stress genutzt (z.B. *Drosophila* und *C. elegans* (Atashpour *et al.*, 2017) oder Ratten (Lashmanova *et al.*, 2015)). Es wurde in einer Konzentration von 20 mM in einer 5 prozentigen Saccharose-Lösung auf ein Stück Whatman Papier (1 ml Lösung auf 2 x 7 cm Whatman Papier) geträufelt und dieses zusammen mit 30 adulten Tieren (7 Tage alt) in ein leeres Futterröhrchen gegeben. Um ein Austrocknen des Whatman Papiers zu verhindern, wurden mit einer langen Gellade-Pipettenspitze nach 24 h weitere 200 µl der Paraquat-Lösung auf das Whatman-Papier gegeben, ohne dabei den Stopfen des Futterröhrchens abzunehmen oder die Tiere zu betäuben. Pro Genotyp und Geschlecht wurden mindestens sechs Röhrchen mit jeweils 30 Tieren eingesetzt. Aufgrund der hohen Toxizität wurden die gestorbenen Tiere alle 4-12 h ausgezählt. Um sicherzustellen, dass die Tiere aufgrund der Stressoren und nicht wegen des experimentellen Aufbaus sterben, wurden einige Tiere auf Whatman Papier mit 5 prozentiger Saccharose-Lösung ohne Paraquat gehalten und deren Lebensspanne ebenfalls überwacht.

2.2.5.4 Messung der Sensitivität adulter Tiere gegenüber Hunger und Dehydration

Um die Sensitivität der Fliegen gegenüber Hungerstress und Dehydration zu untersuchen, wurden adulte Tiere (7 Tage alt) verwendet, deren Entwicklung wie unter 2.2.5.2 beschrieben stattfand. Für die Messung der Lebensspanne unter Hungerbedingungen wurden Gruppen von 30 Individuen in Futterröhrchen gesetzt, in denen sich lediglich 0,5 % Agarose (in Wasser) befand. Die verstorbenen Tiere wurden alle 4-12 h ausgezählt. Um die Sensitivität gegenüber Dehydration zu untersuchen, wurden die Fliegen in komplett leere Futterröhrchen gesetzt und die toten Tiere alle 4-12 h ausgezählt. Pro Genotyp und Geschlecht wurden für beide Versuche mindestens 4 Röhrchen mit jeweils 30 Tieren eingesetzt.

2.2.5.5 Quantifizierung von Eiablage und Schlupfrate

Um die Fruchtbarkeit und eventuelle Störungen in der Entwicklung unterschiedlicher Genotypen zu beurteilen, wurden die Anzahl an Embryonen sowie der Anteil sich daraus zu Puppen entwickelnder Tiere quantifiziert. Die Versuche erfolgten in Anlehnung an Gálíková *et al.*, 2015. Für die Versuche wurden 7 Tage alte adulte und jungfräuliche Tiere verwendet, welche sich aus synchronisierten Embryonen (siehe 2.2.5.2) entwickelt hatten. Es wurden jeweils zwei Weibchen und ein Männchen in ein Röhrchen mit Standardfutter (Medium 1, siehe 2.1.7) gesetzt. Die Fliegen wurden nun für fünf Tage alle 24 h auf neues Futter gesetzt und täglich die Anzahl an Embryonen pro Röhrchen ausgezählt. Die Röhrchen wurden für weitere 7-8 Tage bei 25 °C gelagert und die Anzahl an Puppen pro Röhrchen ausgezählt. Je Genotyp wurden 10-15 Röhrchen eingesetzt.

2.2.5.6 Analyse der larvalen Entwicklung

Die Beurteilung der larvalen Entwicklung erfolgte nach zwei Parametern. Zum einen wurde die Größe der Larven zu fest definierten Zeitpunkten bestimmt, zum anderen wurde die Zeit von der Eiablage bis zur frühen Puppe gemessen. Für beide Experimente wurden 50-60 adulte Tiere (7 Tage alt, entwickelt wie unter 2.2.5.2 beschrieben) über Nacht in ein neues Futterröhrchen gegeben. Am Folgetag wurden die Tiere in ein neues Futterröhrchen gegeben und das ursprüngliche Röhrchen verworfen. Nach genau 16 h Eiablage wurden die Tiere vom Futter genommen und die Röhrchen bei 25°C unter Standardbedingungen (siehe 2.2.5.1) inkubiert. Pro Genotyp und Futterkondition wurden mindestens drei Röhrchen als technische Replikate verwendet. Für die zeitliche Analyse der larvalen Entwicklung wurden die Röhrchen zwei bis drei Mal täglich begutachtet. Neue Puppen an den Gefäßwänden wurden dabei so lange mit einem Stift auf den Röhrchen markiert, bis keine Tiere mehr das Futter verließen. Anhand dieser Daten wurden Wachstumskurven erstellt. Zur Bestimmung der Größe von Larven zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden ca. 20-30 Tiere pro Röhrchen aus dem Futter genommen und mit

eiskaltem PBS gewaschen. Die Tiere wurden in ein vorgekühltes Schälchen gegeben und mit einem Zeiss SteREO Discovery.V8 Mikroskop mit ICc 5 AxioCam mikroskopiert. Die Larven in den Bildern wurden in der Zeiss ZEN Blue (2012) Software händisch umrandet. Die Größe der Tiere wurde anhand der von der Software ausgegebenen Oberfläche (mm^2) verglichen.

2.2.5.7 Quantifizierung der Futteraufnahme

Um die von den Tieren in einem definierten Zeitraum aufgenommene Menge an Futter zu quantifizieren, wurde Medium 2 verwendet, in das zuvor der Farbstoff Fluorescein (finale Konzentration: 200 $\mu\text{g/ml}$) gegeben wurde. Um einen Einfluss von Umweltbedingungen auf das Fressverhalten zu vermeiden, wurden die Tiere einen Tag vor dem eigentlichen Experiment in Gruppen von 20 Individuen (7 Tage alt) nach Geschlechtern getrennt in neue Röhrchen mit Standardmedium (Medium 2) oder einem Hungermedium (0,5 % Agarose in H_2O) gesetzt. Am nächsten Tag um 11:00 Uhr wurden die Fliegen ohne CO_2 Betäubung auf das Fluorescein-Medium umgesetzt. Nach 30 min bei 25 °C wurden die Tiere betäubt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die eigentliche Messung wurden die Fliegen zwei Mal mit PBS gewaschen und in ein 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß mit einer Keramikugel und 300 μl 10mM TRIS pH 7,4 gegeben und in einer BIO101/Savant FastPrep FP120 Cell disruptor Rüttelzentrifuge (Qbiogene, Illkirch, Frankreich) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 14.800 rpm zentrifugiert und 100 μl des Überstandes in eine schwarze 96-well Platte gegeben, und die Fluoreszenzintensität (Ex 475 -490 nm, Em 510 - 520 nm) in einem Synergy Mx Mikrotiter-Plattenlesegerät (BioTek Germany, Bad Friedrichshall) gemessen.

2.2.6 Bioinformatik und Statistik

Die Berechnungen zur Signifikanz des Unterschieds zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben erfolgte über einen ungepaarten t-Test mit zweiseitiger Verteilung in Excel 2016. Der Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten erfolgte über einfaktorielle ANOVA mit Tukey post-hoc Test in R. Die statistische Auswertung der Experimente zur Lebensspanne erfolgte mittels log-rank Test in R. Die Analyse der Daten aus der qRT-PCR fand mit der Software CFX-Manager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und REST (Pfaffl, 2001) statt. Die Analyse der Bilder wurde mit der Segmentierungssoftware CellProfiler sowie dem Datenanalyse Programm KNIME durchgeführt.

3 Ergebnisse

Das *Drosophila* Protein CG9186 wurde im Rahmen einer Proteom-Analyse von Lipidtröpfchen (LDs) aus larvalen Fettkörpern identifiziert (Beller *et al.*, 2006). Obwohl es evolutionär stark konserviert ist und Mutationen im humanen Homolog C2orf43 mit Prostatakrebs korrelieren (Du *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2012; Penney *et al.*, 2015a; Shui *et al.*, 2014), ist bislang nur sehr wenig über die Funktion des Proteins bekannt. Die einzige zu CG9186 veröffentlichte Studie stammt aus unserer Arbeitsgruppe und konzentrierte sich auf eine initiale Beschreibung und *in vitro* Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von CG9186 sowie dessen Einfluss auf die Morphologie und Positionierung der LDs (Thiel *et al.*, 2013).

Um CG9186 näher zu charakterisieren und Hinweise auf seine Funktion zu sammeln, wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf drei Aspekte gelegt. Zunächst wurde *in vitro* eine mögliche enzymatische Funktion von CG9186 als Serin-Hydrolase untersucht. Anschließend wurden Interaktionspartner per Co-Immunpräzipitation identifiziert und diese Interaktionen weiter charakterisiert. Um die gesamtorganismische Rolle von CG9186 zu untersuchen, wurde schließlich eine *loss of function*-Mutante generiert und die resultierenden Phänotypen analysiert. Die Ergebnisse der Experimente werden im Folgenden in der genannten Reihenfolge näher vorgestellt.

3.1 Die enzymatische Aktivität von CG9186

CG9186 und seine Homologe besitzen eine annotierte Esterase/Lipase Domäne (Thiel *et al.*, 2013). Diese zeichnet sich durch ein zentrales Serin (bei *Drosophila* an Position 119) aus, welches zusammen mit einem konservierten Aspartat und Histidin (an Position 254 und 283) wahrscheinlich eine sogenannte katalytische Triade ausbildet. Dieser Serinrest liegt hierbei in einem für Lipasen typischen GX SXG Motiv (Jaeger *et al.*, 1999; Thiel *et al.*, 2013). Durch Homologie-Modellierung wurde für CG9186 bereits gezeigt, dass die besagten Aminosäuren in der finalen Konformation des Proteins in einer Weise angeordnet sind, die eine katalytische Reaktion im Sinne einer Serin-Hydrolase ermöglicht (Thiel *et al.*, 2013).

Das murine Homolog von CG9186 (Lipid Droplet Associated Hydrolase (LDAH), MGI Identifikationsnummer: 1916082) konnte mit einer „ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase“ Sonde (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) markiert werden (Goo *et al.*, 2014). Bei dieser Sonde handelt es sich um einen chemischen Aktivitäts-Sensor auf Basis

von Fluorophosphonat. Fluorophosphonat- und Fluorophosphat-Derivate hemmen spezifisch Serin-Hydrolasen, indem sie mit der freien OH-Gruppe nukleophiler Serinreste reagieren und kovalent an diese gebunden werden (Liu *et al.*, 1999). Über das mit der Sonde fusionierte Desthiobiotin kann dann die markierte Hydrolase mit Streptavidin-Agarose *beads* (engl.: ‚Kügelchen‘) präzipitiert werden.

Zunächst sollte geklärt werden, ob CG9186 ebenfalls als aktive Serin-Hydrolase markiert werden kann. Hierfür wurden stabil transfizierte *Drosophila* Kc167 Zellen verwendet, die ein Fusionsprotein aus CG9186 und eGFP exprimieren. Als Positivkontrolle diente das bereits als Serin-Hydrolase identifizierte LDAH (Goo *et al.*, 2014). Als Negativkontrolle wurde ein Fusionsprotein aus eGFP und dem LD-assoziierten Protein PLIN2 (Grönke *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2002) sowie eGFP alleine verwendet. Für beide Negativkontrollen war keine Serin-Hydrolase Aktivität zu erwarten. Um zu überprüfen, ob tatsächlich das Serin an Position 119 das Zentrum der katalytischen Triade bildet, wurde eine mutierte Variante von CG9186 getestet, in der dieses Serin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (Thiel *et al.*, 2013). Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

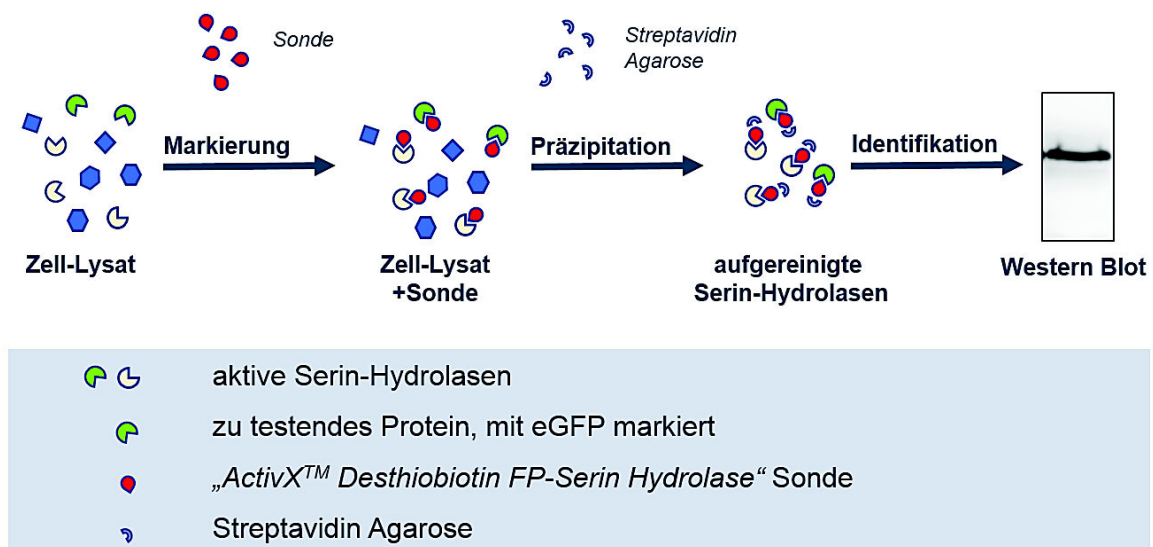


Abbildung 8: Schema des Versuchsablaufs zur Identifikation aktiver Serin-Hydrolasen. Die zu testenden und mit eGFP fusionierten Proteine wurden in Zellkulturzellen (humane HeLa und *Drosophila* Kc167 Zellen) zur Expression gebracht und die Zellen anschließend lysiert. Das Lysat wurde nach Herstellerangaben mit der „ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase“ Sonde inkubiert und die Sonde zusammen mit den gebundenen Serin-Hydrolasen unter Verwendung von Streptavidin Agarose *beads* präzipitiert. Das Präzipitat wurde per Western Blot mit einem eGFP spezifischen Antikörper auf das zu testende Protein hin untersucht. Eigene Darstellung in Anlehnung an Herstellerinformationen (<https://www.thermofisher.com/>).

Die Zellen wurden lysiert und das Lysat nach Herstellerangaben mit der Sonde inkubiert. Die Sonde wurde anschließend samt gebundener Serin-Hydrolasen mit Streptavidin-Agarose aus der Probe präzipitiert (siehe 2.2.2.8). Das Präzipitat wurde unter Verwendung eines GFP spezifischen Antikörpers in einem Western Blot auf die Anwesenheit der Fusionsproteine hin untersucht. Abbildung 9 zeigt Western Blots der Proben vor der Präzipitation (Ausgangs-Lysat) sowie des Präzipitats. Wie sich schon beim Gesamtprotein-normalisierten Ausgangs-Lysat zeigt, weisen die Zellen unterschiedlich starke Expressionsstärken auf. Dieser Unterschied wird besonders deutlich bei den beiden Negativkontrollen (eGFP-PLIN2 und eGFP). Wie Abbildung 9 weiterhin zeigt, waren LDAH, eGFP-CG9186, und eGFP-CG9186(S119A) im Präzipitat angereichert. Die beiden Negativkontrollen ließen sich im Western Blot nicht nachweisen. Auch die beim Ausgangs-Lysat erkennbaren zusätzlichen Banden, bei denen es sich wahrscheinlich um freies eGFP aus degradierten Fusionsproteinen handelt, sind im Western Blot des Präzipitats nicht erkennbar.

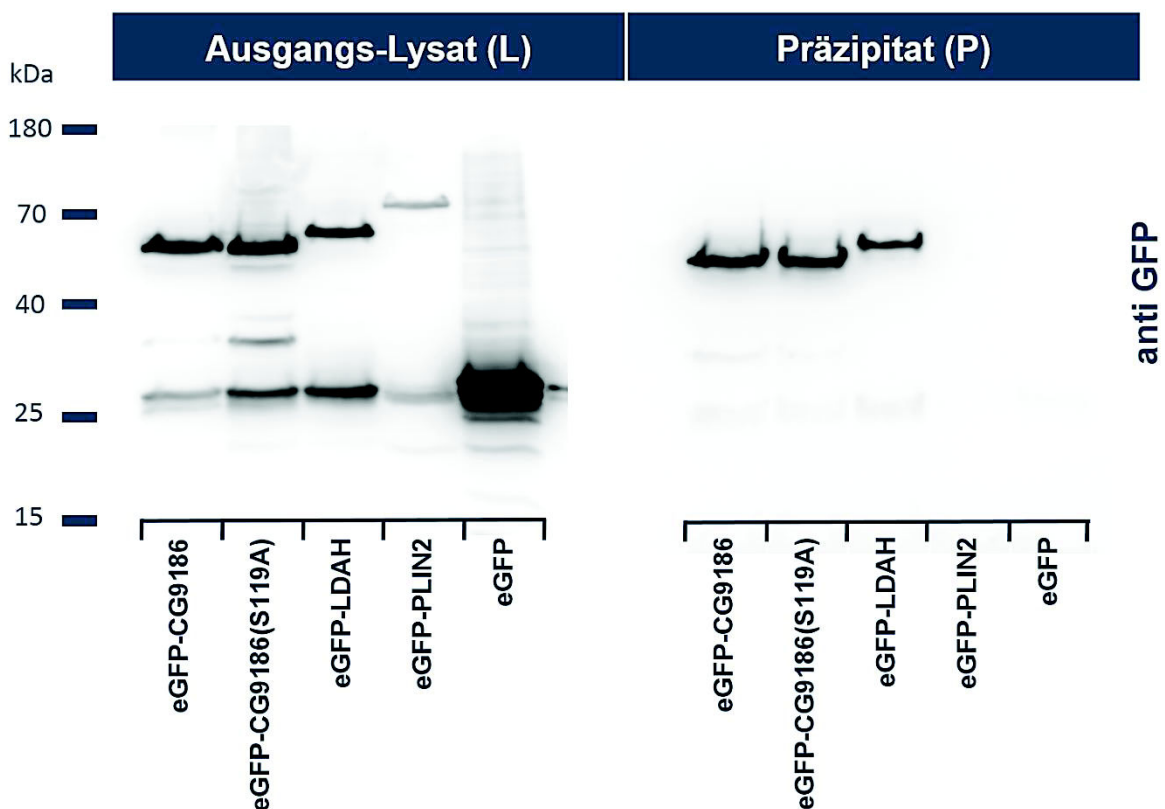


Abbildung 9: Präzipitation von CG9186 und LDAH mit einer Sonde für aktive Serin-Hydrolasen. CG9186, CG9186(S119A) und LDAH wurden als eGFP Fusionsproteine in *Drosophila* Kc167 Zellkulturzellen exprimiert und aktive Serin-Hydrolasen aus dem Zelllysate mit einer spezifischen Sonde präzipitiert. Das Ausgangs-Lysat (L) sowie das Präzipitat (P) wurden in einem Western Blot mit einem GFP spezifischen Antikörper auf die Anwesenheit der Fusionsproteine hin untersucht. Alle drei Proteine waren im Präzipitat nachweisbar. Als Negativkontrollen dienen das LD-assoziierte Protein PLIN2 sowie eGFP. Diese Proteine wurden nicht präzipitiert.

Da die Sonde ebenfalls die CG9186 Variante mit der Mutation innerhalb der vorhergesagten katalytischen Triade (S119A) gebunden hat, stellte sich die Frage, ob die Sonde aufgrund anderer Aminosäuren innerhalb dieses Motivs mit CG9186 reagieren kann. Neben Serin an Position 119 wurde mit Histidin an Position 283 daher eine weitere Aminosäure aus der katalytischen Triade gegen Alanin ausgetauscht. Bei Goo *et al.*, (2014) konnte die Bindung der Sonde an LDAH durch einen Tausch von Serin in Position 140 gegen ein Cystein komplett verhindert werden. Um die Spezifität der Sonde und des Versuchsaufbaus zu zeigen, wurde in Anlehnung an dieses Experiment ein äquivalentes Konstrukt für die eigenen Versuche generiert. Außerdem wurde eine Variante von CG9186 erstellt, in der Serin an Position 119 gegen ein Cystein ausgetauscht wurde. Wie Abbildung 10 zeigt, konnten alle getesteten Varianten im Präzipitat nachgewiesen werden. Lediglich PLIN2 als Negativkontrolle wurde nicht angereichert. Wie sich weiterhin zeigte, band die Sonde selbst dann an CG9186, wenn dieses vorher hitzeinaktiviert (5 min bei 100°C) wurde.

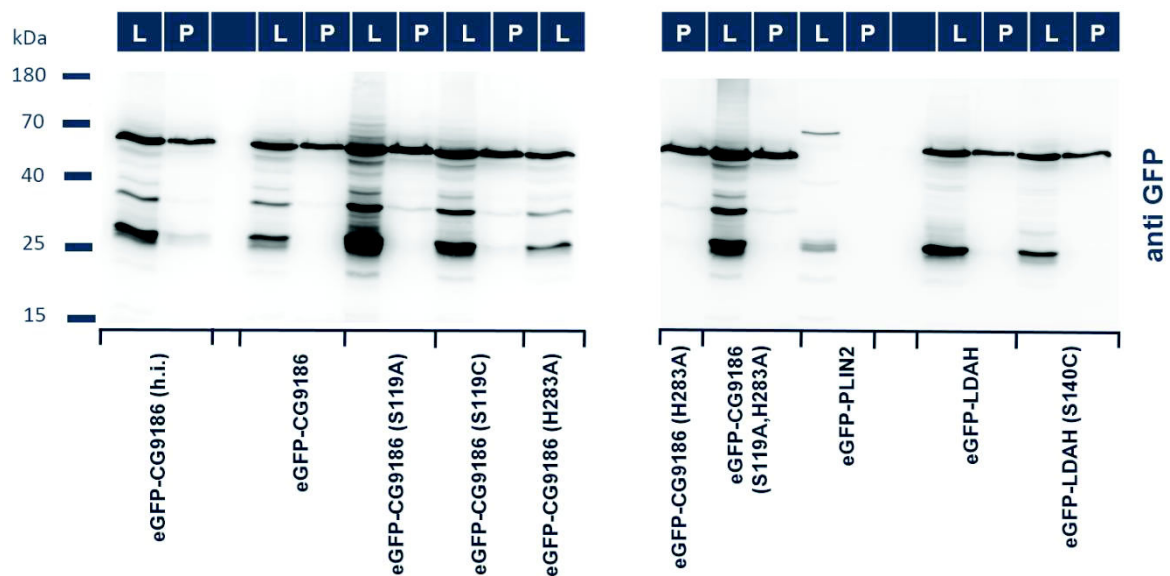


Abbildung 10: Präzipitation verschiedener Varianten von CG9186 und LDAH mit einer Sonde für aktive Serin-Hydrolasen. CG9186, LDAH sowie verschiedene mutagenisierte Varianten dieser Proteine wurden als eGFP Fusionsproteine in *Drosophila* Kc167 Zellkulturzellen exprimiert und aktive Serin-Hydrolasen aus dem Zelllysate mit einer spezifischen Sonde präzipitiert. Das Ausgangs-Lysat (L) sowie das Präzipitat (P) wurden in einem Western Blot mit einem GFP spezifischen Antikörper auf die Anwesenheit der Fusionsproteine hin untersucht. Als Negativkontrollen dienten das LD-assoziierte Protein PLIN2 eine zuvor bei 100 °C hitzeinaktivierte (h.i.). Sowohl wildtypisches CG9186 und LDAH sowie alle mutierten Varianten und das Hitzeinaktivierte CG9186 ließen sich im Präzipitat nachweisen. PLIN2 wurde hingegen nicht von der Sonde markiert.

In den Experimenten von Goo *et al.* (2014) wurde LDAH und LDAH(S140C) in humanen HeLa Zellen zur Expression gebracht. Um einen Einfluss der bislang verwendeten stabil transfizierten *Drosophila* Kc167 Zellen auszuschließen und die von Goo *et al.* durchgeführten Experimente möglichst genau abzubilden, wurden die CG9186- und LDAH Konstrukte in andere Expressionsvektoren umkloniert, und ebenfalls in HeLa Zellen zur Expression gebracht. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen wurde hierbei lediglich eine transiente Transfektion durchgeführt. Wie Abbildung 11 zeigt, markiert die Sonde wie bereits in den *Drosophila* Zellen beobachtet neben CG9186 und LDAH auch die aller Wahrscheinlichkeit nach katalytisch toten Varianten.

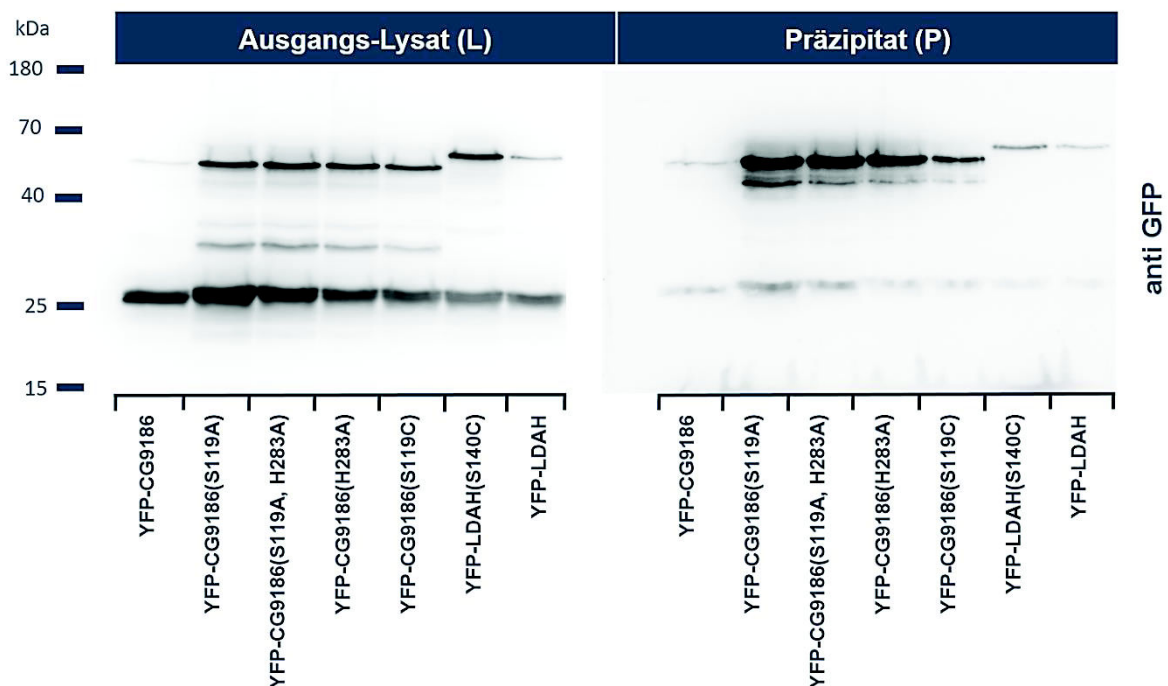


Abbildung 11: Präzipitation mit einer Sonde für aktive Serin-Hydrolasen aus Lysat von HeLa Zellen. CG9186, LDAH sowie verschiedene mutagenisierte Varianten dieser Proteine wurden als YFP Fusionsproteine in humanen HeLa Zellkulturzellen exprimiert. Aktive Serin-Hydrolasen wurden anschließend aus dem Zelllysat mit einer spezifischen Sonde präzipitiert. Das Ausgangs-Lysat (L) sowie das Präzipitat (P) wurden in einem Western Blot mit einem GFP spezifischen Antikörper auf die Anwesenheit der Fusionsproteine hin untersucht.

Obwohl die „ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase“ Sonde sowohl an CG9186 als auch an LDAH bindet, konnte eine Aktivität von CG9186 als Serin-Hydrolase aufgrund der fehlenden Spezifität der Sonde nicht gezeigt werden. Es bleibt also weiterhin die Frage nach der enzymatischen Aktivität von CG9186 bestehen. Obwohl eine Funktion als Lipase aufgrund der katalytischen Triade wahrscheinlich ist, konnte unter *in vitro* Bedingungen keine lipolytische Aktivität im Hinblick auf Trioleoylglycerol (TAG), Dioleoylglycerol (DAG) oder Monooleoylglycerol (MAG) festgestellt werden (Thiel *et al.*, 2013). *In vivo* Versuche mit CG9186-RNAi führten entgegen der Erwartungen an den *knock down* einer Lipase sogar zu verminderten TAG Mengen in den Fliegen. Für LDAH hingegen wurde *in vitro*

unter Verwendung von Proteinextrakten aus transfizierten HeLa Zellen und eines artifiziellen Substrates eine schwache Cholesterolesterase Aktivität nachgewiesen (Goo *et al.*, 2014). Um eine Rolle als Cholesterolesterase für CG9186 zu testen, wurden Proteinlysate ebenfalls mit Cholesterolestern inkubiert, und die Menge an freierwerdenden Fettsäuren (freie Fettsäuren, FFS) gemessen. Als Positivkontrolle diente Hormon Sensitive Lipase (HSL). Für dieses Enzym ist eine Cholesterolesterase Aktivität bekannt (Small *et al.*, 1989). Wie Abbildung 12 zeigt, konnte die von Goo *et al.* (2014) beschriebene Aktivität weder für LDAH noch für CG9186 nachgewiesen werden. HSL hingegen zeigte eine deutliche Cholesterolesterase Aktivität.

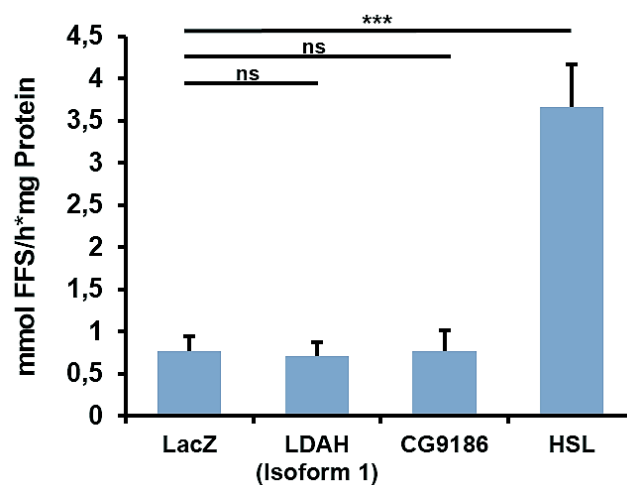


Abbildung 12: Messung der Cholesterolesterase Aktivität von LDAH und CG9186. Die Proteine wurden in COS-7 Zellen überexprimiert und unter Verwendung von Zelllysaten anschließend die Umsetzung eines artifiziellen Cholesterolester Substrates über die Freisetzung von Fettsäuren (FFS, freie Fettsäuren) quantifiziert. LDAH und CG9186 zeigten eine Cholesterolesterase Aktivität. Hormon Sensitive Lipase (HSL) hingegen setzte das Substrat um. Die Messungen wurden durchgeführt von Dr. Christoph Heier, Karl-Franzens-Universität Graz. Signifikanzniveaus: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Neben der in dieser Dissertation nicht reproduzierten Cholesterolesterase Aktivität wurde von Goo *et al.*, (2014) für LDAH außerdem eine allgemeinere Rolle bei der Cholesterolester Homöostase nachgewiesen. So führte eine LDAH Überexpression zur Senkung zellulärer Cholesterol- und Cholesterolester (CE)-Spiegel in humanen Nierenzellen (HEK-293) und murinen RAW 264.7 Makrophagen. Ein *knock down* von LDAH hingegen zeigte einen gegenteiligen Effekt (Goo *et al.*, 2014). Da die Messung der Cholesterolesterase Aktivität (Abbildung 12) in Zelllysaten bestimmt wurde, könnte die fehlende Aktivität von CG9186 auch auf die Versuchsparmeter oder das Fehlen eines Kofaktors zurückgeführt werden. Im Folgenden wurde daher mittels Dünnschichtchromatographie (TLC, engl.: *thin layer chromatography*) untersucht, ob

CG9186 einen Einfluss auf zelluläre Cholesterolester-Spiegel oder auf andere Lipidklassen besitzt. Hierfür wurden stabil transfizierte Zellen verwendet, die entweder eGFP:CG9186 oder eGFP::CG9186(S119A) exprimieren. Als Basis für die stabil transfizierten Zellen diente die Plasmatozyten-ähnliche embryonale Zelllinie Kc167. Die Zellen wurden für 24 h mit Ölsäure bzw. Ölsäure und Cholesterol behandelt, dann gewaschen, und die in den Zellen enthaltenen Lipide mit Dünnschichtchromatographie (TLC, engl.: *thin layer chromatography*) aufgetrennt. Wie Abbildung 13 zeigt, führt die Zugabe von Cholesterol zum Zellkulturmedium zu einer Anreicherung von Cholesterol im Lipidextrakt. Zwischen den getesteten Zelllinien ist bei den einzelnen Lipidklassen kein Unterschied zu erkennen.

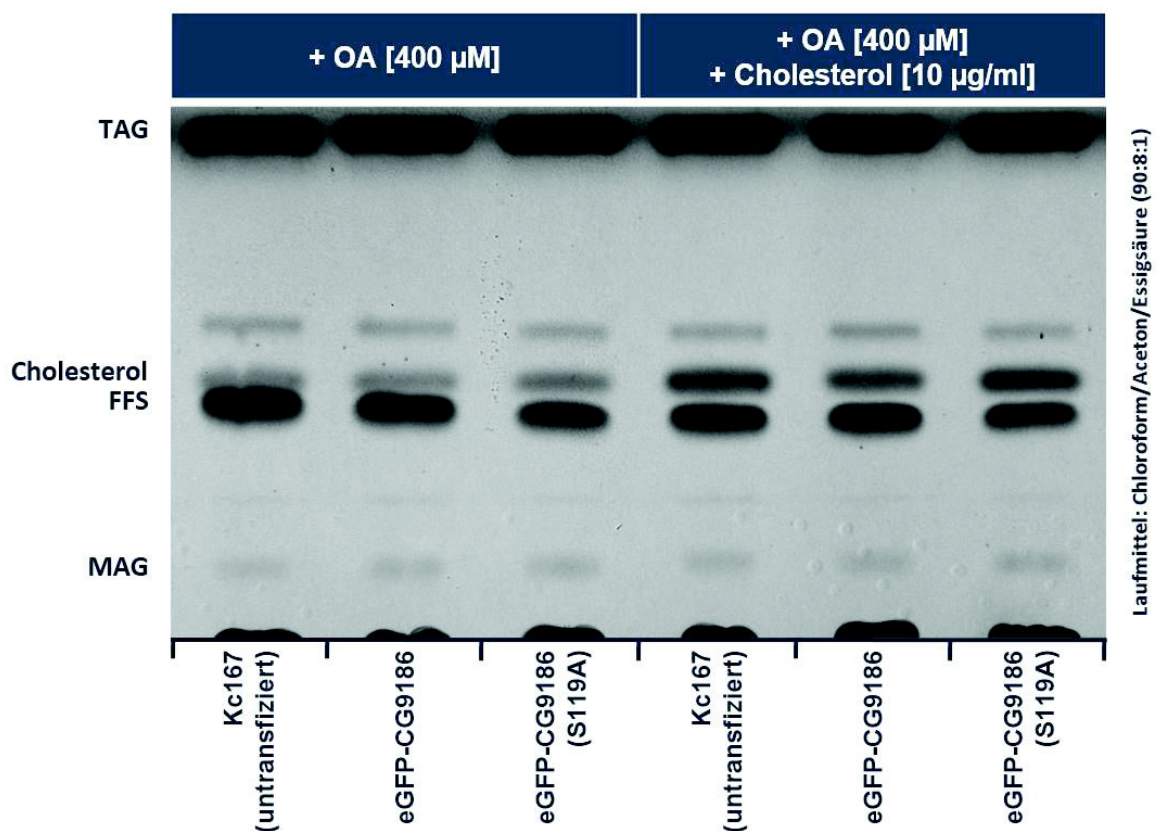


Abbildung 13: Dünnschichtchromatographie (TLC) mit Lipidextrakten aus stabil transfizierten (eGFP-CG9186 und eGFP:CG9186(S119A)) und untransfizierten *Drosophila* Kc167 Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Ölsäure [400 µM] bzw. Ölsäure [400 µM] und Cholesterol [10 µg/ml] behandelt. Zu erkennen ist eine Aufnahme des zugeführten Cholesterols in die Zellen. Zwischen den einzelnen Zelllinien besteht kein Unterschied. TAG= Triacylglycerol, FFS = freie Fettsäuren, MAG = Monoacylglycerol

Die durchgeführten *in vitro* Versuche konnten keine der von Goo *et al.* für das murine CG9186 Homolog LDAH gemachten Beobachtungen mit CG9186 reproduzieren. Auch bei Betrachtung von LDAH selbst konnten die veröffentlichten Daten nicht bestätigt

werden, wie die Untersuchungen zur Cholesterolesterase Aktivität zeigen. Die Frage nach der enzymatischen Funktion von CG9186 bleibt also bestehen. Um Hinweise auf die enzymatische Aktivität von CG9186 zu sammeln und die Funktion des Proteins weiter einzugrenzen, wurde im Folgenden untersucht, mit welchen anderen Proteinen CG9186 interagiert.

3.2 Interaktionspartner von CG9186

Die meisten Proteine erfüllen ihre Funktion in der Zelle nicht isoliert, sondern sind auf die Interaktion mit anderen Proteinen angewiesen (Stumpf *et al.*, 2008). Im Lipidstoffwechsel von Säugetieren zum Beispiel erhöht die Interaktion zwischen der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) und dem Enzym CGI-58 (Comparative Gene Identification-58) die Triglycerid-Hydrolase Aktivität von ATGL um das 20-fache (Lass *et al.*, 2006). Auch die Interaktion von LD Proteinen mit Ubiquitin ist von besonderer Bedeutung. So rekrutiert AUP1 das Ubiquitin konjugierende Enzym Ubc7 auf die LDs und ermöglicht die Sterol-induzierte Ubiquitinierung von Enzymen im Cholesterol Syntheseweg (Jo *et al.*, 2013). Um Hinweise auf die Funktion von CG9186 zu finden und das Protein weiter zu charakterisieren, wurde nach möglichen Interaktionspartnern gesucht.

3.2.1 Identifikation von CG9186 Interaktionspartnern über Co-Immunpräzipitation

Um Interaktionspartner von CG9186 zu identifizieren, wurden Co-Immunpräzipitations-Experimente (Co-IP, engl. = *co-immunoprecipitation*) durchgeführt. Hierfür wurden stabil transfizierte *Drosophila* Kc167 Zellen verwendet, die entweder eGFP alleine oder ein eGFP-CG9186 Fusionsprotein exprimieren. Unter Verwendung von *beads*, die mit einem GFP-spezifischen Antikörper gekoppelt sind, wurden eGFP und eGFP-CG9186 sowie mögliche physikalische Interaktionspartner aus dem Zelllysate präzipitiert und das Präzipitat anschließend massenspektrometrisch analysiert. Abbildung 14 zeigt einen Western Blot der eingesetzten Zelllysate vor und nach der Co-IP sowie vom Präzipitat selbst. Man erkennt die Anreicherung der eGFP-Konstrukte im Präzipitat und deren Abreicherung im Überstand. α Tubulin als Negativkontrolle verbleibt im Überstand. Der Western Blot bestätigt die erfolgreiche Aufreinigung von eGFP und eGFP-CG9186 im gewählten Versuchsaufbau.

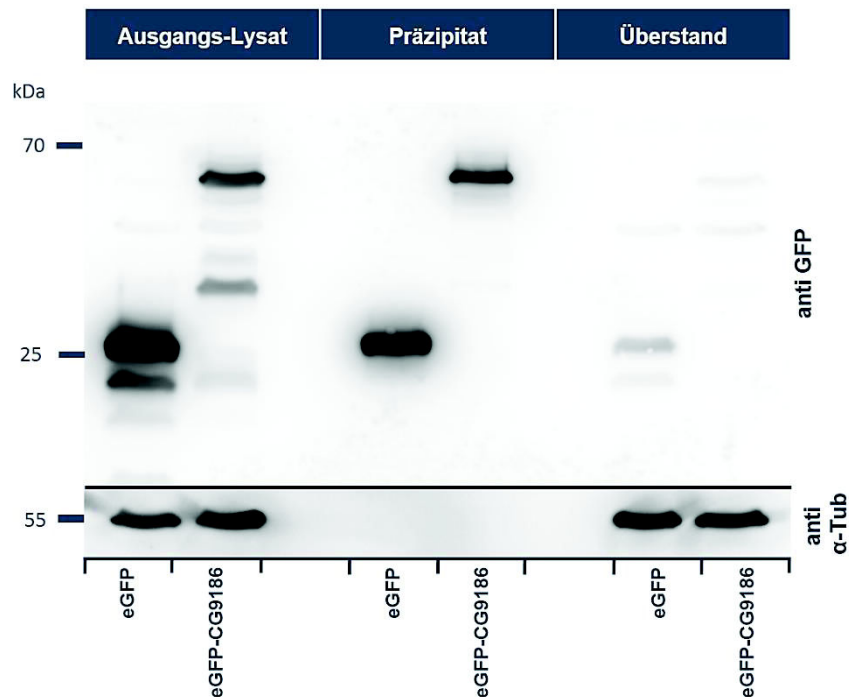


Abbildung 14: Immunpräzipitation von eGFP und eGFP-CG9186. Stabil transfizierte Kc167 Zellen wurden lysiert und die eGFP Fusionsproteine bzw. eGFP selbst mit anti GFP-Antikörper beschichteten *beads* präzipitiert. Das Ausgangs-Lysat, das von den *beads* eluierte Präzipitat sowie der Überstand (Ausgangs-Lysat nach der Präzipitation) wurden über eine PAGE aufgetrennt und GFP sowie α Tubulin in einem Western Blot detektiert. Während α Tubulin im Überstand verbleibt, zeigt sich eine Anreicherung von GFP im Präzipitat und Abreicherung im Überstand.

Wie bereits bei Thiel et al. beschrieben, lokalisiert CG9186 unter Abwesenheit von LDs im ER. Wird in Zellkulturversuchen dem Medium Ölsäure hinzugegeben, lokalisiert das Protein auf den sich bildenden LDs (Thiel et al., 2013). Um bei der Co-IP die Lokalisation in beiden Kompartimenten abzubilden, wurden die Zellen sowohl mit als auch ohne die Zugabe von Ölsäure inkubiert. Insgesamt wurden zwei getrennte Experimente durchgeführt. Das erste Experiment beinhaltete keine Replikate innerhalb der Versuchsbedingungen. Hier wurden vier Proben generiert (zwei Zelllinien, jeweils mit und ohne Ölsäure). Das zweite Experiment sollte die im ersten Experiment gefundenen Interaktionspartner bestätigen. Hierbei wurden pro Kondition fünf technische Replikate generiert, insgesamt also 20 Proben massenspektrometrisch analysiert. Im ersten Experiment konnten insgesamt 412 Proteine im Präzipitat nachgewiesen werden. Zunächst wurde überprüft, welche der identifizierten Proteine in den eGFP-CG9186 Proben stärker angereichert waren als bei der Negativkontrolle eGFP. Hierfür wurde der Quotient des MS/MS counts von eGFP-CG9186 und eGFP gebildet. Der MS/MS count (engl.: count = Anzahl) entspricht der Anzahl der Spektren, mit der das entsprechende Protein identifiziert wurde. Tabelle 12 und 13 zeigen für beide Konditionen (mit und ohne Ölsäure) in absteigender Reihenfolge die 20 Proteine mit dem höchsten CG9186/eGFP Quotienten (siehe auch Anhang).

Tabelle 12: Liste der 20 am stärksten im eGFP-CG9186 Präzipitat angereicherten Proteine; Inkubation der Zellen ohne Ölsäure. eGFP und eGFP-CG9186 wurden in Kc167 Zellen exprimiert und anschließend präzipitiert. Die Tabelle zeigt die 20 Proteine mit der stärksten Anreicherung im eGFP-CG9186 Präzipitat.

Name	Annotation Symbol	Zelluläre Lokalisation	MS/MS count CG9186	MS/MS count eGFP	Quotient CG9186/eGFP
Gp93	CG9186	Endomembransystem, ER, LD	73	0	73
	CG5520	Endomembransystem, extrazellulär, LD	9	1	9
Hmu	CG3373	Zelloberfläche, Endomembransystem, LD	7	0	7
Dp1	CG5170	Heterochromatin, intrazellulärer	5	1	5
		Ribonukleoprotein Komplex, LD, Nucleus			
CCT2	CG7033	Cytoplasma, LD, Mikrotubuli assoziierter Komplex, Spindelapparat	5	1	5
Not1	CG34407	CCR4-NOT Komplex, Zytoplasma	9	2	4,5
Cpr	CG11567	Endomembransystem, LD	4	0	4
Kr-h2	CG9159	Endomembransystem	4	0	4
Pvr	CG8222	Plasmamembran	4	0	4
Rab11	CG1371	Endomembransystem	4	0	4
	CG5771	Diverse (darunter auch LD)	4	1	4
	CG13887	Endomembransystem, ER, integraler Membranbestandteil	4	0	4
Droj2	CG8863	-	7	2	3,5
	CG17514	-	3	1	3
	CG11857	Membranen	3	0	3
	CG2065	-	3	0	3
Cctgamma	CG8977	Mikrotubuli assoziierter Komplex, Chaperonin-enthaltender T-Komplex	3	1	3
Sgt	CG5094	-	3	1	3
Cyt-b5	CG2140	Endomembransystem, LD	3	0	3
Vha26	CG1088	Plasmamembran, Plasmamembran, Protonen-transportierender V-type ATPase Komplex	3	0	3

Die Informationen zu den Proteinen stammen von <http://flybase.org/> (FB2016_05)

ER = Endoplasmatisches Retikulum, LD = Lipidtröpfchen

Tabelle 13: Liste der 20 am stärksten im eGFP-CG9186 Präzipitat angereicherten Proteine; Inkubation der Zellen mit Ölsäure. eGFP und eGFP-CG9186 wurden in Kc167 Zellen exprimiert und anschließend präzipitiert. Die Zellen wurden vorab für 24 h mit 400 μ M Ölsäure behandelt. Die Tabelle zeigt die 20 Proteine mit der stärksten Anreicherung im eGFP-CG9186 Präzipitat.

Name	Annotation Symbol	Zelluläre Lokalisation	MS/MS count CG9186	MS/MS count eGFP	Quotient CG9186/eGFP
Not1	CG9186	Endomembransystem, ER, LD	43	0	43
	CG34407	CCR4-NOT Komplex (mRNA, Transkription), Cytoplasma	11	0	11
β-Spec	CG5870	Plasmamembran, Fusom, LD, Spektrosom	7	1	7
Dhc64C	CG7507	Cytoplasmatischer Dynein Komplex, Fusom	7	0	7
	CG17514	-	5	1	5
shot	CG18076	Cytoplasma, Fusom, Filopodien, Mikrotubuli	5	1	5
Gp93	CG5520	Endomembransystem, extrazellulär, LD	8	2	4
Hmu	CG3373	Zelloberfläche, Endomembransystem, LD	4	1	4
sec31	CG8266	ER, Golgi Stapel	4	0	4
r	CG18572	-	4	0	4
ACC	CG11198	Cytoplasma, LD	4	1	4
Atpalpha	CG5670	Cytoplasma, Plasmamembran, Nucleus	3	0	3
Psa	CG1009	-	3	0	3
tral	CG10686	Cytosol, ER, Fusom, Mikrotubuli assoziierter Komplex	3	1	3
Tango5	CG32675	ER, Golgi Stapel	3	0	3
	CG5482	Endomembransystem	3	0	3
Rpn2	CG11888	Proteasom	3	0	3
Cpr	CG11567	Endomembransystem, LD	2	0	2
Kr-h2	CG9159	Endomembransystem	2	0	2
Pvr	CG8222	Plasmamembran	2	0	2

Die Informationen zu den Proteinen stammen von <http://flybase.org/> (FB2016_05)

ER = Endoplasmatisches Retikulum, LD = Lipidtröpfchen

Wie zu erwarten, war das abundanteste Protein im Präzipitat CG9186. Angereichert waren ansonsten vor allem Proteine, für die eine Lokalisation auf den LDs, im ER oder allgemein im Endomembransystem (ER, Golgi-Apparat, Vesikel, Zellmembran und Kernmembran) beschrieben wurde (<http://flybase.org/> (FB2016_05)). Proteine mit einer Lokalisation auf LDs sind in der Tabelle hervorgehoben. Hierzu gehören zum Beispiel Hemomucin (Hmu), Glycoprotein of 93 kDa (Gp93) und Cytochrome P450 reductase (Cpr). Diese Proteine waren außerdem in beiden Versuchsbedingungen angereichert, und wurden daher für eine tiefergehende Analyse ausgewählt. Auch das PDGF- and VEGF-receptor related (Pvr) wurde mit eGFP-CG9186 Co-präzipitiert. Obwohl für Pvr bislang keine Lokalisation auf LDs beschrieben wurde, zeigen frühere Experimente in der Arbeitsgruppe (Dissertation P. Thul, 2014), dass ein *knock down* von *pvr* zur Aggregation von LDs führt. Da dieser Phänotyp auch unter Überexpression von CG9186 beobachtet werden kann (Thiel *et al.*, 2013), wurde Pvr ebenfalls für weitere Analysen ausgewählt.

Im zweiten durchgeführten Co-IP Experiment wurden pro Zelllinie und Kondition fünf getrennte Ansätze für die Präzipitation verwendet, insgesamt also 20 Proben massenspektrometrisch analysiert. Abbildung 15 zeigt *heat maps* für die Ergebnisse der Messungen. Hierbei zeigen die Spalten die einzelnen Proben, und die Zeilen die identifizierten Proteine innerhalb dieser Proben. Die Rotfärbung gibt die relative Abundanz des jeweiligen Proteins an. Die Versuchsreplikate ordnen sich in den *heat maps* gemäß den Versuchsbedingungen zu Gruppen (engl.: *cluster*) an. So bilden die Messungen des Koimmunpräzipitats von eGFP-CG9186 sowie eGFP alleine jeweils getrennte *cluster*. Ausnahmen bilden hier die Proben eGFP 1 (ohne Ölsäure) sowie eGFP 1 (mit Ölsäure). Diese Proben zeigen insgesamt geringere Protein-Abundanzen. Im Präzipitat aus den Zellen, die nicht mit Ölsäure behandelt wurden, konnten insgesamt 772 Proteine identifiziert werden. Hiervon waren 199 Proteine statistisch signifikant in den eGFP-CG9186 Proben angereichert. In den Proben mit Ölsäure wurden 515 Proteine identifiziert, davon waren 357 statistisch signifikant angereichert. Bei den ebenfalls in Abbildung 15 gezeigten *Volcano-plots* handelt es sich um Streudiagramme, bei denen die einzelnen Punkte die identifizierten Proteine repräsentieren. CG9186 sowie die im Vorexperiment identifizierten Proteine Hmu, Gp93, Cpr und Pvr sind optisch hervorgehoben. Auf der X-Achse ist aufgetragen, um welchen Faktor die Proteine entweder in der CG9186 Probe (>0) oder in der GFP Probe (<0) angereichert sind. Auf der Y-Achse ist der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes aufgetragen. Die Lokalisation der Punkte in Y-Ebene zeigt also die statistische Signifikanz der Anreicherung. Wie sich erkennen lässt, sind Hmu, Gp93, Cpr und Pvr signifikant in den eGFP-CG9186 Proben angereichert. So liegt zum Beispiel der p-Wert für Pvr bei $p=1,92 \cdot 10^{-6}$ (mit Ölsäure) bzw. bei $p=8,28 \cdot 10^{-6}$ (ohne Ölsäure). Die Anreicherung ist damit statistisch hoch signifikant (siehe Tabelle 14 und Tabelle 17 im Anhang).

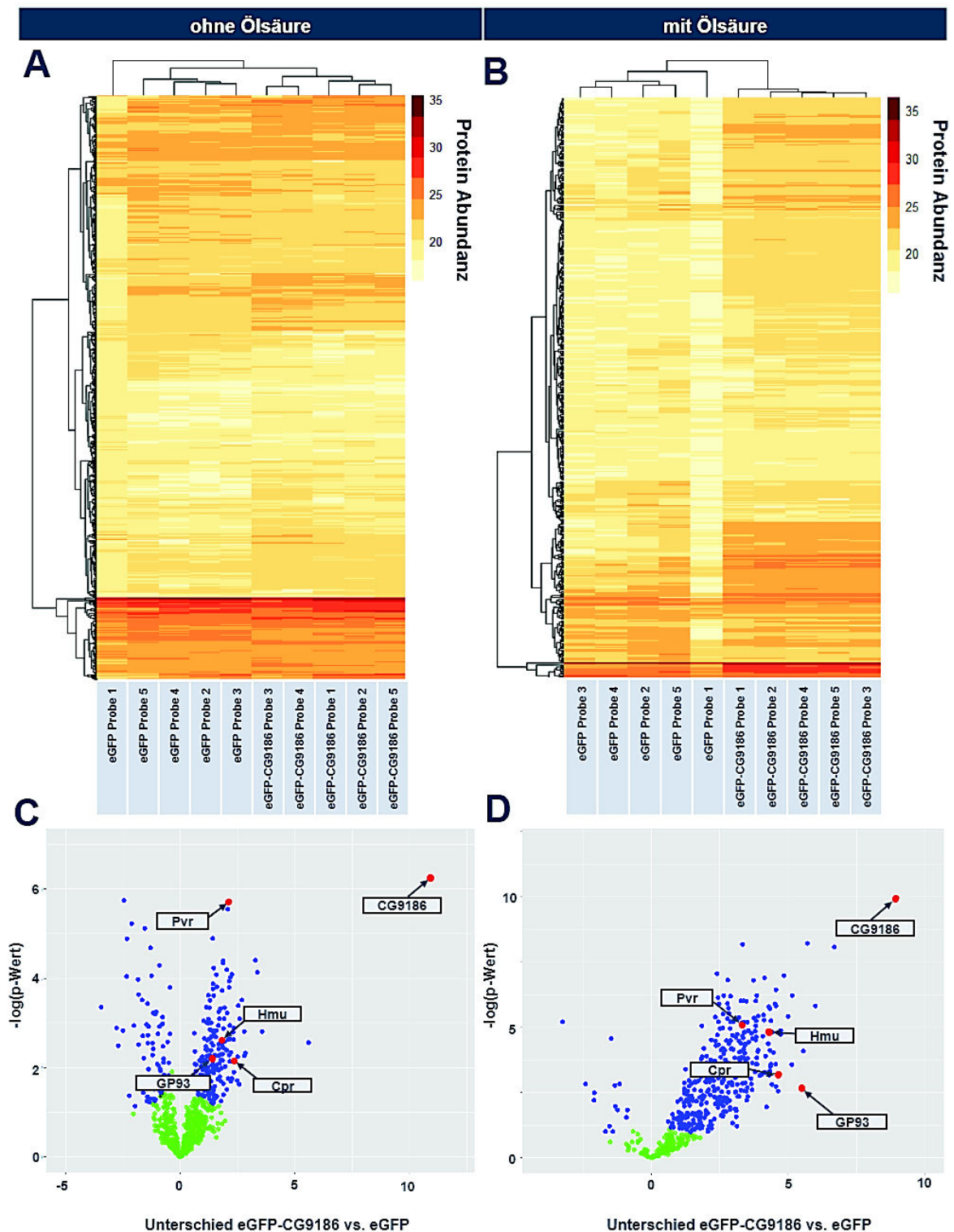


Abbildung 15: Heat maps (A-B) und volcano-plots (C-D) der identifizierten Proteine. A-B: Die *heat maps* zeigen die 20 massenspektrometrisch analysierten Proben aus dem Co-IP Experiment (Spalten) sowie die identifizierten Proteine (Zeilen). Die Rotfärbung gibt die relative Abundanz an. Die Versuchsreplikate ordnen sich gemäß den Versuchsbedingungen zu *clustern* an. Ausnahmen bilden die Proben eGFP 1 (ohne Ölsäure) sowie eGFP 1 (mit Ölsäure). C-D: Die *volcano-plots* geben an, ob die identifizierten Proteine entweder in den eGFP (<0) oder den eGFP-CG9186 Proben (>0) angereichert waren (X-Achse), sowie die p-Werte für die jeweilige Anreicherung (Y-Achse). Jeder Punkt stellt ein Protein dar. Bei blauen Punkten handelt es sich um eine statistisch signifikante Anreicherung. CG9186, Hmu, Gp93, Cpr und Pvr sind rot hervorgehoben und zeigen eine statistisch signifikante Anreicherung im eGFP-CG9186 Präzipitat.

Tabelle 14: p-Werte und Signifikanzniveaus der Anreicherung von Hmu, Gp93, Cpr und Pvr

Protein	p-Werte			
	ohne Ölsäure	Signifikanzniveau	mit Ölsäure	Signifikanzniveau
Hmu	0,002449	**	1,463E-05	***
Gp93	0,006087	**	0,002241	**
Cpr	0,007007	**	0,000644	***
Pvr	1,925E-06	***	8,28E-06	***

p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)

Wie die Daten zeigen, konnten durch die Co-IP Experimente potentielle Interaktionspartner von CG9186 identifiziert werden. Vier von diesen Interaktionspartnern (Hmu, Gp93, Cpr und Pvr) wurden aufgrund der Stärke ihrer Anreicherung, ihrer Lokalisation oder dem Vorhandensein LD-assoziiierter Phänotypen für die weitere Analyse ausgewählt. Für eine Liste mit weiteren im zweiten CoIP Experiment identifizierten Proteinen siehe Tabelle 17 im Anhang.

3.2.2 Bestätigung der identifizierten Protein-Protein Interaktionen

Im Folgenden wurden die in den Co-IPs identifizierten Interaktionen mit einer unabhängigen Methode bestätigt, um das Risiko von falsch-positiven Ergebnissen der Co-IP zu minimieren. Hierfür wurden Luciferase-Fragment Komplementations-Experimente durchgeführt. Abbildung 16 zeigt das Prinzip dieser Technik.

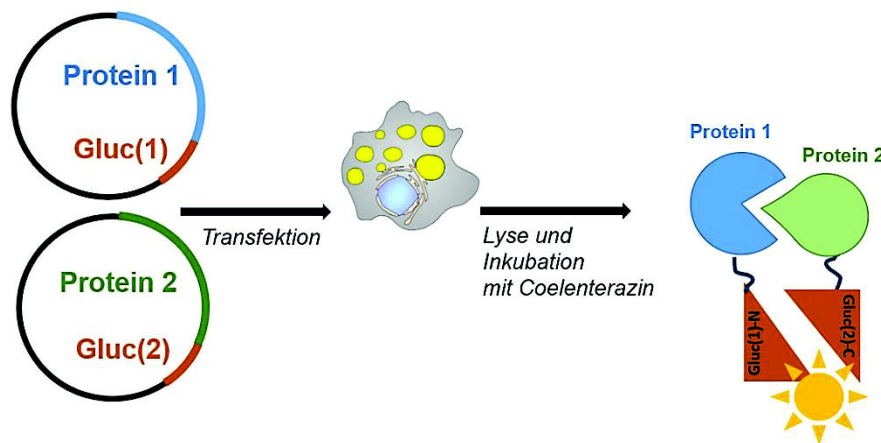


Abbildung 16: Schema der Luciferase-Fragment Komplementations-Experimente. Proteine eines möglichen Interaktionspaares werden mit jeweils einem Fragment des Enzyms Luciferase fusioniert zur Expression gebracht. Findet eine Interaktion statt, gelangen die Luciferase-Fragmente in räumliche Nähe zueinander und führen bei Anwesenheit des Substrates Coelenterazin zu einem chemilumineszenten Signal. Abbildung nach Kolkhof *et al.*, (2017).

Die Luciferase-Fragment Komplementations-Experimente beruhen auf dem Enzym Luciferase aus dem marinen Ruderfußkrebs *Gaussia princeps*. Das Enzym katalysiert die

Oxidation des Substrates Coelenterazin unter Emission von blauem Licht (Maximum bei 480 nm) (Remy und Michnick, 2006). Für die Detektion von Protein-Protein Interaktionen werden hier Konstrukte generiert, bei denen Fragmente der Luciferase (Gaussia Luciferase, Fragmente im Folgenden Gluc(1) und Gluc(2) genannt) einzeln mit jeweils einem Partner eines zu testenden Interaktionspaares verknüpft wird. Diese Verknüpfung kann sowohl C- als auch N-Terminal vorgenommen werden. Interagieren die Proteine miteinander, kommt es zur Komplementation von Gluc und damit zu einem optischen quantifizierbaren Signal. Dieses Signal wird ausgedrückt in *relative light units* (RLU, engl.: ‚relative Lichteinheiten‘). Als Positivkontrolle dient die in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschriebene GCN4 Leucin-Zipper Dimerisierung (Remy und Michnick, 2006). Um die Interaktionen zwischen CG9186 und Pvr, Gp93, Hmu und Cpr zu bestätigen, wurden C- und N-Terminale Gluc-Fusionskonstrukte erstellt und die Interaktionspartner gegeneinander getestet. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse für die Interaktionen zwischen Gp93, Pvr, Hmu und Cpr mit CG9186 unter Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von LDs. Hierbei wurden verschiedenste Kombinationen mit C- oder N-terminal fusionierten Gluc-Fragmenten getestet.

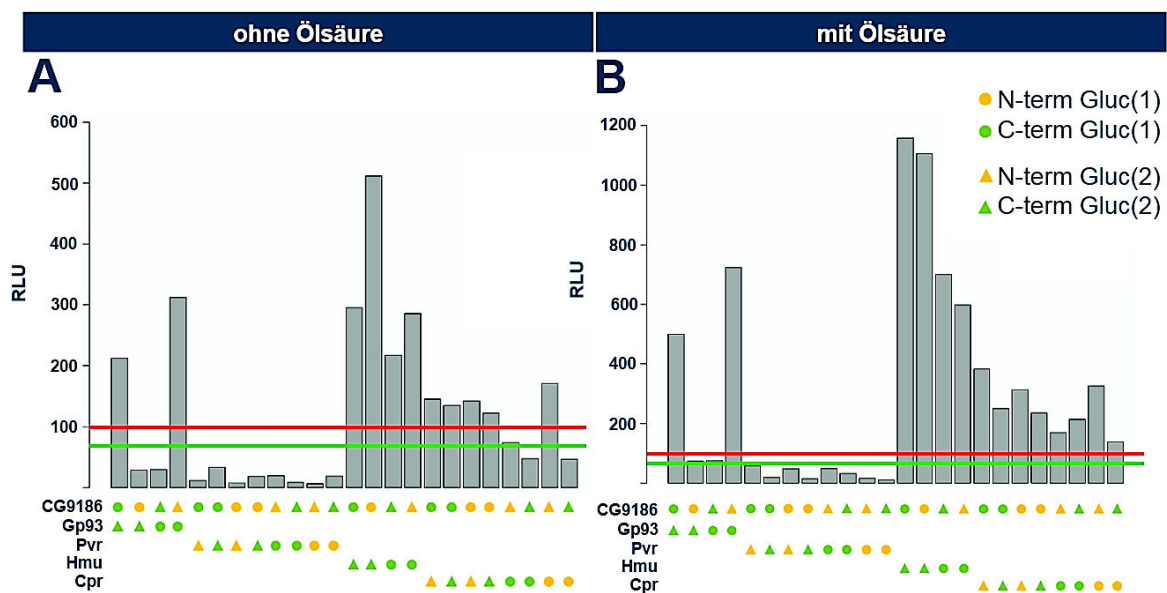


Abbildung 17: Test auf Interaktionen zwischen CG9186 und Gp93, Pvr, Hmu und Cpr in Luciferase Komplementations-Experimenten. Die Zellen wurden ohne die Zugabe von Ölsäure kultiviert (A) oder mit 400 μ M Ölsäure behandelt (B). Als Einheit dienen *relative light units* (RLU). Die rote Linie zeigt die Stärke der Leucin-Zipper Interaktion an (100 %). Die grüne Linie stellt den Schwellenwert für eine positive Interaktion dar. Pvr zeigt unter keiner der getesteten Bedingungen eine positive Interaktion mit CG9186. Hmu, Cpr und Gp93 zeigt positive Interaktionen mit CG9186. Bei Hmu liegen die Werte je nach Kondition um mehr als das Zehnfache über denen der Positivkontrolle. Für Gp93 und Cpr ist die Interaktion von der gewählten Konformation abhängig (Kolkhof et al., 2017).

Die rote Linie in der Abbildung zeigt die Stärke der Interaktion der Positivkontrolle (Zipper-Zipper). Diese Interaktion wurde als Bezugspunkt auf 100 % gesetzt. Die grüne Linie stellt

70 % des Signals der Positivkontrolle dar und wurde als Schwellenwert gewählt, ab dem von einer positiven Interaktion gesprochen werden kann. Für Pvr konnte unter keiner der getesteten Bedingungen eine Interaktion mit CG9186 nachgewiesen werden. Für Hmu, Cpr und Gp93 zeigten sich jedoch recht starke Interaktionen mit CG9186. So lag das Signal bei Hmu (im C-Terminus mit Gluc(2) markiert) versus CG9186 (im C Terminus mit Gluc(1) markiert) um mehr als das Zehnfache über dem der Positivkontrolle. Für Gp93 und Cpr ist die Interaktion von der gewählten Konformation abhängig. Mithilfe der Luciferase Komplementations-Experimente als unabhängiger Methode wurden die in den Co-IP Experimenten identifizierten Proteine Gp93, Hmu und Cpr als Interaktionspartner von CG9186 bestätigt. Sie werden im Folgenden näher charakterisiert. Lediglich für Pvr konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Pvr besitzt 1509 Aminosäuren und eine Masse von 170,321 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9VLQ8>). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Größe von Pvr sterisch eine Komplementation der Gluc-Konstrukte verhindert hat und es so zu einem falsch negativen Ergebnis gekommen ist. Daher wurde auch Pvr in die weitergehende Analyse mit einbezogen.

3.2.3 Lokalisation der Interaktoren in *Drosophila* Kc167 Zellen

Bei den Co-IP und Luciferase Komplementations-Experimenten wurden die Zellen für den Nachweis der Interaktionen lysiert. Hierdurch können auch Proteine interagieren, die ansonsten in der Zelle durch Kompartimentierung räumlich voneinander getrennt sind. Um die Interaktionen zwischen CG9186 und den vier Proteinen Pvr, Cpr, Hmu und Gp93 näher zu untersuchen, und eine falsch positive Interaktion weiter auszuschließen, wurde daher auch deren Lokalisation in den verwendeten Versuchsbedingungen untersucht. Hierfür wurden eGFP Fusionsproteine der vier Kandidaten in *Drosophila* Kc167 Zellen zur Expression gebracht. Um die Bildung von LDs zu induzieren, wurde bei einem Teil der Zellen Ölsäure zum Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden fixiert und die LDs und Zellkerne mit LipidTOX bzw. Hoechst33258 gegengefärbt. Anschließend wurden an einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop Z-Stapel aufgenommen. Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen Maximum Intensitäts-Projektionen (MIPs) der Aufnahmen. Unter Abwesenheit von Ölsäure im Zellkulturmedium zeigen Cpr-eGFP, Hmu-eGFP und Gp93-eGFP eine retikuläre Lokalisation. Pvr-eGFP ist an der Zellmembran und an intrazellulären Membranen angereichert. Nach Zugabe von Ölsäure verändert Cpr-eGFP seine Lokalisation und befindet sich auf den LDs. Die Lokalisation von Gp93-eGFP, Hmu-eGFP und Pvr-eGFP verändert sich unter Zugabe von Ölsäure kaum. Allerdings lässt sich auch für diese Proteine vereinzelt eine Lokalisation auf LDs (Abbildung 18 A und Abbildung 19 A, siehe Pfeile) oder in deren Nähe (Abbildung 19 B, siehe Asterisk) zeigen.

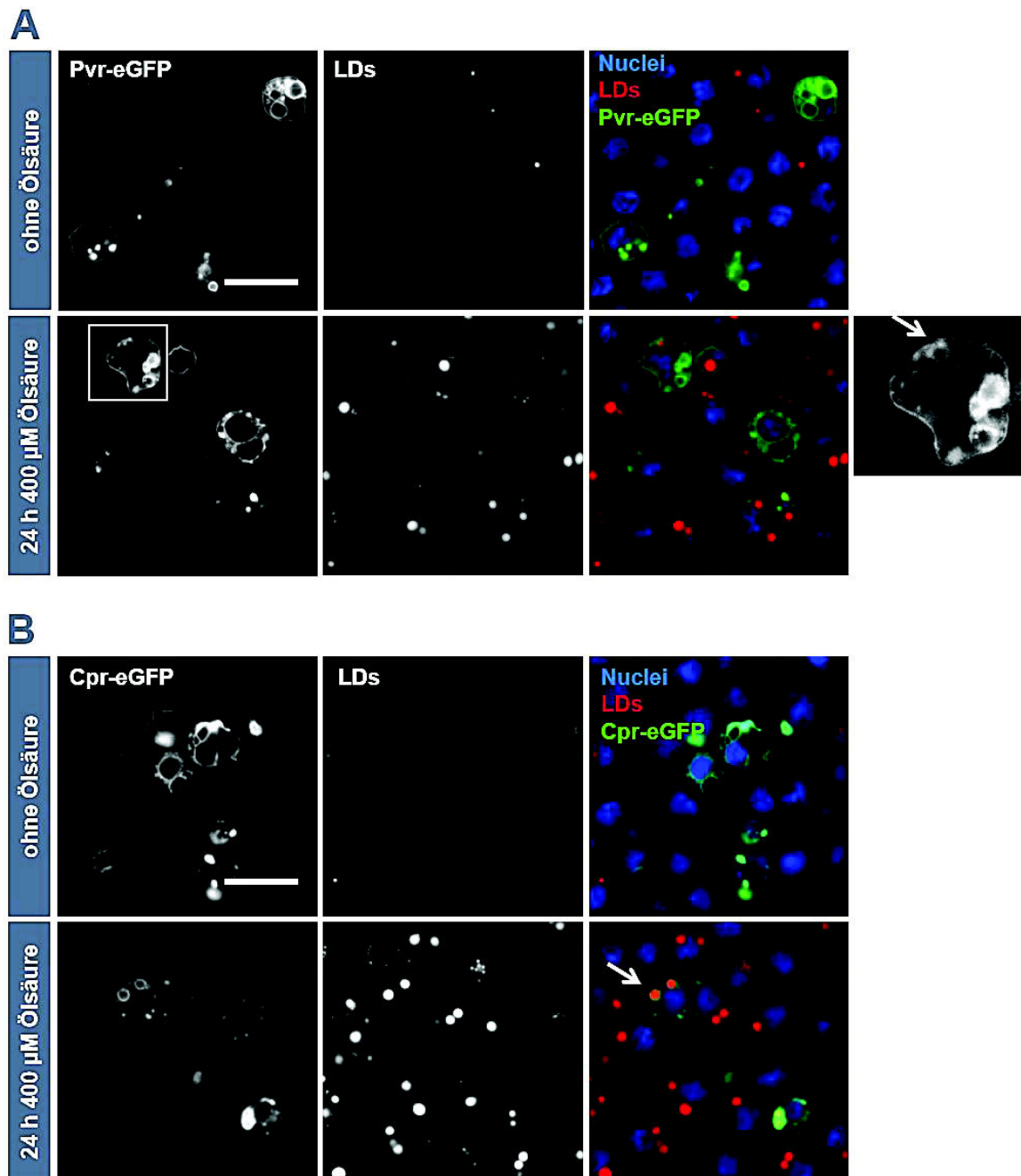


Abbildung 18: Lokalisation von Pvr-eGFP (A) und Cpr-eGFP (B) in *Drosophila* Kc167 Zellen. eGFP Fusionsproteine wurden zur Expression gebracht und die Zellen entweder im Standardmedium inkubiert oder durch die Zugabe von Ölsäure zum Medium die Bildung von LDs induziert. LDs und Zellkerne wurden mit LipidTOX bzw. Hoechst33258 gegengefärbt. Gezeigt werden Maximum Intensitäts-Projektionen (MIPs) von Z-Stapeln. Unter Abwesenheit von Ölsäure im Zellkulturmedium ist Pvr-eGFP an der Zellmembran und an intrazellulären Membranen angereichert (A, obere Reihe). Cpr zeigt eine retikuläre Lokalisation (B, obere Reihe). Nach Zugabe von Ölsäure lokalisiert Cpr-eGFP auf den LDs. Die Lokalisation von Pvr-eGFP verändert sich unter Zugabe von Ölsäure kaum. Allerdings lässt sich auch für Pvr-eGFP vereinzelt eine Lokalisation auf LDs (siehe Pfeil) zeigen. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.

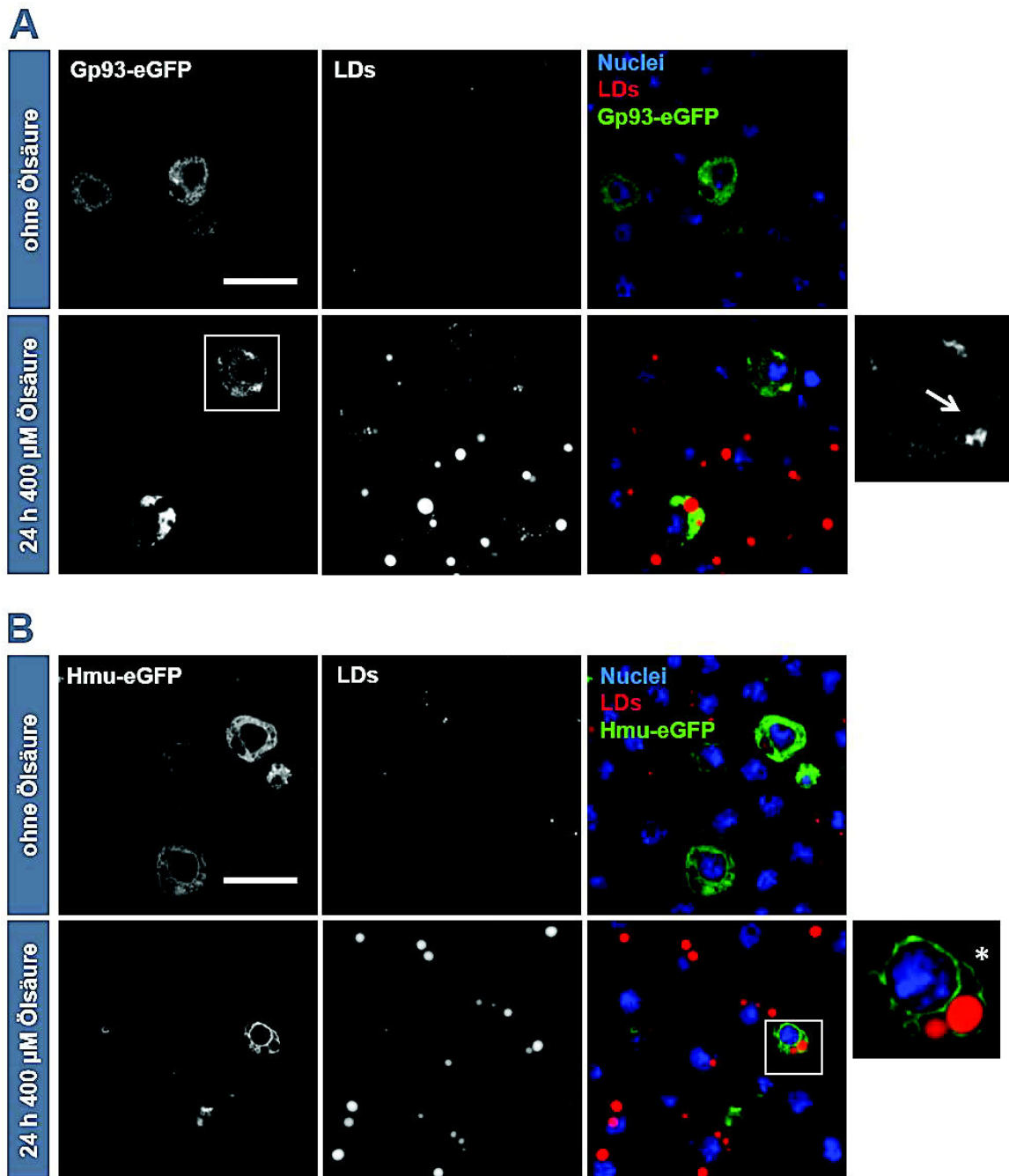


Abbildung 19: Lokalisation von Gp93-eGFP (A) und Hmu-eGFP (B) in *Drosophila* Kc167 Zellen. eGFP Fusionsproteine wurden zur Expression gebracht und die Zellen entweder im Standardmedium inkubiert oder durch die Zugabe von Ölsäure zum Medium die Bildung von LDs induziert. LDs und Zellkerne wurden mit LipidTOX bzw. Hoechst33258 gegengefärbt. Gezeigt werden Maximum Intensitäts-Projektionen (MIPs) von Z-Stapeln. Unter Abwesenheit von Ölsäure im Zellkulturmedium zeigen Gp93-eGFP und Hmu-eGFP eine retikuläre Lokalisation (A und B, obere Reihe). Nach Zugabe von Ölsäure lokalisiert Cpr auf den LDs. Die Lokalisation der beiden Proteine verändert sich unter Zugabe von Ölsäure kaum. Für Gp93-eGFP lässt sich allerdings vereinzelt eine Lokalisation auf LDs zeigen (A, siehe Pfeil). Hmu-eGFP lokalisiert zum Teil auch auf LD-nahen Membranen, wie in B (siehe Asterisk) gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Wie die Experimente zeigen, konnte die in der Literatur beschriebene Lokalisation der Interaktoren im Endomembransystem und auf den LDs bestätigt werden. Da auch CG9186 in diesen Kompartimenten lokalisiert, kann eine Interaktion stattfinden.

3.2.4 Einfluss der Interaktoren auf die CG9186 induzierte LD-Aggregation

Nachdem Interaktoren identifiziert wurden, stellt sich nun die Frage nach der funktionellen Bedeutung der Interaktionen. Wie bei Thiel *et al.* (2013) beschrieben, führt eine Überexpression von CG9186 zu einer Aggregation vieler kleiner LDs. Dieser gut detektier- und reproduzierbare *in vitro* Phänotyp wurde für die weitere Analyse der Interaktionen als Messgröße gewählt. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob die Interaktoren einen Einfluss auf die Lokalisation und Morphologie von LDs nehmen oder die CG9186 induzierte LD-Aggregation beeinflussen. Hierfür wurde ein CG9186-mCherry Fusionsprotein in Kombination mit den eGFP-markierten Interaktoren durch Co-Transfektion in *Drosophila* Kc167 Zellen zur Expression gebracht. Wie bei Thiel *et al.* (2013) beschrieben, wurden die Zellen für 40 Stunden mit 400 μ M Ölsäure behandelt und anschließend fixiert.

Abbildung 20 zeigt MIPs von Z-Stapeln, die an einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop von den Zellen aufgenommen wurden. Die LDs wurden mit AUTOdol gegengefärbt. Unter (A) lässt sich erkennen, dass die mit CG9186-mCherry transfizierten Zellen viele kleine LDs aufweisen, die sich zu größeren Aggregaten zusammenlagern (siehe Pfeil). Die untransfizierten Zellen haben dispers verteilte LDs, die sich untereinander in ihrer Größe stark unterscheiden. Wie bereits in Abbildung 18 und Abbildung 19 zu erkennen, zeigt nur Cpr eine sehr deutliche LD Lokalisation. Die Co-Überexpression von Hmu-eGFP und Gp93-eGFP hat keinen Einfluss auf die CG9186-mCherry induzierte LD-Aggregation (D und E, siehe Pfeile). Auch die Bilder der Pvr-eGFP- und Cpr-eGFP Überexpression zeigen Zellen mit aggregierten LDs. Allerdings fällt hier auf, dass die Aggregate nicht so dicht gepackt sind wie unter alleiniger CG9186-mCherry Expression oder Co-Expression mit Hmu-eGFP und Gp93-eGFP (B und C, siehe Asterisk).

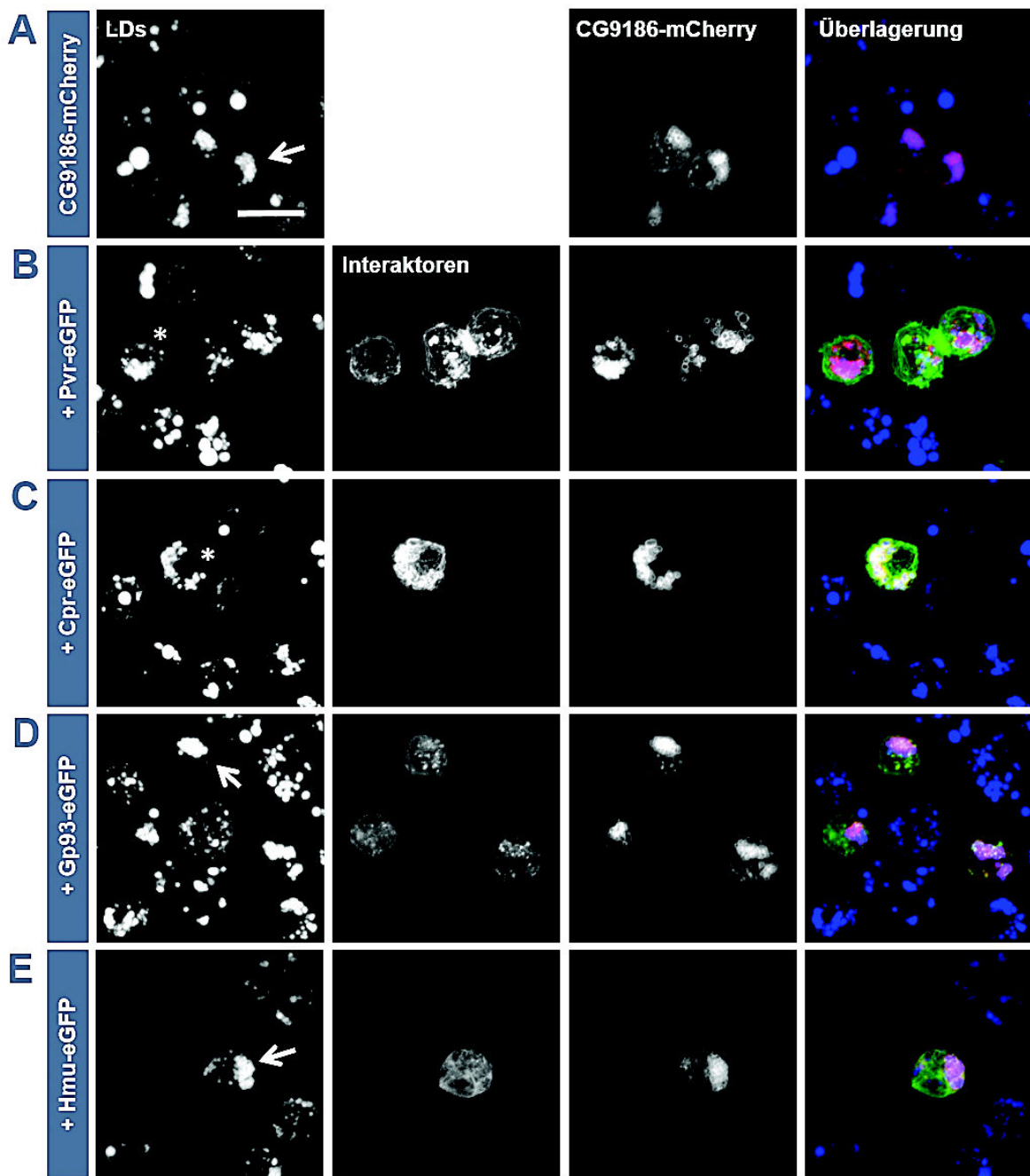


Abbildung 20: Überexpression von CG9186-mCherry (A) sowie in Co-Überexpression mit eGFP markiertem Pvr (B), Cpr (C), Gp93 (D) und Hmu (E) in *Drosophila* Kc167 Zellen. Die Bilder zeigen MIPs von Z-Stapeln, die an einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop aufgenommen wurden. Die LDs wurden mit AUTOdots gegengefärbt. Die mit CG9186-mCherry transfizierten Zellen weisen viele kleine LDs auf, die sich zu größeren Aggregaten zusammenlagern (A, siehe Pfeil). Die Co-Überexpression von Hmu-eGFP und Gp93-eGFP hat keinen sichtbaren Einfluss auf die CG9186-mCherry induzierte LD-Aggregation (D und E, siehe Pfeile). Auch bei Pvr-eGFP- und Cpr-eGFP Co-Überexpression zeigen Zellen mit aggregierten LDs. Die beobachteten LD Aggregate sind allerdings nicht so dicht gepackt wie unter alleiniger CG9186-mCherry Expression oder Co-Expression mit Hmu-eGFP und Gp93-eGFP (B und C, siehe Asterisk). Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Um die gemachten Beobachtungen zu quantifizieren, wurden Übersichtsaufnahmen der Proben gemacht und die Zellen je nach Morphologie und Lokalisation ihrer LDs visuell in die beiden Gruppen ‚dispers‘ und ‚aggregiert‘ eingeteilt. Bei Thiel *et al.* wurden neben dispersen und aggregierten LDs auch irregulär geformte riesige LDs beobachtet. Da sich diese aber in den hier angefertigten Färbungen nicht mit Sicherheit von den aggregierten LDs unterscheiden ließen, wurden diese nicht getrennt aufgeführt. Abbildung 21 zeigt die quantitative Auswertung dieser Bilder. Insgesamt wurden 1779 Zellen ausgezählt. Untransfizierte Kc167 Zellen zeigen nach einer 40 stündigen Behandlung mit 400 μ M Ölsäure zu 88 % dispers verteilte LDs. In 12 % der Zellen lassen sich aggregierte LDs erkennen. Wird CG9186-mCherry zur Expression gebracht, zeigen ca. 70 % der transfizierten Zellen aggregierte LDs. Werden parallel auch Pvr und Cpr überexprimiert, schwächt sich der Phänotyp geringfügig ab (aggregierte LDs in 59-62 % der Zellen). Bei einer Co-Transfektion von CG9186 mit Gp93 oder Hmu zeigt sich eine Verstärkung, hier besitzen 76-82 % der Zellen aggregierte LDs.

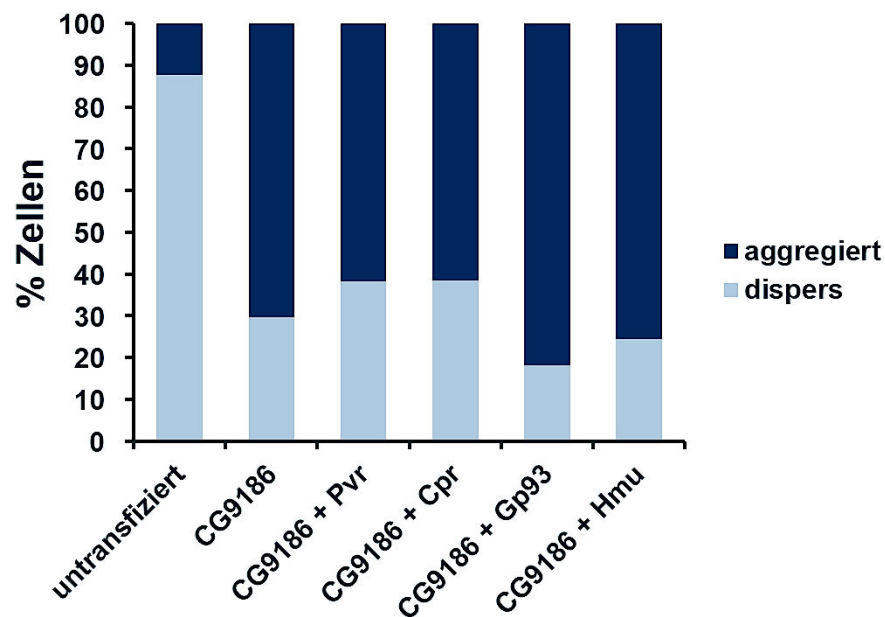


Abbildung 21: quantitative Auswertung der Aggregation von LDs nach Überexpression von CG9186-mCherry alleine sowie in Co-Überexpression mit Pvr-eGFP, Cpr-eGFP, Gp93-eGFP oder Hmu-eGFP. Insgesamt wurden 1779 Zellen aus Übersichtsaufnahmen (MIPs von Z-Stapeln) ausgezählt, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Die Zellen wurden für 40 h mit 400 μ M Ölsäure behandelt. 88 % der untransfizierten Kc167 Zellen zeigen dispers verteilte LDs. In 12 % der Zellen lassen sich aggregierte LDs erkennen. Wird CG9186-mCherry zur Expression gebracht, zeigen ca. 70 % der transfizierten Zellen aggregierte LDs. Co-Expression von Pvr und Cpr schwächt den Phänotyp ab (aggregierte LDs in 59-62 % der Zellen), durch Gp93 oder Hmu zeigt sich eine Verstärkung (aggregierte LDs in 76-82 % der Zellen).

Die Quantifizierung zeigt, dass die Überexpression der vier identifizierten Interaktoren nur einen leichten Effekt auf die CG9186-induzierte LD-Aggregation hat. Es stellt sich die Frage, ob sich durch eine Herunterregulation ein deutlicherer Effekt beobachten lässt. Wie bereits erwähnt, wurde in früheren Experimenten in der AG Beller beobachtet, dass ein RNAi vermittelter *knock down* von *pvr* zu einer Aggregation von LDs führt (Dissertation P. Thul, 2014). Ist der bei *pvr* beobachtete Aggregations-Phänotyp eventuell CG9186 abhängig? Hat ein *knock down* der Interaktoren einen CG9186 abhängigen Einfluss auf die LD Morphologie? Um dies zu überprüfen, wurde ein RNAi Experiment im 96-*well* Format mit anschließender automatisierter Mikroskopie mit einem Cytation-3-Multidetektions-Reader und quantitativer Analyse durch ein Bildsegmentierungsprogramm durchgeführt. Hierfür wurden *Drosophila* Kc167 Zellen für vier Tage mit verschiedenen dsRNAs inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die Zellkerne und LDs mit Hoechst33258 und Bodipy^{493/503} gegengefärbt. Neben den vier Interaktoren wurden auch dsRNAs für den *knock down* bekannter Lipidregulatoren wie dem lipogenen Enzym Diacylglyceroltransferase 1 (DGAT-1, *Drosophila* Gen: *mdy*, *midway*) oder dem Fettsäurebindenden Protein (Gen: *fabp*, *fatty acid binding protein*) eingesetzt (Buszczak *et al.*, 2002; Übersichtsartikel Hotamisligil und Bernlohr, 2015). Als weitere Kontrolle diente der Apoptose Inhibitor *thread*, dessen *knock down* zum Zelltod führt (Kaiser *et al.*, 1998). Abbildung 22 zeigt beispielhaft einige vom automatischen Mikroskop aufgenommene Bilder. Pro *well* wurden mit einem 20x Objektiv jeweils 16 Übersichtsaufnahmen gemacht. Je Kondition konnten damit mehr als 10.000 Zellen analysiert werden. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne, die mittlere Spalte die LDs und die rechte Spalte die von der Bildsegmentierungssoftware erkannten Strukturen. Neben der Anzahl und Größe der LDs (in Pixel) wurden auch deren Nähe zueinander (Anzahl sich berührender LDs pro Zelle) sowie die Gesamtzahl der aufgenommenen Zellen analysiert. Schon die Bilder zeigen, dass ein *knock down* von *fabp* (B) zu einer drastischen Reduktion der LDs führt. RNAi von *thread* hat wie erwartet einen vermehrten Zelltod zur Folge (C), denn nach vier Tagen RNAi befanden sich kaum noch Zellen im *well*. Das Herunterregulieren von *pvr* (C) scheint neben einer veränderten LD Morphologie ebenfalls eine verminderte Zellzahl zur Folge zu haben. Abbildung 23 zeigt die quantitative Auswertung der Bilder auf Basis von Bildsegmentierungssoftware. Für die getesteten Gene wurde jeweils ein einzel-*knock down* (A-C) sowie ein doppel-*knock down* in Kombination mit CG9186 (D-E) durchgeführt. Für manche Gene wurden zwei verschiedene dsRNAs verwendet (mit (1) und (2) beschriftet), da bei der Wahl von dsRNAs auch immer das Risiko von *off target* Effekten oder variierenden Effizienzen besteht (Übersichtsartikel Echeverri *et al.*, 2006). Wie die Diagramme zeigen, führt eine RNAi von *thread* wie erwartet zu einer geringeren Zellzahl. Dieser Effekt zeigt sich auch bei einem knockdown von *pvr* (A). Mit Blick auf die LDs lässt

sich erkennen, dass sowohl *mdy* als auch *fabp* zu einer verringerten LD Fläche je Zelle führt. Bei *fabp* ist dies jedoch stark abhängig von der gewählten dsRNA. Eine RNAi von CG9186 selbst sowie von *gp93*, *hmu* und *cpr* zeigen keinen Effekt auf die LD Fläche innerhalb der Zellen. Als Maß für die Aggregation von LDs wurde die Anzahl sich berührender LDs je Zelle bestimmt. Dieser Wert ist bei *pvr* im Vergleich zur Kontrolle um mehr als das Doppelte erhöht. Dieser Effekt besteht auch bei gleichzeitiger CG9186 RNAi.

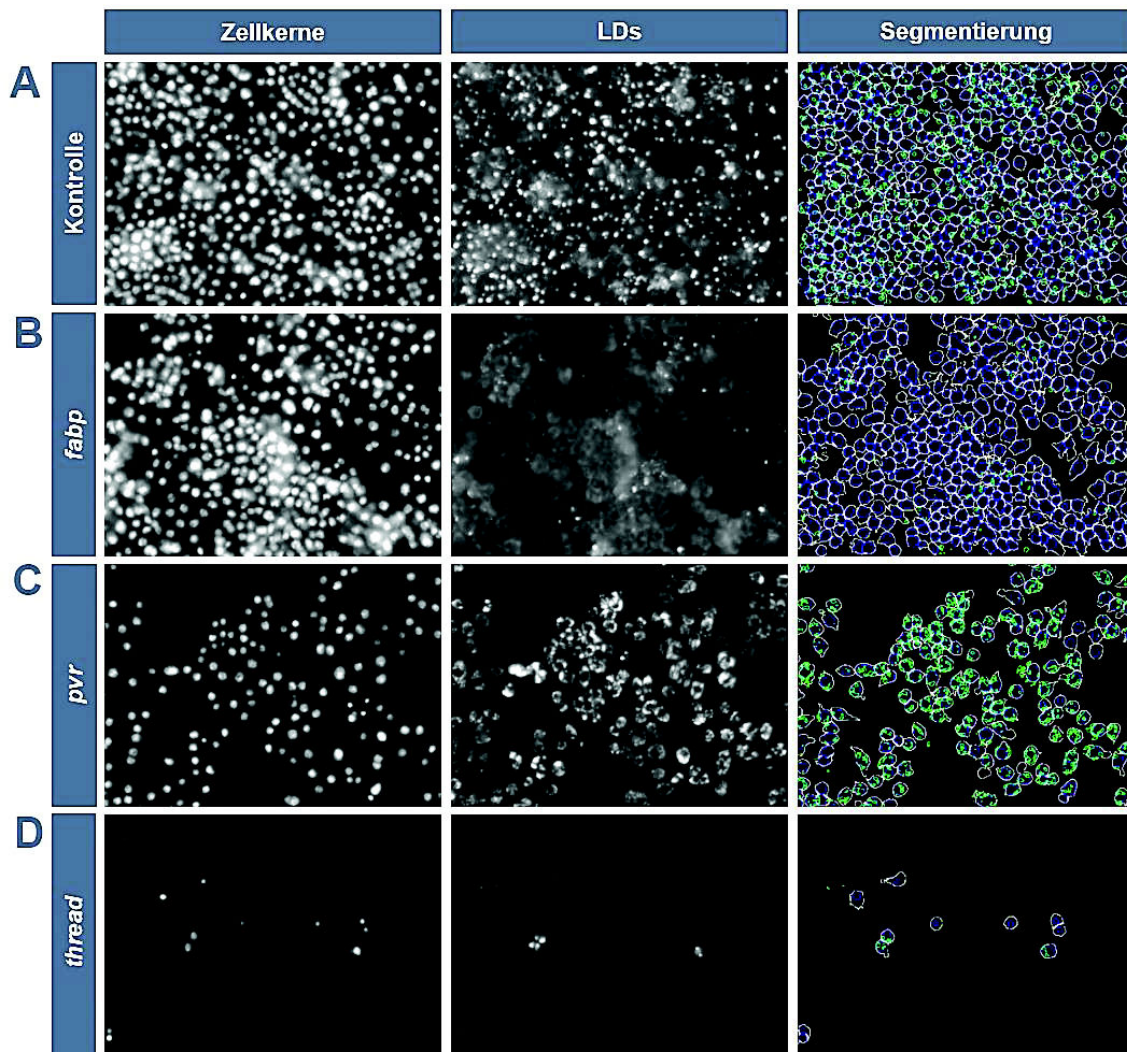


Abbildung 22: Beispiele für die vom automatischen Mikroskop aufgenommenen Bilder sowie die von der Bildsegmentierungssoftware erkannten Strukturen. *Drosophila* Kc167 Zellen wurden in einer 96-well Platte für vier Tage mit verschiedenen dsRNAs inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die Zellkerne und LDs mit Hoechst33258 und Bodipy^{493/503} gegengefärbt. Pro well wurden mit einem 20x Objektiv (automatisiert, nicht-konfokal) jeweils 16 Übersichtsaufnahmen gemacht (> 10.000 Zellen je Kondition). Die linke Spalte zeigt die Zellkerne, die mittlere Spalte die LDs und die rechte Spalte die von der Bildsegmentierungssoftware erkannten Strukturen. Gezeigt ist jeweils ein Beispielbild aus der Kontrolle (keine RNAi, A), *fabp*-RNAi (B), *pvr*-RNAi (C) und *thread*-RNAi (D). Der *knock down* von *fabp* führt zu einer drastischen Reduktion der LDs. RNAi von *thread* führt wie erwartet zum Zelltod, denn nach vier Tagen sind nur noch wenige lebende Zellen im well vorhanden. Ein *knock down* von *pvr* hat neben einer veränderten LD Morphologie ebenfalls eine verminderte Zellzahl zur Folge (Werthebach *et al.*, 2016).

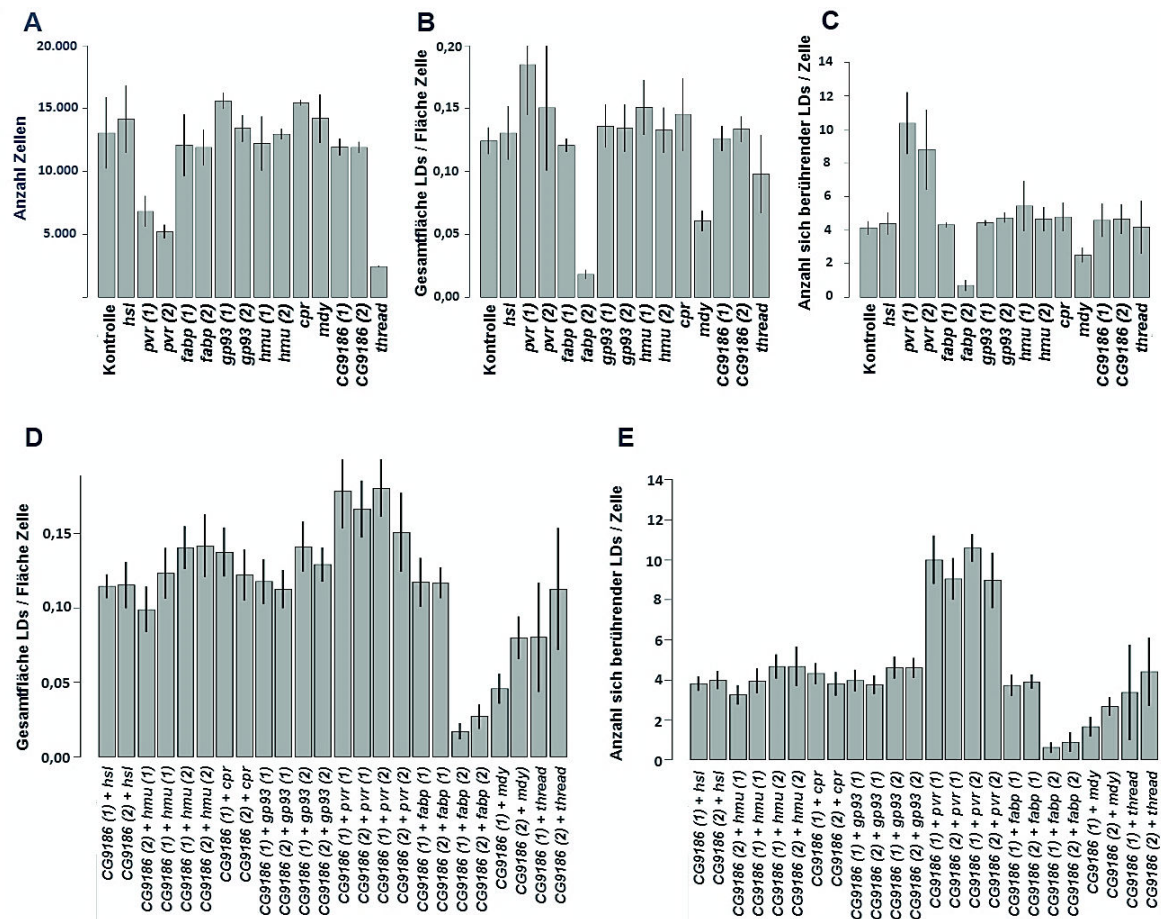


Abbildung 23: Quantitative Auswertung der vom automatischen Mikroskop aufgenommenen Bilder. Die Diagramme zeigen die Zellzahl (A), den Anteil der LD Fläche an der Gesamtfläche der Zelle in Pixeln (B, D) sowie die Anzahl sich berührender LDs je Zelle (C,E). Bei A-C handelt es sich um Einzel-RNAi, bei D-E um Doppel-RNAi. Für einige Gene wurden zwei verschiedene dsRNAs verwendet (1, 2). Für die Zellzahl der Doppel-RNAi siehe Abbildung 54 im Anhang. Die RNAi von *thread* und *pvr* führt zu einer geringeren Zellzahl (A). Sowohl *mdy* als auch *fabp* RNAi hat eine verringerte LD Fläche je Zelle zur Folge. Bei *fabp* ist dies jedoch stark abhängig von der gewählten dsRNA. RNAi von *CG9186* selbst sowie von *gp93*, *hmu* und *cpr* zeigt keinen Effekt auf die LD Fläche innerhalb der Zellen. Die Anzahl sich berührender LDs je Zelle (als Maß für LD Aggregation) ist bei *pvr* RNAi im Vergleich zur Kontrolle im mehr als Doppelte erhöht. Dieser Effekt besteht bei gleichzeitiger *CG9186* RNAi (Werthebach *et al.*, 2016).

Wie die RNAi Versuche gezeigt haben, hat der *knock down* von *hmu*, *cpr* und *gp93* alleine sowie in Kombination mit *CG9186* keinen deutlichen Einfluss auf die LD Morphologie und Lokalisation. Wird jedoch *pvr* herunterreguliert, bilden sich in der Zelle Aggregate aus vielen kleinen LDs. Dieser Effekt besteht allerdings unverändert bei gleichzeitiger *CG9186* RNAi. Die Überexpression der Interaktoren zeigt keinen drastischen Effekt auf die *CG9186* induzierte Aggregation von LDs.

3.3 Ubiquitinierung von CG9186

Wie Kapitel 3.2.4 gezeigt hat, ist die Interaktionen von CG9186 mit Pvr, Gp93, Hmu und Cpr nur von geringer Bedeutung für die CG9186-induzierte Aggregation von LDs. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass durch Ubiquitinierung verschiedene LD-assoziierte Proteine beeinflusst werden können (z.B.: Ruggiano *et al.*, 2016). Das Protein ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) zum Beispiel induziert erst nach Mono-Ubiquitinierung die Bildung von LD-Aggregaten (Lohmann *et al.*, 2013). Es stellt sich daher die Frage, ob auch die CG9186-induzierte LD-Aggregation ubiquitinierungsabhängig ist.

3.3.1 Nachweis der Ubiquitinierung von CG9186

Neben der Identifikation von Interaktionspartnern ermöglicht die Immunpräzipitation von CG9186 und anschließende massenspektrometrische Analyse auch die Suche nach posttranslationalen Modifikationen des Proteins. So kann die Ubiquitinierung von Proteinen anhand einer sogenannten gly-gly Masseverschiebung nachgewiesen werden. Ubiquitin besitzt im C-Terminus zwei Glycinreste. Über das randständige Glycin wird Ubiquitin mit einem Lysin im Zielprotein verknüpft (Finley *et al.*, 2012). Wird dieses Zielprotein für die MS Analyse mit Trypsin verdaut, können die beiden Glycine am Lysin verbleiben und erhöhen damit die Masse des Peptids um 114,0429 Dalton (zusammengefasst in Peng, 2008). Im Rahmen des ersten Co-IP Experimentes wurden so zwei Ubiquitinierungsstellen innerhalb von CG9186 identifiziert. Abbildung 24 zeigt ein Massenspektrum für ein Peptid von CG9186 aus dem ersten der beiden Co-IP Experimente.

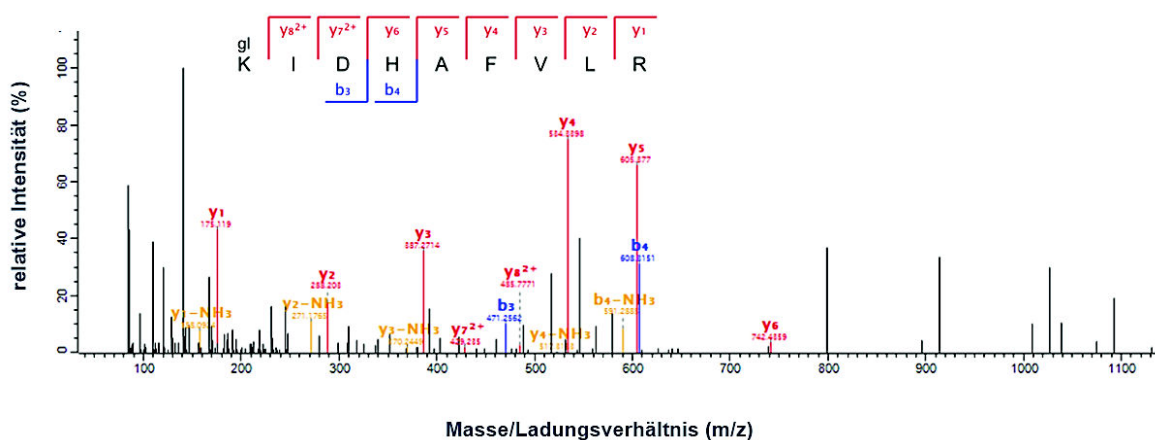


Abbildung 24: Massenspektrum für ein CG9186-Peptid mit gly-gly Masseverschiebung. Das Peptid beinhaltet eine gly-gly Masseverschiebung am Lysin an Position 280 im C-Terminus von CG9186. Es wurde in beiden Co-IP Experimenten identifiziert (Kolkhof *et al.*, 2017).

Das Peptid beinhaltet eine gly-gly Masseverschiebung am Lysin an Position 280 im C-Terminus von CG9186. Zusätzlich wurde das Lysin an Position 271 identifiziert (Daten nicht gezeigt). Im Zweiten Co-IP Experiment wurde das Lysin an Position 280 bestätigt. In Abbildung 25 ist die Aminosäuresequenz von CG9186 dargestellt. Die 16 Lysine des Proteins sind fett gedruckt. Die Komponenten der katalytischen Triade wurden mit Kästen hervorgehoben. Der blau hinterlegte Sequenzabschnitt ist für die Lokalisation auf den LDs verantwortlich. Wird der grau hinterlegte C-Terminale Teil von CG9186 deletiert, so lokalisiert es noch auf den LDs, induziert aber keine LD Aggregation mehr (Thiel *et al.*, 2013). Die beiden identifizierten Lysinreste befinden sich in diesem Sequenzabschnitt und sind mit Pfeilen hervorgehoben.

MQEAYVNINSIPTHTWGRWIEETITE**K**EIVICITGNPGLPGFYTEFAGTLQ
KELGDLPVWVIGHAGHDDPPEASIREVPQLSGNEELFNLDGQIRH**K**IAFIE
KYVPSDV**K**IHLI**GHSIG**AWMILQLLENERIRSRIQ**K**CYMLFPTVERMMESP
N
GWVFT**K**VAMPLYSVFGYIFFSFFNFLPVWRLMLIQIYFLIFS**I**PRQFLGTAL
KYS**K**PSVAE**K**VVFLADDEMARVRGIQREIVEQNLDLL**K**FYYGTT**D**GWVPIS
YYDQL**K**KDYP**K**VDAQLD**T****K****K**IDHAFVLR**H**SQPMVIVRDMIQQHRRV*

↑ ↑ ↑

Abbildung 25: Aminosäuresequenz von CG9186. Die 16 Lysine des Proteins sind fett gedruckt. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade wurden mit Rahmen hervorgehoben. Der blau hinterlegte Sequenzabschnitt ist für die Lokalisation auf den LDs und der grau hinterlegte Abschnitt für die CG9186 induzierte LD Aggregation notwendig (Thiel *et al.*, 2013). Die beiden identifizierten Ubiquitinierungsstellen befinden sich im C-Terminus und sind mit einem Pfeil markiert (Kolkhof *et al.*, 2017).

Um eine mögliche Interaktion von CG9186 und Ubiquitin zu bestätigen, wurden auch hier Luciferase Komplementations-Experimente durchgeführt (siehe 3.2.2). Abbildung 26 zeigt ein Schema der getesteten Konstrukte. Da Ubiquitin über seinen C-Terminus mit Zielproteinen verknüpft wird (Finley *et al.*, 2012), wurde hier lediglich ein Konstrukt mit N-terminal fusioniertem Gluc verwendet. Gezeigt sind außerdem die Messergebnisse der Experimente. Wie sich erkennen lässt, besteht eine starke Interaktion zwischen CG9186 und Ubiquitin. Diese Interaktion ist allerdings stark von der Position des Gluc-Fragmentes abhängig. Liegt es im C-Terminus von CG9186, dann zeigt sich eine starke Interaktion mit Ubiquitin. Wird Gluc an das N-terminale Ende von CG9186 fusioniert, lässt sich keine Interaktion nachweisen.

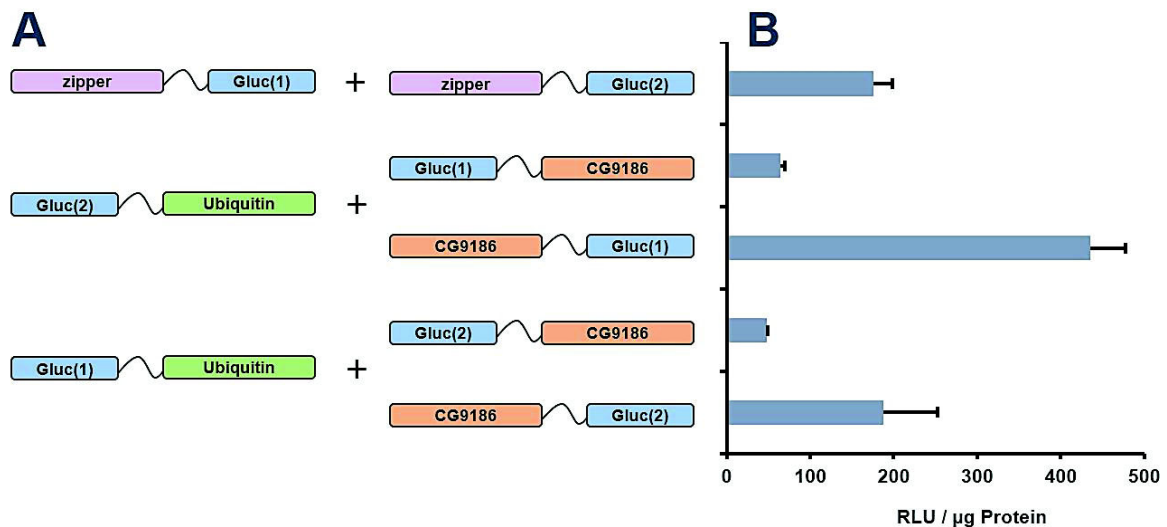


Abbildung 26: Luciferase Experimente mit CG9186 und Ubiquitin. Gezeigt ist ein Schema der getesteten Konstrukte (A) sowie die Messergebnisse der Experimente (B). Es besteht eine starke Interaktion zwischen CG9186 und Ubiquitin, die allerdings von der Position des Gluc-Fragmentes abhängig ist. Abbildung in Anlehnung an Kolkhof *et al.*, 2017.

3.3.2 Bedeutung der Ubiquitinierung bei der CG9186 induzierten LD-Aggregation

Es konnte mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt werden, dass CG9186 mit Ubiquitin interagiert. Es sollte daher die Frage geklärt werden, ob diese Ubiquitinierung einen Effekt auf die Lokalisation des Proteins oder die CG9186 induzierte Aggregation von LDs hat. Da Ubiquitinierung im Zielprotein primär an ϵ -Aminogruppen von Lysinen stattfindet (Finley *et al.*, 2012), wurde ein CG9186 Konstrukt generiert, bei dem alle 16 im Protein vorhandenen Lysine gegen Arginine ausgetauscht wurden (16K2R). Abbildung 27 zeigt die zelluläre Lokalisation einer eGFP-markierten Variante dieses 16K2R Konstruktes im Vergleich zum eGFP markierten Wildtyp-Protein.

Hierfür wurden *Drosophila* Kc167 Zellen transient transfiziert und für 40 Stunden mit 400 μ M Ölsäure behandelt. Die LDs und Zellkerne wurden mit LipidTOX und Hoechst 33258 gefärbt und die Zellen schließlich mit einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop aufgenommen. Wildtyp-CG9186 lokalisiert erwartungsgemäß auf den LDs und führt wie bei Thiel *et al.* (2013) beschrieben zu einer Aggregation der LDs (Pfeil). Das 16K2R Konstrukt lokalisiert ebenfalls auf den LDs, allerdings lässt sich keine deutliche Veränderung der LD Größe und Lokalisation im Vergleich zu den untransfizierten Zellen beobachten (Asterisk). Die Zellen zeigen nicht den LD-Aggregations-Phänotyp.

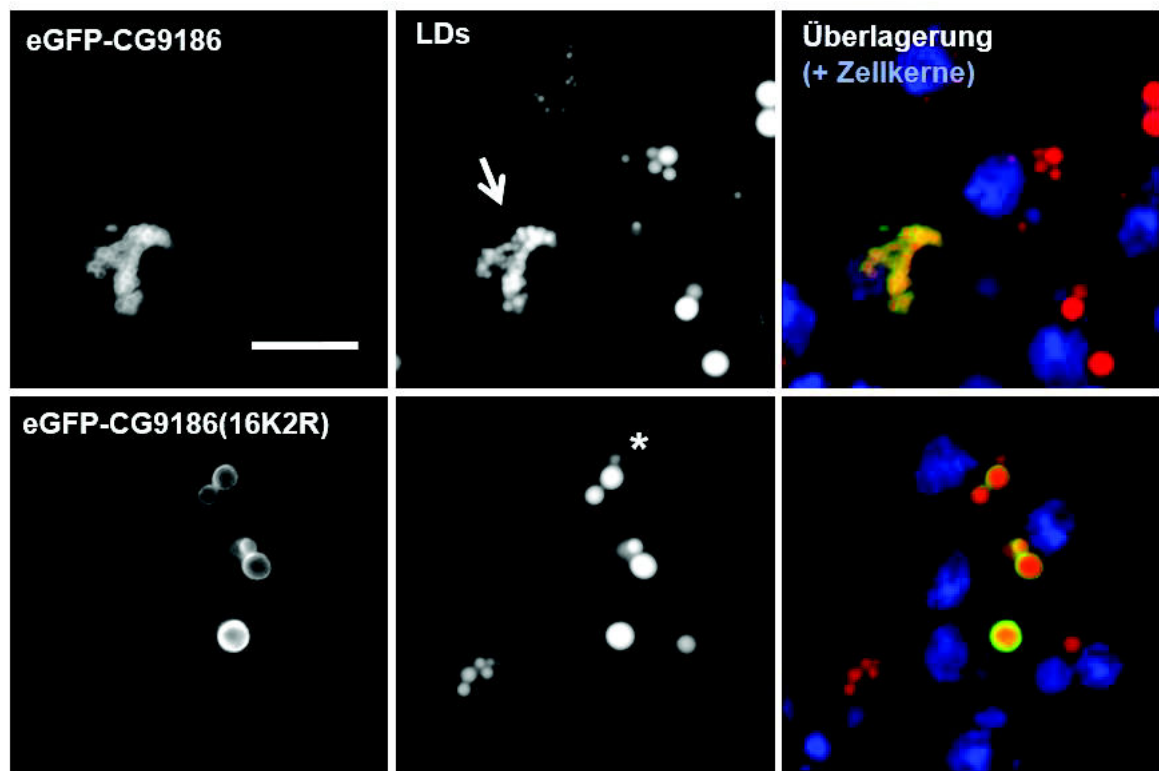


Abbildung 27: zelluläre Lokalisation von eGFP-CG9186 und eGFP-CG9186(16K2R). *Drosophila* Kc167 Zellen wurden transient transfiziert und für 40 Stunden mit 400 μ M Ölsäure behandelt. LDs und Zellkerne wurden mit LipidTOX und Hoechst 33258 gegengefärbt. eGFP-CG9186 lokalisiert auf den LDs und führt zu einer Aggregation der LDs (Pfeil). Das 16K2R Konstrukt lokalisiert ebenfalls auf den LDs, allerdings ohne die Induktion von LD Aggregaten. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ M.

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, welche der insgesamt 16 Lysine des Wildtyp-Proteins bei der Aggregation der LDs eine besondere Rolle spielen. Die im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse als Ubiquitinierungsstellen identifizierten Lysine befinden sich im C-Terminus an Position 271 und 280. Thiel *et al.* (2013) konnten mit Deletions-Konstrukten zeigen, dass gerade der C-Terminus für den LD Aggregations-Phänotyp essentiell ist. Beruht dies auf einer Ubiquitinierung dieses Proteinbereiches? Um diese Frage zu klären, wurden verschiedene Lysin-Austausch-Konstrukte erstellt. Diese sind in Abbildung 28 schematisch abgebildet.

Bei Variante eins wurden lediglich die beiden identifizierten Lysine (Position 271 und 280) gegen Arginine ausgetauscht. Bei den Varianten zwei und drei wurden weitere Lysine im C-Terminus ausgetauscht. Bei Variante vier wurden bis auf die beiden Lysine in Position 271 und 280 alle Lysine gegen Arginine ausgetauscht. Bei Variante 5 handelt es sich um das 16K2R Konstrukt, bei dem alle 16 Lysine mutagenisiert wurden.

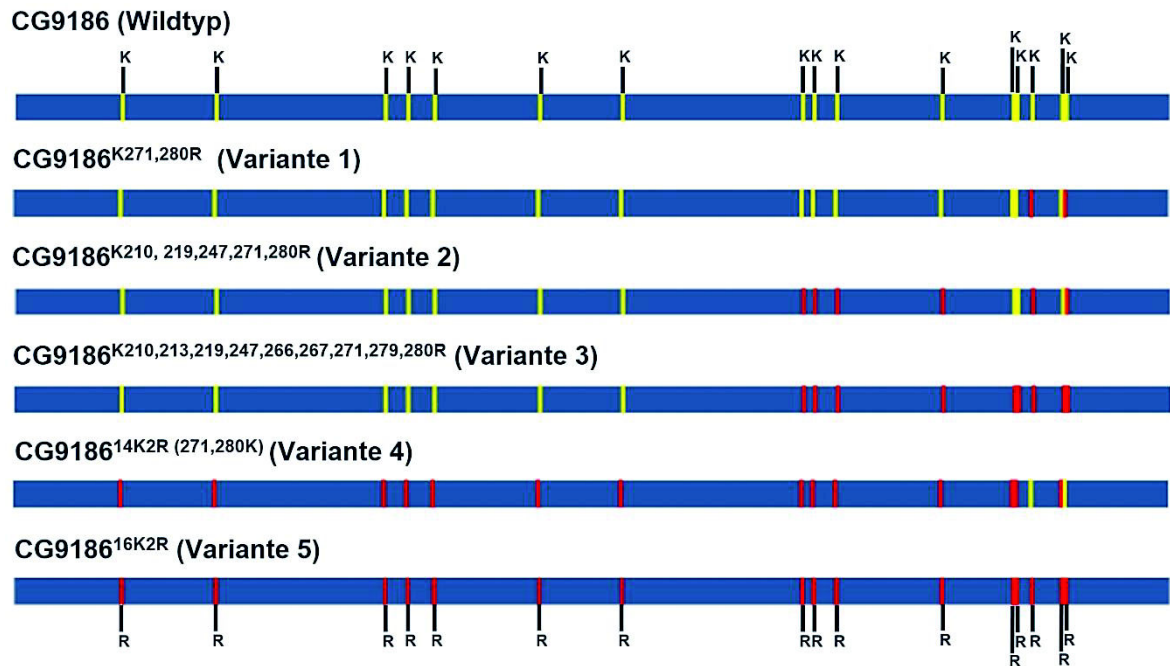


Abbildung 28: Schematische Abbildung der generierten Lysin- zu Arginin Austauschvarianten von CG9186. Bei Variante eins wurden die beiden Lysine in Position 271 und 280 gegen Arginine ausgetauscht. Bei den Varianten zwei und drei wurden weitere Lysine im C-Terminus ausgetauscht. Bei Variante vier wurden bis auf die beiden Lysine in Position 271 und 280 alle Lysine gegen Arginine ausgetauscht. In Variante fünf wurden alle Lysine ausgetauscht (16K2R).

Um den Einfluss der CG9186 Varianten auf die Morphologie und Positionierung der LDs zu untersuchen, wurden eGFP-Fusionsproteine in Kc167 Zellen zur Überexpression gebracht und die Zellen für 40 Stunden mit 400 µM Ölsäure behandelt. Die Zellen wurden fixiert und die LDs mit LipidTOX gefärbt. Wie Abbildung 29 zeigt, lokalisieren alle Konstrukte auf den LDs. Allerdings zeigte sich nur beim Wildtyp-Protein und bei den Varianten eins und zwei eine Aggregation der LDs (Siehe Pfeil). Überexpression der Varianten drei (siehe Asterisk), vier und fünf führen nicht zu einer Aggregation der LDs. Die Varianten vier und fünf lokalisierten im Gegensatz zum Wildtypprotein nicht mehr auf allen LDs (siehe Kreuz).

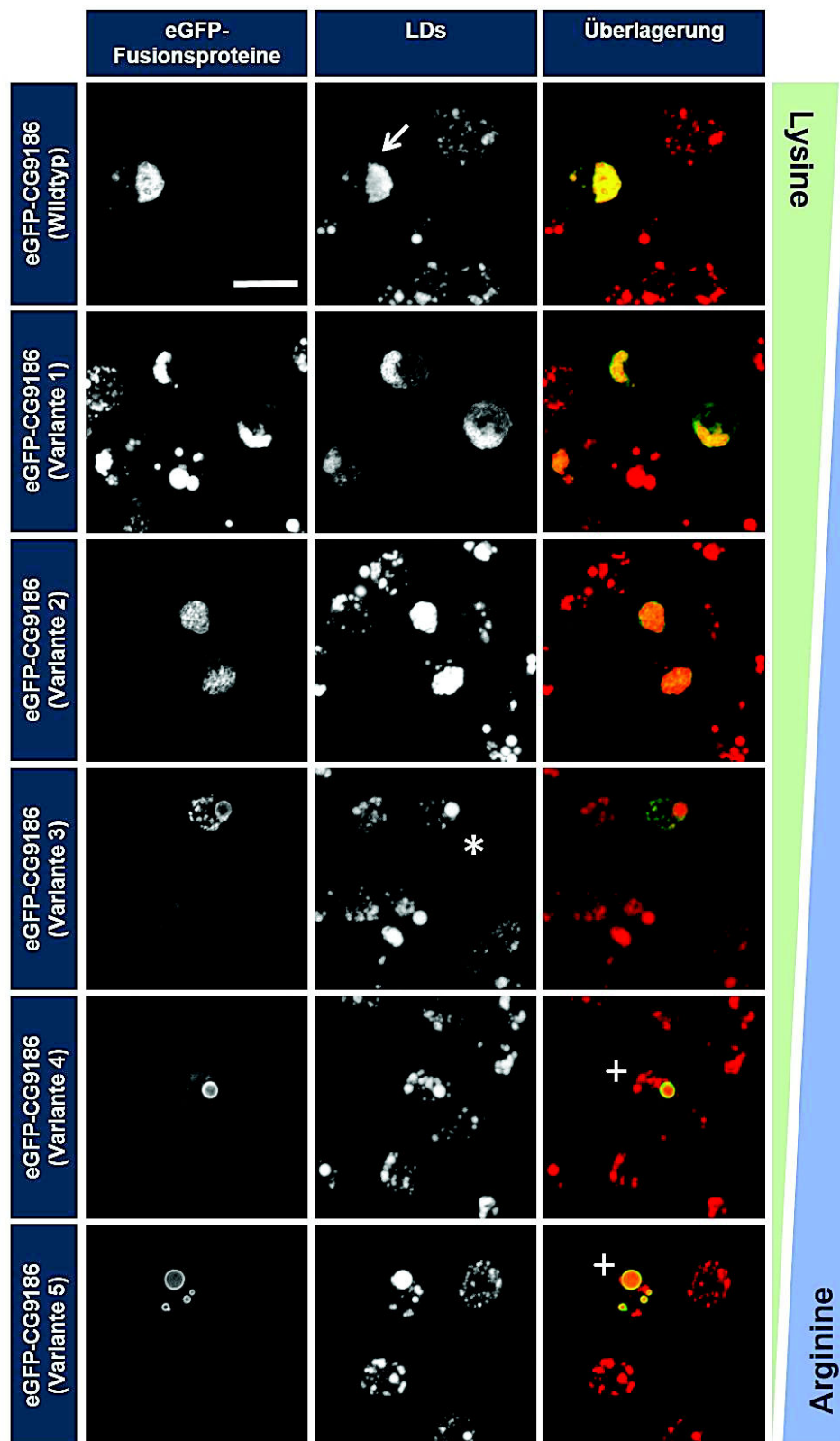


Abbildung 29: Zelluläre Lokalisation der CG9186 Lysin Austauschvarianten. Die eGFP-Fusionsproteine wurden in Kc167 Zellen zur Überexpression gebracht und die Zellen für 40 Stunden mit 400 μ M Ölsäure behandelt. Die Zellen wurden fixiert und die LDs mit LipidTOX gegengefärbt. Bei den Aufnahmen handelt es sich um MIPs von Z-Stapeln, die mit einem Zeiss LSM780 gemacht wurden. Alle getesteten Konstrukte lokalisieren auf den LDs. Nur das wildtypische CG9186 und die Varianten eins und zwei führen zu einer Aggregation der LDs. Die Varianten 4 und 5 lokalisierten nur auf einzelnen LDs (siehe Kreuz). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ M.

Für die Quantifizierung des Aggregations-Phänotyps wurden Übersichtsaufnahmen der Zellen angefertigt und die Zellen aufgrund ihrer LDs visuell in die Gruppen „dispers“, und „aggregiert“ eingeteilt. Insgesamt wurden 3705 Zellen ausgezählt. Im Vergleich zu den untransfizierten Zellen führt die Überexpression von Wildtyp-CG9186 sowie der Varianten eins und zwei zu einer starken Aggregation der LDs. So zeigen 70-80% der Zellen aggregierte LDs (siehe Abbildung 30). Der Austausch der beiden per Massenspektrometrie identifizierten Lysine (Variante 1) hat keinen drastischen Effekt auf die LD Morphologie und Lokalisation. Allerdings schwächt sich der Aggregations-Phänotyp mit steigender Anzahl an Lysin zu Arginin Austausch jedoch stark ab. Gerade der Schritt von Variante zwei zu Variante drei, bei der alle C-terminalen Lysine ausgetauscht sind, ist besonders deutlich.

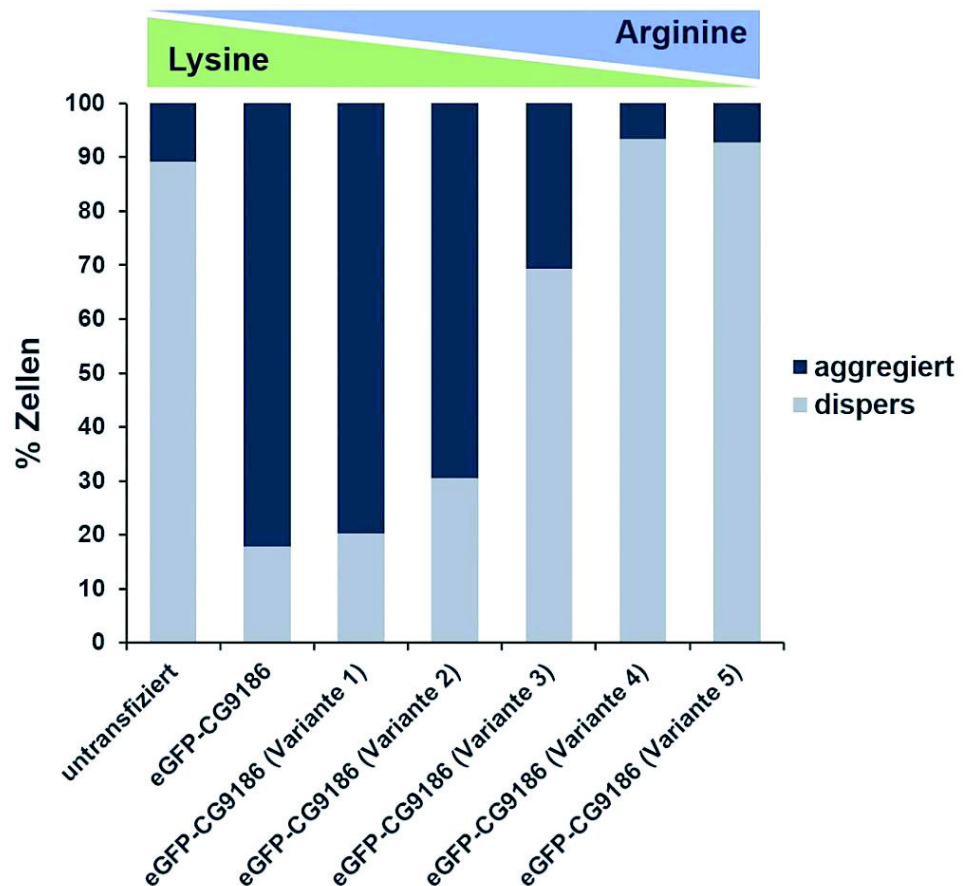


Abbildung 30: quantitative Auswertung der Aggregation von LDs nach Überexpression von eGFP-CG9186 sowie verschiedener Lysin zu Arginin Austauschvarianten von CG9186. Insgesamt wurden 3705 Zellen aus Übersichtsaufnahmen (MIPs von Z-Stapeln) ausgezählt, die mit einem Zeiss LSM780 aufgenommen wurden. Die Zellen wurden für 40 h mit 400 μ M Ölsäure behandelt. Die Überexpression von Wildtyp-CG9186 sowie der Varianten eins und zwei führt zu einer starken Aggregation der LDs. Der Austausch der beiden per Massenspektrometrie identifizierten Lysine (Position 271 und 280, Variante 1) hat keinen drastischen Effekt auf die Aggregation. Der Phänotyp schwächt sich jedoch mit steigender Anzahl von Lysin zu Arginin Mutationen stark ab. Besonders deutlich ist diese Abnahme von Variante zwei zu Variante drei (alle C-terminalen Lysine ausgetauscht).

Im Rahmen des vorliegenden Kapitels wurden Interaktionspartner von CG9186 durch Co-IP Experimente identifiziert. Vier dieser Proteine wurden aufgrund ihrer Lokalisation oder LD-assoziiierter Phänotypen für eine weitere Analyse ausgewählt. Für Cpr, Hmu und Gp93 konnte die Interaktion mit Luciferase Komplementations-Experimenten bestätigt werden. Für Pvr zeigte sich in diesen Versuchen keine Interaktion mit CG9186. Anschließend wurden die Interaktionen mit Blick auf die CG9186 induzierte LD-Aggregation näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die vier getesteten Interaktoren keinen drastischen Effekt auf die Ausbildung dieses Phänotyps haben. Die Bedeutung der Interaktionen liegt also wahrscheinlich in einer anderen Funktion von CG9186.

Als weiterer Interaktor von CG9186 wurde Ubiquitin identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung von CG9186 für die Ausbildung des LD-Aggregations-Phänotyps notwendig ist. Eine besondere Rolle kommt hierbei den Lysinen im C-Terminus von CG9186 zu.

Obwohl Interaktoren identifiziert und der Aggregations-Phänotyp näher charakterisiert wurde, bleibt die Frage nach der gesamtorganismischen Bedeutung für CG9186. Um dies zu beantworten, wurden *in vivo* Nullallele generiert und analysiert. Im Folgenden Kapitel werden die gewonnenen Erkenntnisse vorgestellt.

3.4 Untersuchungen zur *in vivo* Funktion von CG9186

Die einzigen bislang veröffentlichten *in vivo* Daten zum *Drosophila* Protein CG9186 beschränken sich auf wenige, mit dem GAL4-UAS System durchgeführte RNAi- und Überexpressions-Experimente. Hierbei zeigte sich, dass eine gesamtorganismische RNAi von CG9186 zur Reduktion von LDs in den Speicheldrüsen von L3 Larven sowie zu einer geringeren Lipidmenge in adulten Tieren führt (Thiel *et al.*, 2013). Wie aber in dieser Veröffentlichung diskutiert wird, kann eine gewisse Restaktivität von CG9186 aufgrund einer hohen Stabilität des Proteins nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin ist ungeklärt, in welchen Stoffwechsel- oder Signaltransduktionswegen CG9186 eine Rolle spielt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine *loss of function* (engl.: ‚Funktionsverlust‘) Mutante zu generieren und zu analysieren.

3.4.1 Generierung von CG9186 Nullallelen mittels CRISPR/Cas9

Um CG9186 mutante Fliegenlinien zu generieren, wurde die CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*) Technik in Anlehnung an Kondo und Ueda (2013) genutzt. Diese Methode nutzt *guide* RNAs (gRNAs), um mit der Endonuklease Cas9 an spezifischen Zielen im Genom Doppelstrangbrüche zu induzieren und so Indels (kleinere Insertionen oder Deletionen von weniger als 50 bp) zu erzeugen oder größere Sequenzabschnitte aus dem Genom zu entfernen (Übersichtsartikel Bassett und Liu, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene gRNAs in einer Fliegenlinie zur Expression gebracht, die Cas9 spezifisch in der Keimbahn exprimiert. Auf diese Weise wurde ein ca. 1,1 kb großes Sequenzstück (inklusive Startcodon) aus dem offenen Leserahmen (ORF, engl.: *open reading frame*) von CG9186 herausgeschnitten (siehe Abbildung 31 A und B), und so eine Mutante ohne funktionelles CG9186 Protein generiert.

Abbildung 31 A zeigt die Basensequenz eines ca. 3.000 Basenpaar großen Ausschnitts der CG9186 Genregion. Der offene Leserahmen für CG9186 ist grau hinterlegt. Die beiden schwarz hinterlegten Sequenzen sind die Ziele für die Cas9 induzierten Doppelstrangbrüche (DSBs). Die unterstrichenen Bereiche am Anfang und Ende der Sequenz wurden als Oligonukleotid-Sequenzen gewählt, um mittels PCR die transgenen Tiere zu identifizieren. Eine schematische Darstellung der geplanten Mutagenese ist in Abbildung 31 B gezeigt. Die vorhergesagten gRNA Zielsequenzen (DSB 1 und DSB 2)

liegen *upstream* des ORFs sowie in dessen 3'-Ende. Die Oligonukleotide für die beiden gRNAs wurden in pBFv-U6.2 Vektoren (Kondo und Ueda, 2013) kloniert und die Plasmide in >200 Embryonen einer nos-Cas9 Linie (yw;attP40{nos-Cas9}/CyO) injiziert. Insgesamt schlüpften aus den Injizierten Embryonen 36 Tiere. Diese wurden einzeln mit sogenannten *Multi-Balancer* Fliegen gekreuzt (w; If/CyO^{wg-lacZ};MKRS(Sb)/TM6b(Hu,Tb,e)). Die Balancer Chromosomen dieser Linie wurden genutzt, um eine erfolgreiche Mutation auf dem dritten Chromosom über mehrere Generationen hinweg verfolgen zu können, Rekombinationen zu verhindern, und um das Cas9 Konstrukt auf dem zweiten Chromosom der injizierten Fliegenlinie auskreuzen zu können. Von den aus diesen Kreuzungen hervorgehenden Tieren wurden nun erneut vier bis sechs Individuen einzeln mit der *Multi-Balancer* Linie gekreuzt (s.o.) und deren Nachfahren dann per PCR auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation hin untersucht. Wie sich zeigte, produzierten zwei der ursprünglich injizierten Tiere (#6 und #35) heterozygot mutante Nachfahren (Benennung der Linien entsprechend 35.1, 35.2, usw.).

Die heterozygot mutanten Nachfahren der Injizierten Tiere (also 35.1 usw...) wurden anschließend mit w;;MKRS(Sb)/TM6b(Hu,Tb,e) gekreuzt, um ein wildtypisches zweites Chromosom zu erhalten. Um TM3 als Balancier Chromosom zu nutzen, wurden die Tiere danach mit einer w;;TM3 Linie gekreuzt. Um eine wildtypische Kontrolllinie mit ansonsten gleichem genetischen Hintergrund zu erhalten, durchliefen nicht injizierte Tiere der nos-Cas9 Linie parallel die gleichen Kreuzungsschritte. Wie sich bei den mutanten Tieren zeigte, waren lediglich die Nachkommen von Tier #35 homozygot lebensfähig. Sie wurden daher für alle folgenden Experimente verwendet. Abbildung 31 C zeigt ein Agarosegel sowie einen Western Blot unter Verwendung von Fliegen zweier mutanter Allele und der Kontrolllinie. Eine PCR mit genomischer DNA (gDNA) der Kontrolllinie führt zu einem Amplifikat von ca. 2,8 kb. Das Allel 35.7 hingegen zeigt im homozygoten Zustand eine Bande auf Höhe von ca. 1,7 kb und ist damit um die vorausberechnete Deletion von ca. 1,1 kb kleiner als das Wildtyp-Amplifikat. Um zu bestätigen, dass es sich auch auf Proteinebene um Nullmutanten handelt, wurde ein Western Blot mit einem CG9186-spezifischen Antikörper durchgeführt. Wie Abbildung 31 C zeigt, war in den homozygoten Tieren kein CG9186 Protein nachweisbar. Mit Balancierchromosom zeigen sich in der PCR insgesamt drei Banden: auf Höhe der Kontrolle, etwas darunter, sowie auf Höhe des homozygoten Nullalleles. Allel 35.2, welches wie 35.7 durch Kreuzung des injizierten Tieres #35 entstanden ist, zeigt ein Amplifikat, das im vorliegenden Gel in der Größe nicht von der Wildtypsituation zu unterscheiden ist. Im Western Blot konnte allerdings auch bei 35.2 kein CG9186 Protein detektiert werden. Zur näheren Untersuchung auf genomischer Ebene wurden die betreffende Region in den Allelen 35.2 und 35.7 sequenziert. Wie Abbildung 31 D zeigt, kam es beim Allel 35.2 durch ein Indel in der zweiten gRNA

Erkennungssequenz zu einer Leserasterverschiebung. Das Allel 35.7 zeigt auf genomischer Ebene eine Deletion von der ersten bis zur zweiten gRNA Erkennungssequenz.

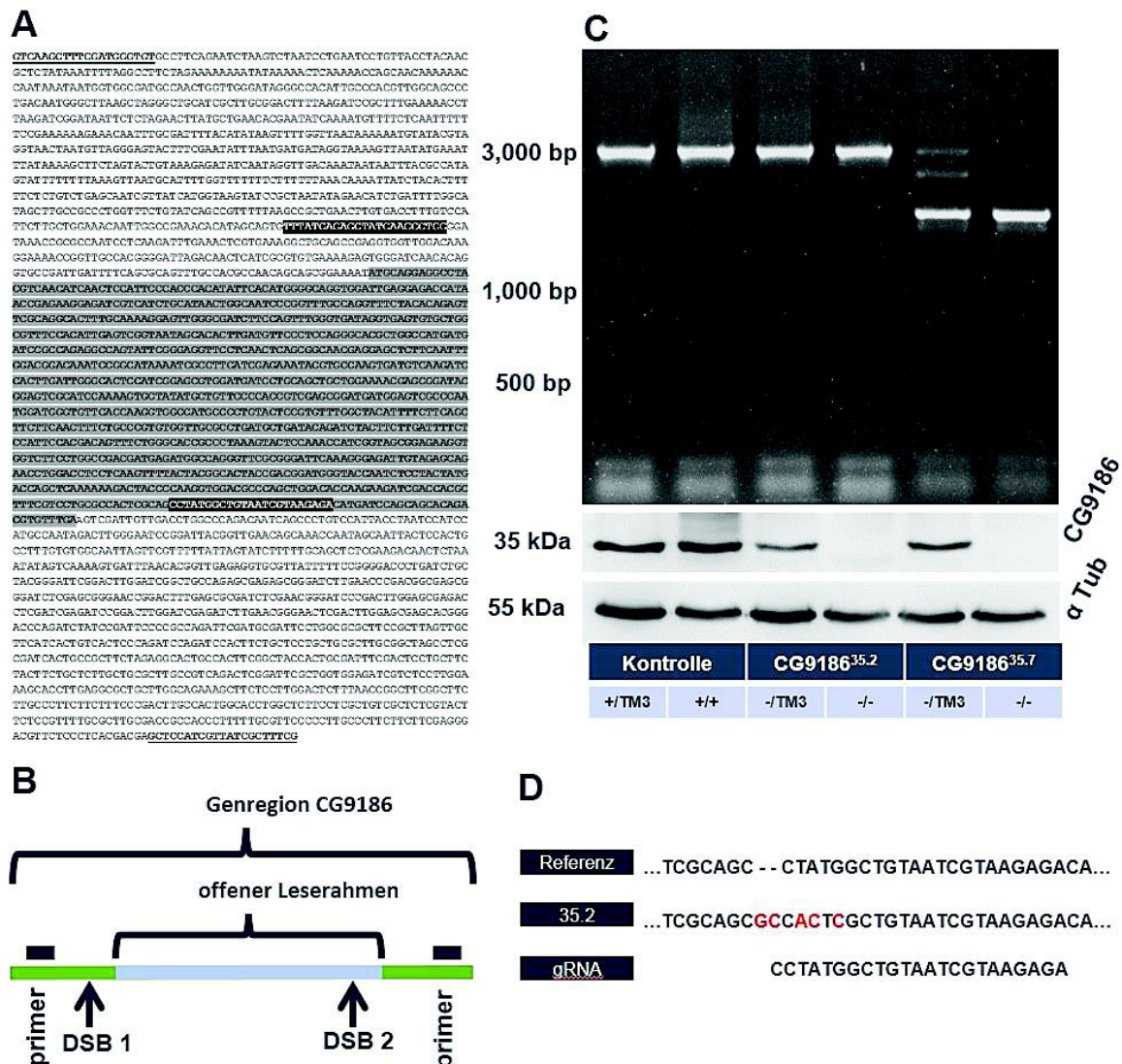


Abbildung 31: Generierung von Nullallelen mittels CRISPR/Cas9. A zeigt einen Ausschnitt aus der CG9186 Genregion. Grau hinterlegt ist der offene Leserahmen für das CG9186 Protein. Schwarz hinterlegt sind die *guide* RNA (gRNA) Ziele für Doppelstrangbrüche (DSBs). Die Primer für die PCR-basierte Detektion von transgenen Tieren sind unterstrichen. B zeigt eine schematische Darstellung der Mutagenese. Die vorhergesagten DSBs liegen *upstream* des offenen Leserahmens und in dessen 3'-Ende. Die entstehende Deletion hat eine theoretische Größe von 1,1 kb. Abbildung C zeigt die PCR-Produkte, die auf Basis der genomischen DNA (gDNA) von Kontrolltieren sowie den Allelen 35.2 und 35.7 generiert wurden. Allel 35.7 zeigt ein kleineres Amplifikat als die Kontrolle, während bei 35.2 kein Unterschied sichtbar ist. Ein Western Blot mit CG9186-spezifischem Antikörper zeigt, dass in homozygoten 35.2 und 35.7 Tieren kein CG9186-Protein nachweisbar ist. Die Sequenzierung von Allel 35.2 (D) zeigt, dass ein Indel (im DSB 2) zu einer Leserasterverschiebung geführt hat.

3.4.2 Effekte des CG9186-Verlustes auf adulte Tiere

3.4.2.1 CG9186 beeinflusst die Lipidspeicher

Wie einleitend beschrieben, konnten mit den Nachfahren von Tier #35 homozygot CG9186 mutante Stämme etabliert werden. CG9186 ist also für das Überleben der Fliegen nicht essentiell. Allerdings zeigt sich unter Standardbedingungen durchweg eine geringfügig verringerte (wenn auch nicht signifikante) Fruchtbarkeit der Tiere (siehe Abbildung 55 im Anhang). Wie Abbildung 32 (A) für das Allel 35.7 zeigt, sind die mutanten Tiere im Vergleich zur Kontrolllinie etwas kleiner und haben eine schwächere Melanisierung. Der Größenunterschied zeigt sich auch in einer leichten Reduktion des Körpergewichtes um ca. 5-8% (B). Wie bei Thiel *et al.* (2013) beschrieben, führt eine gesamtorganismische RNAi von CG9186 zu einer Reduktion der Triacylglycerol (TAG)-Speicher in adulten Tieren. Abbildung 32 (C) zeigt, dass dieser Phänotyp auch bei den verschiedenen CG9186 Nullallelen (7 Tage alt, jungfräulich) besteht.

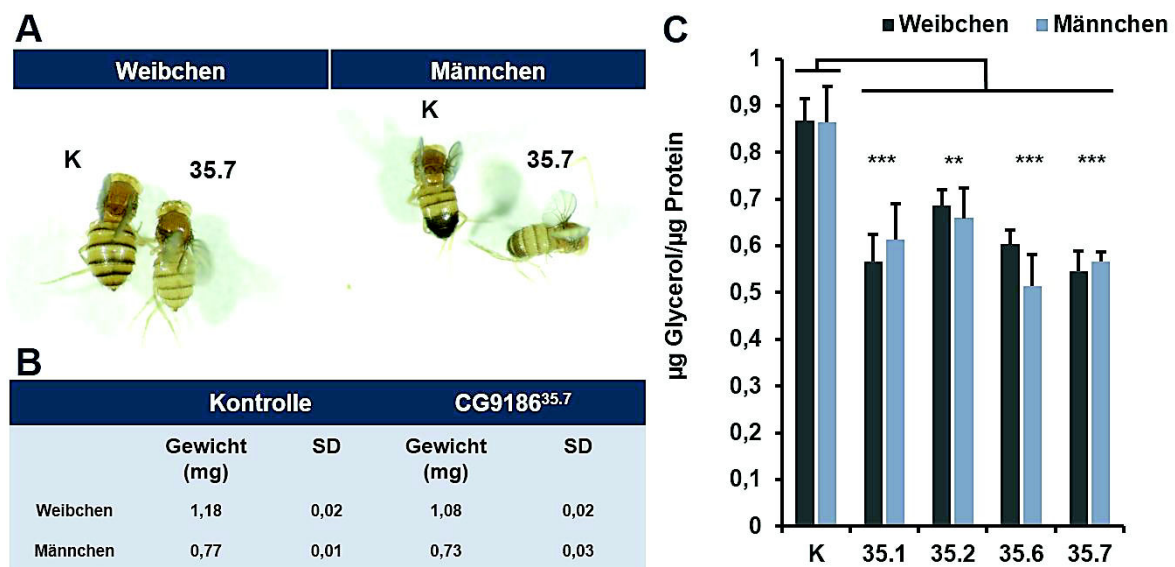


Abbildung 32: Gewicht und Triacylglycerol (TAG)-Gehalt sieben Tage alter adulter CG9186 mutanter Tiere im Vergleich zur Kontrolle. (A) zeigt Aufnahmen von sieben Tage alten Fliegen der Kontrolllinie (K) und des Allels 35.7. Mutante Tiere sind kleiner und haben eine schwächere Melanisierung. Gravimetrische Untersuchungen (B) zeigen ein um 5-8 % geringeres Körpergewicht mutanter Tiere im Vergleich zur Kontrolle. (C) zeigt die enzymatische Messung von Glycerol (als Indikator für Triacylglycerol (TAG)) jungfräulicher sieben Tage alter Tiere. Die Nullallele weisen einen um 20-35 % verringerten TAG-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle (K) auf. Bei (A) und (C) handelt es sich um Einzelversuche mit jeweils 4-5 technischen Replikaten pro Genotyp und Geschlecht, Versuch (B) zeigt eines von zwei getrennten Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Signifikanzniveaus: $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

In der hier angewendeten enzymatischen Messung werden Glycerolipide gespalten und die Gesamtmenge an Glycerol als Maß für TAGs quantifiziert (Hildebrandt *et al.*, 2011). Die TAG Werte bei den mutanten Fliegen liegen sowohl bei den Weibchen als auch den Männchen zwischen 20 und 35 % unter denen der Kontrolllinie. Wie die Messungen

zeigen, konnte dieser Effekt in allen Allelen beobachtet werden. Im Folgenden werden nur die Daten für das Allel 35.7 vorgestellt. Zentrale Experimente wurden aber parallel mit mindestens einem weiteren Allel (35.1 oder 35.2) durchgeführt. Diese Daten befinden sich im Anhang. Als Kontrolle diente bei allen Experimenten die parallel zu den Nullallelen generierte Kontrolllinie. Diese besitzt den gleichen genetischen Hintergrund, allerdings ohne Deletion in CG9186. Neben den verringerten TAG Mengen wurden auch signifikant reduzierte Gesamt-Cholesterol- und CE-Spiegel gemessen (siehe Abbildung 64 im Anhang). Im Hinblick auf die verringerte Lipidspeicherung in den adulten Tieren stellt sich die Frage, ob dieser Effekt eventuell auf einer reduzierten Nahrungsaufnahme beruht. Das CG9186 Transkript wird in den Speicheldrüsen von L3 Larven exprimiert (Celniker *et al.*, 2009; Chintapalli *et al.*, 2007) und ein *knock down* führt hier zu einer starken Reduktion der ansonsten im Gewebe vorhandenen LDs (Thiel *et al.*, 2013). Könnte also das Fehlen von CG9186 zur Funktionsbeeinträchtigung der Speicheldrüsen führen und damit die Nahrungsaufnahme erschweren? Um diese Frage zu klären, wurden sieben Tage alte männliche Fliegen in Gruppen von 20 Tieren für 30 min auf Fluorescein-haltiges Futter gesetzt. Die Tiere wurden anschließend homogenisiert und die aufgenommene Futtermenge über die Fluoreszenz-Intensität quantifiziert (siehe Abbildung 33).

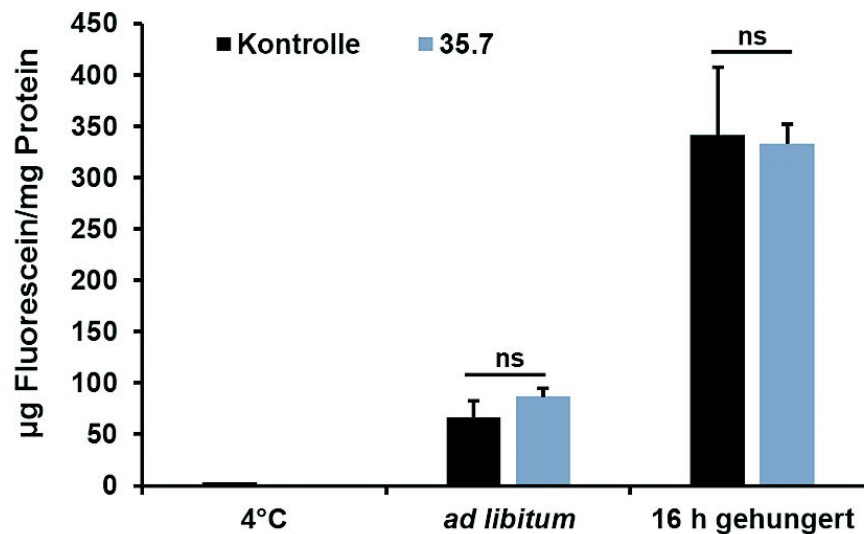


Abbildung 33: Quantifizierung der Futterraufnahme sieben Tage alter männlicher Fliegen. Sieben Tage alte männliche Fliegen wurden in Gruppen von 20 Tieren für 30 min auf Fluorescein-haltiges Futter gesetzt. Die Tiere wurden anschließend homogenisiert und die Fluoreszenz-Intensität quantifiziert. Als Positivkontrolle dienten Fliegen, die über Nacht gehungert wurden. Pro Genotyp und Kondition wurden Tiere aus drei Röhrchen (60 Fliegen) gemessen. Als Negativkontrolle wurden Kontrollfliegen auf gekühltes Futter gesetzt und der Versuch bei 4°C durchgeführt. Die Tiere bei 4°C zeigen eine verringerte Futterraufnahme, die vorab gehungerten Fliegen hingegen eine höhere Futterraufnahme als unter *ad libitum* Bedingungen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und dem Nullallel 35.7 festgestellt werden. Für ein Diagramm mit dem Allel 35.2 siehe Abbildung 56 im Anhang. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant

Als Positivkontrolle dienten Fliegen, die über Nacht gehungert wurden. Hier ist eine erhöhte Futteraufnahme gegenüber den Tieren zu erwarten, die zuvor unbeschränkten Zugang zu Futter hatten (*ad libitum*). Pro Genotyp und Kondition wurden drei Röhrchen (60 Tiere) verwendet. Eine weitere Versuchsgruppe wurde für 30 min bei 4°C inkubiert. Diese Tiere sollten aufgrund des Kälteschocks keine Nahrung aufnehmen. Hier wurde nur ein Röhrchen mit 20 Kontrolltieren verwendet. Abbildung 33 lässt erkennen, dass die Tiere bei 4°C wie erwartet eine deutlich verringerte Futteraufnahme zeigen. Im Lysat der vorab gehungerten Fliegen hingegen konnte eine höhere Fluoreszenzintensität gemessen werden. Weder nach vorherigem Hungern noch unter *ad libitum* Futtergabe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle gemessen werden.

Wie bei Säugetieren wird in *Drosophila* die Energiehomöostase nicht nur durch die Speicherung und Remobilisierung von Lipiden gewährleistet, sondern auch durch Kohlenhydrate wie Glykogen. Während Glykogen eine Speicherform für Energie darstellt, zählt Trehalose sowie zu einem geringeren Anteil auch Glukose zu den wichtigsten Transportformen (Matsuda *et al.*, 2015; Wyatt und Kale, 1957). Es stellt sich nun die Frage, ob neben dem verringerten TAG-Werten auch Kohlenhydrat-Speicher und -Transportformen betroffen sind. Um dies zu untersuchen, wurden bei sieben Tage alten adulten Tieren die Glukose-, Glykogen- und Trehalose-Spiegel bestimmt. Wie Abbildung 34 zeigt, weisen die mutanten Tiere keine drastisch veränderten Glukose-, Glykogen- und Trehalosewerte auf.

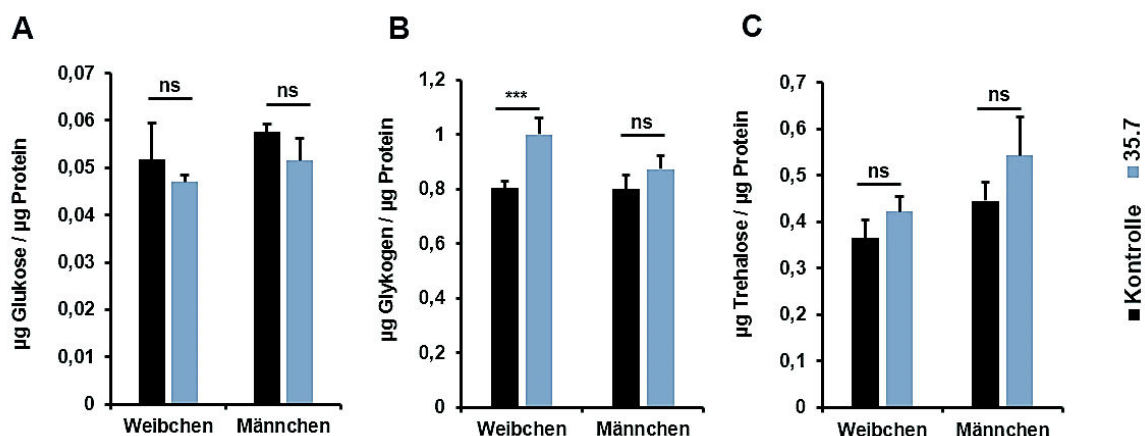


Abbildung 34: Gesamtorganismische Glukose-, Glykogen-, und Trehalose-Spiegel in 7 Tage alten Tieren. Die Glukose-, Glykogen- und Trehalose-Spiegel von 7 Tage alten adulten Tieren wurden bestimmt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle. Lediglich die Glykogenwerte der mutanten Weibchen sind im gezeigten Versuchsreplikat erhöht. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,001$ (***)

Eine Verringerung der Spiegel, wie sie bei TAG beobachtet werden konnten, ist nicht zu erkennen. Für die Glykogenwerte der Weibchen trifft im gezeigten Experiment das Gegenteil zu, hier sind die Spiegel erhöht. Der gezeigte Effekt auf Glykogen-Ebene wurde in den verschiedenen Versuchsreplikaten allerdings nicht konsistent beobachtet.

Fraglich bleibt also, warum die CG9186 mutanten Tiere trotz vergleichbarer Futteraufnahme und Kohlenhydrat-Speicher einen geringeren TAG-Spiegel aufweisen als die Kontrolltiere. CG9186 ist ein prominenter Bestandteil des LD-Subproteoms (Beller *et al.*, 2006). RNAseq und Microarray Daten zeigen außerdem, dass CG9186 in Lipidspeichernden Organen wie dem Mitteldarm und Fettkörper exprimiert wird (Celniker *et al.*, 2009; Chintapalli *et al.*, 2007). Besteht also ein Problem bei der Speicherung oder Remobilisierung von Lipiden? Um dies zu klären, wurde die Nährstoffverfügbarkeit für die Tiere variiert und anschließend die TAG-Werte bestimmt. Um eine Situation erhöhter Energieverfügbarkeit darzustellen, wurden frisch geschlüpfte Tiere für sieben Tage auf ein Futtermedium mit sehr hoher Energiedichte (HF = hoher Fettanteil, Standardmedium 2 mit 10 % Kokosöl) gesetzt. Wie Abbildung 35 (A) für die Männchen zeigt, führt die Haltung der Tiere auf HF Medium sowohl in der Kontrollgruppe als auch in CG9186 mutanten Tieren zu einer gesteigerten TAG Menge im Vergleich zum Kontrollfutter. Die Mutante besitzt also die Fähigkeit, die gestiegenen Energiemengen in Form von Lipiden zu speichern. Allerdings zeigt die Mutante auch unter HF Bedingungen signifikant niedrigere TAG-Werte auf als die Kontrolltiere. Als nächstes stellt sich die Frage, ob die mutanten Fliegen einmal gespeicherte Lipide im gleichen Maß remobilisieren können wie die Kontrolle. Um dies zu testen, wurden sieben Tage alte Tiere für 24 Stunden ohne Nahrung auf 0,5 % Agarose (in Wasser, zur Flüssigkeitsversorgung) gehungert und anschließend die TAG Werte gemessen. Um das Wiederauffüllen stark entleerter Energiespeicher in den Mutanten zu untersuchen, wurde ein Teil der Tiere nach der Hungerphase erneut für 24 auf Standardmedium 1 gesetzt. Wie die TAG Messungen zeigen (Abbildung 35 B), reagieren sowohl die Mutante als auch die Kontrolle auf die Hungerphase mit einer drastisch verringerten Lipidspeichermenge. Nach der Hungerphase ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen feststellbar. Das Umsetzen auf Standardmedium führt sowohl in den Kontrolltieren als auch der Mutante zu einem erneuten Anstieg der TAG-Mengen. Die Mutante zeigt zu diesem Zeitpunkt wieder eine etwas geringere Lipidspeichermenge als die Kontrolle.

Neben den TAG Werten wurde auch Glykogen und Glukose in den Tieren bestimmt (siehe Abbildung 57 im Anhang). Auch die Glykogen-Spiegel sinken in Folge der Hungerperiode. Allerdings ist kein klarer Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante zu beobachten.

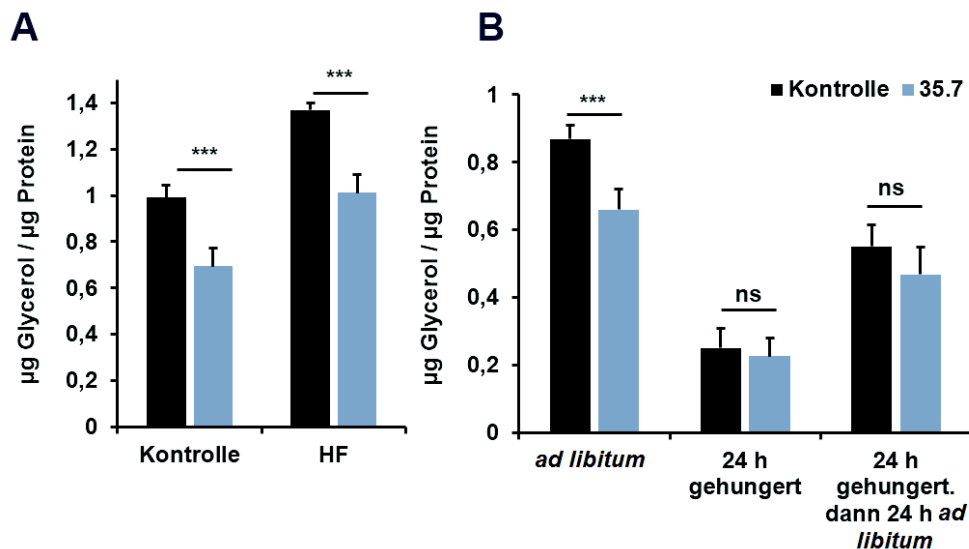


Abbildung 35: Perturbation der Energieverfügbarkeit und anschließende Messung der TAG-Spiegel in 7 Tage alten Männchen. A: Fliegen wurden nach dem Schlüpfen für sieben Tage auf Futter mit einem hohen Fettanteil (HF) gesetzt. Sowohl die Kontroll- als auch die CG9186 mutanten Tiere reagieren mit einem Anstieg der gesamtorganismischen Lipidspeicher. Auch unter HF Futter zeigen die Mutanten eine signifikant niedrigere TAG Menge als die Kontrolle. B: Vor der TAG Messung von sieben Tage alten Männchen wurden die Tiere entweder *ad libitum* gefüttert, für 24 Stunden gehungert oder für 24 Stunden gehungert und anschließend wieder *ad libitum* gefüttert. Das Hungern führt sowohl in Mutante als auch in der Kontrolle zu einer drastisch verringerten Lipidspeichermenge. Nach der Hungerphase ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen feststellbar. Das Umsetzen auf Standardmedium führt zu einem erneuten Anstieg der TAG-Mengen. Die Mutante zeigt zu diesem Zeitpunkt wieder eine etwas geringere Lipidspeichermenge als die Kontrolle. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,001$ (***)

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, hat der Verlust von CG9186 eine Verminderung der Lipidspeichermenge zur Folge. Andere Metabolite wie Glukose und Glykogen sowie die Futteraufnahme der Tiere sind nicht betroffen. Außerdem besitzen die Tiere trotz des Verlustes von CG9186 die Fähigkeit, sich mit ihren Energiespeichern flexibel an veränderte Energieverfügbarkeit anzupassen. Im Folgenden wurde daher der Frage nachgegangen, welchen Effekt die veränderte Lipidhomöostase und das Fehlen von CG9186 auf die Physiologie der Tiere hat.

3.4.2.2 Der Verlust von CG9186 verkürzt die Lebensspanne von Männchen

Der Zusammenhang zwischen Lipid-Homöostase und der Lebensspanne von Organismen (Übersichtsartikel Kapahi *et al.*, 2016) ist nicht zuletzt wegen der epidemiologischen Bedeutung für den Menschen Gegenstand intensiver Forschung. Auch in *Drosophila* konnte ein Einfluss der Lipid-Homöostase auf Lebensspanne, Reproduktion und Stressresistenz der Tiere festgestellt werden. Wichtige Regulatoren befinden sich hier im Insulin/IGF- (*Insulin-like growth factors*) und dem TOR (*target of rapamycin*) Signalweg (zusammengefasst in Kannan und Fridell, 2013; Zheng *et al.*, 2016). So führt z.B. die

Fettkörper-spezifische Überexpression von *dilp6* (*Drosophila insulin-like peptide 6*) zu einem Anstieg der Fettkörper-TAGs und einer erhöhten Stressresistenz (z.B. gegenüber Hungerstress) sowie einer verlängerten Lebensspanne unter basalen Bedingungen. Auf der anderen Seite wurde in einer Vielzahl von Modellorganismen sowie im Menschen der lebensverlängernde Effekt einer Drosselung der Nahrungszufuhr (*dietary restriction* (engl.) genannt) gezeigt (zusammengefasst in Kapahi *et al.*, 2016). Es stellt sich nun die Frage, ob die durch den CG9186 Verlust bedingte Reduktion der Lipidspeicher ebenfalls ein Effekt auf die Lebensspanne besteht. Hierfür wurden Tiere nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von 30 Individuen in Futterröhrchen gehalten und alle zwei bis drei Tage umgesetzt und dabei tote Tiere ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden zwischen vier und fünf Röhrchen (120-150 Tiere) ausgezählt. Abbildung 36 (A und B) zeigt die Überlebenskurven für das Experiment.

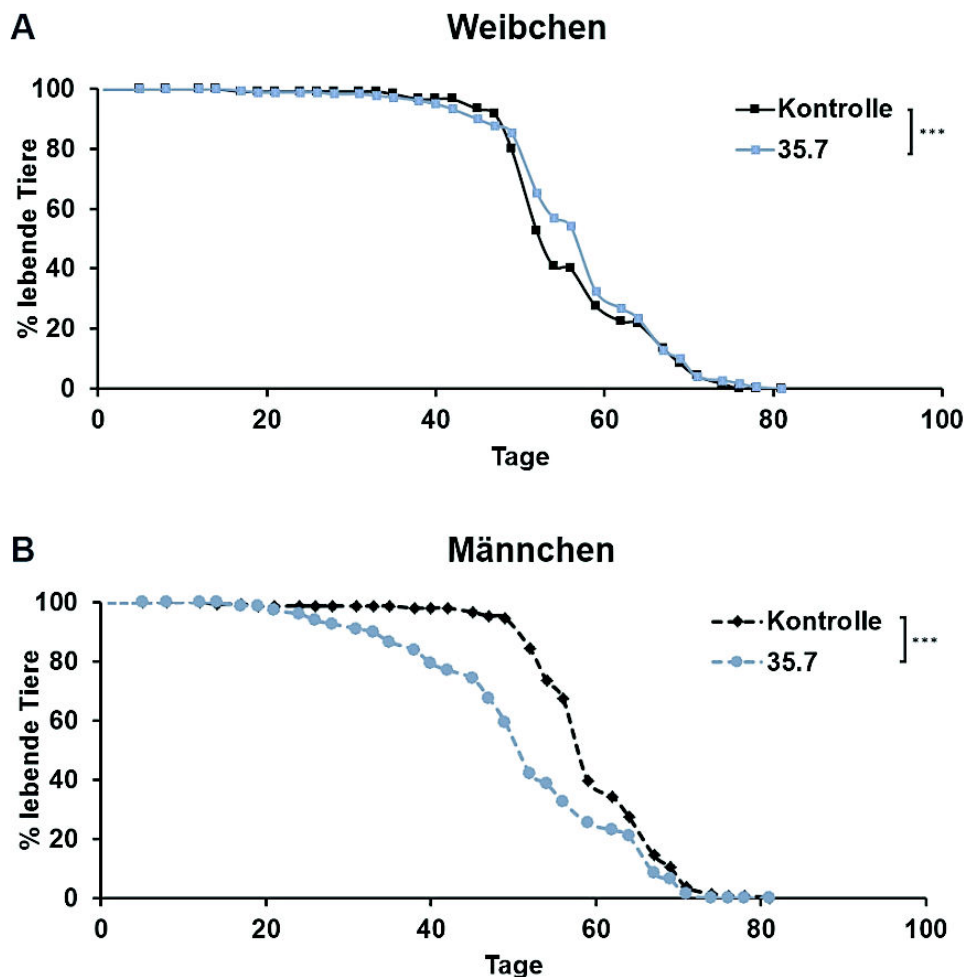


Abbildung 36: Lebensspanne unter basalen Bedingungen. Fliegen wurden nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von 30 Individuen in Futterröhrchen gehalten und alle zwei bis drei Tage umgesetzt. Dabei wurden tote Tiere ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden zwischen vier und fünf Röhrchen (120-150 Tiere) ausgezählt. Die Abbildung zeigt den Anteil der noch lebenden Tiere in Abhängigkeit von der Zeit. Bis zu einer Dauer von ca. 50 Tagen besteht bei den Überlebenskurven der Weibchen kein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante. Danach weist die Mutante eine höhere Überlebensrate auf als die Kontrolle. Bei den Männchen zeigt sich schon nach zwei Wochen eine signifikant erhöhte Sterblichkeit der mutanten Tiere. Gegen Ende der Lebensspanne nähern sich die Kurven allerdings wieder an. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***), Log-rank Test

Bis zu einer Dauer von ca. 50 Tagen zeigt sich bei den Überlebenskurven der Weibchen kein Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante. Danach weist die Mutante allerdings eine höhere Überlebensrate auf als die Kontrolle. Obwohl dieser Effekt mild ist, wurde er in allen drei biologischen Wiederholungen dieses Versuchs beobachtet. Bei den Männchen hingegen zeichnet sich schon nach zwei Wochen eine erhöhte Sterblichkeit der mutanten Tiere ab. Während in der Kontrollgruppe an Tag 40 noch 94 % der Tiere lebten, waren es bei der Mutante nur 76 %. Gegen Ende der Lebensspanne nähern sich die Kurven allerdings wieder an. Vergleicht man nur die ältesten 10 % der Männchen miteinander, so erreichten diese bei der Kontrolllinie im Schnitt ein Alter von 68 Tagen ($\pm 2,6$ Tage). Die ältesten 10 % der mutanten Männchen wurden im Schnitt 66 Tage ($\pm 5,1$ Tage). Die Daten legen also nahe, dass die höhere Sterblichkeit bereits sehr früh in den adulten Männchen auftritt. Ein Teil der mutanten Männchen hingegen erreicht ein normales Alter und scheint von diesem Effekt nicht betroffen zu sein.

Das humane Homolog von CG9186 (C2orf43) wurde bereits in einer Vielzahl genomischer Screens mit Prostatakrebs in Verbindung gebracht (Du *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2012; Penney *et al.*, 2015a; Shui *et al.*, 2014). Mit den akzessorischen Drüsen besitzen männliche *Drosophilae* ein Organ, das wie die menschliche Prostata an der Sekretion von Samenflüssigkeit beteiligt ist und auch als Modell für Studien zu Prostatakrebs verwendet wird (Übersichtsartikel Wilson *et al.*, 2017). Im Rahmen von Experimenten in der AG Beller (Masterarbeit Alisa Gahlen) konnte gezeigt werden, dass das CG9186 Protein in den akzessorischen Drüsen männlicher Fliegen exprimiert wird. Die Expression ist hierbei in sexuell aktiven Männchen stärker als in gleichaltrigen Jungfrauen (siehe Abbildung 37). Die Akzessorischen Drüsen in *Drosophila*. Es stellt sich die Frage, ob die frühe Sterblichkeit männlicher Mutanten von der sexuellen Aktivität der Tiere und deren akzessorischen Drüsen bestimmt ist. Daher wurden in einem Lebensspanne-Versuch Männchen wie im Vorversuch (2 Tage Kopulation vor Versuchseintritt) und jungfräuliche Tiere verwendet. Wie sich zeigte, hat die sexuelle Aktivität keinen Einfluss auf die CG9186 bedingte verkürzte Lebensspanne männlicher Mutanten (Abbildung 37 B). Auch mikroskopische Aufnahmen von Präparationen der Akzessorischen Drüsen früh verstorbener CG9186 Mutanten zeigten keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen (Abbildung 37 C). Es konnte also keine direkte Beteiligung der Akzessorischen Drüsen an der CG9186 bedingten Lebensspanne-Verkürzung nachgewiesen werden.

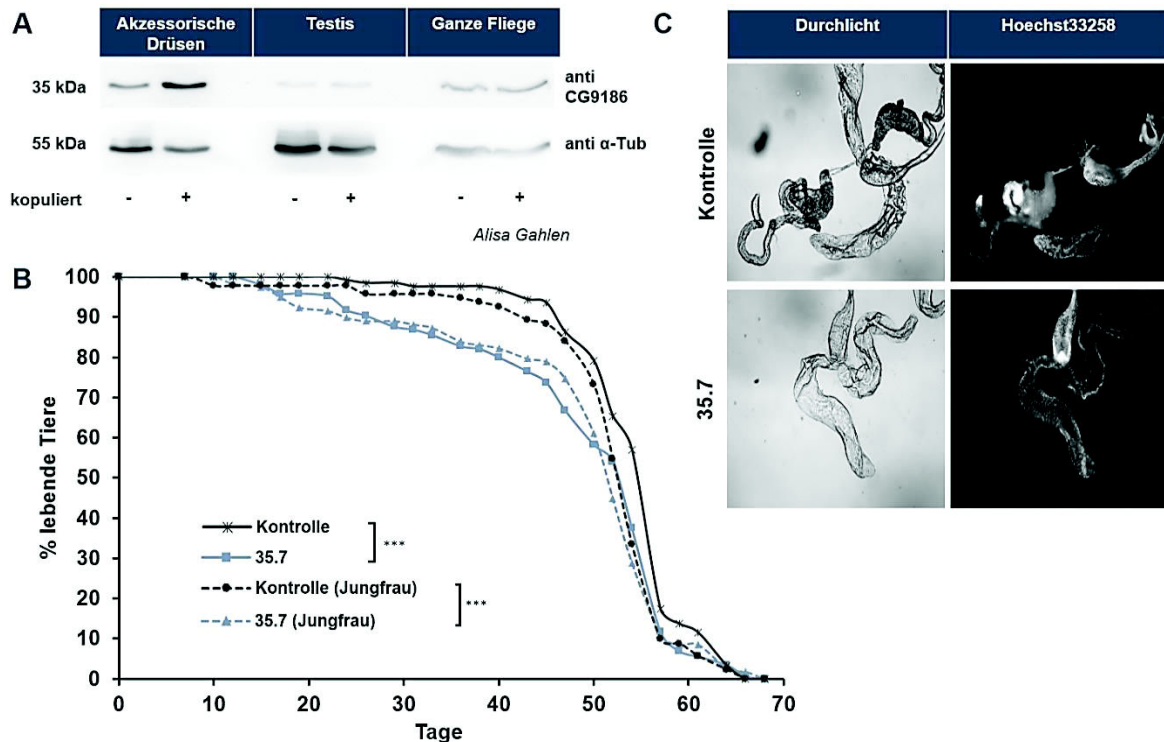


Abbildung 37: Untersuchung der Beteiligung von Akzessorischen Drüsen an der erhöhten Sterblichkeit junger CG9186 mutanter Männchen. A zeigt einen Western Blot mit Protein aus Akzessorischen Drüsen, Testis und ganzen Fliegen. Das CG9186 Protein ist in den Akzessorischen Drüsen nachweisbar. Die Expression ist in sexuell aktiven Tieren höher als in gleichaltrigen Jungfrauen. B zeigt Überlebenskurven für jungfräuliche sowie nicht jungfräuliche Männchen der Kontrolllinie und dem Allel 35.7. Auch bei jungfräulichen Tieren zeigt sich eine früh einsetzende Sterblichkeit. In C sind mikroskopische Aufnahmen von Akzessorischen Drüsen von Tieren aus Lebensspanne-Versuchen dargestellt. Präpariert wurden die Drüsen aus solchen mutanten Tieren, die bereits sehr früh (<30 Tage) verstarben. Als Kontrolle wurde eine gleichaltrige lebende Kontrollfliege präpariert. In den Präparaten zeigten sich keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***), Log-rank Test

3.4.2.3 Der Verlust von CG9186 beeinflusst die Stressresistenz der Tiere

Wie unter 3.4.2.2 gezeigt wurde, besitzen CG9186 mutante Männchen unter basalen Bedingungen (Standardmedium 1, *ad libitum*, 25 °C) eine verringerte Lebensspanne. Wie aber reagieren die Tiere unter akutem Stress? Gibt es auch hier geschlechtsspezifische Effekte? In der Literatur wurde beschrieben, dass erhöhte Energiespeicher in Form von Lipiden und Kohlenhydraten auch mit einer höheren Resistenz gegenüber Hungerstress einhergehen (Slack *et al.*, 2010). Im Folgenden wurde daher der Frage nachgegangen, ob auch die CG9186 Mutante mit ihren geringeren Lipidspeichern eine erhöhte Sensitivität gegenüber Stress aufweist. Hierfür wurden sieben Tage alte Tiere ohne Nahrung in Gruppen von 30 Individuen in ein Röhrchen mit einer Flüssigkeitsquelle (0,5 % Agarose in Wasser) gegeben und tote Tiere alle vier bis zwölf Stunden ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden fünf Röhrchen (150 Fliegen total) ausgezählt. Abbildung 38 zeigt die Überlebenskurven, also den Anteil lebender Fliegen in Abhängigkeit der Hungerdauer.

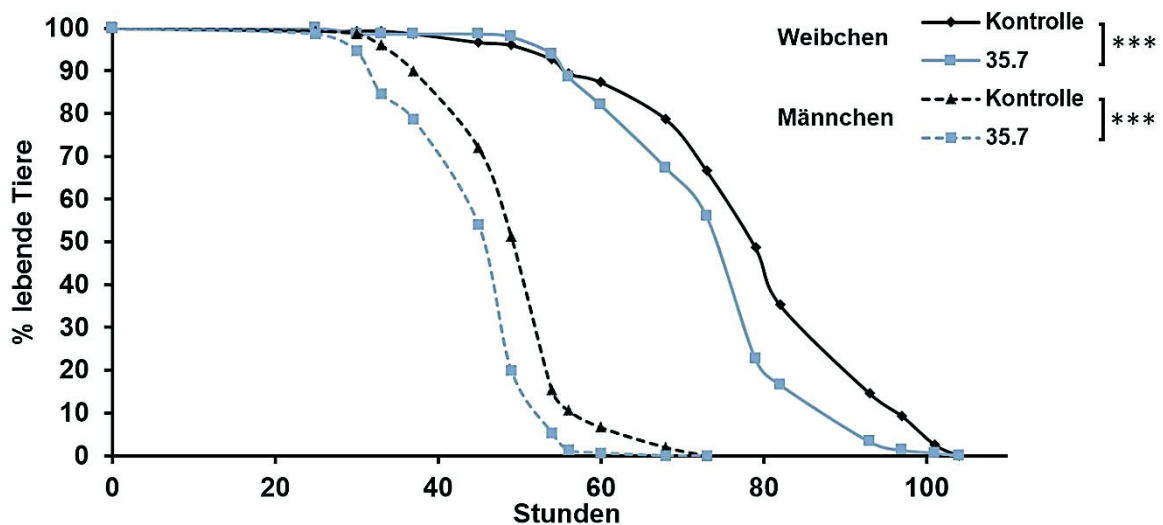


Abbildung 38: Überlebensdauer unter Hungerstress. Sieben Tage alte Tiere wurden in Gruppen von 30 Individuen in ein Röhrchen mit 0,5 % Agarose (in Wasser) gegeben und alle vier bis zwölf Stunden tote Tiere ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden fünf Röhrchen (150 Fliegen total) ausgewertet. Das Diagramm zeigt den Anteil lebendiger Fliegen in Abhängigkeit von der Hungerdauer. Sowohl für die mutanten Weibchen als auch Männchen zeigt sich eine signifikante Linksverschiebung der Überlebenskurven. Für Allel 35.1 siehe Abbildung 59 im Anhang. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***), Log-rank Test

Wie bereits in der Literatur beschrieben, überleben Weibchen deutlich länger unter Nahrungsmangel als Männchen (Rion und Kawecki, 2007; Slack *et al.*, 2010). Sowohl CG9186-mutante Weibchen als auch Männchen zeigen eine statistisch signifikante Linksverschiebung der Überlebenskurven. So waren z.B. nach 42 Stunden noch ca. 51 % der männlichen Kontrolltiere und lediglich 20 % der mutanten Männchen lebendig. Die CG9186 mutanten Tiere sind also sensibler gegenüber Hungerstress.

Das Fehlen von CG9186 führt also zu verringerten Lipidspeichern und einer höheren Sensitivität gegenüber Hungerstress. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob der geringe Körperfett-Anteil der Mutanten auch die Sensitivität gegenüber anderen Stressoren erhöht. Ein stark beforschtes Gebiet ist die Verbindung zwischen Fettstoffwechsel und oxidativem Stress im Menschen (McMurray *et al.*, 2016; Verdile *et al.*, 2015) sowie in verschiedenen Modellorganismen (Della Vedova *et al.*, 2016; Trindade de Paula *et al.*, 2016). Konsens ist hier ein Modell, in welchem Übergewicht und übermäßige Lipidspeicher eine Ursache für oxidativen Stress darstellen. Wie allerdings von Bailey *et al.* (2015) in *Drosophila* gezeigt, können LDs den Organismus aber auch vor oxidativem Stress und Lipidperoxidation schützen. Um zu überprüfen, ob die CG9186-Mutante mit ihren verringerten Lipidspeichern eine veränderte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress hat, wurden die Tiere mit Paraquat (Methylviologen) behandelt. Hierbei

handelt es sich um eine initial als Herbizid genutzte Substanz, die aufgrund ihrer starken prooxidativen Eigenschaften toxisch wirkt (Stokes und Walker, 1970) und standardmäßig in verschiedensten Modellorganismen zur Induktion von oxidativem Stress genutzt wird (z.B. *Drosophila* und *C. elegans* (Atashpour *et al.*, 2017) oder Ratte (Lashmanova *et al.*, 2015)). Für das Experiment wurden 30 Tiere (sieben Tage alt) zusammen mit einem Stück Filterpapier in ein leeres Futterröhrchen gegeben. Das Filterpapier wurde zuvor mit 20 mM Paraquat (mit 5 % Saccharose in Wasser) beträufelt. Das Überleben der Tiere wurde überwacht und tote Fliegen alle vier bis zwölf Stunden ausgezählt. Pro Genotyp und Geschlecht wurden jeweils fünf Röhrchen (also 150 Tiere) ausgezählt. Um sicherzustellen, ob die Tiere in Folge des Paraquats sterben und nicht wegen des Versuchsaufbaus, wurde ein weiteres Röhrchen mit Kontrollfliegen beobachtet, bei dem das Filterpapier mit 5 % Saccharose in Wasser (ohne Paraquat) beträufelt wurde. Abbildung 39 (A und B) zeigt Überlebenskurven für das Experiment.

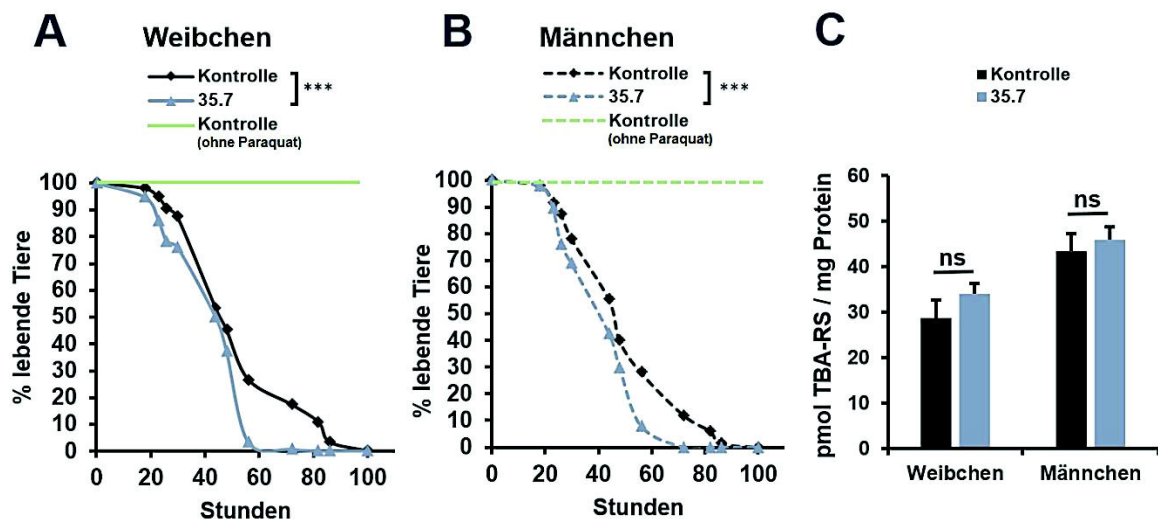


Abbildung 39: Sensitivität gegenüber oxidativem Stress. 30 Tiere (sieben Tage alt) wurden mit 20 mM Paraquat (mit 5 % Saccharose in Wasser) inkubiert und das Überleben der Tiere überwacht. Pro Genotyp und Geschlecht wurden jeweils fünf Röhrchen (150 Tiere) ausgezählt. Paraquat führt schon nach 20 Stunden zu einem Abfall der Überlebenskurven. Hierbei zeigen sich die mutanten Tiere sensibler als die Kontrolle. Die Messung von Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBA-RS) als Indikator für oxidativen Stress zeigt unter basalen Bedingungen keinen Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle. Für Allel 35.1 siehe Abbildung 60 im Anhang. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,001$ (***), Log-rank Test (A und B)

Paraquat führt in der verwendeten Konzentration schon nach 20 Stunden zu einem vermehrten Sterben der Fliegen (Abbildung 39 A und B). Hierbei zeigen sich die mutanten Tiere sensibler als die Kontrolle. Von den Fliegen im Kontrollröhrchen (lediglich 5 % Saccharose ohne Paraquat) ist während der gesamten Versuchsdauer keine gestorben.

Im Hinblick auf die höhere Sterberate unter oxidativem Stress wurde anschließend bei sieben Tage alten Tieren unter Basalbedingungen (25 °C, *ad libitum* Standardmedium 1) die Menge an Thiobarbitursäure Reaktiven Substanzen (TBA-RS, *thiobarbituric acid reactive substances*) gemessen. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der indirekt die Reaktionsprodukte von Lipidperoxidation gemessen werden (Übersichtsartikel Halliwell und Chirico, 1993). Die Menge an TBA-RS gibt damit Hinweise darauf, ob der Organismus in der Vergangenheit vermehrtem oxidativem Stress ausgesetzt war. Obwohl die mutanten Tiere unter Paraquat-Behandlung eine im Vergleich zu den Kontrolltieren kürzere Lebensspanne zeigen, wurden unter basalen Bedingungen keine erhöhten TBA-RS Werte im Vergleich zur Kontrolle gemessen (Abbildung 39 C).

Die bisherigen Versuche zeigen, dass CG9186 mutante Tiere sensitiver gegenüber Hunger- und oxidativem Stress sind. Wie in der Literatur beschrieben ist, nehmen Lipidspeicher und verschiedene Kohlenhydrate auch Einfluss auf die Resistenz der Tiere gegenüber Trockenstress (Djawdan *et al.*, 1998; Gefen *et al.*, 2006). Um die Rolle von CG9186 im Hinblick Trockenstress zu untersuchen, wurden 30 Tiere (sieben Tage alt) ohne Wasser- oder Nahrungsquelle in ein leeres Röhrchen gegeben und die toten Fliegen alle vier bis zwölf Stunden ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden vier Röhrchen (insgesamt 120 Tiere) ausgewertet. Abbildung 40 zeigt Überlebenskurven für das Experiment.

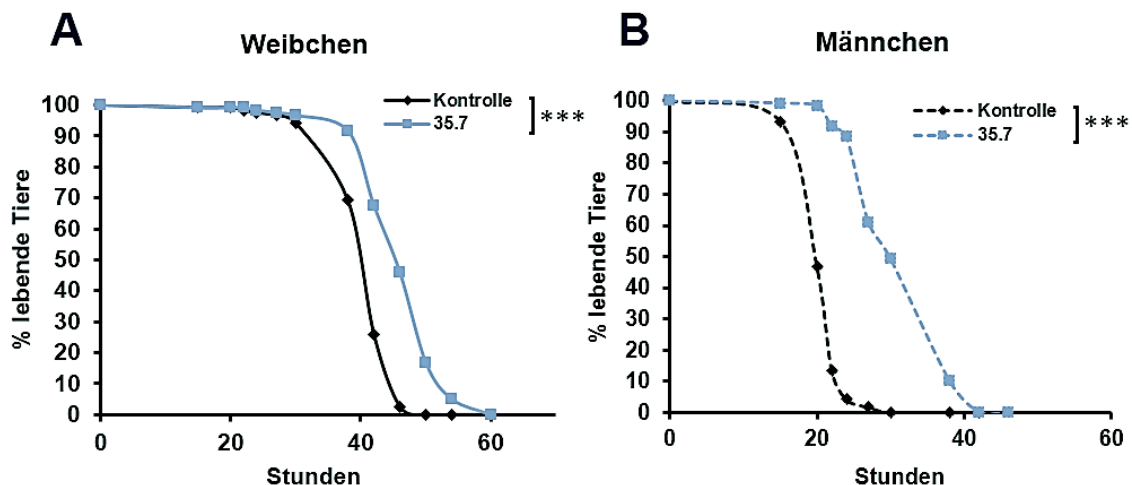


Abbildung 40: Sensitivität der Mutante gegenüber Trockenstress. 30 Tiere wurden ohne Futter- und Wasserquelle in ein Röhrchen gegeben und tote Tiere alle vier bis zwölf Stunden ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden vier Röhrchen ausgezählt (120 Tiere). Bei den CG9186 mutanten Weibchen und Männchen zeigt sich eine höhere Resistenz gegenüber Trockenstress und dadurch eine statistisch signifikante Rechtsverschiebung der Überlebenskurven. Für Allel 35.1 siehe Abbildung 61 im Anhang. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***), Log-rank Test

Im Gegensatz zu allen bisherigen Stresstoleranz-Experimenten überleben die mutanten Tiere unter Trockenstress länger als die Kontrolltiere. So befanden sich nach 30 Stunden in der Kontrolle keine lebenden männlichen Tiere mehr in den Röhrchen, bei den CG9186-Mutanten hingegen durchschnittlich noch 49 %. Auch die weiblichen Mutanten zeigten sich toleranter gegenüber Trockenstress.

Am Beispiel der Toleranz gegenüber Trockenstress zeigt sich, dass die CG9186 mutanten Tiere nicht generell im Nachteil gegenüber der Kontrolllinie sind. In der Literatur werden zwei wichtige Faktoren genannt, die die Resistenz gegenüber Trockenstress beeinflussen. Dies sind zum einen die Hydrocarbon-Verbindungen auf der Cuticula der Tiere (Rouault *et al.*, 2004) und zum anderen der TOR (*target of rapamycin*)- und Insulinsignalweg sowie deren Einfluss auf Wasserhaushalt und Trehalosegehalt der Hämolymphe (Liu *et al.*, 2015; Marunde *et al.*, 2013; Thorat *et al.*, 2012). Im Zusammenhang mit dem Insulin-Signalweg wurde außerdem ein geschlechtsspezifischer Effekt auf die Lebensspanne männlicher Tiere beobachtet (Liu *et al.*, 2016). Daher wurde neben dem Wasserhaushalt und der Trehalose- und Glukose-Konzentration der Hämolymphe auch die Expression verschiedener *dilps* (*Drosophila insulin like peptides*) mittels qRT-PCR gemessen. Abbildung 41 (A) zeigt den Wassergehalt CG9186 mutanter Tiere im Vergleich zur Kontrolle. Hierfür wurde das Gewicht der Fliegen (sieben Tage alt) gemessen, diese dann für mindestens 24 h bei 60 °C getrocknet und anschließend erneut gewogen. Aus der Gewichts Differenz errechnet sich der Wasseranteil in Prozent. Gewogen wurden pro Geschlecht und Genotyp jeweils dreimal 30 Tiere. Wie die Abbildung zeigt, besteht im Wasseranteil der Tiere kein Unterschied zwischen Kontrolle (Männchen ca. 66 % ($\pm 0,01$ %)) und Mutante (Männchen z.B. ca. 65 % ($\pm 0,67$ %)). Abbildung 41 (B und C) zeigt Messungen der Trehalose- und Glukosekonzentrationen der Hämolymphe sieben Tage alter Fliegen. Im Hinblick auf die Trehalosekonzentration der Hämolymphe konnte kein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante nachgewiesen werden. Die Glukosekonzentration der Hämolymphe mutanter Männchen war hingegen deutlich erhöht. Wie in Kapitel 3.4.2.1 dargelegt, besitzen sowohl mutante Männchen als auch Weibchen keine signifikant veränderten gesamtorganismischen Trehalosekonzentrationen. Abbildung 41 (D und E) zeigt die Ergebnisse von qRT-PCRs unter Verwendung von RNA aus Köpfen (IPCs sind im Gehirn lokalisiert) sieben Tage alter Fliegen. Gemessen wurde die Expression von verschiedenen *dilps* sowie von *act5* als Negativkontrolle. Die Expression wurde auf *rp49* (Ribosomales Protein 49) normalisiert. Die Expression der Kontrolllinie wurde als 1 definiert. Insgesamt wurden zwei biologische Wiederholungen des Versuchs durchgeführt. In beiden Wiederholungen war *dilp3* sowohl in den Männchen als auch in den Weibchen herunterreguliert.

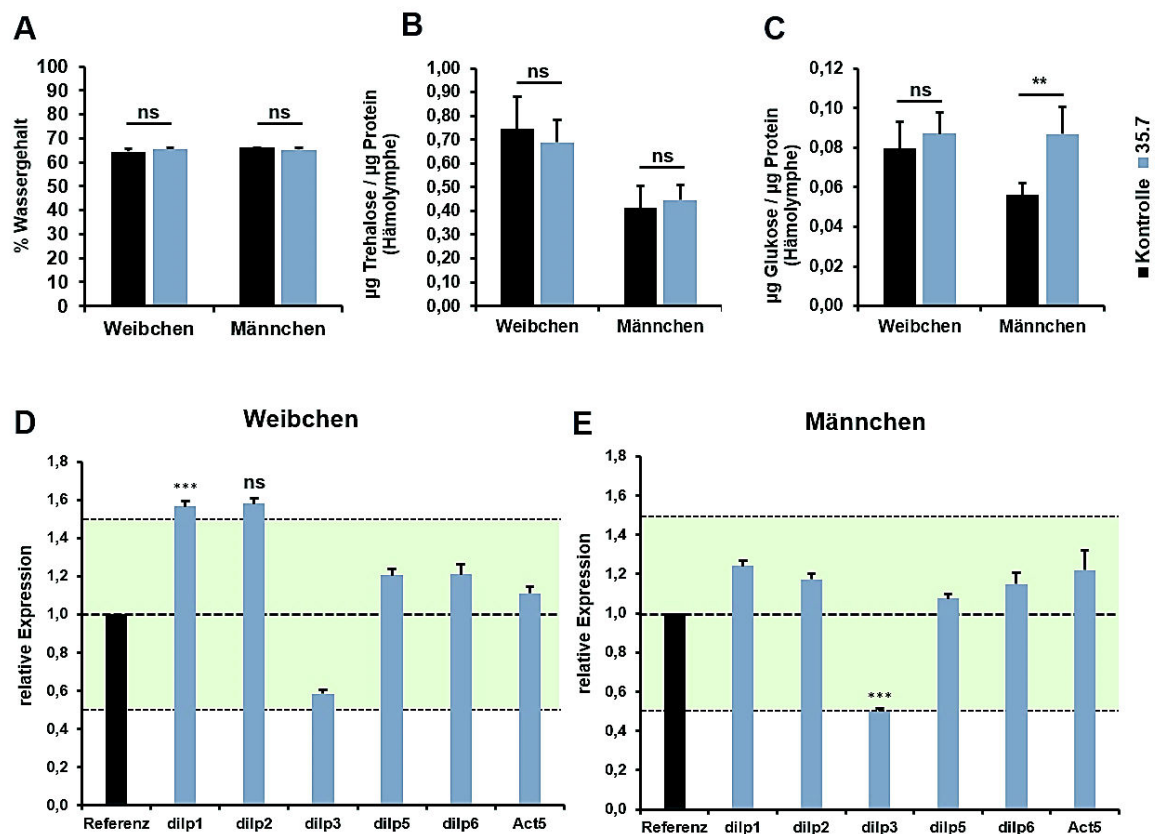


Abbildung 41: Untersuchungen zur Trockenstress-Resistenz und dilp-Expression der CG9186 Mutanten. Gezeigt sind Messungen von Wassergehalt ganzer Tiere (A) sowie Trehalose- und Glukosekonzentrationen in der Hämolymphe (B und C) sieben Tage alter Fliegen. Beim Körperwassergehalt und der Trehalosekonzentration in der Hämolymphe besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante. Die Männchen weisen allerdings erhöhte Glukosewerte in der Hämolymphe auf. (D) und (E) zeigt die Ergebnisse aus qRT-PCRs unter Verwendung von RNA aus Köpfen sieben Tage alter Fliegen. Gemessen wurde die Expression von dilps (*Drosophila insulin like peptides*) sowie von Act5 als Negativkontrolle. Die Expression wurde auf *rp49* und die Kontrolltiere normalisiert (Kontrolle= 1). Es wurden zwei biologische Wiederholungen durchgeführt. Die *dilp3* Expression war in beiden Wiederholungen im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Unter D und E sind die Signifikanzen für alle Gene gezeigt, deren Expression in den Mutanten um mindestens 50 % erhöht oder reduziert war.

Wie bereits einleitend beschrieben, basieren die bislang veröffentlichten *in vivo* Daten zu CG9186 ausschließlich auf Experimenten unter Verwendung des GAL4-UAS Systems (Thiel *et al.*, 2013). Am Beispiel des Trockenstress Phänotyps wurde im Folgenden untersucht, ob eine Überexpression von CG9186 zu einem komplementären Phänotyp führt. Hierfür wurde ein eGFP-CG9186 Fusionsprotein ubiquitär mit einer Actin-GAL4 Linie überexprimiert. Um eine mögliche Rolle der katalytischen Triade zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Variante von CG9186 überexprimiert, bei der das Serin an Position 119 gegen ein Alanin ausgetauscht ist. Als Kontrolle dient eine Kreuzung zwischen der Treiberlinie und w1118 Fliegen. Analog zu den Versuchen mit den Nullallelen wurden 30 Tiere in ein leeres Röhrchen gegeben und alle vier bis zwölf Stunden tote Tiere ausgezählt. Je nach Geschlecht und Genotyp wurden gingen drei bis vier Röhrchen (90-

120 Tiere) in das Experiment ein. Die Überlebenskurven in Abbildung 42 zeigen, dass die eGFP-CG9186 überexprimierenden Tiere sensitiver gegen Trockenstress sind als die Kontrolle. Dieser Phänotyp entspricht damit genau dem Gegenteil des Phänotyps der Nullallele. Wird hingegen die S119A Austauschvariante von CG9186 überexprimiert, schwächt sich der Effekt ab. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben wurde, handelt es sich hierbei um eine Variante von CG9186, bei der das zentrale Serin als Teil der katalytischen gegen Alanin ausgetauscht wurde, um die annotierte Funktion als Serin-Hydrolase zu unterbinden.

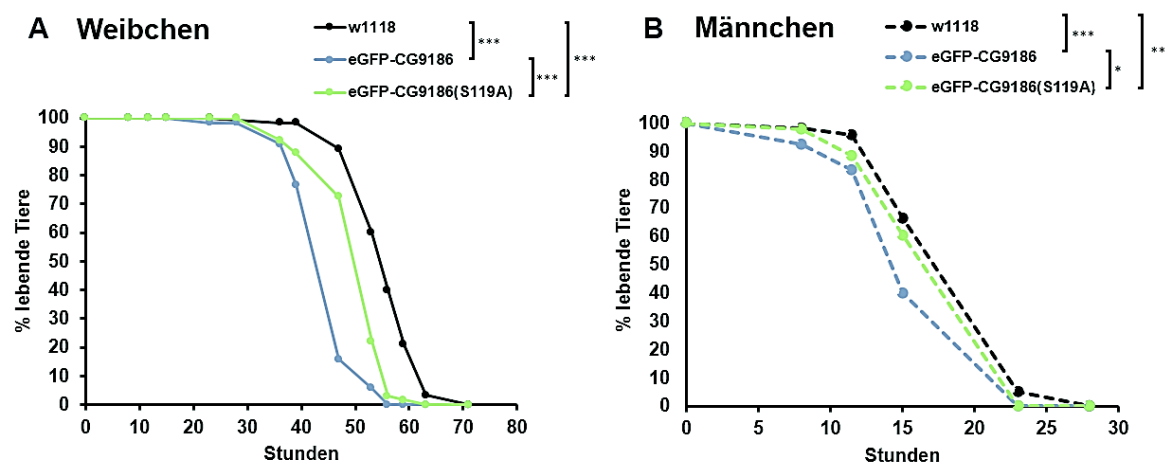


Abbildung 42: Trockenstress-Resistenz nach Überexpression von eGFP-CG9186 und eGFP-CG9186(S119A). Mit einer Actin-GAL4 Treiberlinie wurden eGFP-CG9186 und eGFP-CG9186(S119A) zur Expression gebracht. 30 sieben Tage alte Tiere wurden in ein leeres Röhrchen gegeben und alle vier bis zwölf Stunden die toten Tiere ausgezählt. Je nach Geschlecht und Genotyp gingen drei bis vier Röhrchen (90-120 Tiere) in das Experiment ein. eGFP-CG9186 überexprimierende Tiere zeigen sich sensitiver gegen Trockenstress als die Kontrolle (GAL4 Linie mit w1118 gekreuzt). Die Überexpression der S119A Austauschvariante hat einen milderen Effekt auf die Sensitivität gegenüber Trockenstress. Signifikanzniveaus: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), Log-rank Test.

In diesem Kapitel wurde in adulten Tieren gezeigt, dass ein Verlust von CG9186 zu einer verkürzten Lebensspanne in männlichen Tieren führt. Außerdem weisen sowohl männliche als auch weibliche Fliegen verringerte Lipidspeicher und eine höhere Sensitivität gegenüber Hunger- und oxidativem Stress auf. Gegen Trockenstress sind CG9186 mutante Fliegen hingegen geschützt. Die beschriebenen Phänotypen werden in der Literatur häufig im Zusammenhang mit dem Insulin-Signalweg beobachtet (Enell *et al.*, 2010; Hwangbo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015; *et al.*, 2010). Im Rahmen dieses Kapitels wurde gezeigt, dass *dilp3* in den mutanten Tieren herunterreguliert ist. Für *dilp3* wurde in der Literatur eine Beteiligung am Lipidmetabolismus beschrieben (Varghese *et al.*, 2010). Außerdem beeinflusst es die larvale Zuckerhomöostase und Entwicklung (Kim und Neufeld, 2015). Da sowohl die Energiehomöostase als auch endokrine Signale wie die *dilps* die larvale Entwicklung beeinflussen, wurde im Folgenden der Fokus auf die larvale Entwicklung der CG9186-Mutanten gelegt.

3.4.3 CG9186 und die Larvale Entwicklung

3.4.3.1 CG9186 beeinflusst larvale Speicheldrüsen-Lipid Droplets

Im Rahmen von RNAi Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein *knock down* von CG9186 zu einer starken Reduktion von LDs in den Speicheldrüsen von L3 Larven führt (Thiel *et al.*, 2013). Um einen möglichen Einfluss eines kompletten Verlustes von CG9186 auf die larvalen LDs zu untersuchen, wurden zunächst Speicheldrüsen und Fettkörper aus wandernden L3 Larven präpariert und die LDs mit Bodipy^{493/503} gefärbt. Abbildung 43 A zeigt MIPs mutanter Organe im Vergleich zur Kontrolllinie.

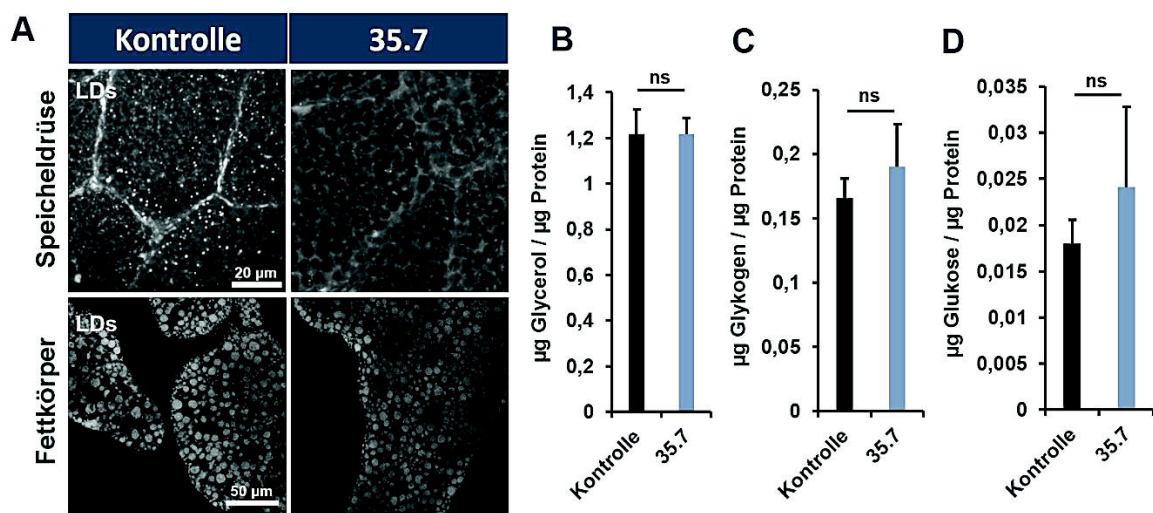


Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahmen von LDs aus Speicheldrüsen und Fettkörpern sowie gesamtorganismische TAG-, Glykogen- und Glukosewerte. A: Speicheldrüsen und Fettkörper aus 5 Tage alten wandernden L3 Larven wurden fixiert und die LDs mit Bodipy^{493/503} gefärbt. Das Allel 35.7 weist eine im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Anzahl an LDs in den Speicheldrüsen auf. Bei der Morphologie der LDs im Fettkörper ist kein offensichtlicher Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante erkennbar. Bei der Messung der gesamtorganismischen TAG-, Glykogen- und Glukosewerte (B-D) gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Mutante. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant

Es ist zu erkennen, dass die Speicheldrüsen des 35.7 Allels im Vergleich zur Kontrolle eine verringerte Anzahl an LDs aufweist. Betrachtet man jedoch die LDs im Fettkörper, dem Hauptspeicherorgan für Lipide, so lässt sich kein Unterschied zur Kontrolle entdecken. Um die Nährstoffversorgung der Tiere zu beurteilen, wurden neben den Speicherlipiden in Form von TAG auch Kohlenhydrate wie Glykogen und Glukose mithilfe enzymgekoppelter Farbgebender Reaktionen gemessen. Wie die Daten in Abbildung 43 B-D zeigen, besteht bei gesamtorganismischer Betrachtung dieser Metabolite kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante. Dennoch stellt sich die Frage,

ob es durch den Verlust von CG9186 zu einer Beeinträchtigung der larvalen Entwicklung kommt.

3.4.3.2 CG9186 beeinflusst futterabhängig die larvale Entwicklung

Um zu überprüfen, ob durch das Fehlen von CG9186 die larvale Entwicklung beeinträchtigt ist, wurde die Zeit zwischen Eiablage und dem Auftreten von Puppen gemessen. Hierfür wurden ca. 50-60 adulte Fliegen (sieben Tage alt) über Nacht auf Futter gesetzt. Am nächsten Tag wurden die Tiere erneut umgesetzt und die adulten Tiere nach ca. 16 Stunden verworfen. Diese Röhrchen wurden bei 25 °C inkubiert und mehrfach täglich die Anzahl an Puppen gezählt. Wie bei Post und Tatar (2016) beschrieben, hat die Futterzusammensetzung einen starken Einfluss auf den Insulin-Signalweg. Dies gilt besonders im Hinblick auf das Zucker-zu-Hefe Verhältnis des Futters (Post und Tatar, 2016). Da adulte CG9186 mutante Tiere eine verminderte *dilp3* Expression aufweisen, wurde das Entwicklungsexperiment daher auf vier Futtersorten durchgeführt. Neben den zwei verwendeten Standardmedien 1 und 2 wurde auf Basis des Rezeptes von Standardmedium 2 auch ein Futter gekocht, dass 90 % weniger Hefe enthält (WH, wenig Hefe).

Zusätzlich wurde wie in Na *et al.* (2013) beschrieben ein Futter gekocht, dass sehr reich an Hefe, dafür aber arm an Zucker ist (WZ, wenig Zucker). Pro Genotyp und Futtersorte wurden drei Röhrchen ausgezählt. Das Zucker-zu-Hefe Verhältnis der eingesetzten Medien ist in Tabelle 15 aufgeführt. Abbildung 44 zeigt anhand von Wachstumskurven den Anteil verpuppter Tiere in Abhängigkeit von der Zeit (A-D). Wie die Wachstumskurven erkennen lassen, entwickeln sich die mutanten Tiere auf Standardmedium 1 langsamer als die Kontrolltiere (A). Auf Standardmedium 2 hingegen ist ein gegenteiliger Trend erkennbar (B). Größere Unterschiede in der Menge an Hefe und Zucker verstärken den Effekt. So besitzen die mutanten Tiere auf dem WZ Medium eine reduzierte Entwicklungsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Auf dem WH Medium hingegen entwickeln sich die mutanten Tiere schneller. Das Fehlen von CG9186 führt also in Abhängigkeit vom Futter zu Veränderungen im Wachstum. Insgesamt wird die Entwicklungsgeschwindigkeit der mutanten Tiere weniger von der Futterzusammensetzung beeinflusst als die Kontrolltiere. Betrachtet man den Zeitpunkt, an dem 50 % der Tiere im Röhrchen verpuppt waren, so variiert dieser Zeitpunkt bei den Kontrolltieren zwischen ca. 130 Stunden (WZ Futter) und 250 Stunden (WH Futter). Bei den CG9186 mutanten Tieren hingegen liegen die Werte mit ca. 160-190 Stunden näher beieinander.

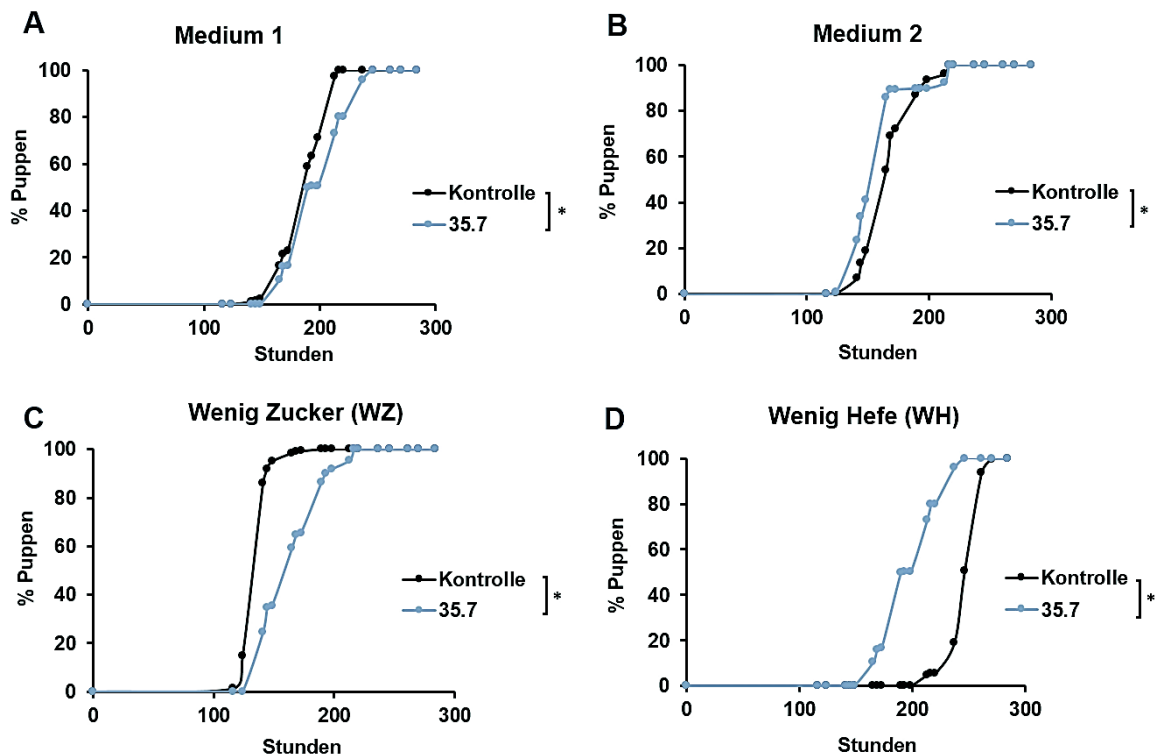


Abbildung 44: Dauer bis zur Verpuppung auf Medien unterschiedlicher Zucker-zu-Hefe Verhältnisse. 50-60 adulte Fliegen (sieben Tage alt) wurden für ca. 16 Stunden auf verschiedenen Futter (A-D) gehalten und das Auftreten von Puppen gezählt (Inkubation bei 25 °C). Die mutanten Tiere entwickeln sich auf dem Standardmedium 1 langsamer als die Kontrolltiere (A). Auf Standardmedium 2 ist ein gegenteiliger Trend erkennbar (B). Während die mutanten Tiere auf dem WZ Medium eine reduzierte Entwicklungsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle besitzen, verpuppen sie sich auf dem WH Medium hingegen früher als die Kontrolle. Signifikanzniveaus: $p < 0,05$ (*), Permutationstest mit 10000 Iterationen, Benjamini-Hochberg Korrektur

Tabelle 15: Zucker zu Hefe Gewichtsverhältnis sowie Anteil Hefe. Für die Einwaagen und eine Nährstofftabelle siehe Kapitel 2.1.7 sowie Tabelle 18 im Anhang. Die Medien sind in Reihenfolge des steigenden Zucker-zu-Hefe Verhältnisses aufgeführt. Die Informationen zu den einzelnen Nährstoffen wurden den Verpackungen entnommen.

Medium	Zucker-zu-Hefe Verhältnis (g/g)	% Hefe
Wenig Zucker (WZ)	0,64*	8
Standardmedium 1	2,87	1,68
Standardmedium 2	2,90	1,8
Wenig Hefe (WH)	28,99	0,18

*Das Zucker-zu-Hefe Verhältnis des WZ Mediums (beschrieben in Na *et al.*, 2013) ist lediglich eine Annäherung, da der genaue Zuckergehalt von Bacto™ Pepton und Bacto™ Yeast Extract nicht bekannt war.

In Abbildung 44 wird als Endpunkt das Auftreten von Puppen betrachtet. Im Folgenden wurde überprüft, ob auch während früherer Zeitpunkte in der larvalen Entwicklung Unterschiede zwischen Mutante und Kontrolltieren bestehen. Hierfür wurden 50-60 adulte Tiere zur Eiablage über Nacht auf verschiedene Futter (Standardmedium 1, Standardmedium 2, WH, WZ) gesetzt. Nach genau fünf Tagen wurden Bilder von den Larven aufgenommen und deren Größe (in mm² Oberfläche) mit der Zeiss ZEN Blue

(2012) Software quantifiziert (siehe Abbildung 45). Da sich die Larven auf dem WH Futter langsamer entwickeln, wurden von diesen Tieren nach weiteren vier Tagen erneut Bilder aufgenommen. Die Tiere der anderen drei Futterkonditionen befanden sich zu diesem Zeitpunkt schon im Puppenstadium.

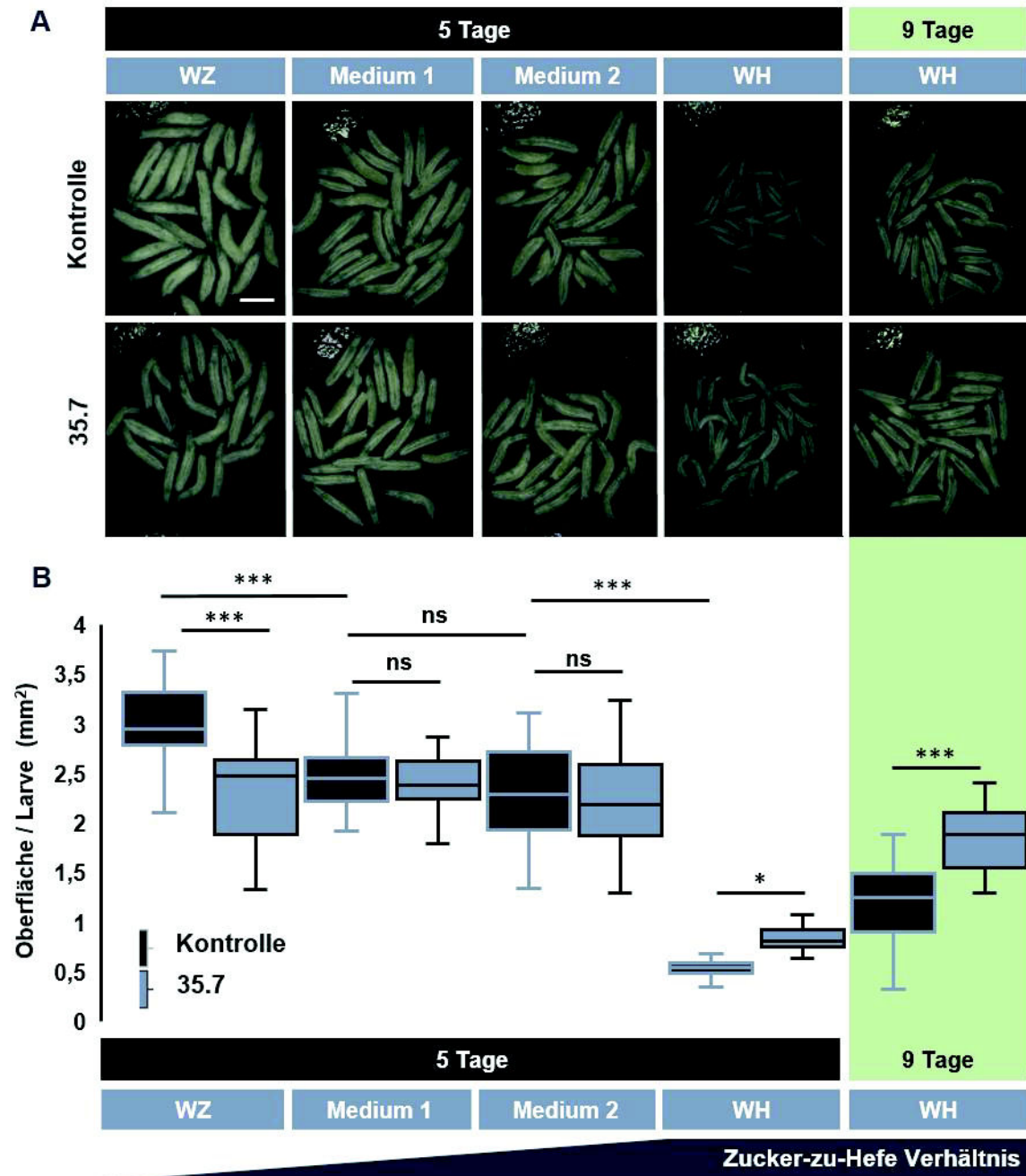


Abbildung 45: Larvale Entwicklung auf Medien mit unterschiedlichen Zucker-zu-Hefe Verhältnissen. 50-60 adulte Tiere über Nacht auf verschiedene Futter gesetzt. Nach genau fünf Tagen wurden Bilder von den Larven aufgenommen und deren Größe (in mm² Oberfläche) quantifiziert. Von den Larven auf dem WH Futter wurden nach weiteren vier Tagen erneut Bilder aufgenommen. A zeigt die Bilder und B die quantitative Auswertung der larvalen Größe. Die fünf Tage alten Larven der Kontrolllinie auf WZ Futter signifikant größer als die mutanten Tiere. Findet die Entwicklung auf WH Futter statt, sind die mutanten Tiere größer als die Kontrolle. Dieser Effekt ist nach neun Tagen hoch signifikant. Der Maßstabsbalken entspricht 2 mm. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, p < 0,05 (*), p < 0,001 (***), einfaktorielle ANOVA mit Tukey Post-hoc Test

Abbildung 45 zeigt die Bilder aus diesem Versuch (A) sowie die quantitative Auswertung der larvalen Größe (B). Die Bilder und Kastengrafiken wurden in aufsteigender Reihenfolge ihres Zucker-zu-Hefe Verhältnisses angeordnet. Schon in den Bildern spiegeln die im zeitlichen Entwicklungsexperiment gemachten Beobachtungen wider. So sind die 5 Tage alten Larven der Kontrolllinie auf WZ Futter signifikant größer als die mutanten Tiere. Findet die Entwicklung auf WH Futter statt, stellt sich die Situation genau gegensätzlich dar. Hier sind die mutanten Tiere größer als die Kontrolle. Dieser Unterschied wird nach insgesamt neun Tagen noch deutlicher. Insgesamt zeigt sich also, dass die CG9186 mutanten Tiere mit steigendem Zucker-zu-Hefe Gehalt einen Wachstumsvorteil genießen. Ihre Entwicklungsgeschwindigkeit reagiert auf das Fehlen von Hefe nicht so drastisch wie das der Kontrolllinie.

Es stellt sich nun die Frage, warum sich CG9186-mutante Larven auf Futter mit wenig Hefe schneller entwickeln, während das hefereiche WZ Futter die Entwicklung zu stören scheint. Betrachtet man die Makronährstoffe in den Standardmedien (1 und 2), so liefert die zugegebene Hefe ca. 31-32 % der finalen Protein- sowie 30 % der finalen Lipidmenge. Um zu verstehen, welcher der Hefe-Inhaltsstoffe für die Effekte verantwortlich ist, wurden Rettungs-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden dem WH Futter zur Kompensation der fehlenden Hefe entweder Bacto Pepton (BP), Bacto Yeast Extract (HE, Hefe Extrakt) oder delipidierte Hefe (DH) zugegeben. Während BP die fehlende Proteinmenge ausgleichen soll, dient HE und delipidierte Hefe dazu, die Bedeutung fettlöslicher Substanzen zu beurteilen. HE ist der wasserlösliche Teil autolyserter Hefe und liefert vor allem Proteine und B-Vitamine (<http://www.bd.com>). Die delipidierte Hefe wurde durch Extraktion mit Chloroform selbst hergestellt. Abbildung 63 B im Anhang zeigt TLCs mit Lipidextrakten aus Standardhefe, HE und der delipidierten Hefe. Die Trockenhefe zeigt eine Vielzahl unterschiedlicher Lipidklassen. Quantitativ sehr prominent ist hier TAG. Durch die Behandlung mit Chloroform lässt sich ein Großteil dieser Lipide drastisch reduzieren. Die delipidierte Hefe zeigt dennoch eine nahezu unveränderte Konzentration an Ergosterol und freien Fettsäuren. Im HE lassen sich mit TLC keine Lipide nachweisen. Wie Abbildung 46 zeigt, kommt es wie erwartet auf dem WH Medium zu einer Entwicklungsverzögerung. Die Larven sind deutlich kleiner als gleichaltrige Tiere auf Standardmedium. Hierbei fällt allerdings auf, dass dieser Effekt in den CG9186 mutanten Larven signifikant milder ausfällt. Wird dem WH Medium zur Kompensation delipidierte Hefe zugegeben, ist kein signifikanter Unterschied mehr zum Wachstum auf Standardmedium feststellbar. Wird die Menge an fehlendem Protein im WH Medium (durch weniger Hefe) jedoch durch BP ersetzt, ist keine Rettung feststellbar. Durch Supplementation mit HE kommt es zu einer partiellen Rettung. Allerdings sind auch hier die Larven von Allel 35.7 signifikant größer als die Kontroll-Tiere. Wie die Daten also

zeigen, lässt sich der Wachstumsvorteil der CG9186 mutanten Tiere unter Hefemangel nicht auf das fehlende Protein oder die TAG Menge zurückführen. Allerdings scheint die Hefekonzentration bzw. das Hefe zu Zucker Verhältnis eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der CG9186 Mutanten zu haben.

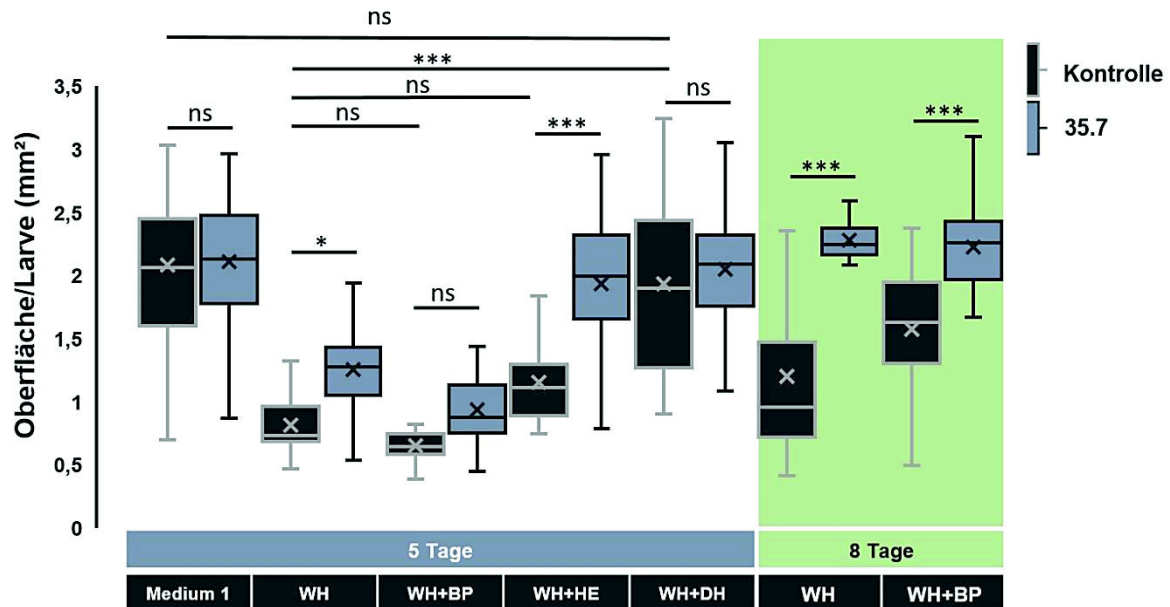


Abbildung 46: Rettungsexperiment für die larvale Entwicklung auf WH-Medium. 50-60 adulte Tiere wurden über Nacht auf verschiedene Futter gesetzt. Nach genau fünf Tagen wurden Bilder von den Larven aufgenommen und deren Größe (in mm² Oberfläche) quantifiziert. Von den Larven auf dem WH Futter wurden nach weiteren drei Tagen (auftreten erster nicht wandernder L3 Larven) erneut Bilder aufgenommen. Auf Standardmedium (Medium 1) besteht kein Größen-Unterschied zwischen Kontrolle und Allel 35.7. Mutante Larven auf WH Medium sind an Tag fünf und acht signifikant größer als Kontrolltiere. Wird dem WH Medium delipidierte Hefe zugegeben (WH+DH), kommt es zu einer kompletten Rettung der WH-bedingten Wachstums-Verzögerung. Die Zugabe von Protein in Form von Bacto Pepton (WH+BP) hat keinen Effekt. Bacto Yeast Extract führt zu einer partiellen Rettung (WH+HE). Allerdings besteht auch hier ein signifikanter Größenunterschied zwischen Kontrolle und Mutante. Die Aufnahmen zu diesem Experiment befinden sich in Abbildung 63 im Anhang. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), einfaktorielle ANOVA mit Tukey Post-hoc Test.

Im Hinblick auf die ausgeprägten Unterschiede bei der Entwicklung der Tiere auf unterschiedlichen Futtermedien sollte nun geklärt werden, ob es auch Effekte auf zentrale Metabolite gibt. Hierfür wurden der TAG-, Glukose- und Glykogengehalt von wandernden L3 Larven gemessen, die sich auf den unterschiedlichen Futtern entwickelt haben. Wie Abbildung 47 zeigt, führt die Entwicklung auf WH Medium (wie auch auf den supplementierten WH Medien) zu einem Anstieg der gesamtorganismischen TAG-Spiegel auf das fast dreifache derjenigen Tiere, die sich auf den Standardmedien entwickelt haben.

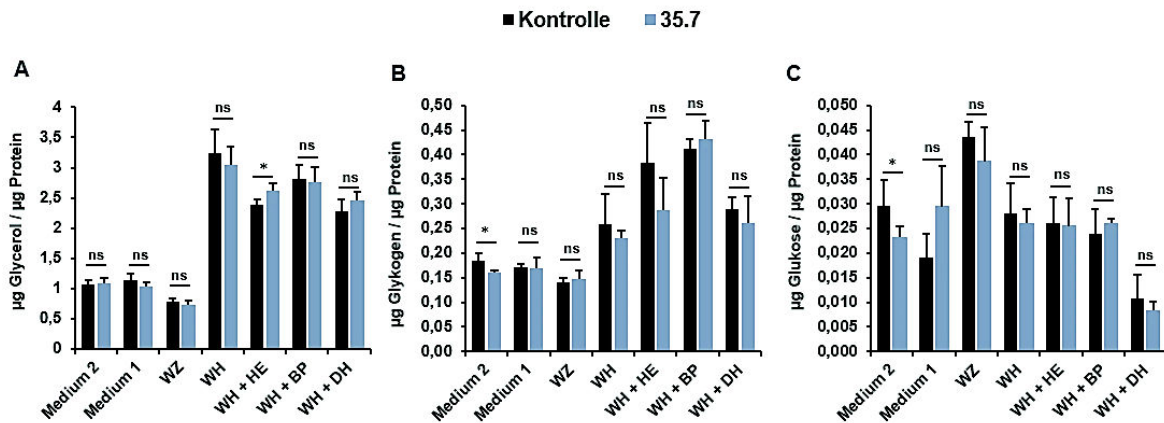


Abbildung 47: TAG-, Glukose- und Glykogengehalt von wandernden L3 Larven unterschiedlicher Futterkonditionen. Die Entwicklung auf WH Medium (wie auch auf WH + HE, + BP und + DH) zu einem Anstieg der gesamtorganismischen TAG-Spiegel. Obwohl sich die Metabolite zwischen den einzelnen Futtersorten stark unterscheiden, sind kaum Unterschiede zwischen Mutante und Kontrolle vorhanden. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*), t-test

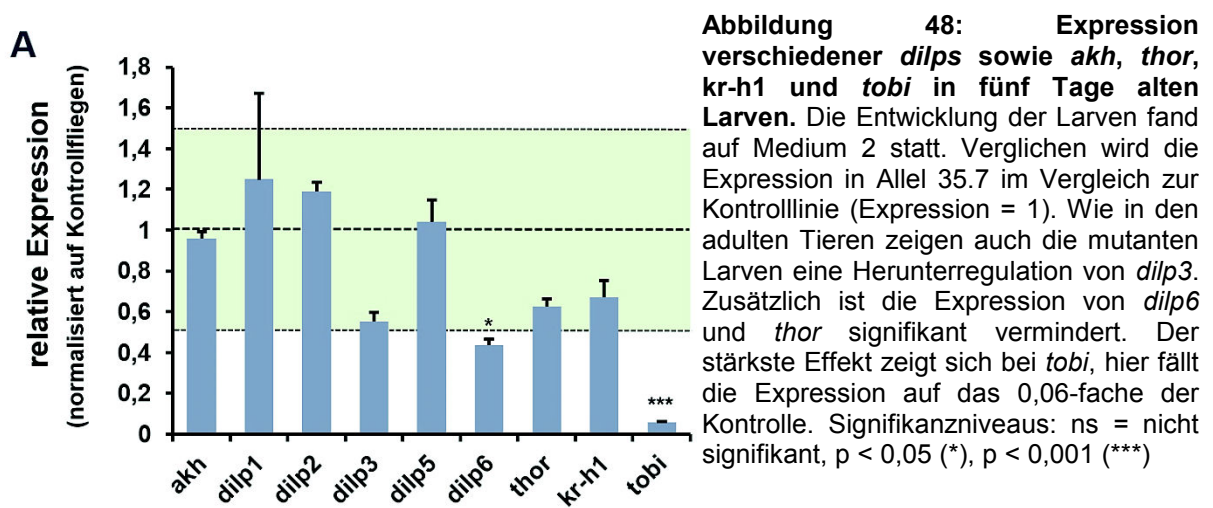
Vergleicht man jedoch Kontrolle und Mutante, so zeigen sich kaum signifikante Unterschiede. Lediglich die Glykogen- und Glukosewerte der Mutante liegen auf dem Standardmedium 2 geringfügig unter denen der Kontrolle. Es wurde also gezeigt, dass CG9186 die larvale Entwicklung in Abhängigkeit vom Futtermedium stark beeinflusst. Bei L3 Larven, die sich auf den jeweiligen Futtern entwickelt haben, besteht jedoch kein drastischer Effekt im Hinblick auf Metabolite wie TAG, Glykogen und Glukose. Worin liegt also die unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeit begründet?

3.4.3.3 CG9186 mutante Tiere zeigen Veränderungen im Insulin-Signalweg

Wie bereits in diesem Kapitel einleitend beschrieben, beeinflusst das Zucker-zu-Hefe Verhältnis des Futters den Insulin-Signalweg (Post und Tatar, 2016). In adulten Fliegen wurde in dieser Arbeit mittels qRT-PCR gezeigt, dass *dilp3* in den CG9186 Mutanten herunterreguliert ist. Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob auch in den Larven eine Veränderung im Insulin Signalweg vorliegt. Hierfür wurde (analog zu den Entwicklungsexperimenten) in fünf Tage alten Larven mittels qRT-PCR die Expression verschiedener *dilps* gemessen. Zusätzlich wurden weitere Gene betrachtet, die stromauf- oder stromabwärts des Insulin-Signalweges liegen. Hierzu gehört das stromabwärts gelegene *thor* (Herboso *et al.*, 2015) sowie das Glucagon Homolog Adipokinetisches Hormon (*akh*). Für Akh selbst wurde ein Einfluss auf die Energiehomöostase (Gáliková *et al.*, 2015) und *dilp3* Expression beschrieben (Kim und Neufeld, 2015). Weiterhin wurde die Expression des Gens *target of brain insulin (tobi)* gemessen. Hierbei handelt es sich um eine α Glucosidase, die Signale aus dem Insulin- und Akh Signalweg integriert (Buch *et al.*, 2007). Außerdem wurde die Expression von *kruppel related h1 (kr-h1)* gemessen.

Kr-h1 kann als Indikator für Signale des Juvenilhormons genutzt werden, die wiederum die larvale Entwicklung beeinflussen (Kayukawa *et al.*, 2012).

Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR. Wie schon in den adulten Tieren ist auch bei den fünf Tage alten Larven die *dilp3* Expression signifikant verringert. Auch für *dilp6* und *thor* konnte eine veränderte Expression im Allel 35.7 gezeigt werden. Besonders stark ist hingegen die Expression von *tobi* betroffen, diese liegt bei dem 0,06-fachen der Kontrolle. Die Daten zeigen also, dass die CG9186 Mutante schon unter Standardbedingungen veränderte Expressionsmuster im Insulin Signalweg aufweist. Wie aber ändert sich die Expression unter den Futterbedingungen, die zu den unterschiedlichen Entwicklungsgeschwindigkeiten geführt haben?



Hierfür wurden fünf Tage alte Larven verwendet, die sich entweder auf Standardmedium 2, WZ- oder WH Medium entwickelt haben. Abbildung 49 zeigt die Expressionsstärken der bereits in Abbildung 48 untersuchten Gene. Normalisiert wurde allerdings nicht über die Kontrolltiere, sondern über das Standardmedium. Wie verändert sich also die Expression in Mutante und Kontrolle, wenn sie sich nicht auf Standardmedium, sondern z.B. auf WZ Medium entwickeln? Wie die Daten erkennen lassen, ist die Expression der überprüften Gene in der Kontrolllinie stark von den Futterbedingungen abhängig. So ist zum Beispiel die *tobi* Expression auf WH Medium um mehr als das Dreifache reduziert und auf WZ Medium um mehr als das Sechsfache gesteigert. Ein ähnlicher Effekt lässt sich bei *thor* beobachten. Die Kontrolllinie reagiert also auf die veränderten Futterbedingungen mit Anpassungen im Insulin-Signalweg. Betrachtet man allerdings die Expressionsstärken im Allel 35.7, so zeigt sich kaum eine Regulation. Die *tobi* Expression beträgt auf WH Medium das 0,9-fache und auf WZ Medium das 1,2-fache der Expression auf Standardmedium.

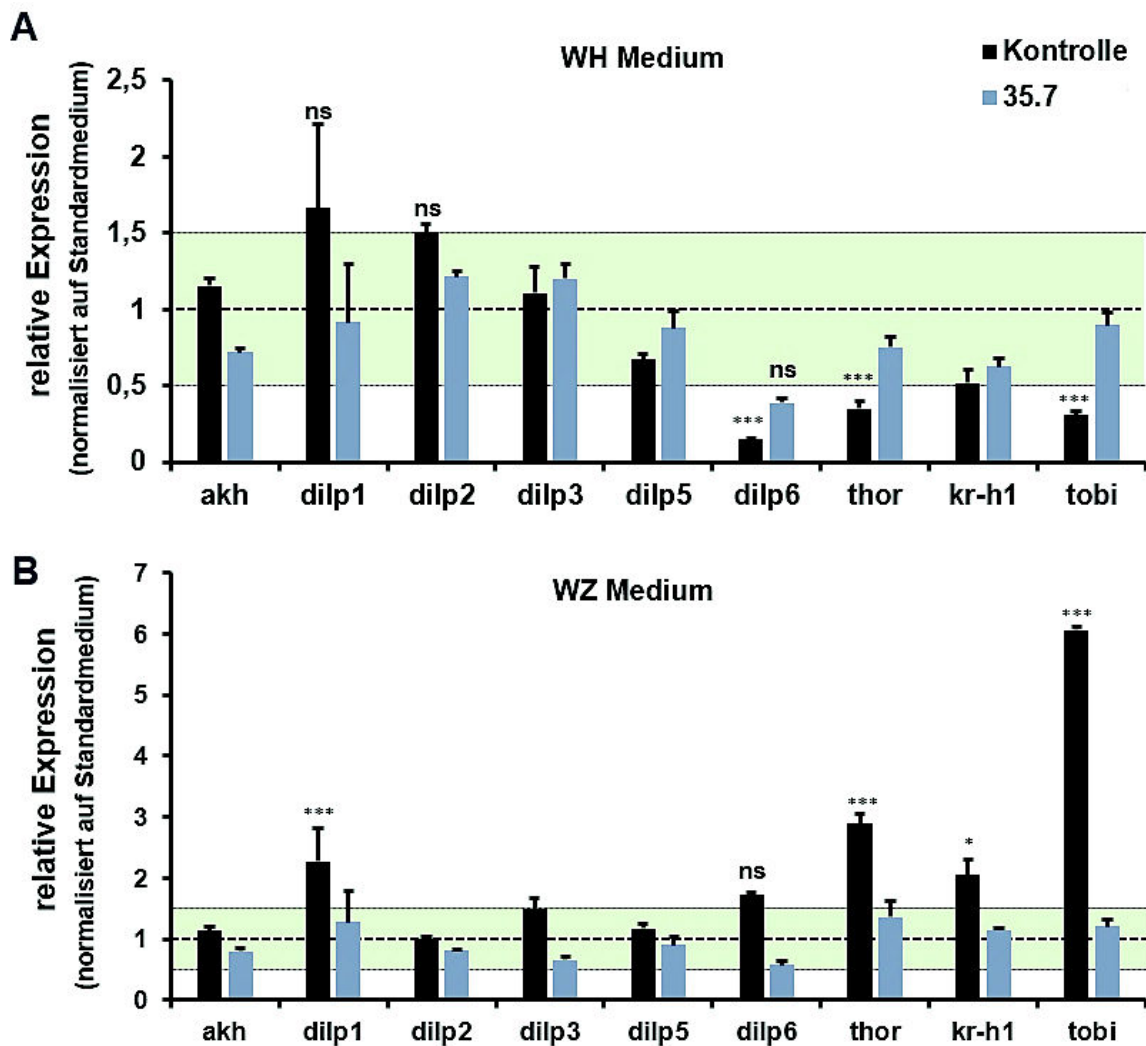


Abbildung 49: Expression verschiedener *dilps* sowie *akh*, *thor*, *kr-h1* und *tobi* in fünf Tage alten Larven. Die Entwicklung der Larven fand auf Medium 2, WH- und WZ Medium statt. Gezeigt wird die Expression von Allel 35.7 und der Kontrolllinie auf WH- und WZ Medium im Vergleich zum Standardmedium (Medium 2, Expression = 1). Die Daten zeigen eine starke Futterabhängigkeit der Expressions-Stärke in den Kontrolltieren. So führt die Entwicklung auf WH Medium in der Kontrolllinie zu einer verringerten und auf WZ Medium zu einer stark erhöhten Expression von *tobi*. Die Expressionsmuster der CG9186 mutanten Tiere reagieren hingegen kaum auf die unterschiedlichen Futter. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)

Im vorliegenden Kapitel wurde also gezeigt, dass der Verlust von CG9186 zu einer zeitlich veränderten larvalen Entwicklung führt. Dieser Effekt tritt besonders dann auf, wenn die Larven sich auf einem Futter mit besonders hohem oder niedrigen Zucker-zu-Hefe Verhältnis entwickeln. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Tiere unter genau diesen Bedingungen ein verändertes Expressionsmuster im Insulin-Signalweg aufweisen.

4 Diskussion

Die regulierte Speicherung und Remobilisierung chemischer Energie in Form von Lipiden ist eine Fähigkeit, die Organismen aus allen Reichen des Lebens (von Bakterien bis hin zum Menschen) miteinander teilen (Übersichtsartikel z.B. Murphy, 2012). Diese Lipidspeicher ermöglichen es, flexibel auf Schwankungen bei der Verfügbarkeit von Nahrung oder dem Energiebedarf zu reagieren. Dieses Sicherstellen einer langfristig ausgeglichenen Energiebilanz wird auch als Energie-Homöostase bezeichnet (Übersichtsartikel Rothwell und Stock, 1981). Auf zellulärer Ebene findet die Speicherung von Lipiden in sogenannten Lipidtröpfchen (LDs, engl.: *lipid droplets*) statt. Hierbei handelt es sich um spezialisierte Organellen mit einem hydrophoben Kern. Dieser besteht besonders aus Triacylglycerolen (TAGs) und Cholesterolestern (CEs) und ist von einer Phospholipid-Einzelschicht umgeben, mit der Proteine assoziiert sind (Übersichtsartikel z.B.: Thiam und Beller, 2017; Walther und Farese, 2012). Neben der Bedeutung für die Energie-Homöostase kommt den LDs aber noch eine Vielzahl anderer Funktionen zu. So dienen sie als Zwischenspeicher für Histone (Li *et al.*, 2014) oder liefern Bausteine für die Synthese von Steroid-Hormonen (Sandoval *et al.*, 2014; Talamillo *et al.*, 2013). Diese funktionelle Diversität spiegelt sich in den LD assoziierten Proteinen wider (u.a.: Beller *et al.*, 2006; Cermelli *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Einige der LD-assozierten Proteine wurden bereits eingehend studiert und spielen wie die PERILIPINE eine Rolle im Lipid-Metabolismus (Wang *et al.*, 2011). Auf den LDs finden sich aber auch Proteine mit bislang unbekannter Funktion. Ein Beispiel hierfür ist das *Drosophila melanogaster* Protein CG9186 (Beller *et al.*, 2006). Obwohl es evolutionär stark konserviert ist und Mutationen im humanen CG9186-Homolog (C2orf43) mit Prostatakrebs korrelieren (Du *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2012; Penney *et al.*, 2015a; Shui *et al.*, 2014), gibt es bislang nur wenige Veröffentlichungen. Eine initiale Charakterisierung von CG9186 fand in der AG Beller statt (Thiel *et al.*, 2013). Hierbei lag der Fokus auf der zellulären Lokalisation des Proteins und seinem Einfluss auf die Positionierung von LDs. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde CG9186 durch *in vitro* Methoden weiter charakterisiert und seine gesamtorganismische Bedeutung durch Etablierung und Analyse einer Deletions-Mutante untersucht.

4.1 Die enzymatische Funktion von CG9186

Durch Homologie Modellierung wurde gezeigt, dass CG9186 mit einem Serin an Position 119 sowie Aspartat und Histidin (Position 254 und 283) eine katalytische Triade ausbildet und damit wahrscheinlich eine Funktion als Serin-Hydrolase besitzt (Thiel *et al.*, 2013).

Serin-Hydrolasen (EC 3.1) stellen eine der größten Enzymklassen dar (Liu *et al.*, 1999; Simon und Cravatt, 2010). Hierunter fallen neben vielen Esterasen auch Serinproteasen wie Trypsin (Huber *et al.*, 1974; Stroud *et al.*, 1974). In CG9186 liegt das zentrale Serin innerhalb einer GX SXG Sequenz. Dieses Motiv findet sich auch in den unterschiedlichen Homologen von CG9186 wieder (Thiel *et al.*, 2013) und ist innerhalb der Serin-Hydrolasen typisch für Esterasen bzw. Lipasen. Beispiele hierfür sind die Hormon Sensitive Lipase (HSL) oder die Monoacylglycerol Lipase ROG1 (Vishnu Varthini *et al.*, 2015, Holm *et al.*, 1994). Für CG9186 konnte allerdings im Rahmen von *in vitro* Tests keine lipolytische Aktivität gegenüber Triacylglycerol (TAG) sowie Mono- und Diacylglycerol (MAG und DAG) nachgewiesen werden (Thiel *et al.*, 2013). Für das murine Homolog von CG9186 (LDAH = Lipid Droplet Associated Hydrolase) wurde von Goo *et al.*, (2014) eine schwache Cholesterolesterase Aktivität gezeigt. Dieser Befund konnte allerdings in einer aktuellen Studie nicht bestätigt werden (Kory *et al.*, 2017). Außerdem wurde von Goo *et al.* unter Verwendung einer „ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase“ Sonde (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gezeigt, dass LDAH eine Aktivität als Serin-Hydrolase besitzt (Goo *et al.*, 2014). Die verwendete Sonde nutzt die Eigenschaft von Fluorophosphonaten, spezifisch mit dem katalytisch aktiven Serin in Serin-Hydrolasen zu reagieren und kovalent an dieses gebunden zu werden (Liu *et al.*, 1999). Nach dem Austausch des zentralen Serins an Position 140 (S140C) innerhalb der katalytischen Triade fand keine Bindung durch die Sonde mehr statt (Goo *et al.*, 2014).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob CG9186 ebenfalls durch die „ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase“ Sonde markiert wird und damit eine Funktion als aktive Serin-Hydrolase bestätigt werden kann. Hierfür wurden stabil transfizierte *Drosophila* Kc167 Zelllinien lysiert, die verschiedene eGFP Fusionskonstrukte exprimieren. Getestet wurden neben wildtypischem CG9186 auch eine Variante, in der das zentrale Serin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (S119A). Als Positivkontrolle diente LDAH, als Negativkontrolle eGFP alleine sowie das LD Protein PLIN2 (Grönke *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2002), für das keine Serin-Hydrolase Aktivität beschrieben ist. Das Lysat wurde mit der Sonde inkubiert und diese dann über Streptavidin Agarose *beads* präzipitiert. Unter Verwendung eines eGFP-spezifischen Antikörpers wurde im Rahmen eines Western Blots überprüft, welche der eGFP Konstrukte durch die Sonde gebunden wurden. Wie sich zeigte, konnte neben der Positivkontrolle und dem wildtypischen CG9186 auch die S119A Variante gebunden werden (Abbildung 9). Die beiden Negativkontrollen hingegen wurden im Präzipitat nicht nachgewiesen. Die Bindung an CG9186(S119A) war nicht zu erwarten, da die Fluorophosphonat-Sonde mit freien OH-Gruppen nukleophiler Serinreste reagiert und kovalent an diese gebunden wird (Liu *et al.*, 1999). Im S119A Konstrukt wurde das zentrale Serin jedoch gegen ein Alanin ausgetauscht, hier fehlt die für die Reaktion

benötigte OH-Gruppe. Könnte also ein anderes Serin die Bindung verursacht haben? Wie der Sequenzvergleich von CG9186 und seinen Homologen zeigt, entspricht das Serin an Stelle 119 im *Drosophila* Protein dem Serin an Position 140 im murinen LDAH (Thiel *et al.*, 2013). Auch die Positionen der anderen Komponenten der katalytischen Triade (Aspartat, Histidin) sind in den unterschiedlichen Homologen stark konserviert (Goo *et al.*, 2014; Thiel *et al.*, 2013). Dies spricht gegen die Beteiligung eines anderen Serinrestes. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eine katalytisch wirklich inaktive CG9186 Variante zu generieren, wurde in einem nächsten Schritt Histidin an Position 283 als weitere Komponente der katalytischen Triade gegen Alanin ausgetauscht. Außerdem wurde eine Doppelmutation (S119A und H283A) getestet. Wie bereits erwähnt, konnte eine S140C Variante vom murinen LDAH nicht präzipitiert werden (Goo *et al.*, 2014). Hier wurde also nicht gegen ein Alanin ausgetauscht, sondern gegen Cystein. Durch diese Mutation fällt die OH-Gruppe des Serins wie beim Austausch gegen Alanin nicht ersatzlos weg, sondern an seine Stelle tritt die Thiolgruppe des Cysteins. Thiolgruppen bilden in Proteinen Disulfidbrücken aus (z.B.: Bobyk *et al.*, 2011). Die von Goo *et al.* durchgeführte Mutation kann also potentiell die Faltung von LDAH oder dessen Interaktion mit anderen Proteinen gestört haben. Um auch diese Situation für CG9186 abzubilden, wurde zusätzlich eine S119C Mutante generiert. Außerdem wurde in Anlehnung an Goo *et al.* auch ein LDAH(S140C) Konstrukt getestet. Eine weitere Probe (mit wildtypischem CG9186) wurde für fünf Minuten bei 100 °C gekocht. Diese hitzeinaktivierte Probe sowie PLIN2 dienten als Negativkontrolle. Wie Abbildung 10 zeigt, lassen sich alle eGFP Fusionskonstrukte im Präzipitat nachweisen. Selbst die S140C Variante von LDAH wurde im Gegensatz zu den publizierten Versuchen von der Sonde gebunden. PLIN2 als Negativkontrolle wurde hingegen nicht markiert. In Abbildung 9 und Abbildung 10 fällt auf, dass die verwendeten Zellen stark unterschiedliche Expressionsstärken aufweisen. PLIN2 wird z.B. nur schwach exprimiert, eGFP allein hingegen sehr stark. Wurden also die *beads* nicht stringent genug gewaschen, und so eGFP aus dem Lysat mit ins Präzipitat übertragen? Gegen diese Vermutung spricht, dass auch das im Lysat extrem abundante eGFP nicht im späteren Präzipitat nachgewiesen wurde. Auch generelle Schwankungen im Protein-zu-Sonden Verhältnis liefern keine Erklärung, da alle Proben vor Zugabe der Sonde nach Herstellerangaben auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt wurden. Eine Erklärung ist allerdings, dass CG9186 und seine Homologe aufgrund ihrer Struktur (z.B. durch eine mögliche Biotinylierung) eventuell an die Streptavidin-*beads* binden, die zur Präzipitation der Sonde verwendet wurden. Hiergegen spricht, dass Goo *et al.* ebenfalls Streptavidin-*beads* benutzt haben und das LDAH(S140C) Konstrukt im Gegensatz zu den eigenen Experimenten nicht präzipitiert wurde.

Eine weitere Ursache für die von der Literatur abweichenden Ergebnisse sind unbekannte Faktoren im experimentellen Aufbau. In dieser Dissertation wurden die gleiche kommerziell erhältliche Sonde und ebenfalls Streptavidin Agarose *beads* nach Herstellerangaben verwendet. Außerdem wurden neben CG9186 auch die gleichen Proteine getestet (LDAH und LDAH(S140C)). Ein Unterschied besteht allerdings in den verwendeten Protein-Markierungen. Während die getesteten Proteine bei Goo *et al.* mit FLAG markiert waren, wurde in den eigenen Versuchen das deutlich größere eGFP verwendet. Gegen einen Einfluss von eGFP spricht allerdings, dass es als Negativkontrolle verwendet wurde und trotz starker Abundanz nicht von der Sonde gebunden wurde. Ein weiterer Unterschied ist, dass die durchgeführten Experimente mit Lysat aus stabil transfizierten Kc167 Zellen stattfanden, die von Goo *et al.* jedoch unter Verwendung humaner HeLa Zellen. Um den von Goo *et al.* durchgeführten Versuchsablauf also noch genauer abzubilden, wurden die verschiedenen Konstrukte in YFP-Expressionsvektoren für humane Zellen kloniert und transient in HeLa Zellen zur Expression gebracht. Auch in diesem Versuchsaufbau wurden alle getesteten Proteine von der Sonde gebunden (Abbildung 11).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass eine Aktivität als Serin-Hydrolase für CG9186 nicht zweifelsfrei gezeigt werden konnte. Auch wenn die Sonde zwei verschiedene Negativkontrollen nicht gebunden hat, wurden alle CG9186 und LDAH Konstrukte unabhängig von Punktmutationen und Hitzeinaktivierung präzipitiert. Obwohl dieser Effekt bei Goo *et al.* nicht beobachtet wurde, müsste künftig dennoch überprüft werden, ob CG9186 und LDAH unspezifisch an die Streptavidin-Agarose binden. Sollte dies der Fall sein, wäre der nächste Schritt, eine mögliche Biotinylierung von CG9186 und seiner Homologe zu überprüfen.

Neben den Experimenten mit der „*ActivX Desthiobiotin-FP serine hydrolase*“ Sonde konnten Goo *et al.* für LDAH *in vitro* eine schwache Cholesterol Esterase Aktivität zeigen. Außerdem wurde eine Rolle bei der Cholesterol und CE Homöostase nachgewiesen. So führte LDAH Überexpression zu einer Senkung und ein *knock down* zu einem Anstieg zellulärer Cholesterol- und CE-Spiegel in humanen kidney-293 Zellen und murinen RAW 264.7 Makrophagen (Goo *et al.*, 2014). Für CG9186 könnte eine Aktivität im Cholesterol Metabolismus Hinweise auf die Ursache des CG9186 induzierten LD Aggregations-Phänotyp geben (Thiel *et al.*, 2013). So könnte eine Veränderung der Sterol bzw. Cholesterol-Konzentration der LD Membran einen Effekt auf ihre physikalischen Eigenschaften (z.B. Fluidität) haben (Mouritsen and Zuckermann, 2004) und die Aggregation von LDs begünstigen, wie es z.B. für Squalen beschrieben wurde (Ta *et al.*, 2012). Auch die Rolle des humanen CG9186 Homologs (C2orf43) bei Prostatakarzinomen könnte mit einer Aktivität als Cholesterol Esterase erklärt werden, da

Lipid-Metabolismus und Prostatakrebs eng verknüpft sind und eine Akkumulation von CE die Aggressivität von Prostatakarzinomen erhöht (Wu *et al.*, 2014; Yue *et al.*, 2014). Wie man in Abbildung 12 allerdings erkennt, zeigten in den eigenen *in vitro* Versuchen weder LDAH noch CG9186 eine lipolytische Aktivität gegenüber dem verwendeten ^{14}C -Cholesteryl Oleat. HSL als Positivkontrolle hingegen führte wie erwartet (Small *et al.*, 1989) zu dessen Spaltung in Cholesterol und freiem Oleat. Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von CG9186 die zellulären Cholesterol-Spiegel verändert, wurden TLCs mit stabil transfizierten *Drosophila* Kc167 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor entweder mit Ölsäure oder mit Ölsäure und Cholesterol behandelt. Die CG9186 Überexpression zeigt jedoch keinen deutlichen Effekt auf den zellulären Cholesterol-Gehalt. Neben diesen *in vitro* Versuchen wurde die im Rahmen dieser Arbeit generierte CG9186 Verlustmutante ebenfalls auf ihren Cholesterol-Gehalt hin untersucht. So wurde mit einer enzymgekoppelten kolorimetrischen Nachweisreaktion in diesen Tieren (adult und L3) die Mengen an freiem Cholesterol und CE (zusammen Gesamt-Cholesterol) bestimmt. Wie Abbildung 64 im Anhang zeigt, weisen die Tiere ohne CG9186 Protein signifikant niedrigere CE und Gesamt-Cholesterol Mengen auf als die wildtypische Kontrolle. Wenn CG9186 eine Funktion als Cholesterolesterase hätte, dann wären nach Verlust von CG9186 erhöhte CE-Spiegel zu erwarten. Hier zeigt sich aber ein Gegenteiliger Effekt. Es besteht allerdings noch die Möglichkeit, dass die niedrigen CE Spiegel Folge einer Überkompensation durch andere Cholesterolesterasen (wie HSL) sind. Außerdem führt der Verlust von CG9186 in den Tieren zu einer gesamtorganismischen Senkung der TAG-Spiegel. Die CE-Spiegel könnten also im Rahmen verringerter gesamtorganismischer Lipidspeicher reduziert sein. Auch dies spricht gegen eine spezifische Funktion von CG9186 als Cholesterolesterase.

In einer erst kürzlich (2017) erschienenen Studie wurde wie im Rahmen dieser Arbeit der Versuch unternommen, die von Goo *et al.* für LDAH postulierte Cholesterolesterase-Aktivität zu bestätigen. Hierfür wurde neben *in vitro* Experimenten eine murine LDAH-Deletions-Mutante generiert, und diese im Hinblick auf ihre Cholesterol-Spiegel hin untersucht (Kory *et al.*, 2017). Auch Kory *et al.* konnten weder für LDAH noch für CG9186 eine Cholesterolesterase Aktivität nachweisen. Auch die *in vivo* Versuche unter Verwendung LDAH mutanter Mäuse zeigten keine Effekte auf den Cholesterol- oder CE Haushalt der Tiere (Kory *et al.*, 2017).

Abschließend bleibt festzustellen, dass die von Goo *et al.* für LDAH postulierte Cholesterolesterase Aktivität für CG9186 weder im Rahmen dieser Arbeit noch von Kory *et al.* (2017) gezeigt werden konnte. Die von Goo *et al.* gemessenen Effekte sind durchweg mild und nur schwach signifikant. Daher ist die Funktion von LDAH und CG9186 als Cholesterolesterase eher fragwürdig oder als zweitrangig zu betrachten. Die

genaue enzymatische Funktion von CG9186 und LDAH bleibt also ungeklärt. Trotz des Vorhandenseins der katalytischen Triade mit dem zentralen GXSXG Motiv konnte keine lipolytische Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings wurden in allen bisherigen Versuchen nur die quantitativ bedeutsamsten Lipidklassen untersucht. CG9186 könnte aber auch an der Prozessierung wenig abundanter lipophiler Moleküle wie Steroid Hormonen oder anderer Hydrocarbon-Verbindungen beteiligt sein. Hier ergibt sich das Problem, dass schon das Lipidom einer einzelnen Zelle aus über tausend verschiedenen Lipiden bestehen kann (van Meer, 2005). Eine direkte Suche nach einem möglichen CG9186 Substrat gestaltet sich also schwierig. So müssten in einem Hochdurchsatzverfahren ganze Lipid Bibliotheken untersucht werden. Wie Kory *et al.* außerdem berichten, konnten auch mit ungerichteten Spektrometrie-basierten Lipidom-Experimenten bislang keine Kandidaten identifiziert werden. Weiterhin könnte CG9186 trotz des GXSXG Motivs eine gänzlich andere Funktion haben. Das Protein Rv1497 aus *Mycobacterium tuberculosis* zum Beispiel besitzt zwar das für lipolytische Enzyme typische GXSXG Motiv, hat neben einer Esterase- aber auch eine beta-Lactamase Aktivität (Singh *et al.*, 2016). Eventuell basiert die Hauptfunktion von CG9186 also nicht auf der katalytischen Triade. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich die Funktion von CG9186 in *Drosophila* grundlegend von der ihrer Homologe in Maus und Mensch unterscheiden könnte. So besitzen evolutionär konservierte Proteine und Signalwege, die in Vertebraten Funktionen im Cholesterol-Metabolismus ausüben, in sterol auxotrophen Organismen wie *Drosophila* (Hobson, 1935) andere Funktionen (zusammengefasst in Carvalho *et al.*, 2010). Ein Beispiel hierfür ist das *sterol regulatory element binding protein* (SREBP), welches in *Drosophila* nicht auf Cholesterol, sondern auf bestimmte Phospholipide reagiert (Dobrosotskaya *et al.*, 2002).

Um sich also der Funktion von CG9186 zu nähern, wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt. So wurden Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert. Außerdem wurde eine *loss of function* Mutante generiert und die resultierenden Phänotypen untersucht. Ist mehr über die gesamtorganismische Rolle von CG9186 bekannt, kann künftig auch gezielter nach der enzymatischen Funktion und nach möglichen Substraten von CG9186 gesucht werden.

4.2 Interaktionspartner von CG9186

Nahezu alle zellulären Prozesse beruhen auf Interaktionen zwischen Proteinen (Protein-Protein Interaktion, PPI) (zusammengefasst in Xing *et al.*, 2016). Während im Menschen

zwischen 30.000 und 40.000 Gene für Proteine codieren (Lander *et al.*, 2001), wird die Anzahl unterschiedlicher PPIs, deren Gesamtheit als Interaktom bezeichnet wird, auf ca. 650.000 geschätzt (Stumpf *et al.*, 2008). In einer 2011 veröffentlichten ‚Interaktions-Karte‘ für *Drosophila* Proteine (*Drosophila protein interaction map (DPiM)*) wurden für CG9186 bereits mittels Co-IP Interaktionen mit den beiden Proteinen Mbs (Myosin binding subunit) und Jheh3 (Juvenile hormone epoxide hydrolase 3) gezeigt (Guruharsha *et al.*, 2011). Mbs bindet Proteine (Fukata *et al.*, 1998) und ist reich an Glutamin und Alanin. Im Polypeptid befindet sich ein QQQPAAAAAASAA-Sequenzabschnitt (Gramates *et al.*, 2017). Für Alanin- und Glutamin-reiche Proteinregionen wurde gezeigt, dass sie andere Proteine binden (Leitgeb *et al.*, 2007). Es könnte sich also bei Mbs um ein falsch-positives Ergebnis handeln. Jheh3 ist eine annotierte *cis*-Epoxid-Hydrolase und wahrscheinlich am Abbau von Juvenilhormon beteiligt, seine genaue Funktion wurde bislang allerdings noch nicht charakterisiert (Gramates *et al.*, 2017). Die Beteiligung am Juvenilhormon Metabolismus ist eine Erklärung für die in dieser Arbeit gemachten *in vivo* Beobachtungen mit der CG9186 Mutante (siehe Kapitel 4.4.2). Um diese Interaktion zu bestätigen und ungerichtet weitere Interaktionspartner zu identifizieren, wurden Co-IP Experimente durchgeführt. Hierfür wurden stabil transfizierte Zellen verwendet, die ein eGFP-CG9186 Fusionsprotein exprimieren. Das Konstrukt wurde unter Verwendung von *beads* präzipitiert, die mit einem GFP-spezifischen Antikörper beschichtet sind (GFP Trap A, Chromotek). Das Präzipitat wurde anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Wie bei vielen Nachweistechiken zu PPIs kann es auch bei Co-IP Experimenten zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. So gelten bestimmte Proteine als *sticky* (engl. klebrig), weil sie aufgrund ihrer Struktur unspezifisch andere Proteine binden (Leitgeb *et al.*, 2007). Es besteht auch die Möglichkeit, dass Proteine CG9186-unabhängig ins Präzipitat gelangen, indem sie unspezifisch an die *beads* oder an das Protein-*tag* (engl.: Markierung, hier eGFP) binden (Übersichtsartikel z.B. Avila *et al.*, 2015; ten Have *et al.*, 2011). Um diese Risiken zu minimieren, wurden als Negativkontrolle Zellen verwendet, die nur eGFP exprimieren. Abbildung 14 zeigt die Anreicherung von eGFP im Präzipitat und Abreicherung im Überstand. Die eGFP-Konstrukte werden also von den *beads* gebunden. Wie bereits berichtet, lokalisiert CG9186 auf den LDs bzw. im ER (Thiel *et al.*, 2013). Um beide Situationen im Versuchsaufbau abzubilden, wurde ein Teil der Zellen für die Co-IP Versuche mit Ölsäure (Induktion von LDs) und ein anderer Teil im Standardmedium inkubiert. In einem ersten Experiment konnten insgesamt 412 Proteine im Präzipitat nachgewiesen werden. Tabelle 12 und 13 zeigen für beide Konditionen (mit und ohne Ölsäure) in absteigender Reihenfolge die 20 Proteine mit dem höchsten CG9186/eGFP Quotienten (Anreicherung im CG9186-eGFP Präzipitat/Anreicherung im eGFP Präzipitat). Zunächst fällt auf, dass für mehr als die Hälfte der Proteine in dieser

Liste eine Lokalisation im ER, den LDs, oder allgemein im Endomembransystem beschrieben ist. Dies war so zu erwarten, da CG9186 in diesen Kompartimenten lokalisiert (Thiel *et al.*, 2013). Einige der Proteine befinden sich auf beiden Listen, wurden also unter beiden Konditionen identifiziert. Hierzu gehören die Proteine Not1, Gp93, Hmu, Cpr, Pvr, Kr-h2. Drei dieser Kandidaten (Gp93, Hmu und Cpr) wurden bereits auf LDs aus Fettkörpern von Larven nachgewiesen (Beller *et al.*, 2006). Aufgrund der Lokalisation sowie der Anreicherung in beiden Präzipitaten wurden sie für eine weitergehende Analyse ausgewählt. Für Pvr wurde bislang nur eine Lokalisation in Plasmamembranen gezeigt (Harris *et al.*, 2007; Jékely *et al.*, 2005). Obwohl in der Literatur bislang keine direkte LD assoziierte Funktion beschrieben wurde, konnte in einem früheren Screening-Experiment in der AG Beller gezeigt werden, dass ein *knock down* von *pvr* zu einer Aggregation von LDs führt (Thul, 2014). Da dieser Phänotyp auch bei Überexpression von CG9186 beobachtet werden kann (Thiel *et al.*, 2013), wurde auch Pvr für weitergehende Experimente ausgewählt.

In einem weiteren Co-IP Experiment sollten die im ersten Experiment gefundenen Interaktionspartner bestätigt werden. Dieses Mal wurden pro Kondition fünf IPs parallel durchgeführt und massenspektrometrisch analysiert, um eine statistische Aussage zu ermöglichen. Die Messung mehrerer Replikate erlaubt die statistische Auswertung der Ergebnisse. Wie Tabelle 14 und Abbildung 15 zeigen, waren die vier ausgewählten Kandidaten im zweiten Versuch signifikant im CG9186-Päzipitat angereichert.

Um die identifizierten Interaktionen mit einer weiteren Technik zum Nachweis von PPIs zu bestätigen, wurden Luciferase Komplementations-Experimente (Kolkhof *et al.*, 2017) durchgeführt (Abbildung 17). Hier konnte die Interaktion von CG9186 mit Gp93, Hmu und Cpr bestätigt werden. Eine Interaktion mit Pvr konnte in diesen Experimenten nicht gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Lokalisation der Interaktoren sowie ihr Einfluss auf die CG9186 induzierte Aggregation von LDs (Thiel *et al.*, 2013) untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse für die vier Kandidaten einzeln diskutiert. Dabei wird der bisherige Wissensstand zu den Proteinen skizziert und die Bedeutung einer möglichen Interaktion mit CG9186 diskutiert:

4.2.1 Hemomucin (Hmu)

Hemomucin (Hmu) wurde auf der Zelloberfläche der *Drosophila* Hämozyten-Zelllinie mbn-2 identifiziert (Theopold *et al.*, 1996), konnte aber auch im Endomembransystem (Tan *et al.*, 2009) und auf LDs (Beller *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Auch das murine *Hmu* Homolog *adipose plasma membrane associated Protein* (APMAP) wurde in

einem LD Proteomscreen identifiziert (Ding *et al.*, 2012). Um die Lokalisationen von Hmu in den für die Co-IP verwendeten Kc167 Zellen zu zeigen, wurde ein Hmu-eGFP Fusionsprotein zur Überexpression gebracht. Unter Abwesenheit von LDs zeigt Hmu eine retikuläre Lokalisation (Abbildung 19 A). Nach Zugabe von Ölsäure zum Zellkulturmedium zeigt sich zwar keine klare LD Lokalisation, Hmu-eGFP befindet sich allerdings auf LD nahen Membranen (Abbildung 19 B). Wie die Bilder zeigen, erlaubt die zelluläre Lokalisation von Hmu eine Interaktion mit CG9186. Diese Interaktion wurde in Luciferase Komplementations-Experimenten bestätigt (Abbildung 10, Kolkhof *et al.*, 2017). Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion zu untersuchen, wurden mit Hmu Experimente im Hinblick auf die CG9186 induzierte LD Aggregation durchgeführt. Wie Abbildung 23 zeigt, hat ein *knock down* von *hmu* alleine sowie in Kombination mit CG9186 keinen Einfluss auf die Größe und Positionierung der zellulären LDs. Die Überexpression von Hmu hat keinen Effekt auf die CG9186 induzierte Aggregation von LDs (Abbildung 21). Die funktionelle Bedeutung der Interaktion scheint also außerhalb des LD Aggregations-Phänotypen zu liegen. Um dies jedoch mit Sicherheit sagen zu können, muss in der Zukunft noch überprüft werden, wie sich eine RNAi von *Hmu* bei gleichzeitiger CG9186 Überexpression auf die LD Aggregation auswirkt. Des Weiteren stellt sich die Frage nach der *in vivo* Bedeutung einer möglichen PPI zwischen CG9186 und Hmu. Wie RNA Seq Daten zeigen, wird *hmu* nicht nur in Hämocyten, sondern auch in Akzessorischen Drüsen, Ovarien und dem Fettkörper exprimiert. Auch eine Expression in larvalen Speicheldrüsen wurde gezeigt (Gramates *et al.*, 2017). Überexpression der NAD(+) abhängigen Histon Deacetylase Sir2 (Silent Information Regulator 2) im adulten Fettkörper führt dazu, dass CG9186 in männlichen und *hmu* in weiblichen Tieren herunterreguliert sind (Hoffmann *et al.*, 2013). In der zellulären und organismischen Lokalisation sowie in Faktoren der Expressionsstärke von Hmu und CG9186 sind also Schnittmengen vorhanden. Hmu besitzt eine Domäne mit Ähnlichkeit zum Pflanzen-Enzym Strictosidin Synthase, einem Schlüsselenzym in der Synthese von Monoterpen-Indolalkaloiden (Theopold *et al.*, 1996; Treimer und Zenk, 1979). Strictosidin Synthase wurde auf den mit den LDs verwandten Ölkörpern in Mais Embryonen identifiziert (Tnani *et al.*, 2011). Über die Synthese von Alkaloid-Verbindungen, besonders im Zusammenhang mit LDs, ist nichts bekannt. Der C-Terminus des Proteins bildet mit einer großen Anzahl an Threonin- und Prolinresten eine Mucin-Domäne (Theopold *et al.*, 1996). Vor allem in Säugern wurde gezeigt, dass die Sekretion von Mucinen Schleimhäute wie die des Magen-Darm Traktes vor mechanischen und chemischen Schäden schützt (zusammengefasst in Lipkin, 1971). Darüber hinaus besitzen Mucine eine immunologische Funktion, indem sie Bakterien (Lindén *et al.*, 2009) oder Pilze (Kavanaugh *et al.*, 2014) binden und so deren Anlagerung und Eindringen in die Schleimhaut verhindern. Auch für *Drosophila* Hmu wurde eine Rolle bei der humoralen

Immunantwort gegen gram-negative Bakterien diskutiert (Theopold *et al.*, 1996). Hier könnte auch der Zusammenhang zu CG9186 bestehen. Während Hmu auf Hämocyten exprimiert wird, die in *Drosophila* an der zellulären Immunantwort beteiligt sind (Theopold *et al.*, 1996), wurde das murine Homolog LDAH in Makrophagen nachgewiesen (Goo *et al.*, 2014). CG9186 könnte also eine immunologische Funktion zukommen. Wie Hmu wird CG9186 prominent in Organen exprimiert, die eine Sekretorische Funktion haben. Dies trifft insbesondere auf den Mitteldarm, die Akzessorischen Drüsen, Ovarien und Speicheldrüsen zu. Wie genau die Verbindung zwischen dem LD assoziierten CG9186 und der Bildung und Funktion von Mucus zusammenhängt, ist an dieser Stelle noch sehr spekulativ. Obwohl in *Drosophila* über 30 Gene identifiziert wurden, die für Mucin-ähnliche Proteine kodieren (Syed *et al.*, 2008), weiß man fast nichts über Mucus und seine Funktion in den Fliegen (Übersichtsartikel Lemaitre und Miguel-Aliaga, 2013).

4.2.2 Glycoprotein 93 (Gp93)

Bei Glycoprotein 93 (Gp93) handelt es sich um ein Homolog des humanen Glucose-regulated protein 94 (GRP94), das als Chaperon an der korrekten Faltung einer Vielzahl von Zielproteinen beteiligt ist (Marzec *et al.*, 2012; Maynard *et al.*, 2010). Gp93 lokalisiert im Endomembransystem (Tan *et al.*, 2009) und auf den LDs (Beller *et al.*, 2006; Cermelli *et al.*, 2006). Es wurde aber auch im Lumen Akzessorischer Drüsen männlicher Fliegen und somit dem Extrazellulärraum nachgewiesen (Walker *et al.*, 2006). Die eigenen Lokalisationsstudien in dieser Arbeit bestätigen die in der Literatur gemachten Beobachtungen. Gp93-eGFP zeigt eine retikuläre Lokalisation, befindet sich nach Zugabe von Ölsäure zum Zellkulturmedium teilweise aber auch auf den LDs (Abbildung 19). Die Interaktion von Gp93 mit CG9186 konnte im Rahmen der Luciferase Komplementations-Experimente bestätigt werden (Abbildung 17). Allerdings zeigt sich hier eine starke Anhängigkeit von der Konformation der Konstrukte. Wird z.B. Gluc(1) N-terminal mit CG9186 und Gluc(2) C-terminal mit Gp93 fusioniert, ist keine Interaktion messbar. Dieser Effekt kann vermutlich aufgrund sterischer Gegebenheiten auch bei anderen PPIs beobachtet werden, weshalb im Rahmen der Luciferase Komplementations-Experimente auch mehrere Konfigurationen getestet wurden (Kolkhof *et al.*, 2017). Wie schon bei Hmu, so konnte auch für Gp93 kein Einfluss auf die Größe und Positionierung zellulärer LDs sowie auf die CG9186 induzierte LD-Aggregation beobachtet werden (Abbildung 21 und Abbildung 23). Die Bedeutung der Interaktion liegt damit wahrscheinlich außerhalb der zellulären Positionierung von LDs.

Der Verlust von Gp93 führt zu einer Entwicklungsverzögerung, prominenten Defekten im larvalen Mitteldarm mit morphologischen Veränderungen der *septate junctions* und letztendlich zum Absterben der Tiere im späten L3 Stadium (Maynard *et al.*, 2010). Die metabolischen Konsequenzen des Gp93 Verlustes reichen über eine verminderte Nährstoffaufnahme im Darm bis hin zu einem gestörten Insulin-Signalweg, verminderten TAG- und erhöhten Trehalose-Spiegeln (Maynard *et al.*, 2010). Wie in der Studie diskutiert wird, lässt sich die larvale Entwicklungsverzögerung der Tiere nicht alleine mit einer verminderten Nährstoffaufnahme im Darm erklären. Vielmehr werden Probleme in enteroendokrinen Signalen und dem *nutrient sensing* vermutet (Maynard *et al.*, 2010). Mit *nutrient sensing* ist die sensorische Beurteilung der aufgenommenen Nahrung im Hinblick auf ihre Nährstoffzusammensetzung sowie die daraus folgende spezifische physiologische Reaktion (z.B. durch Aktivierung des Insulinsignalweges) gemeint (zusammengefasst z.B. in Hietakangas und Cohen, 2009). Hier könnte ein Zusammenhang zu CG9186 bestehen. Wie im Ergebnisteil dargestellt, wurde im Anschluss an die Untersuchungen zu möglichen Interaktoren in dieser Arbeit eine *loss of function* Mutante von CG9186 generiert. Der Verlust von CG9186 führt zu ähnlichen Phänotypen wie die RNAi von Gp93. Hierzu gehören neben verminderten TAG-Spiegeln (Abbildung 32) auch eine veränderte larvale Entwicklung (Abbildung 44 und Abbildung 45) und gestörtem Insulin-Signalweg (Abbildung 48 und Abbildung 49). Des Weiteren wurde die Beobachtung gemacht, dass mutante Organe (besonders Akzessorische Drüsen, Fettkörper und Speicheldrüsen) deutlich fragiler sind als die der wildtypischen Kontrolle. So zerfielen diese Organe schneller, wenn sie für die Mikroskopie mit einer Pinzette in Mowiol überführt wurden. Diese Phänotypen passt zu der von Maynard *et al.* (2010) für Gp93 beobachteten morphologischen Defekte im Mitteldarm und der Septate Junctions. Gp93 könnte also als ER Chaperon die korrekte Faltung von CG9186 steuern. Das Herunterregulieren von Gp93 hätte demnach eine Verringerung funktionalen CG9186 Proteins zur Folge und würde zu ähnlichen Phänotypen wie bei einem Verlust von CG9186 führen. Da Gp93 auch als Chaperon für andere Proteine dient (Maynard *et al.*, 2010), sind im Vergleich zu CG9186 auch andere und teilweise drastischere Phänotypen (z.B. die Letalität) zu beobachten. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass CG9186 als Co-Chaperon für Gp93 dient. Für das humane Gp93 Homolog GRP94 wurde gezeigt, dass es für die Produktion von Insulin like growth Factor II (IGF-II) notwendig ist (Ostrovsky *et al.*, 2009). Das Fehlen von CG9186 in *Drosophila* könnte also Gp93 abhängig zur Fehlfaltung eines Signalpeptids im Insulinsignalweg führen und so die beobachteten Phänotypen verursachen.

Auch eine gemeinsame Funktion von CG9186 und Gp93 im Sterol-Metabolismus ist denkbar und mit den beobachteten Phänotypen vereinbar. Die Expression von Gp93

korreliert stark mit der Expression der ERG (von Ergosterol) Homologe Lamin B receptor (*dLBR*) und CG1998 (Vinci *et al.*, 2008). Bei den ERG Genen handelt es sich um Komponenten des Ergosterol-Synthesewegs in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Bard *et al.*, 1977). Für diese Gene wird im sterol auxotrophen Organismus *Drosophila* eine Funktion in der Ecdysteroid-Synthese vermutet (Veitia und Hurst, 2001). Interessanterweise wurde *dLBR* in den in dieser Arbeit durchgeführten Co-IP Experimenten als CG9186 Interaktor identifiziert (Daten nicht gezeigt). Obwohl die Anreicherung von *dLBR* im CG9186 Präzipitat nicht zu den 20 stärksten gehört (Tabelle 12 und Tabelle 13), ist sie statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Für LDAH, dem murinen CG9186 Homolog, wird eine Beteiligung im Sterol-Metabolismus diskutiert (Goo *et al.*, 2014; Kory *et al.*, 2017). Das bei der CG9186 Mutante beobachtete veränderte Zusammenspiel von *nutrient sensing*, Entwicklung und Insulin Signalweg (z.B. Abbildung 44 und Abbildung 49) wurde auch schon im Zusammenhang mit Ecdyson beschrieben (Ohhara *et al.*, 2017). CG9186 und Gp93 könnten als Chaperone *dLBR* regulieren und so Einfluss auf die Ecdysteroidsynthese nehmen.

4.2.3 Cytochrome P450 reductase (Cpr)

Cytochrome P450 reductase (Cpr) ist ein Homolog des humanen Proteins POR (P450 Oxidoreduktase) (Gramates *et al.*, 2017), welches im Menschen an der Steroidogenese beteiligt ist (zusammengefasst in Miller, 2012). Cpr lokalisiert im Endomembransystem (Tan *et al.*, 2009) und auf den LDs (Beller *et al.*, 2006). Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 18 bestätigen diesen Befund. Abbildung 20 C zeigt die Co-Lokalisation von Cpr und CG9186. Die in den Co-IP Experimenten nachgewiesene Interaktion zwischen Cpr und CG9186 konnte in den Luciferase Komplementations-Experimenten bestätigt werden. Wie bei Gp93 ist die Signalstärke im Assay dabei stark von der Position der Gluc-Fragmente abhängig. Auch für Cpr konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Zusammenhang mit der CG9186 induzierten Aggregation von LDs hergestellt werden. Hier gibt es allerdings Hinweise, dass die Interaktion in einem anderen Kontext eine Bedeutung haben könnte. Auf Organebene werden Cpr und sein Redoxpartner CYP4G1 sehr stark in Oenozyten exprimiert (Lycett *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2012). Oenozyten sind endokrine Zellen, die verschiedene Funktionen im Lipid-Metabolismus haben (zusammengefasst in Makki *et al.*, 2014). So führt z.B. Hungerstress Cpr abhängig zur Bildung von LDs in den Oenozyten (Cinnamon *et al.*, 2016; Gutierrez *et al.*, 2007). Auch in adulten Tieren wurde dieser Effekt beobachtet. Hier konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess von *Drosophila* insulin-like peptide 6 (*dilp6*) aus dem Fettkörper induziert wird (Chatterjee *et al.*, 2014). Die in dieser Arbeit generierte CG9186 Mutante hingegen weist eine geringere *dilp6* Expression und eine höhere Sensitivität gegenüber Hungerstress auf. *In vivo*

Versuche müssen hier künftig zeigen, ob dieser Effekt mit Oenozyten-LDs und *cpr* in Verbindung steht. Des Weiteren werden in den Oenozyten adulter Tiere Hydrocarbon-Verbindungen für die Cuticula synthetisiert, die das Insekt vor Trockenstress schützen oder als Pheromone wirken können (Billeter *et al.*, 2009; Wicker-Thomas *et al.*, 2015). RNAi von *cpr* in den Oenozyten führt zu einer erhöhten Mortalität zum Zeitpunkt des Schlüpfens adulter Tiere und zu einer drastisch reduzierten Menge an cutikulären Hydrocarbonen. Diese Tiere zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Trockenstress (Qiu *et al.*, 2012). Die CG9186 Mutanten hingegen sind vor Trockenstress geschützt (Abbildung 40). CG9186 könnte also ein negativer Regulator von *cpr* sein.

4.2.4 PDGF- and VEGF-receptor related (PVR)

Das *Drosophila* Protein PDGF- and VEGF-receptor related (Pvr) ist ein Homolog der *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs) aus Vertebraten (Heino *et al.*, 2001). VEGFRs werden in Endothel- und bestimmten Hämatopoetischen Zellen exprimiert und gehören zur Familie der VEGFR/*platelet derived growth factor* (PDGF) Tyrosinkinase Rezeptoren (zusammengefasst z.B. in Robinson and Stringer, 2001). Sie spielen bei der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen (Dainiak *et al.*, 1983) sowie von Endothelzellen (Breier *et al.*, 1992) eine wichtige Rolle. Sie tragen damit zur Angiogenese bei und haben hierüber Einfluss auf Tumorgenese und Metastasierung (zusammengefasst in Breier, 2000).

Wie seine humanen Homologe lokalisiert *Drosophila* Pvr hauptsächlich in der Plasmamembran (Harris *et al.*, 2007; Jékely *et al.*, 2005; Uhlén *et al.*, 2015). Dieser Befund wurde in dieser Arbeit unter Verwendung eines Pvr-eGFP Konstruktes bestätigt. Allerdings zeigt sich hier auch eine Lokalisation auf vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle und vereinzelt auch um die LDs (Abbildung 18). Die durchgeführten Luciferase Komplementations-Experimente konnten die in der Co-IP gemessenen Interaktionen nicht bestätigen (Abbildung 17). Hier stellt sich nun die Frage, ob es um ein falsch-positives Ergebnis aus der Co-IP oder ein falsch negatives Ergebnis aus dem Luciferase Komplementations-Experiment handelt. Ein limitierender Faktor bei der Aussagekraft des Luciferase Komplementations-Experimentes könnte die Größe von Pvr sein. Das Protein existiert in verschiedenen Spleißvarianten, von denen Variante PA mit 1509 Aminosäuren (170,321 kDa) die quantitativ bedeutendste ist (Heino *et al.*, 2001). Diese Variante wurde auch für die Klonierung der Pvr Expressions-Konstrukte gewählt. Die Gluc-Fragmente sind zwar über einen flexiblen Linker mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert (Kolkhof *et al.*, 2017), die Größe von Pvr könnte dennoch dazu führen, dass die beiden Fragmente trotz Interaktion von Pvr mit CG9186 zu weit voneinander entfernt sind, um ein

Signal zu erzeugen. Ein Problem mit großen Proteinen (über 1000 Aminosäuren) wurde für die angewendete Technik bislang allerdings noch nicht berichtet oder diskutiert (Kolkhof *et al.*, 2017; Remy und Michnick, 2006).

Pvr wird in embryonalen Hämocyten (Cho *et al.*, 2002; Heino *et al.*, 2001) und Speicheldrüsen (Harris *et al.*, 2007) exprimiert. Die Expression geht während den frühen larvalen Stadien (L1 und L2) stark zurück, steigt im L3 Stadium wieder an und bleibt dann bis ins adulte Tier konstant (Heino *et al.*, 2001). Es trägt eine Signalsequenz, gefolgt von sieben Ig-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer Split-Tyrosin Kinase Domäne. Die Organisation der Domänen entspricht der der Säuger-Rezeptoren (Heino *et al.*, 2001). In Flügelscheiben wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Pvr zur Aktivierung verschiedener onkogener Signalwege (inklusive Ras, PI3K/Akt, Raf/ERK, Src und JNK) und darüber zur Bildung von Tumoren führt (Wang *et al.*, 2016). Das Pvr induzierte Tumorgewebe zeigt eine metabolische Reprogrammierung von der oxidativen Phosphorylierung hin zur aeroben Glycolyse (Wang *et al.*, 2016). Diese Eigenschaft von Tumorzellen wird auch als Warburg Effekt bezeichnet (Warburg, 1956; Weinhouse *et al.*, 1956). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Pvr zu einer Induktion verschiedener metabolischer Gene führt, darunter neben *thor* und *Juvenile hormone-inducible protein 1 (Jhl-1)* auch *cpr* (Wang *et al.*, 2016). Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass CG9186 mit Cpr interagiert (Abbildung 17) und die Expression von *thor* beeinflusst (Abbildung 49). Außerdem legt die in der Literatur und den CoIP Experimenten in dieser Dissertation (Tabelle 17) beschriebene Interaktion zwischen CG9186 und den JHEHs (Guruharsha *et al.*, 2011) eine Beteiligung am Juvenilhormon-Signalweg nahe. In diesem Zusammenhang müssen weitere Experimente die physiologische Bedeutung einer möglichen Interaktion zwischen CG9186 und Pvr klären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Co-IP Experimenten Interaktoren von CG9186 identifiziert und drei von vier Kandidaten mit einer weiteren Methode bestätigt. Um auch eine funktionelle Bedeutung der Interaktion zu zeigen, wurden Experimente im Hinblick auf die bei Thiel *et al.* (2013) beobachtete CG9186 induzierte LD Aggregation durchgeführt. Dieser Phänotyp ist gut reproduzierbar, quantifizierbar und kann mikroskopisch leicht detektiert werden. Leider zeigte hier keiner der Kandidaten einen Effekt. Dies schließt eine Interaktion allerdings nicht aus. Schon bei Thiel *et al.* (2013) werden unterschiedliche funktionelle Bereiche innerhalb von CG9186 diskutiert. So legen die mit der Serin-Austauschvariante von CG9186 gewonnenen Daten nahe, dass die katalytische Triade und damit die mögliche enzymatische Funktion gegen eine LD-Aggregation zu wirken („*contra clustering*“) scheint, während das C-terminale Ende des Proteins diese begünstigt („*pro clustering*“) (Thiel *et al.*, 2013). Liegt die Hauptfunktion von

CG9186 außerhalb der Positionierung von LDs, ist auch die Aggregation kein geeigneter Marker für die Beurteilung einer Interaktion. Erst die mit der CG9186 Funktionsverlustmutante beobachteten Phänotypen werfen ein neues Licht auf die Interaktoren. So zeigen sich zum Beispiel beim *nutrient sensing*, der larvalen Entwicklung, dem Insulinsignalweg und der Resistenz gegenüber Trockenstress Parallelen zu den Funktionen von Gp93 und Cpr. Gerade diese Phänotypen müssen künftig *in vivo* näher untersucht werden. So stellt sich zum Beispiel die Frage, ob die Resistenz der CG9186 Mutante gegenüber Trockenstress auf einer cpr-induzierten Veränderung der cuticulären Hydrocarbon-Zusammensetzung beruht.

Zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit initial charakterisierten potentiellen CG9186 Interaktoren fanden sich in den Co-IP Versuchen weitere vielversprechende Kandidaten (Tabelle 17). Hierzu gehören zum Beispiel die Juvenile hormone expoxid hydrolasen (Jheh). In der Literatur wurde bereits eine Interaktion von CG9186 mit Jheh3 beschrieben (Guruharsha *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Dissertation wurden Jheh1 und Jheh2, nicht aber Jheh3 als mögliche Interaktoren identifiziert. Jheh3 wird in den verwendeten Kc167 Zellen allerdings nur sehr schwach exprimiert (www.flybase.org (FB2017_02)). Dies könnte erklären, warum das Protein in den CoIP Experimenten nicht identifiziert werden konnte. Gerade die in der Mutante beobachtete nahrungsbedingt veränderte Entwicklungszeit könnte durch die Interaktion von CG9186 mit Jheh1-3 erklärt werden. So wurde in verschiedenen Insekten gezeigt, dass Jheh die Juvenilhormon (JH)-Spiegel reguliert und so direkt an der Steuerung der larvalen Entwicklung beteiligt ist (Seino *et al.*, 2010; Tusun *et al.*, 2017). Auch andere Phänotypen der CG9186 Mutante könnten im Kontext einer Interaktion mit den Jheh Enzymen untersucht werden. In adulten *Drosophila* Weibchen ist zum Beispiel unter Hungerbedingungen Jheh2 und 3 hochreguliert (Terashima und Bownes, 2005). In einem Experiment könnte nun überprüft werden, ob diese Regulation auch in der Hungerstress-sensitiven CG9186 Mutante besteht. Ein weiterer vielversprechender identifizierter Kandidat ist Krüppel Homolog 2 (Kr-h2). Kr-h2 ist in JH-defizienten Tieren herunterreguliert (Liu *et al.*, 2009). Auch die Aktivität des Transkriptionsfaktors Kr-h1 wird von JH gesteuert (Kayukawa *et al.*, 2012), ist aber in der CG9186 Mutante nicht verändert (Abbildung 48).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Co-IPs fanden unter Verwendung von Kc167 Zellen statt. Es besteht die Möglichkeit, dass einige für CG9186 organismisch relevante Interaktoren in diesen Zellen nicht exprimiert werden. Co-IPs aus Lysaten anderer Zellen, Gewebe oder ganzer Tiere könnten hier weitere, eventuell sogar organspezifische Interaktoren nachweisen.

4.3 Ubiquitinierung von CG9186

Die Funktion und Stabilität von Proteinen kann durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden (Voet *et al.*, 2008). Ein Beispiel für eine solche Modifikation ist die sogenannte Ubiquitinierung, also die Verknüpfung eines Proteins mit Ubiquitin über Isopeptidbindungen (Übersichtsartikel Weissman, 2001). Für Ubiquitinierungen werden Lysinreste im Zielprotein verwendet (Übersichtsartikel Finley *et al.*, 2012; Varshavsky, 1997), aber auch die Ubiquitinierung anderer Reste wurde berichtet (Cadwell and Coscoy, 2005). Ubiquitin kann über sieben verschiedene Lysinreste selbst ubiquitiniert werden (Übersichtsartikel Sadowski *et al.*, 2012). Je nachdem, in welcher Weise Ubiquitin mit dem Zielprotein verknüpft wird, hat dies unterschiedliche Signalwirkungen. Das Anhängen von Ketten miteinander verknüpfter Ubiquitin-Moleküle (Polyubiquitinierung) dient meist als Signal für den proteasomalen Abbau des Zielproteins (Übersichtsartikel Finley *et al.*, 2012). Die Bindung eines einzelnen Ubiquitins (Monoubiquitinierung) oder mehrerer einzelner Ubiquitine an verschiedene Lysin-Reste im Zielprotein (Multiubiquitinierung) kann Prozesse wie DNA-Reparatur, Gen-Expression sowie den intrazellulären Transport und die Lokalisation von Membranrezeptoren (z.B. Tyrosinkinase Rezeptoren) steuern (Übersichtsartikel Acconcia *et al.*, 2009; Sadowski *et al.*, 2012). Auch die Biologie der LDs wird durch Ubiquitinierung beeinflusst. Für das LD-assoziierte Fat-specific protein 27 (Fsp27) wurde eine Ubiquitinierungs-abhängige proteasomale Degradation nachgewiesen (Nian *et al.*, 2010). Ein weiteres Beispiel ist die Ubiquitinierung von ancient ubiquitous protein 1 (AUP1), dessen Überexpression zur Aggregation von LDs führt (Lohmann *et al.*, 2013). Werden alle Lysine in AUP1 gegen Arginine ausgetauscht und eine Ubiquitinierung damit unterdrückt, bleibt zwar die LD-Lokalisation bestehen, der LD-Aggregationsphänotyp geht aber verloren (Lohmann *et al.*, 2013). Schon eine Monoubiquitinierung von AUP1 reicht aus, um den Phänotyp zu ermöglichen (Lohmann *et al.*, 2013).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde überprüft, ob auch die bei CG9186 beobachtete LD-Aggregation (Thiel *et al.*, 2013) von einer Ubiquitinierung abhängt. Die Detektion einer Ubiquitinierung kann massenspektrometrisch erfolgen. Hierfür macht man sich zunutze, dass nach dem Trypsin-Verdau im Rahmen der MS-Probenvorbereitung zwei Glycinreste des Ubiquitins an Lysinen des Zielproteins verbleiben und so zu einer Erhöhung der Peptidmasse führen (zusammengefasst in Peng, 2008). Im Rahmen der Co-IP Experimente dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CG9186 an mindestens zwei Lysinen im C-Terminus des Proteins (Position 271 und 280) ubiquitiniert werden kann (siehe Kapitel 3.3.1). Die physische Interaktion zwischen CG9186 und Ubiquitin konnte durch Luciferase Komplementations-Experimente bestätigt werden. Wie Abbildung 26

zeigt, besteht eine starke Interaktion nur dann, wenn das Gluc-Fragment C-terminal mit CG9186 fusioniert ist. Auch dies spricht für den C-Terminus als Ziel einer möglichen Ubiquitinierung. Wie mit Deletions-Konstrukten gezeigt wurde, ist das C-terminale Ende von CG9186 (Aminosäuren 201-307) für die CG9186 induzierte LD-Aggregation essentiell (Thiel *et al.*, 2013). Um die Rolle der Ubiquitinierung bei diesem Phänotyp zu untersuchen, wurde eine Variante von CG9186 erstellt, in der alle 16 Lysine gegen Arginine ausgetauscht wurden (16K2R, siehe Abbildung 28). Wie die Bilder in Abbildung 27 zeigen, lokalisiert das CG9186(16K2R) Konstrukt zwar auf LDs, führt im Vergleich zum Wildtypprotein aber nicht zu deren Aggregation. Die Lysine sind also für den Aggregations-Phänotyp von Bedeutung. Durch unterschiedliche Lysin-Austausch-Konstrukte (Abbildung 28) und einer Quantifizierung des Aggregations-Phänotyps (Abbildung 30) konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Lysine essentiell für die CG9186-induzierte LD-Aggregation sind. Die vorab identifizierten Lysine in Position 271 und 280 alleine reichen für die Ausbildung des Phänotyps allerdings nicht aus. Aufgrund der Befunde kann davon ausgegangen werden, dass eine Multiubiquitinierung an mehreren Lysinresten vorliegt. Es stellt sich nun die Frage, welcher Mechanismus hinter Aggregations-Phänotypen steht. Denkbar sind hier mindestens zwei Möglichkeiten, die im Folgenden näher diskutiert werden:

Möglichkeit 1: Die enzymatische Aktivität von CG9186 führt zur An- oder Abreicherung eines Metaboliten, der die Membraneigenschaften verändert (z.B. ein Phospholipid oder Sterol). Diese Änderung könnte dazu führen, dass LD-Fusionen nur noch erschwert stattfinden können und die Zelle daher viele kleine aggregierte LDs aufweist. Die enzymatische Aktivität könnte durch die Ubiquitinierung von CG9186 gesteuert werden. Gegen die An- oder Abreicherung eines Metaboliten durch die enzymatische Aktivität von CG9186 spricht, dass auch die wahrscheinlich katalytisch inaktive Form des Proteins (S119A) zur Aggregation von LDs führt. Diese ist sogar stärker als nach Überexpression des Wildtypproteins (Thiel *et al.*, 2013), was auf der anderen Seite eine Rolle der katalytischen Triade nicht ganz ausschließt. Ein *knock down* von CG9186 hat jedoch keinen offensichtlichen Einfluss auf die Morphologie und Verteilung zellulärer LDs (Abbildung 23). Wie Experimente mit aufgereinigten LDs aus den Fettkörpern CG9186-mutanter Larven gezeigt haben, ist die Phospholipid-Zusammensetzung im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle unverändert (Alisa Gahlen, Masterarbeit). Diese Befunde schließen die enzymatische Funktion als Ursache für den Phänotyp zwar nicht aus, sprechen aber dagegen.

Möglichkeit 2: Das CG9186 Protein könnte aufgrund seiner hohen Abundanz auf den LDs (Beller *et al.*, 2006) und starken LD-Bindungsaffinität (Kory *et al.*, 2015) einen

strukturellen Einfluss auf die Membran haben, der nicht oder nur bedingt abhängig von der enzymatischen Funktion ist. Diese Möglichkeit ist auf Basis der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse als wahrscheinlicher zu betrachten. Wie die Bilder in Abbildung 27 zeigen, hat die Ubiquitinierung nicht nur einen Einfluss auf die Aggregation der LDs, sondern auch auf die Lokalisation von CG9186. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein lokalisieren die Varianten vier (14K2R(271,280K)) und fünf (16K2R) nicht auf allen, sondern bevorzugt auf größeren LDs. Dass diese Konstrukte auf einigen kleineren LDs nicht zu finden sind, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Ubiquitinierung das CG9186-Protein auf den LDs stabilisiert. In einer 2015 erschienen Studie wurde gezeigt, dass ein Schrumpfen von LDs eine Veränderung der Proteinzusammensetzung der LD-Membran zur Folge hat. Da durch die sinkende Membranoberfläche weniger Protein-Bindungsstellen zur Verfügung stehen, kommt es zu einer relativen Anreicherung von Proteinen (*protein crowding*), in dessen Folge weniger stark bindende Proteine die Membran verlassen (Kory *et al.*, 2015). Wie in dieser Studie gezeigt wurde, besitzt CG9186 eine sehr hohe Bindungsaffinität und verbleibt länger auf der Membran als andere LD-assoziierte Proteine (z.B. CCT1) (Kory *et al.*, 2015). Dass CG9186(16K2R) auf manchen kleinen LDs nicht oder nur schwach lokalisiert, könnte bedeuten, dass das Fehlen der Lysine in CG9186 zu einer verminderten Bindungsaffinität führt. Schrumpfen nun durch lipolytische Prozesse einige LDs in den Zellen, dissoziiert CG9186, während es auf wachsenden oder unveränderten LDs verbleibt. Um diese Hypothese zu bestätigen, könnten künftig Zellen mikroskopiert werden, die erst kurz zuvor mit Ölsäure behandelt wurden. Diese Zellen werden fast ausschließlich wachsende LDs enthalten, die entsprechend der Hypothese alle eGFP-CG9186(16K2R) tragen. Im Gegenzug werden Zellen mikroskopiert, die über eine gewisse Zeit mit Ölsäure behandelt und anschließend einem Hungerreiz ausgesetzt wurden. In diesen Zellen werden die LDs als Reaktion auf den Hungerreiz schrumpfen, und CG9186(16K2R) wird schneller von der Membran dissoziieren als das Wildtypprotein.

Ein Faktor bei der Stabilisierung von CG9186 auf den LDs, und auch eine Erklärung für den LD-Aggregations-Phänotyp, ist die Eigenschaft des Proteins, Homodimere zu bilden (Kolkhof *et al.*, 2017). In Luciferase Komplementations-Experimenten wurde gezeigt, dass CG9186 sehr stark mit sich selbst interagiert (Kolkhof *et al.*, 2017). Diese Interaktion scheint in einem gewissen Maß Lysin-abhängig zu sein, da CG9186(16K2R) eine schwächere Interaktion mit sich selbst zeigt als zwei Wildtypproteine. Auch die CG9186-Interaktion mit Ubiquitin besteht nach der Mutagenese weiter, ist aber schwächer (Kolkhof *et al.*, 2017). Wird die CG9186(16K2R) Variante gegen ein Deletions-Konstrukt getestet, bei dem das C-Terminale Ende von CG9186 fehlt (Aminosäuren 201-307), geht die Dimerisierung ganz verloren (Kolkhof *et al.*, 2017). Die Ergebnisse deuten darauf hin,

dass CG9186 Ubiquitin-abhängig Homodimere bildet. Der C-Terminus und die Lysine des Proteins spielen hierbei eine zentrale Rolle. Da das 16K2R Konstrukt dennoch Ubiquitin bindet, müssen im Protein müssen also Bereiche sein, die entweder Lysin-unabhängig ubiquitiniert werden können oder Ubiquitin nichtkovalent binden (siehe Abbildung 50 B). In Abbildung 50 C sind Hypothesen dargestellt, wie die Fähigkeit zur Dimerisierung die Aggregation von LDs (C) ermöglicht. So können CG9186-Moleküle Dimerisieren, die sich auf unterschiedlichen LDs befinden, und so zu einer Zusammenlagerung der LDs führen (C'). Eine andere Variante ist die Verknüpfung von CG9186 Molekülen auf dem gleichen LD (C''). Dies könnte verhindern, dass LDs Lipide austauschen oder zu einem größeren LD fusionieren, was zu einer Ansammlung vieler kleiner LDs führt.

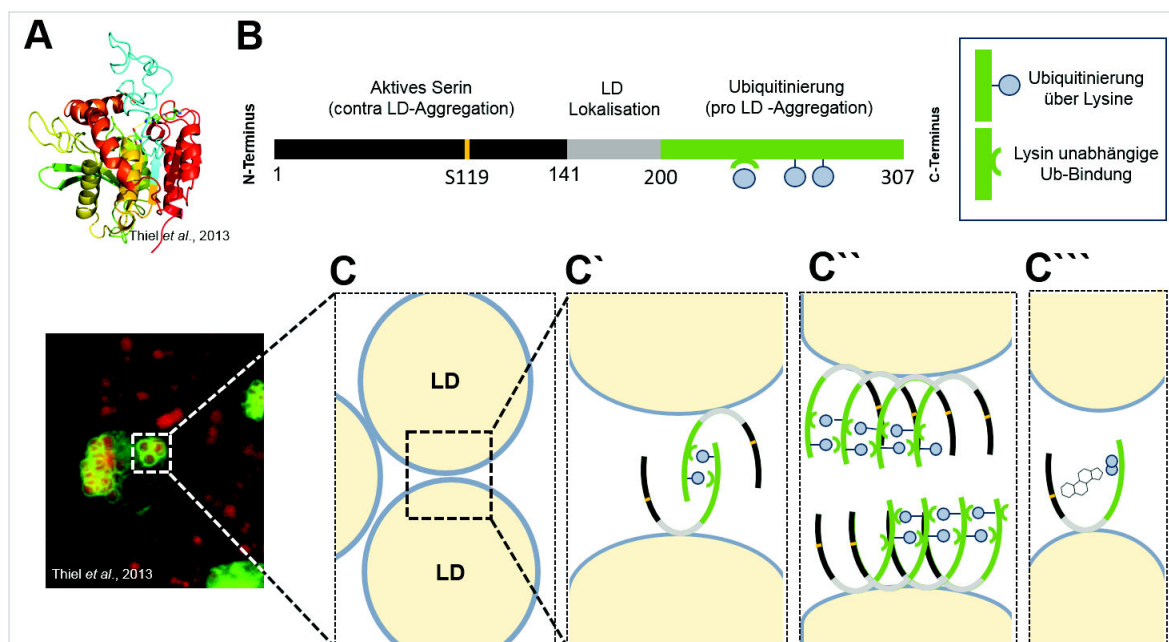


Abbildung 50: CG9186-Induzierte Aggregation von LDs. (A) Struktur von CG9186 auf Basis von Homologie-Modellierungen. In Türkis zu erkennen ist die LD-Bindedomäne (Thiel *et al.*, 2013). In (B) ist eine schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von CG9186 in Anlehnung an Thiel *et al.* (2013) gezeigt. (C) zeigt mögliche Mechanismen der CG9186-induzierten Aggregation von LDs.

Das Modell der quervernetzten CG9186 Moleküle liefert auch eine Erklärung dafür, warum das Protein eine so große Bindungsaffinität zu LDs besitzt. Die Verknüpfung der CG9186 Moleküle in beiden Hypothesen beruht dabei sowohl auf einer klassischen Ubiquitinierung (Isopeptidbindung an einem Lysin) als auch an einer Lysin-unabhängigen Bindung von Ubiquitin. Es muss allerdings die Frage geklärt werden, ob CG9186 Dimere oder sogar Polymere bilden kann. Durch die Luciferase Komplementations-Technik konnte nur gezeigt werden, dass die Moleküle miteinander interagieren. In Western Blots unter Verwendung eines CG9186-spezifische Antikörper (Thiel *et al.*, 2013) zeigt sich eine einzelne klare Bande. Die Di- oder Polymerisierung könnte also in einer Form vorliegen, die im Rahmen der Probenaufbereitung mit Lämmli Puffer verloren geht. Abbildung 50

(C“) zeigt, warum die enzymatische Aktivität einer LD-Aggregation entgegenwirken könnte. Wie von Thiel *et al.* (2013) gezeigt wurde, ist der LD-Aggregations-Phänotyp nach Überexpression einer katalytisch inaktiven Variante von CG9186 stärker als beim Wildtypprotein. Während der enzymatischen Reaktion in Serin-Hydrolasen wird das Substrat kovalent an das Enzym gebunden (Polgár, 2005). Sollte diese Bindung die sterischen Eigenschaften des Proteins verändern, stünde ein gewisser Anteil der CG9186-Moleküle nicht zur Di/Polymerisierung bereit. Da es bei der S119A Variante nicht zu einer Substratbindung kommt, ist der Effekt hier stärker.

4.4 Generierung und Analyse einer CG9186 *loss-of-function* Mutante

Um die Funktion von Genen zu entschlüsseln, finden in der Genetik zwei Vorgehensweisen Anwendung. Bei der klassischen Genetik (im Englischen *forward genetics* genannt) werden Phänotypen beobachtet und auf ihre genetische Ursache hin untersucht. Häufig werden vorher ungerichtete Mutationen (z.B. durch Ethylmethansulfonat) induziert (Greene *et al.*, 2003). Bei der reversen Genetik (im Englischen *reverse genetics*) wird gezielt Einfluss auf ein bestimmtes Gen genommen und daraus resultierende Phänotypen untersucht. Dies kann durch *knock down* (z.B.: Agrawal und Hardin, 2016), Überexpression (z.B.: M'Angale und Staveley, 2017) oder Deletionen (z.B.: Winzeler *et al.*, 1999) geschehen. Um die Funktion von CG9186 zu erforschen, wurden in der vorliegenden Arbeit unter Anwendung der CRISPR/Cas9 Technik CG9186 Nullallele generiert (siehe Methodenteil Kapitel 2.2.1.9, Ergebnisteil Kapitel 3.4.1). Hierbei wurden zwei verschiedene gRNAs zur Expression gebracht, um mit der Endonuklease Cas9 ein ca. 1,1 kb großen Sequenzabschnitt aus dem offenen Leserahmen von CG9186 (inklusive Startcodon) zu deletieren (Abbildung 31 A und B). Wie im Ergebnisteil dargelegt, entwickelten sich von den über 200 injizierten Embryonen nur 36 zu adulten Tieren. In Einzelkreuzungen konnten hiervon 33 Individuen erfolgreich mit *Balancer*-Fliegen (tragen *Balancer*-Chromosomen) verpaart werden. Wie durch PCR gezeigt wurde (Abbildung 31 C), produzierten zwei dieser Tiere Nachkommen mit Mutationen im CG9186 Gen. Die Effizienz der hier durchgeführten Mutagenese liegt mit 6 % innerhalb des Bereichs, der in der Literatur für CRISPR/Cas9 (von 4 bis 88 %) beschrieben wurde (Bassett *et al.*, 2013).

Lediglich bei den Nachfahren des Tieres #35 konnten homozygot CG9186-mutante Tiere (also ohne *Balancer*-Chromosom) identifiziert werden. Mit diesen Tieren wurden für die weitere Analyse homozygote Fliegenlinien generiert. Auch nach mehrmaligem

Rückkreuzen der Nachfahren von Tier #6 konnten keine homozygoten Tiere identifiziert werden. Eventuell könnte die Mutagenese einen homozygot letalen *off-target* Effekt haben, der wie CG9186 ebenfalls auf dem dritten Chromosom liegt. Da die gRNA Erkennungssequenz im CRISPR/Cas9 System nur 20 Basen (+ PAM Sequenz) beinhaltet (Kondo und Ueda, 2013), sind *off target* Effekte denkbar und werden in der Literatur auch diskutiert (Tycko *et al.*, 2016). In einer BLAST Suche mit den in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen wurden zwei Gene auf dem dritten Chromosom identifiziert (CG4080 und CG17362), die eine gewisse Sequenzidentität zu den verwendeten gRNAs aufweisen. Die Übereinstimmung liegt für CG4080 bei 56 % und für CG17362 bei 60 % (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul *et al.*, 1990). In der Literatur wurden bei CRISPR/Cas9 *off target* Effekte bis zu einer Anzahl von maximal 5 Basen-Fehlpaarungen (also ab 75 % Sequenzidentität) beobachtet (Zhang *et al.*, 2015). Ein *off target* Effekt ist demnach bei den verwendeten gRNA Sequenzen unwahrscheinlich.

Wie Abbildung 31 zeigt, sind die Nachfahren von Tier 35 im Hinblick auf die Läsion im CG9186 Gen nicht identisch. Allel 35.2 z.B. zeigt in der PCR eine Bande auf der Höhe des Wildtypamplifikats, in Western Blots konnte aber kein CG9186-Protein detektiert werden. Wie die Sequenzierung des Allels zeigte, hat Cas9 hier nur an einer der beiden Zielsequenzen geschnitten. Durch unpräzise Reparatur dieses Doppelstrangbruchs (z.B. durch *Non-homologous end-joining* (NHEJ)) kam es zu einer Leserasterverschiebung. Die anderen Allele weisen die vorausgesagte 1,1 kb Deletion auf. Um einen ansonsten gleichen genetischen Hintergrund zu gewährleisten, wurden die einzelnen Nullallele sowie die Kontrolllinie für drei Generationen mit den gleichen *Balancer*-Fliegen gekreuzt.

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist CG9186 weder für das Überleben noch die Fortpflanzung von *Drosophila* essentiell (Abbildung 55). Dennoch hat der Verlust des Gens tiefgreifende physiologische Folgen für die Tiere. Im Folgenden werden die sich aus der Mutation ergebenden Konsequenzen zunächst für die adulten Tiere und anschließend für die Larven diskutiert.

4.4.1 CG9186 Verlust in adulten Tieren

4.4.1.1 CG9186 mutante Fliegen weisen niedrigere Lipid-Spiegel auf

Wie gezeigt werden konnte, sind adulte CG9186-mutante Tiere bei ansonsten gleichem genetischen Hintergrund kleiner und leichter als die Kontrolltiere und weisen eine schwächere Melanisierung auf (Abbildung 32 A und B). Eine Ursache für diese Phänotypen könnte laut Literatur in einer schlechten Nährstoffversorgung während der larvalen Entwicklung oder einer Störung im TOR (*target of rapamycin*)- oder IIS (*insulin*/IGF

(insulin-like growth factor)-like signalling) liegen (Ormerod *et al.*, 2017; Shakhmantsir *et al.*, 2014; Tu *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf mRNA-Ebene tatsächlich ein Einfluss von CG9186 auf den Insulin-Signalweg nachgewiesen werden (Abbildung 48 und Abbildung 49). Außerdem zeigen die Tiere ein gestörtes *nutrient sensing*, also die Fähigkeit, sich an eine veränderte Zusammensetzung der Nahrung adaptieren (Abbildung 45). Dies lässt auf eine Beteiligung des TOR-Signalweges schließen, und steht damit im Einklang mit den in der Literatur gemachten Beobachtungen zur Größe und Melanisierung adulter Tiere. Neben einer geringeren Körpergröße zeigen adulte CG9186-mutante Fliegen um 20-30 % niedrigere Triacylglycerol (TAG)-Spiegel als die Kontrolllinie (Abbildung 32). Dieses Ergebnis bestätigt ähnliche von Thiel *et al.* (2013) nach CG9186-RNAi gemachte Beobachtungen. TAG ist die quantitativ bedeutendste Speicherform von Lipiden und dient unter anderem zur Aufrechterhaltung der Energie-Homöostase (Voet *et al.*, 2008). Da CG9186 als Lipase annotiert ist, überrascht der niedrige Lipidspiegel der CG9186-mutanten Tiere. Eine lipolytische Funktion von CG9186 vorausgesetzt, wäre nach einem Verlust eher mit erhöhten Lipid-Speichern zu rechnen. Dies wurde zum Beispiel nach Verlust der Lipase Brummer beobachtet (Grönke *et al.*, 2005). Auch eine Cholesterolesterase Aktivität - wie sie für das murine Homolog von CG9186 postuliert wurde (Goo *et al.*, 2014) - ist unwahrscheinlich. Wie Abbildung 64 zeigt, weisen die Mutanten Fliegen signifikant niedrigere Cholesterolester Spiegel auf als die Kontrolllinie. Auch hier wäre nach Wegfall eines Enzyms mit Cholesterolesterase Aktivität eher mit einem Anstieg der Cholesterolester Spiegel zu rechnen (Wang *et al.*, 2017a). Es bleibt also die Frage nach der Ursache für die niedrigen Lipidspeicher. Es kommen mehrere Erklärungen in Frage:

Reduzierte Futteraufnahme CG9186-mutanter Tiere

CG9186 wird prominent in der larvalen Speicheldrüse exprimiert und ein *knock down* (Thiel *et al.*, 2013) sowie ein komplettes Fehlen von CG9186 (Abbildung 43) führt in diesem Organ zu einem Rückgang der dort vorhandenen LDs. Bislang ist unklar, welche Funktion die LDs in der Speicheldrüse besitzen. Eventuell könnte es durch das Fehlen von CG9186 und der LDs zu einer Funktionseinschränkung der Speicheldrüse kommen. Als Folge wären Probleme bei der Nahrungsaufnahme und ggf. eine Mangelernährung zu erwarten. Dies könnte auch erklären, warum die adulten Tiere kleiner sind und eine schwächere Melanisierung haben. Gegen diese Theorie spricht aber, dass L3 Larven keine veränderten TAG-Spiegel aufweisen (Abbildung 43). Da der Lipid-Phänotyp erst im adulten Stadium auftritt, wurde die Futteraufnahme adulter Tiere unter Verwendung von fluoreszierendem Futter quantifiziert. Es konnte allerdings kein Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle detektiert werden (Abbildung 33). Gegen eine grundsätzliche

Mangelernährung durch verringerte Futteraufnahme spricht außerdem, dass durch den Verlust von CG9186 zwar TAG betroffen ist, andere Energiespeicher (wie Glykogen) oder Transportformen metabolischer Energie (Glukose, Trehalose) hingegen nicht (Abbildung 34).

Gestörte Lipid-Speichermechanismen

Eine weitere Erklärung für die reduzierten Lipidspeicher könnte auf zellulärer Ebene zu suchen sein. Bei CG9186 handelt es sich um ein Protein mit hoher Abundanz auf den LDs (Beller *et al.*, 2006). Wie von Thiel *et al.* (2013) gezeigt, führt eine Überexpression von CG9186 zu einer Aggregation vieler kleiner LDs. Es wird diskutiert, dass eine Überexpression von CG9186 dazu führt, dass Zellen Probleme bei der Speicherung erhöhter Lipidmengen haben (Thiel *et al.*, 2013). Darüber hinaus haben Experimente in der AG Beller gezeigt, dass LDs aus den Fettkörpern CG9186-mutanter L3-Larven eine veränderte Proteinzusammensetzung besitzen (Alisa Gahlen, Masterarbeit). Der Verlust von CG9186 führt dazu, dass die Abundanz bestimmter Proteine auf den LDs sinkt (z.B.: CG5167, CG14715, CG10924) oder steigt (z.B. CG11594). Für keines dieser Proteine wurde bislang ein direkter Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel gezeigt (www.flybase.org (FB2017_02)). Dennoch könnte die veränderte Proteinkomposition der LD-Membran zu einer Funktionsbeeinträchtigung der LDs führen und so eine gestörte zelluläre Speicherung oder Remobilisierung von Lipiden zur Folge haben. Wie aber die Experimente mit fettreichem Futter oder Energiemangel gezeigt haben, reagieren die Lipidspeicher der CG9186-mutanten Tiere flexibel auf sich ändernde Nährstoff-Verfügbarkeiten (Abbildung 35). Allerdings liegt die Gesamtmenge der gespeicherten Lipide in den CG9186 mutanten Tieren dabei häufig unterhalb der Lipidmenge der Kontrolle.

Endokrine Modulation der Lipid-Homöostase

Die Aufrechterhaltung von Energiehomöostase und Metabolismus wird von einem komplexen Zusammenspiel diverser Signaltransduktionswege gesteuert. In mehrzelligen Organismen erfordert dies den Austausch von Signalen zwischen Organen und Geweben (Voet *et al.*, 2008). Von besonderer Bedeutung ist hier der evolutionär konservierte IIS (Voet *et al.*, 2008). Die Ausschüttung des Peptidhormons Insulin führt zur Aufnahme von Glukose in Zellen, induziert darüber hinaus aber auch Proteinsynthese und Liponeogenese bei gleichzeitiger Hemmung der Lipolyse (Voet *et al.*, 2008). Auch *Drosophila* verfügt über einen IIS (LeRoith *et al.*, 1993). Hier dienen die sogenannten *Drosophila insulin like peptides* (DILPs) als zentrale Mediatoren (Übersichtsartikel Nässel und Vanden Broeck, 2016). Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit für Larven (Abbildung 48)

und adulte Tiere (Abbildung 41) gezeigt, führt der Verlust von CG9186 auf mRNA Ebene zu einer veränderten Expression von Genen innerhalb des IIS sowie von solchen, die direkt vom IIS beeinflusst werden. Neben dem IIS steuern auch andere endokrine Signale metabolische Prozesse. Androgene wie Testosteron beeinflussen zum Beispiel Lipolyse, Liponeogenese, die Differenzierung von Adipozyten sowie die Insulin Sensitivität (Übersichtsartikel Newell-Fugate, 2017). In Insekten wurden für das Steroidhormon Ecdyson sowie für Juvenilhormon ebenfalls Effekte auf den Fettstoffwechsel gezeigt (Kamoshida *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017). Wie die Versuche zur larvalen Entwicklung (Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46) nahelegen, ist ein Einfluss von CG9186 auf diese Hormone wahrscheinlich (Die Ergebnisse zu den larvalen Experimenten werden im Detail an späterer Stelle diskutiert). Außerdem konnte im *in vitro*-Teil dieser Arbeit sowie in der Literatur gezeigt werden, dass CG9186 mit verschiedenen Juvenilhormon Epoxidhydrolasen (Jheh 1-3) interagiert (siehe Kapitel 4.2.4, Tabelle 17, Guruharsha *et al.*, 2011). Auch ein möglicher Einfluss von CG9186 auf die Oenozyten als endokrine Zellen, wie für den CG9186 Interaktor Cpr in Kapitel 4.2.3 diskutiert wurde, könnte eine Grundlage für den Phänotyp sein. Die wahrscheinlichste Erklärung für die verringerten Lipidspeicher liegt also in einem veränderten endokrinen Haushalt der CG9186 mutanten Tiere. Auch die Tatsache, dass die adulten Tiere kleiner sind als die wildtypische Kontrolle, kann durch ein Zusammenspiel von IIS, Ecdyson und Juvenilhormon erklärt werden (Colombani *et al.*, 2005; Mirth *et al.*, 2014).

4.4.1.2 CG9186 beeinflusst geschlechtsspezifisch die Lebensspanne

Wie epidemiologische Studien am Menschen gezeigt haben, geht starkes Übergewicht mit einer verkürzten Lebensspanne einher (Fontaine *et al.*, 2003). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig und beeinflussen sich gegenseitig. Stark übergewichtige Menschen zeigen zum Beispiel erhöhte Biomarker für oxidativen Stress und Inflammation (Pahwa *et al.*, 2017). Außerdem besitzen sie ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Zalesin *et al.*, 2008), Insulinresistenz (Übersichtsartikel Samuel *et al.*, 2010) oder Krebs (Taherogorabi *et al.*, 2016). Für eine reduzierte Nahrungszufuhr (engl.: *dietary restriction*) und dem damit einhergehenden moderaten Untergewicht wurde in mehreren Modellorganismen sowie im Menschen eine lebensverlängernde Wirkung gezeigt (Übersichtsartikel Kapahi *et al.*, 2016). Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, ob die CG9186 mutanten Fliegen mit ihrem verminderten Körpergewicht und Körperfettanteil eine im Vergleich zu den Kontrolltieren veränderte Lebensspanne aufweisen. Wie Abbildung 36 zeigt, hat die Mutation in den Weibchen eine lebensverlängernde Wirkung. Dieser Effekt ist quantitativ schwach, allerdings hoch signifikant ($p < 0,001$). Bei den Männchen hingegen lässt sich ein gegenteiliger Effekt beobachten. Schon ab Tag 20 zeichnet sich eine erhöhte Sterblichkeit der CG9186

mutanten Tiere ab. Nach 40 Tagen leben nur noch 76 % der mutanten Tiere, aber 94 % der Kontrolltiere. Interessanterweise nähern sich die Kurven nach 60 Tagen wieder an. Es gibt also mutante Männchen, die ebenso lang leben wie die Kontrolle. Die Überlebenskurve der CG9186 mutanten Tiere ist nicht als Ganzes nach Links verschoben, sondern verläuft flacher. Sind alle Individuen einer Versuchsgruppe gleichermaßen benachteiligt, dann ist eine Überlebenskurve zu erwarten, die nach links verschoben ist, in ihrem Verlauf aber der Kontrolle ähnelt. Dies wurde z.B. nach Deletion von Genen wie dMRP 4 (Schutz vor oxidativem Stress (Huang *et al.*, 2014)) oder nach Exposition mit Ethanol (Jahromi *et al.*, 2015) beobachtet. Ist nur ein Teil der Tiere einer Versuchsgruppe betroffen, dann wäre eher eine veränderte Form der Kurve zu erwarten. Eine solche Kurve könnte zum Beispiel nach dem Verlust eines Tumorsuppressorgens beobachtet werden. In bestimmten Individuen innerhalb der Kohorte kommt es aufgrund der Mutation stochastisch zu einem Tumor. Individuen, bei denen dieses Ereignis nicht eintritt, haben keinen Nachteil im Hinblick auf ihre Lebenserwartung. Abbildung 51 stellt die Überlebenskurven nach Deletion von dMRP 4 (Huang *et al.*, 2014) und CG9186 (diese Arbeit) gegenüber.

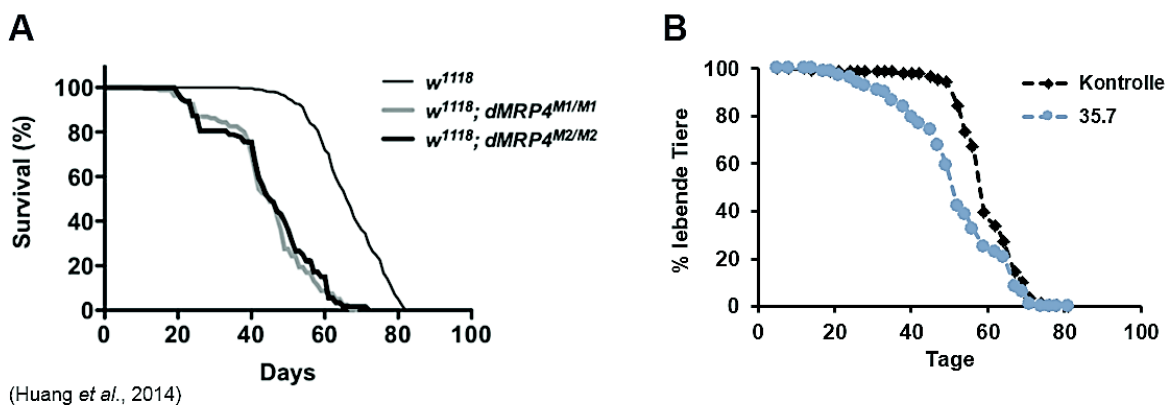


Abbildung 51: Überlebenskurven nach Deletion von dMRP 4 (Huang *et al.*, 2014) und CG9186 (diese Arbeit)

Ein solcher stochastischer Effekt könnte erklären, warum in der CG9186 Gruppe schon sehr früh einzelne Tiere sterben, andere aber ähnlich lange lebt wie die Kontrolle. Es bleibt die Frage, warum der lebensverkürzende Effekt nur bei den mutanten Männchen auftritt. Auf Basis bislang veröffentlichter Daten und der Ergebnisse aus dieser Arbeit sind folgende Erklärungen denkbar:

Kanzerogene Prozesse in den akzessorischen Drüsen

Wie bereits beschrieben, wurde das humane Homolog von CG9186 (C2orf43) mit Prostatakrebs in Verbindung gebracht (Du *et al.*, 2016; Takata *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Männliche Insekten besitzen mit der akzessorischen Drüse ein Organ, das

ähnliche Funktionen besitzt wie die menschliche Prostata und als Prostatakrebs-Modell genutzt wird (Übersichtsartikel Wilson *et al.*, 2017). Kanzeröse Veränderungen der akzessorischen Drüse könnten eine Erklärung liefern, warum der Verlust von CG9186 lediglich die Lebensspanne der Männchen verkürzt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden akzessorische Drüsen CG9186-mutanter Männchen seziiert, die im Rahmen von Lebensspanne Versuchen besonders früh verstorben sind (Tag 20 bis Tag 30). Wie Abbildung 37 C zeigt, konnten keine morphologischen Veränderungen an den Drüsen festgestellt werden. In Western Blots wurde gezeigt, dass CG9186 Protein in den akzessorischen Drüsen exprimiert wird. Diese Expression verstärkt sich, wenn die Männchen kopulieren konnten (Abbildung 37 A). Die Sensitivität der CG9186 Expression im Hinblick auf die Paarung der Männchen wirft die Frage auf, ob der lebensverkürzende Effekt ebenfalls paarungsabhängig ist. Wie man in Abbildung 37 B erkennt, zeigen auch jungfräuliche mutante Männchen eine erhöhte Sterblichkeit. Um eine sensitive Methode zur Beurteilung der Proliferation in den akzessorischen Drüsen zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit einer Masterstudentin (Alisa Gahlen) eine CG9186 mutante Fliegenlinie generiert, die nach Hitzeschock GFP-Protein in den Sekundärzellen der akzessorischen Drüsen exprimiert. Eine veränderte Anzahl der Sekundärzellen in den akzessorischen Drüsen kann Hinweise auf eine veränderte Proliferation geben. Eine ähnliche Technik wurde in Kombination mit RNAi schon benutzt, um in *Drosophila* mögliche Prostatakrebs-Regulatoren zu untersuchen (Ito *et al.*, 2014). Wie die Quantifizierung ergab, lag die Anzahl der Sekundärzellen in der CG9186 Mutante mit 20 bis 35 Zellen signifikant (p -Wert = 0,003) unter der Zellzahl der Kontrolllinie (zwischen 30 und 40 Zellen). Neben den Experimenten zur Quantifizierung der Sekundärzellen wurde eine größere Anzahl akzessorischer Drüsen sieben und 14 Tage alter Männchen (Kontrolle n = 28, Mutante n = 25) präpariert und morphologisch beurteilt. Abbildung 52 zeigt beispielhaft die akzessorischen Drüsen der 7 Tage alten Tiere im Durchlicht (A-C) sowie das GFP-Signal der Sekundärzellen (D-H). Bei etwa der Hälfte der CG9186-mutanten Tiere konnten morphologische Veränderungen festgestellt werden. So waren die akzessorischen Drüsen kleiner und schmaler (C) und die Sekundärzellen lagen dichter aneinander (G,H) als bei der Kontrolllinie (Alisa Gahlen, Masterarbeit).

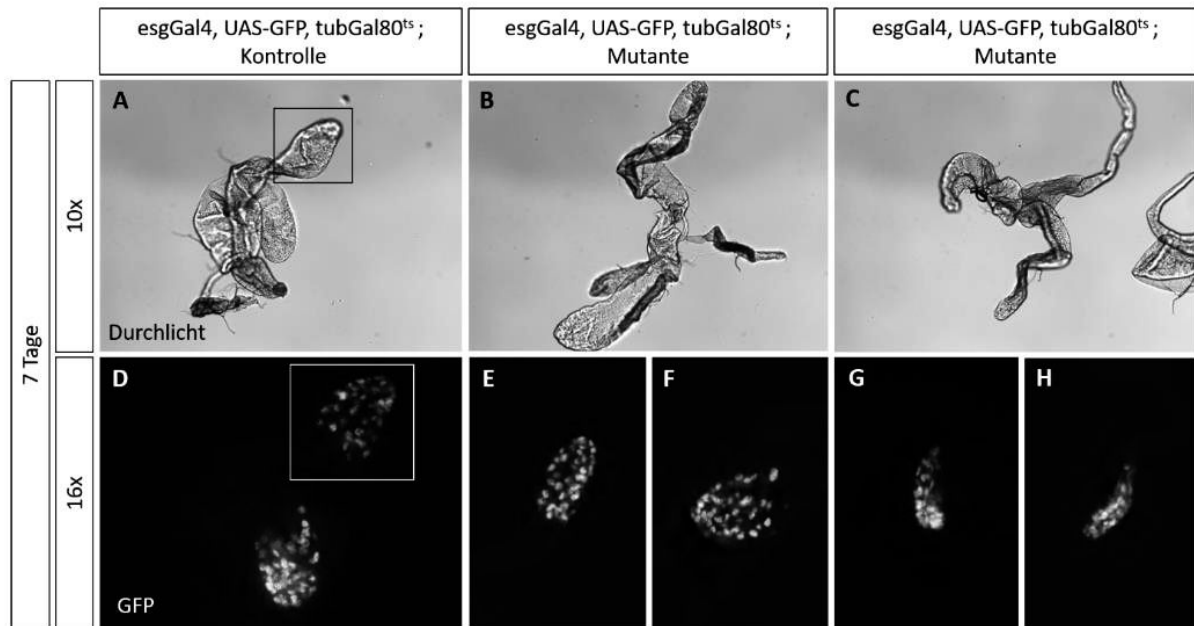


Abbildung 52: Mikroskopische Aufnahmen akzessorischer Drüsen 7 Tage alter Männchen. Gezeigt werden die Drüsen CG9186-mutanter Tiere und der Kontrolllinie im Durchlicht (A-C) sowie die GFP-positiven Sekundärzellen (D-H) (Alisa Gahlen, Masterarbeit).

Wie die vorgestellten Ergebnisse zeigen, hat der Verlust von CG9186 morphologische Einfluss Folgen für die akzessorischen Drüsen der männlichen Tiere. Dieser Effekt scheint stochastisch zu sein, da er nur bei etwa 50 % der Tiere beobachtet wird. Eine Überproliferation, die Hinweise auf kanzerogene Prozesse geben könnte, wurde nicht beobachtet. Es bleibt die Frage, ob die morphologischen Veränderungen an der verkürzten Lebensspanne der Tiere beteiligt sind. Auch eine mögliche Beteiligung des CG9186 Interaktors Gp93, wie unter 4.2.2 diskutiert, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

Endokriner Einfluss auf die Lebensspanne

In adulten Insekten haben die lipophilen Hormone Ecdyson und Juvenilhormon einen Effekt auf Oogenese, Stressresistenz und die Lebensspanne (Uryu *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2013). Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern Hinweise darauf, dass CG9186 diese Hormone oder deren *downstream* gelegene Effektoren beeinflusst. Dies könnte eine Ursache für die verkürzte Lebensspanne CG9186-mutanter Tiere sein. Wie bei Hentze *et al.* (2013) postuliert, verfügen neben der Prothoraxdrüse auch die akzessorischen Drüsen der Männchen über die Fähigkeit, Ecdyson zu exprimieren. Die besondere Funktion der akzessorischen Drüse im Hinblick auf Ecdyson könnte dabei erklären, warum die lebensverkürzende Wirkung der CG9186 Mutation geschlechtsspezifisch ist. Auch für den IIS ist ein Einfluss auf die Lebensspanne von *Drosophila* gezeigt (Übersichtsartikel

Altintas *et al.*, 2016). Ein Verlust von *dilp1* führt zum Beispiel zu einer geschlechtsspezifischen Verlängerung der Lebensspanne in Männchen (Liu *et al.*, 2016). Die CG9186 Mutante weist eine um 20-60 % höhere *dilp1* Expression auf als die Kontrolle. Auch dies könnte die verkürzte Lebensspanne erklären. In Anbetracht der vorgestellten Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass eine endokrine Beteiligung bei der Verkürzung der Lebensspanne CG9186-mutanter Männchen wahrscheinlich ist. Auch wenn keine Überproliferation in der akzessorischen Drüse gezeigt werden konnte, scheint dieses Organ zumindest morphologisch von der Mutation betroffen zu sein. Der Grund hierfür könnte ebenfalls endokriner Natur sein. Wie Abbildung 45 zeigt, konnte bereits an Tag fünf nach Eiablage ein Effekt von CG9186 auf die larvale Entwicklung detektiert werden. Dieser Phänotyp besteht also schon in einem Stadium, in dem die Fortpflanzungsorgane der Tiere noch nicht final entwickelt sind (Übersichtsartikel Sánchez und Guerrero, 2001). Im Rotbraunen Reismehlkäfer (*Tribolium castaneum*) wurde gezeigt, dass der IIS und die Ernährung das Wachstum und die Reifung der akzessorischen Drüse beeinflussen (Xu *et al.*, 2015). Die möglichen endokrinen Konsequenzen der CG9186 Mutation könnten also erklären, warum die akzessorischen Drüsen der mutanten Tiere kleiner sind als die der Kontrolle.

4.4.1.3 CG9186 beeinflusst die Stressresistenz männlicher und weiblicher Fliegen

Es stellt sich die Frage, ob die Verkürzung der Lebensspanne sowie der Lipid-Phänotyp unspezifisch durch eine generell schlechtere Fitness der CG9186-mutanten Tiere bedingt ist. Aus diesem Grund wurden die Tiere Konditionen ausgesetzt, die auf Basis unterschiedlicher Mechanismen Stress für die Tiere darstellen. Wie diese Experimente zeigen, sind die Mutanten nicht generell im Nachteil gegenüber der Kontrolllinie. So sind sie zwar sensitiver gegenüber Hungerstress (Abbildung 38) und oxidativem Stress (Abbildung 39), auf der anderen Seite aber geschützt vor Trockenstress (Abbildung 40). Gerade dieser Phänotyp war nicht zu erwarten, da eine stärkere Resistenz gegenüber Trockenstress in der Literatur eher im Zusammenhang mit erhöhten Lipidspeichern beobachtet wurde (Gefen *et al.*, 2006). Weitere Faktoren bei der Toleranz gegenüber Trockenstress liegen in der Steuerung des Wasserhaushaltes der Tiere sowie des Trehalosegehaltes der Hämolymphe durch den TOR (*target of rapamycin*)-Signalweg und IIS (Liu *et al.*, 2015; Marunde *et al.*, 2013; Thorat *et al.*, 2012). Obwohl eine veränderte Expression von Genen des IIS nachgewiesen wurde (Abbildung 41 D und E), besteht kein Effekt auf den Wassergehalt, den gesamtorganismischen Trehalosegehalt sowie die Trehalosekonzentration der Hämolymphe (Abbildung 41 A - C). Ein zusätzlicher Faktor bei der Resistenz gegenüber Trockenstress sind Hydrocarbon-Verbindungen auf der Cuticula der Tiere (Rouault *et al.*, 2004). Wie bereits in Kapitel 4.2.3 diskutiert, könnte

CG9186 über seine Interaktion mit Cpr an der Synthese dieser Verbindungen in den Oenocyten beteiligt sein. Auch die Interaktion von CG9186 mit JHEHs (Tabelle 17 und Guruharsha *et al.*, 2011) könnte eine Erklärung für eine Hydrocarbon-bedingte Veränderung der Trockentoleranz von *Drosophila* darstellen. So wurde in verschiedenen Studien bereits gezeigt, dass der Juvenilhormon-Signalweg in Insekten Einfluss auf cuticuläre Hydrocarbone nimmt (Bontonou *et al.*, 2015; Lengyel *et al.*, 2007).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass der Verlust von CG9186 den Metabolismus, die Lebensspanne sowie die Stressresistenz adulter *Drosophilae* beeinflusst. Der zugrundeliegende Mechanismus ist höchstwahrscheinlich endokriner Natur und im IIS sowie den Hormonen Ecdyson und Juvenilhormon zu suchen.

4.4.2 CG9186 Verlust und die larvale Entwicklung

Wie in den adulten Tieren gezeigt wurde, beeinflusst CG9186 den Lipidgehalt und die Stressresistenz der Fliegen. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die CG9186 mutanten Tiere auf mRNA Ebene veränderte Expressionslevel von Komponenten des IIS aufweisen. Außerdem sind sie kleiner und haben ein geringeres Körpergewicht als die Kontrolltiere. Gesamtorganismisches Wachstum spielt sich in *Drosophila* hauptsächlich in den larvalen Phasen ab. Die finale Größe der adulten Tiere wird dabei durch die Gegebenheiten während dieses Lebenszyklus bestimmt und ändert sich aufgrund des Exoskeletts kaum (Übersichtsartikel Nijhout *et al.*, 2014). Genetische Veränderungen im IIS können so in den Larven starke Wachstums-Phänotypen hervorrufen, während sie in adulten Tieren eher metabolische Konsequenzen haben (Übersichtsartikel Teلمان, 2009). Auch Hormone wie Juvenilhormon und Ecdyson, welche in adulten Tieren die Oogenese (Sieber und Spradling, 2015), die Stammzellen in den Testis männlicher Tiere (Li *et al.*, 2014), das Paarungsverhalten (Liu *et al.*, 2008; Wijesekera *et al.*, 2016) und die Lebensspanne (Yamamoto *et al.*, 2013) beeinflussen, besitzen in Larven andere Funktionen. Hier steuern sie hauptsächlich den Ablauf der larvalen Entwicklung, z.B. die Häutung und den Übergang von der Larve zur Puppe (Lavrynenko *et al.*, 2015; Riddiford und Ashburner, 1991). Im Folgenden wird diskutiert, welche Bedeutung CG9186 während der larvalen Entwicklung besitzen könnte.

4.4.2.1 CG9186 mutante Larven weisen keine veränderten Lipid-Spiegel auf

In adulten Tieren führt ein *knock down* (Thiel *et al.*, 2013) sowie ein kompletter Verlust von CG9186 (Abbildung 32) zu verringerten Lipid-Speichermengen. Wie Abbildung 47 A zeigt, besteht ein solcher Effekt in Larven nicht. Die Spiegel anderer Metabolite wie Cholesterol, Cholesterolester, Glukose und Glykogen scheinen ebenfalls nicht von der

CG9186 Mutation betroffen zu sein (Abbildung 47 B und C, Abbildung 64). Die LDs aus den Fettkörpern CG9186 mutanter Larven zeigen keine offensichtlichen morphologischen Unterschiede zur Kontrolle, wie in Abbildung 43 zu erkennen ist. Um die Lipid-Zusammensetzung dieser LDs genauer zu untersuchen, wurden sie im Rahmen einer Masterarbeit in der AG Beller aufgereinigt und ihr Lipidprofil massenspektrometrisch untersucht (Alisa Gahlen). LDs aus den CG9186-mutanten Tieren zeigten keinen veränderten Gesamtgehalt an TAG, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Auch die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Lipidklassen zeigt keine Abweichungen. Betrachtet man allerdings die Speicheldrüsen CG9186-mutanter Larven, so zeigt im Vergleich zur Kontrolle verringerte Anzahl an LDs (Abbildung 43). Dieser Phänotyp wurde auch nach CG9186-RNAi beobachtet (Thiel *et al.*, 2013). Der Rückgang an LDs in den Speicheldrüsen scheint gesamtorganismisch betrachtet nicht stark genug zu sein, um den Lipidgehalt der Larven als Ganzes signifikant zu verringern. Mit Blick auf diese Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass CG9186 trotz seiner Annotation als Lipase wahrscheinlich keine quantitativ bedeutende lipolytische Aktivität besitzt. Vielmehr scheint es so, dass das Protein an übergeordneten Regelkreisen beteiligt ist und darüber die Physiologie der Tiere beeinflusst.

4.4.2.2 CG9186 beeinflusst Nährstoffabhängig die larvale Entwicklung

Aufgrund seiner Anwesenheit auf LDs ist eine Funktion von CG9186 im Metabolismus lipophiler Hormone denkbar. Hierfür spricht auch, dass in der Literatur (Guruharsha *et al.*, 2011) sowie in dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.2.4) eine Interaktion von CG9186 mit Juvenilhormon Epoxidhydrolasen (Jheh 1-3) gezeigt werden konnte. Diese Enzyme dienen dem Abbau von Juvenilhormon und sind hierüber an der Steuerung der larvalen Entwicklung beteiligt (Seino *et al.*, 2010). Betrachtet man die Zeitspanne zwischen Eiablage und Verpuppung, entwickeln sich die CG9186-mutanten Tiere auf Standardmedium 1 allerdings nur marginal langsamer als die Kontrolltiere (Abbildung 44). Variiert jedoch im Medium das Verhältnis von Hefe zu Zucker, zeigen sich deutlichere Effekte. Die mutanten Tiere weisen z.B. auf Medium mit einem hohen Hefe- und geringen Zuckergehalt (WZ) eine im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Entwicklungsgeschwindigkeit auf. Geschieht die Entwicklung auf Medium mit wenig Hefe und relativ dazu hohem Zuckergehalt (WH) besteht ein genau entgegengesetzter Effekt, und die mutanten Tiere entwickeln sich schneller als die Kontrolle. Betrachtet man die Wachstumskurven der Tiere unter den unterschiedlichen Konditionen so fällt auf, dass die CG9186-mutanten Larven sehr viel weniger auf die variierenden Futtermedien reagieren als die Kontrolle. Während bei den Kontrolltieren auf WZ Medium nach 133 Stunden 50 % der Tiere verpuppt waren, benötigen sie auf WH Medium 113 Stunden länger (246

Stunden). Diese Differenz beträgt bei den Mutanten nur 36 Stunden (159 Stunden auf WZ und 195 Stunden auf WH). Die CG9186 mutanten Tiere passen sich also in ihrer Entwicklungsdauer weniger flexibel an veränderte Futterbedingungen an. Das zentrale Ziel der larvalen Entwicklung ist das Erreichen des sogenannten kritischen Gewichtes, ab dem das Tier die Futteraufnahme einstellt, als wandernde L3 Larve das Futter verlässt und anschließend mit der Verpuppung beginnt (Mirth *et al.*, 2005). Wie die metabolischen Messungen in Abbildung 47 zeigen, haben wandernde L3 Larven, die sich auf dem Futter mit wenig Hefe entwickelt haben, höhere TAG Spiegel. Interessanterweise besteht trotz der unterschiedlichen Entwicklungsgeschwindigkeit und damit Verweildauer der Larven im Medium kein Unterschied in den TAG-, Glykogen und Glukosespiegeln zwischen der Kontrolle und Mutante. Die mutanten Tiere scheinen also auf dem WH Futter früher ihr kritisches Gewicht zu erreichen. Außerdem konnte keine erhöhte Letalität beobachtet werden, aus den Puppen schlüpften nach der Metamorphose auch tatsächlich adulte Tiere.

Es stellt sich nun die Frage, warum eine derart veränderte Entwicklung gerade im Hinblick auf die Zusammensetzung des Futters besteht. Wachstum von Organismen erfordert die regulierte Metabolisierung und Allokation der zugeführten Nährstoffe. Ein zentraler Mediator dieser Prozesse ist der IIS und *target of rapamycin* (TOR) Signalweg (Oldham und Hafen, 2003). Des Weiteren wird der Mechanismus der larvalen Entwicklung und Metamorphose von dem Zusammenspiel der Hormone Juvenilhormon und Ecdyson bestimmt. Ecdyson wird periodisch (in Schüben) exprimiert und induziert die für Wachstum notwendigen Häutungen. Die Titer von Juvenilhormon sind während der larvalen Entwicklung hoch und sinken erst gegen deren Ende. Unter Abwesenheit von Juvenilhormon ändert sich der organismische Effekt von Ecdyson und führt dazu, dass die Tiere die Nahrungsquelle verlassen und sich zu verpuppen (Übersichtsartikel Nijhout *et al.*, 2014). Die Synthese von Juvenilhormon wird dabei auch von der Nährstoffverfügbarkeit beeinflusst. Wie in der Gelbfiebermücke *Aedes aegypti* gezeigt werden konnte, ist dieser Effekt abhängig vom TOR-Signalweg (Pérez-Hedo *et al.*, 2013). Eine Funktion von CG9186 innerhalb dieser Regelkreise könnte die veränderte larvale Entwicklung der CG9186 Mutanten erklären. So könnte ein gestörter Abbau von Juvenilhormon in den Mutanten dazu führen, dass der Juvenilhormon Titer weniger Flexibilität gegenüber sich verändernden Nahrungsbedingungen besitzt.

4.4.2.3 CG9186 und *target of brain insulin (tobi)*

Wie Abbildung 41 für die adulten Tiere zeigt, weisen die CG9186 mutanten Fliegen veränderte Expressionsstärken von Genen aus dem IIS auf. So ist zum Beispiel die Expression von *dilp 3* um etwa die Hälfte reduziert. Es stellt sich die Frage, ob dieser

Effekt auch schon während der larvalen Entwicklung zu beobachten ist. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression verschiedener *dilps* in 5 Tage alten Larven gemessen, die sich auf Standardmedium 2 entwickelt haben. Zusätzlich wurden die Expressionsstärken ausgewählter Gene bestimmt, die *upstream* und *downstream* des IIS liegen. Wie Abbildung 48 zeigt, ist wie in den adulten Tieren auch in den CG9186 mutanten Larven die *dilp 3* Expression im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert. Auch für *dilp 6*, das *downstream* des IIS gelegene d4E-BP (*thor*) sowie für *kruppel related h1* (*kr-h1*) konnte eine reduzierte Expression gemessen werden. Wie in der Literatur für *Drosophila* und den Seidenspinner *Bombyx mori* beschrieben wurde, wird die Expression von *kr-h1* durch Juvenilhormon induziert (Kayukawa *et al.*, 2012; Minakuchi *et al.*, 2008). Die hier bei den eigenen Experimenten beobachtete Verminderung der *kr-h1* Expression könnte also auf einen geringeren Juvenilhormon Titer in den Mutanten hinweisen. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die bereits diskutierte Interaktion zwischen CG9186 und den Jheh Enzymen sein. So könnte die Interaktion mit CG9186 die Jheh-Aktivität hemmen. Fällt CG9186 und damit auch diese Hemmung weg, sinkt der Juvenilhormonspiegel, und als Folge hiervon auch die *kr-h1* Expression.

Betrachtet man die qRT-PCR Ergebnisse in Abbildung 48, so fällt besonders die in den Mutanten drastisch verminderte Expression der α -Glucosidase *target of brain insulin* (*tobi*) auf. Wie gezeigt wurde, integriert *tobi* Signale aus dem IIS und AKH Signalweg (Buch *et al.*, 2008). Die *tobi* Expression wird durch den *Drosophila forkhead box O* Transkriptionsfaktor (dFOXO) gesteuert (Buch *et al.*, 2008), der auch an der Regulation der larvalen Entwicklung durch Juvenilhormon beteiligt ist (Mirth *et al.*, 2014). Interessanterweise reagiert die Expression von *tobi* sehr stark auf Veränderungen im Hefe-zu-Zucker Verhältnis des Futters (Buch *et al.*, 2008). Wie in Kapitel 4.4.2.2 diskutiert wurde, passen sich die CG9186 mutanten Larven im Vergleich zur Kontrolle weniger flexibel an solche Veränderungen an. Im Folgenden wurde daher die Expression der bereits unter Standardbedingungen betrachteten Gene (*akh*, *dilp1-3*, *dilp 5*, *dilp 6*, *thor*, *kr-h1* und *tobi*) in Larven gemessen, die sich auf WH und WZ Medium entwickelt haben. Als Vergleich dienten Tiere, die auf Standardmedium 2 gehalten wurden. Wie Abbildung 49 zeigt spiegelt sich die mangelnde larvale Anpassung auch auf Transkriptebene wieder. Betrachtet man zum Beispiel die Expression von *tobi*, so erkennt man bei den Tieren der Kontrollgruppe die bereits in der Literatur beschriebene Abhängigkeit von der Futterzusammensetzung (Buch *et al.*, 2008). So zeigen Tiere, die auf WH Medium gehalten werden (hohes Zucker-zu-Hefe Verhältnis, siehe Tabelle 15), eine um das Dreifache reduzierte *tobi* Expression. Besitzt das Futter ein sehr niedriges Zucker-zu-Hefe Verhältnis, hat dies eine um das Sechsfache gesteigerte *tobi* Expression zur Folge (Abbildung 49). Betrachtet man allerdings die Expressionsstärken bei der CG9186 Mutante, so fehlt diese Regulation der *tobi* Expression fast völlig. Auch bei der Expressionsstärke von *dilp 1*, *dilp 6* und *thor* zeigen sich in der Kontrolle futterabhängige

Schwankungen, in der Mutante jedoch nicht. Diese Ergebnisse passen zu den bei der larvalen Entwicklung gemachten Beobachtungen und untermauern eine mögliche Funktion von CG9186 bei der Regulation endokriner Signale wie dem Juvenilhormon Signalweg.

4.5 Ausblick

Da CG9186 ein Serin-Hydrolase Motiv besitzt und auf den LDs lokalisiert, wurde bislang davon ausgegangen, dass das Protein als Lipase agiert und eine Funktion im Lipidmetabolismus einnimmt (Thiel *et al.*, 2013). Obwohl in einer Studie für das murine CG9186 Homolog (genannt LDAH) tatsächlich eine schwache Cholesterol-Esterase Aktivität gemessen wurde (Goo *et al.*, 2014), konnte im Rahmen anderer Studien (Kory *et al.*, 2017) sowie in den eigenen Experimenten keine lipolytische Aktivität von CG9186 nachgewiesen werden. Vielmehr sprechen die in dieser Dissertation identifizierten CG9186 Interaktionspartner und die bei der Deletionsmutante beobachteten Phänotypen für eine Funktion außerhalb des Lipidmetabolismus. Wie die vorliegende Arbeit zum Beispiel zeigt, ist CG9186 am *nutrient sensing* beteiligt und besitzt wahrscheinlich eine Funktion bei der Regulation des Juvenilhormon Signalweges. Künftige Experimente müssen zeigen, wie CG9186 hier genau eingebunden ist. Besonders wichtig wäre dabei die Messung des Juvenilhormon Titors in den mutanten Tieren, sowohl unter Standard- als auch unter wechselnden Futterbedingungen. Wie bereits diskutiert, könnte CG9186 durch Interaktion mit Jheh Enzymen den Juvenilhormon-Abbau hemmen. Dies könnte dazu führen, dass die Fähigkeit der Tiere, die Titer des Hormons auf veränderte Umweltbedingungen anzupassen, eingeschränkt wird. Sollten die Juvenilhormon-Titer in den CG9186 Mutanten Veränderungen aufweisen, würde sich unter anderem die Frage stellen, inwieweit diese Funktion evolutionär konserviert ist. Gegebenenfalls könnte eine Funktion in endokrinen Signalwegen so auch eine Erklärung für die Assoziation des humanen CG9186-Homologs mit Prostatakrebs liefern.

5 Zusammenfassung

Ein zentrales Element des Lebens ist die Fähigkeit, überschüssige Energie aus der Nahrung in Form energiereicher Speichermetabolite zu bevorraten und diese bei Nahrungsmangel oder erhöhtem Energiebedarf zu remobilisieren. Lipide stellen hierbei die kalorisch bedeutendste Speicherform dar. Innerhalb von Zellen werden Lipide in spezialisierten Organellen, den sogenannten Lipidtröpfchen (engl.: *Lipid Droplets*, LDs), gespeichert. LDs bestehen aus einem hydrophoben Kern, der von einer mit Proteinen assoziierten Phospholipideinzelschicht umgeben ist. Über die Bereitstellung von Energie hinaus besitzen LDs zahlreiche weitere Funktionen. So können sie als Speicherort für Histone dienen oder sind an der Synthese lipophiler Signalmoleküle wie Steroidhormone beteiligt. Diese funktionelle Diversität spiegelt sich auch in der Zusammensetzung der LD-assoziierten Proteine wieder. In Proteom-Analysen mit aufgereinigten LDs wurden mehrere hundert unterschiedliche Proteine identifiziert, von denen viele bislang wenig charakterisiert sind. Eines dieser Proteine ist die evolutionär konservierte annotierte Lipase CG9186 aus *Drosophila melanogaster*. Eine initiale Charakterisierung anhand von Überexpressionsexperimenten widerlegte die vorhergesagte Rolle als Lipase, charakterisierte den Lokalisationsmechanismus des Proteins und demonstrierte eine induzierte Aggregation der LDs (Thiel *et al.*, 2013). Die organismische Bedeutung von CG9186 blieb jedoch weiterhin unklar.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher die Funktion von CG9186 näher untersucht werden. Durch massenspektroskopische Untersuchungen konnte ich zeigen, dass eine C-terminale Ubiquitinierung von CG9186 für die induzierte LD-Aggregation notwendig ist. Des Weiteren konnte ich Interaktionspartner von CG9186 identifizieren, die auf eine Funktion außerhalb des Fettstoffwechsels hindeuten. Um die *in vivo* Funktion von CG9186 zu untersuchen, habe ich mittels CRISPR/Cas9 eine CG9186 Deletionsmutante generiert. Die mutanten Tiere sind homozygot lebensfähig und weisen verringerte Lipidspeichermengen auf. Außerdem zeigen sie eine höhere Sensitivität gegenüber Hungerreizen und oxidativem Stress sowie eine geschlechtsspezifische Verkürzung der Lebensspanne männlicher Tiere. Zugleich besitzt die Mutante aber eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Trockenstress. In Verbindung mit Expressionsdaten verschiedener Kandidatengene waren die beobachteten Phänotypen mit einem Einfluss der CG9186 Mutation auf die endokrine Regulation der Physiologie vereinbar. Diese Hypothese wurde durch die in den Protein-Protein Interaktionsstudien beobachtete Bindung zwischen CG9186 und Enzymen, die den Abbau des Juvenilhormons vermitteln, unterstützt. Dass CG9186 mutante Larven ihre Entwicklungsgeschwindigkeit nicht an wechselnde Futterbedingungen anpassen können und auch nicht in der Lage sind auf Transkriptebene

adäquat zu reagieren, untermauert die mögliche Rolle von CG9186 in der Regulation des Juvenilhormon Signalwegs.

Summary

The ability to store excess nutritional energy in the form of energy-rich metabolites, and to remobilize them in the event of a lack of nutrient supply or elevated energy demand, is a central feature of life across all phyla. Lipids are the quantitatively most important storage metabolite. Within cells, lipids are stored in specialized organelles called lipid droplets (LDs). LDs consist of a hydrophobic core surrounded by a phospholipid monolayer with proteins attached. In addition to their function as a source of energy-rich compounds to fuel energy metabolism, more recent data demonstrated multifarious functions of LDs. For example, LDs serve as storage sites for histones or provide building blocks for the synthesis of lipophilic signaling molecules such as steroid hormones. This functional diversity is also reflected by the composition of the LD-associated proteome. Mass spectrometric analyses of purified LDs have identified several hundred different proteins, many of which have not been characterized to date. One of these proteins is the evolutionarily conserved, annotated lipase CG9186 of *Drosophila melanogaster*. An initial characterization based on overexpression experiments refuted the predicted role of CG9186 as a lipase, characterized the protein's localization mechanism and demonstrated an induced aggregation of LDs (Thiel et al., 2013). However, the organismic role of CG9186 remained unclear.

The major goal of this dissertation was therefore the elucidation of the function of CG9186. Through mass spectroscopic experiments I was able to demonstrate that ubiquitination of the CG9186 C-terminus is necessary for the induced LD aggregation. Furthermore, I was able to identify interaction partners of CG9186 that indicate a function outside of fat metabolism. To investigate the *in vivo* function of CG9186, I used the CRISPR/Cas9 technique to generate a CG9186 deletion mutant. The mutant animals are homozygous viable and have reduced lipid storage levels. Additionally, they show a higher sensitivity towards starvation and oxidative stress as well as a sex-specific. At the same time, however, the mutants are highly resistant towards desiccation stress. In conjunction with expression data from selected candidate genes, the observed phenotypes were in accordance with a predicted influence of the CG9186 mutation on the endocrine regulation of physiology. In support of this hypothesis I detected a physical interaction between CG9186 and juvenile hormone degrading enzymes in the protein-protein interaction studies. The fact that CG9186 mutant larvae are unable to adapt their developmental timing and transcriptional response to altered nutritional conditions underlines the potential role of CG9186 in regulating the juvenile hormone signaling pathway.

6 Anhang

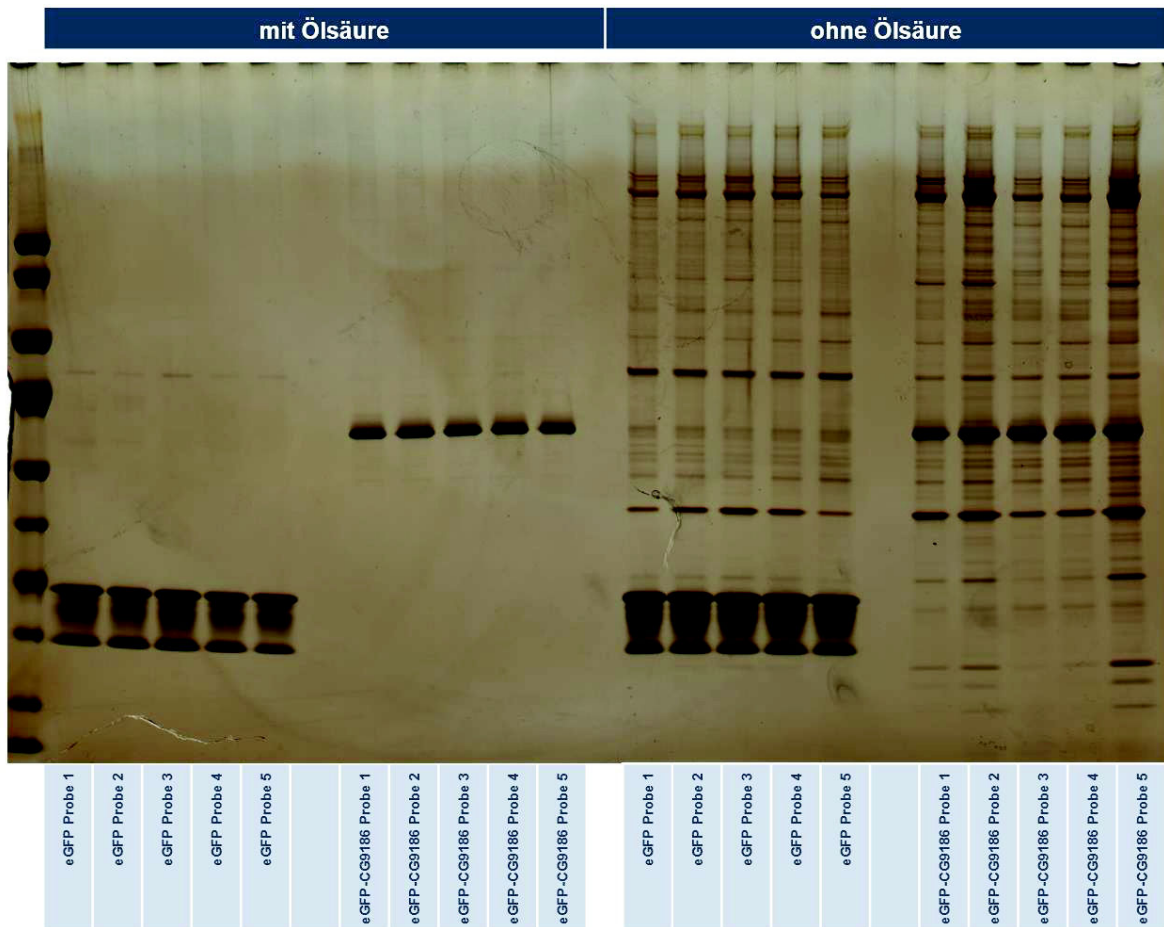


Abbildung 53: Silberfärbung des Polyacrylamid-Gels der Co-IP Proben. Aufgetragen wurde das von den *beads* eluierte Präzipitat. Zu erkennen ist die geringere Proteinkonzentration bei den Proben aus Zellen, die mit OA behandelt wurden.

Tabelle 16: Liste der im ersten Co-IP Experiment identifizierten Peptide. Inkubation der Zellen mit 400 µM Ölsäure (OA) und ohne OA. Insgesamt wurden 412 Proteine identifiziert. Angegeben sind die MS/MS counts (engl.: count = Anzahl), also die Anzahl der Spektren, mit der das entsprechende Protein identifiziert wurde.

Protein IDs	Gen Namen	MS/MS Count 9186 (400 µM OA)	MS/MS Count 9186 (kein OA)	MS/MS Count GFP (400 µM OA)	MS/MS Count GFP (kein OA)
Q59E58;A0A0B4JD57;A0A0B4JD95		43	73	0	0
P42212	Not1	11	9	0	2
Q00963;M9PF16;M9PHG4	β-Spec	7	3	1	2
A0A0B4K661;A0A0B4KG68;Q6NN28;P06754;A0A0B4KG06;P49455;Q8IGY1;A0A0B4K6Y8;Q95TA3;Q8IG84	Dhc64C	7	0	0	0
P11147;C7LA75;P29843;Q8I0E9		5	3	1	1
X2JC31;P29742	shot	5	1	1	3
P02572	Gp93	8	9	2	1
X2JCP8;P10987	Hmu	4	7	1	0
Q9VFT4	sec31	4	2	0	0
Q9VZI1;M9PE30	r	4	1	0	0
Q24560;A1ZBL0;P61857;Q9VAX7;Q8MST5	ACC	4	3	1	3
Q24020	Atpalpha	3	2	0	0
Q46231;E1JJ21;Q9VA56;Q9VA58;C7LAH8;A0A0B4KHF2;Q9VA59;A0A0B4K7R6;A0A0B4KHW6;A8JRH3;A0A0B4K6N4	Psa	3	2	0	1
P40796	tral	3	4	1	7
P46222;A0A0B4LGZ5	Tango5	3	1	0	2
Q0E9B6;A1Z8U9		3	1	0	2
X2JH42;Q05825;L0MQ04;Q8T4C4	Rpn2	3	0	0	1
P54357;M9NEW1	Cpr	2	4	0	0
X2JB48;Q26365	Kr-h2	2	4	0	0
A0A0B4LHV4;Q01989;H1UUJ8;A0A0B4KGX1	Pvr	2	4	0	0
P40423;F6J1D0		2	3	0	0
O96607;Q9VM94;M9PB54;M9PEX1;Q0E8S7		2	2	0	0
Q9V3Z6;G7H829;Q8IPH6;Q8IPH7;Q9VLZ3;Q8IPH8	larp	4	4	2	2
P09180	Cas	2	3	0	2
Q9VA91;Q8IMI7	RpS5a;RpS5b	2	6	1	4
X2J950;Q03334	Jheh1;Jheh2	2	1	0	0
Q9V9W2;Q9V9W3	glu	2	1	0	0
P06605;P06603;P06604	14-3-3zeta	2	2	0	2
A8DYJ2		12	4	6	4
P55841		2	1	1	0
Q9VBN5	RnrL	2	1	1	1
Q99323;M9ND95;E1JHJ5;E1JHJ4;P05661;M9NF46;M9NEP1;M9NCU7;E1JHJ3	alphaCop	14	6	7	7
Q9VN21	RpL31	2	3	1	4
P37276;M9PE73;M9PEC8;M9PBQ0;M9PEN4;M9PHG8;M9PBQ3	Fmr1	2	1	1	4
P29845;A0A0B4LFD2	poe	2	0	0	0
Q9V597	Nup358	2	0	0	0
Q9VNE2	MRP	2	0	0	1
X2JC80;P38979	bocksbeutel	2	0	1	0
Q23979	Chc	16	12	9	9
P21187	Aats-glupro	7	1	4	2
Q9VEX6;REV__Q9VCU9	alt	3	4	2	2
P41093	Aats-ile	3	2	2	1
Q9W0A8		3	5	2	4
Q9VXN3	ref(2)P	10	9	7	7
Q9VJD1	Hmt-1	4	0	3	0
Q9W2N0	porin	6	10	5	9
P13395;M9PDQ0;M9PB15;M9PGV6	Ca-P60A	9	17	8	10
X2JGM9;P41042	Dp1	1	5	1	1
P08736;C6TP87;P05303;A4V3Q6		1	4	0	0
P35381	Rab11	2	4	2	1
P55830		1	3	0	0
O61231;M9PIM0	Cctgamma	1	3	1	1
Q8MLY8;A0A0B4K6N1	Sgt	1	3	1	1
P29844;F3YDH0	I(2)03709	2	8	2	3
P55935;C6SUW3;Q95RG1	BcDNA.GH04962	1	2	0	0

Protein IDs	Gen Namen	MS/MS Count 9186 (400 µM OA)	MS/MS Count 9186 (kein OA)	MS/MS Count GFP (400 µM OA)	MS/MS Count GFP (kein OA)
Q9VZS5;D1Z3A1;REV__Q9VGU6	twin	1	2	0	0
P02828;M9PBL3	Gp210	1	2	0	0
Q7KUT2	clu	1	2	0	0
X2JCS6;P46223	CHOp24	1	2	0	1
Q9VVU2;Q7JRQ1	RpS27	1	3	1	2
Q7JRH5	Tom40	1	3	1	2
Q8T3U2;A0A0B4LFD9		1	1	0	0
X2JDU0;P50882	Gbeta13F	1	1	0	0
P41094	Aldh-III	1	1	0	0
X2JKU5;Q24186;A0A0B4K683;Q9VFE4	spel1	1	1	0	0
O16797	ColV	1	1	0	1
A0A0B4K7U5;E1JH02;Q86S05;A0A0B4KFC5;A0A0B4K6T1;D0Z768		1	1	0	1
O17445;A8Y560	Rbp2	1	1	0	1
P62152;A0A0B4LF57		1	1	0	1
Q9W1B9	RpS27A;RpL40;Ubi- p5E;Ubi-p63E	3	5	3	5
Q9VN25	CG1129	1	1	1	0
Q9V9M7	Acsl	1	1	1	0
Q9VWG3;M9NEQ9;Q9VB14		1	1	1	0
Q9VQL7;B7Z001	hts	1	1	1	0
P13060	RpA-70	1	1	1	0
P54397	RpL12	1	4	1	4
O18335		1	3	1	3
Q24154	RpL7A	2	7	2	8
Q9VHP0;A0A0B4KGU4	RpL26	1	2	0	4
Q7KN75	betaCop	2	2	2	4
Q9VHL2		1	2	1	4
Q27597;M9PCQ1;Q8IPJ7	RpS10b	1	1	1	2
Q9VDI3	Hel25E	1	1	1	2
Q9VEH0;Q960Y8		1	0	0	1
O62621	AP-1-2beta	1	0	1	0
A0A0B4K6U6;Q08473		1	0	1	0
Q94516	opa1-like	1	0	1	1
M9NG39;P41073	vig2;fdy	1	0	1	1
P48598;M9PBZ9	zip	1	0	1	1
P24156;A0A023GQA5	bor	10	13	11	11
A0A0C4DHG5;P26686	Ef1alpha48D;Ef1alpha48D- RA	8	13	10	11
Q9VB46	eIF-2gamma	4	6	5	6
Q9VXY3	Hsc70-5	4	10	5	15
Q9VYD8;M9MS48;Q02427	eIF3-S10	4	4	5	6
Q9Y0Y7;M9PH85	blw	9	10	12	14
O77434;M9PGI6	Top2	3	2	4	6
A1Z8D0	rln	16	27	22	25
Q9VZL3	zip	5	4	7	3
Q9VJD4	Ef2b	5	7	7	7
Q7K2N0	ATPsyn-beta	5	12	7	20
Q7K3D4	RpS19a	4	5	6	4
Q9VVU1	RpL9	2	6	3	7
Q8IN56;Q9I7I8;A0A0B4JDD8;A0A0B4JDG2;B7Z0M9;Q7KSB3;A0A0B4JCZ0;Q8I N55	Hsc70-4;Hsc70-4-RA	16	29	24	48
Q9W423	RpS17	2	3	3	5
Q9VNA3	B52	2	1	3	2
X2J4W8;Q9V447	Iva	2	0	3	0
Q9W0H3	Hsp83	5	23	8	10
Q53YH3;P29413	eIF4G	5	2	8	18
Q06559;G3M3A2	I(2)37Cc	3	10	5	5
Q0E940;E2QCG7	kst	3	3	5	2
A1Z7J7;A1Z7J6;A0A0B4LEY1;A0A0B4LEZ1	alphaTub84D;alphaTub84B; alphaTub85E	6	13	10	13
Q9VL69	mod	3	9	5	12
Q9VPJ9;Q8IPV3	RpS11	3	3	5	5
Q9VPR3	hts	28	20	49	54

Protein IDs	Gen Namen	MS/MS Count 9186 (400 µM OA)	MS/MS Count 9186 (kein OA)	MS/MS Count GFP (400 µM OA)	MS/MS Count GFP (kein OA)
Q9W0R0	zip	314	326	570	520
M9NH51;Q24562;M9NDZ4;M9NF89;Q9W1T4	betaTub56D;betaTub85D	7	11	13	16
A0A0B4LGI1;P20354;Q7PL78;P16378;P20353;P25157;M9PDM5	ck;ck-RA	31	24	59	23
A0A0B4K7A5;A0A0B4K849;Q02645	jar;jar-RG	25	18	48	41
P15357;Q7JYK1;P18101;Q9W418;P0CG69;A4V1F9;R9PY16	CG3800	1	2	2	0
O02649	nonA	1	2	2	1
Q24208;A0A0B4KGP8;P45975	RpL8	1	4	2	3
Q9W047	Hsp60	1	6	2	5
Q9VAW5;A0A0B4K7Y7;A0A0B4K6K9	RpL18A	2	8	4	7
P45889	RpL22	5	9	10	9
Q24319	bsf	1	1	2	0
Q9VIQ8	CG8801	1	3	2	3
O97125;Q9VG58;Q9BIS2;Q9BIR7;Q8IN18;P82910;P02825;P11146	His1:CG33807;His1:CG33834;His1:CG33858;His1;His1:CG33801	1	2	2	2
A1Z729;Q7JYX2;Q8MZG9;Q7JUS1	eIF3-S8	1	1	2	1
Q9VBU6	TFAM	1	1	2	1
Q9V411;A0A0B4LEY9	pzg	1	1	2	1
X2JAI2;Q9VIM5	Imp	5	9	10	10
Q9V438	RpS13	3	6	6	7
A1Z843	Pep	1	1	2	2
Q9VI10	eIF-2alpha	1	1	2	2
Q9V3A7	RpLP0	3	5	6	11
X2JC94;O46084	Aats-lys	1	2	2	5
Q9VKW3	Act5C	2	3	4	8
Q27331;A4V0N4	filI	20	11	40	33
Q9V3A8	Unc-115b;unc-115-RA;Unc-115a	4	1	8	3
A0A0B4LH64;Q8SWR8	TER94	1	1	2	4
Q9VJ86	RpL15	1	1	2	4
P45437	CG12272;CG12272-RA	1	0	2	0
X2JEM4;Q9W334	Hrb98DE	1	0	2	5
Q9VPQ2	lost	3	4	7	7
Q24253	RpL23A	3	2	7	7
A0A0B4KEX0;A1ZAB5	Myo61F	40	41	96	73
Q7KN62;A0A0B4LFZ4	Ost48	2	5	5	4
Q9W4K0	CG4668;CG42389-RF	2	1	5	0
A0A0B4LG88;Q9W255;A0A0B4LGB9	RpS3	4	7	10	17
P43248;M9ND86	beta-Spec	49	62	126	109
Q8IQQ9;Q8T4G5	Capr;rngi	3	14	8	14
Q8IRC2;E1JIC5;Q9S1U8;Q8IOQ7;F0JAM2;Q9VZI4;E1JIC6	pAbp	6	9	16	16
A0A0B4LFB8;Q9S1U20;A0A0B4LGF5;A1Z9N0;A0A0B4LF33	alpha-Spec	56	91	156	126
Q9VKC1	Act42A	36	77	107	120
Q9VNB9	Mtpalpha	1	2	3	0
A8DY82;E2QC�4;A8DY81;A0A0B4LEZ3;A8DY80	RpL13A	1	2	3	0
Q8IPE8;Q9V397	RpS25	1	4	3	4
Q8SXM8;Q9W327	CG13349	1	2	3	2
X2JFR1;Q04047;Q8IR16	RpL18	1	6	3	7
M9PCR4;Q9VUY8;D3DMJ6	Chd64	8	12	24	16
Q7K2G1;A0A0B4LFA6	Ef1gamma	1	5	3	7
Q9VL18	RpL10	3	6	9	9
P92177		2	8	6	12
Q9VZ04	RpS15Aa	1	2	3	5
Q7KTK9;M9PCA2;M9PCU4;M9PCG1;Q9VM14	AGO2	5	3	16	10
Q9VLT5;M9PB68	PyK	2	3	7	7
Q9V4N3	Hsc70-3;Hsc70-3-RA	9	8	32	30
Q9W4X7	Myo31DF	8	1	29	15
A0A0B4KF46;Q8T0L3	RpS16	3	11	12	8
Q7KMP8	Rpn1	1	5	4	4
Q7KMM4	ran;Ran	1	4	4	5
Q9VHA7;Q709R6	Klp61F	2	4	8	6
Q7K3B7	RpL10Ab	1	5	4	9
O97182	sqd	1	2	4	4

Protein IDs	Gen Namen	MS/MS Count 9186 (400 µM OA)	MS/MS Count 9186 (kein OA)	MS/MS Count GFP (400 µM OA)	MS/MS Count GFP (kein OA)
Q9VCA9;A0A0B4K7R1	RpL6	1	3	4	7
Q7K180	CG17896	1	1	4	3
P18053	Rme-8	1	0	4	0
Q94511;A4V449	Aats-asn	1	0	4	2
Q9VVA4;M9NFH8;M9PCU8	Tm1	9	29	38	28
Q9VK59	Thiolase	1	2	5	0
A1Z9E3	RpS14a	2	10	10	10
Q9VYY2;B4F5U4	RpS6	1	4	5	5
Q9W1H4	CG10641	2	4	10	8
Q9I7N0;Q7KTD0;Q7KTC9;Q7KTC8;Q7KTC7;Q7KTC6;Q7KTC5;Q7KTC4;Q7KTC3;Q7KTC2;Q7KTC1;Q7KTB9;Q7KTB8;Q7KTB7;Q9VK56;Q7KTC0	betaCop	1	2	5	4
O18333	didum	4	7	20	17
P45594	RpL17	1	0	5	6
Q9VSA3		33	62	171	269
Q9VEX9	RpS2	1	5	6	7
P25161;M9PG62	Rm62;Rm62-RE	2	6	12	14
Q9VWC7	RpL5	1	5	6	14
Q9VN44	sesB	2	18	13	24
Q9V3C0	Rack1	2	9	14	9
A1Z7H3;Q8T3L1;A1Z7H2;A0A0B4KFE4	RpL11	1	4	7	5
Q9I7K5;Q86BA5	RpS23	1	4	7	8
Q7JVY0;A0A0B4KEU5;A0A0B4KEJ7		4	19	30	27
Q9VBU7;A0A0B4K7J2	RpS3A	2	9	18	13
Q9VHR5	RpL4	2	14	20	16
Q7K0D3	homer	1	11	10	13
Q9VPU7;Q8IPW1	RpS4	1	7	10	14
Q7JW27;A0A0B4LF66	RpS8	1	6	12	14
P48462;H5V895;Q8T0U6	Mlc-c	2	10	26	13
Q960D3;Q9VBX3;D2A6L8	cpa	1	12	14	10
P50887		0	5	2	1
Q9W237;A0A0B4LG52		0	4	0	0
Q94920;M9PD75	Droj2	0	7	3	2
P31009;M9PB84	Cyt-b5	0	3	0	0
X2JCX8;P14130	Vha26	0	3	0	0
A4V3J6;P07909;A4V3J5	OstDelta	0	6	4	2
P41126;M9PFF0	I(1)G0156	0	6	2	2
Q9VZ34	CG6089	0	3	2	1
O61380;A8DZ29	CG31729-RA;CG6263	0	3	1	1
Q0E924;A8DYI7;A8DYI6	Jafrac1	0	3	0	1
Q7JZW2;A1ZAH8		0	2	0	0
Q9VTP4	Rho1	0	2	0	0
Q23978;M9MRS7		0	2	0	0
Q9VPJ0;M9PDP6	AP-2alpha	0	2	2	0
R9Q794;Q9W5R8	Mec2	0	2	0	0
P39018;E2QD65	Spase22-23	0	2	0	0
P13469;A0A0B4K7G4	Sec22	0	2	0	0
P48588		0	2	0	0
X2J5G6;P32100	eEF1delta	0	2	0	0
E1JJ68;C7LAE4;P19109;A0A0B4K624;A0A0B4K6A3;A0A0B4K6K1;A0A0B4K6T7		0	2	0	0
Q9VS34;M9PHM6	Uba1	0	2	0	0
P19889;M9PG76		0	2	0	0
P48149;E1JJM9	Karybeta3	0	2	0	0
A1Z6Z9;A1Z6Z8;A1Z700	asrij	0	2	0	0
O18640;M9PCC1;M9PB67;Q9VYQ9;REV__M9PBG8;REV__Q9W0S2	ergic53	0	2	0	0
A0A0B4LGB7;P22700	eIF3-S4-1	0	2	0	0
P48603;M9PBN7	RpL38	0	2	0	0
P29327;Q95TP9	Spase25;CG1751	0	2	0	0
Q95RF6	wash	0	2	1	0
Q9V3G1	Rpn6	0	2	0	0
Q9I7D3;E4NKG1		0	2	0	0
Q76NQ0	La	0	4	2	2
P12613;A4V391	Rpt1	0	2	1	1

Protein IDs	Gen Namen	MS/MS Count 9186 (400 µM OA)	MS/MS Count 9186 (kein OA)	MS/MS Count GFP (400 µM OA)	MS/MS Count GFP (kein OA)
Q9VZ23;A4V4A5	Sec61alpha	0	2	0	1
Q9VBH8;Q9VHE5		0	2	0	1
Q9VJ19	ND75	0	2	0	1
Q9W1H8	Rpn9	0	2	1	1
P46863;Q7KVC2	eIF-3p40	0	2	0	1
Q9W0B8	Oscp	0	2	0	1
X2J1Q5;Q9W3W8		0	2	1	1
Q9VBU9	SmD2	0	2	0	1
P48159		0	2	0	1
Q9VNE9;A0A0B4KFM7	BEST:CK01296	0	2	0	1
Q9W229	Rab5	0	2	1	1
P17704	dUTPase	0	2	0	1
Q3YMU0		0	2	4	1
P55828		0	2	0	1
Q9NJH0;A0A0B4JD11	glo	0	2	0	1
Q9VJJ8;Q9VJJ9;M9PD19;B7YZW3	Arc-p34	0	2	1	1
Q95RE4;M9NFR5	14-3-3epsilon	0	2	0	1
Q9W045	eIF-3p66	0	2	2	1
P36241		0	5	1	3
O62619	Aats-asp	0	5	2	3
P14199	ATPsyn-gamma	0	6	1	4
Q9VAY2	Tcp-1eta	0	3	0	2
Q9VUQ5;M9PFK7	Rab2	0	3	0	2
Q9XZJ4;E1JGZ9	Rpl13	0	7	7	5
Q7K3J0	RpS9;RpS9-RA	0	8	4	6
Q9VFFV9	Hop	0	4	1	3
O96827;A0A0B4LFL3	yps	0	5	4	4
Q9VDL2;Q86BR8	LBR	0	5	3	4
Q9W5W8	Rpl28	0	7	6	6
X2J6X1;Q9VJ26	Rpl29	0	1	0	0
A1ZBE9	eca;p24-2	0	1	1	0
Q9V434	Acn	0	1	1	0
A0A0B4LFR4;Q7K110	Prosalpha1	0	1	1	0
Q0KHU2;Q9VZ69;M9NF14;Q8IR99;E1JJM0	GstO3	0	1	0	0
Q59E59;A0A0B4K7Q4	ATPsyn-b	0	1	1	0
Q9VSL2	Cam	0	5	4	5
Q02748;C9QP42	RpS15	0	3	1	3
Q4ABD8;Q4AB94;Q4AB54;P02255;Q4ABE3	Trip1	0	3	1	3
A0A0B4K618;A0A0B4KGP6;A0A0B4KFN9;B3LF78;Q9NFU0	Nap1	0	3	0	3
Q9VLL3;Q8IPF5;Q86BM5	Rpl35A	0	2	2	2
Q7JVI3;A0A0B4LFB3		0	2	1	2
Q0E8E8	Tcp-1zeta	0	2	1	2
Q8T8R1;A0A0B4JD46	Mpcp	0	2	1	2
X2JAF1;Q8MSS1	R	0	2	0	2
Q9VZQ3;Q7KV69;Q7KV70;M9PBL6;A8JNJ6	deltaCOP	0	2	1	2
Q9VF20	Nacalalpha	0	2	1	2
P08645;M9MRT6		0	2	6	2
Q9VZ71		0	1	0	1
Q9W392	Rpl35	0	1	1	1
X2JC35;P49630	Atx2	0	1	0	1
Q9VW54	Pros29	0	1	0	1
Q8SY19;Q8SY70	Rpn3	0	1	0	1
Q9VK69	rept	0	1	0	1
X2JE06;Q9VJY6	CG12702-RA	0	1	0	1
Q9V9N7;M9PBG0;R9PY70;M9PDE6;A8DZ25;M9MSJ5;Q9V9N5;M9PDY6;M9PD L8;A8DZ24	RanGap	0	1	0	1
Q9W499	Cyp1	0	1	0	1
Q9XZU1	Rpl7-like	0	1	0	1
Q7K0E6		0	1	0	1
Q9W5N2;A0A0B4KED0	coro	0	1	0	1
P15348;M9PDQ1	Tapdelta	0	1	1	1
Q9U4L6;M9PGL7	G-salalpha60A;G-	0	1	0	1

Protein IDs	Gen Namen	MS/MS Count 9186 (400 µM OA)	MS/MS Count 9186 (kein OA)	MS/MS Count GFP (400 µM OA)	MS/MS Count GFP (kein OA)
	oalpa47A;G-ialpa65A;cta				
Q8MLV1	RfC3	0	1	0	1
Q7KM15		0	1	1	1
M9PFB2;M9PCB7;M9PFF9;M9PFG3;Q9VTZ0;M9PI44;M9PF14;M9PF20	SrpRbeta	0	1	0	1
Q8INN5;Q8INN7;E8NH01;Q9VH92;Q8INN6;A0A0B4LGZ0;Q9VH91;A0A0B4LI11; A0A0B4LGY1;E1JIH2;E1JIH3;A0A0B4LGY0	His4	0	1	0	1
Q7PLL6;D2A6J9	Vap-33-1	0	1	1	1
P28668	RpS28b	0	1	0	1
O01666	CG7993	0	1	0	1
X2JE34;Q8IR13;Q9VXF8;Q7KUX7;X2JC79	RpL27A	0	1	1	1
Q8SWV5	x16	0	1	3	1
P29310;A0A0B4KEH0	Mgstl	0	1	0	1
P04359		0	1	0	1
Q9VP57	RpL21	0	1	2	1
M9PD65;Q9VIW3;M9PBD9	cpb	0	10	11	11
P48605;A4V303	RpL32	0	4	0	5
P91926	sta	0	3	3	4
Q9VSN9	lig;lig-RA	0	7	5	10
Q9VCB6;Q7K112;Q8IMX1	RpS18	0	4	3	6
Q7KMQ0	RpL34a;RpL34b	0	2	2	3
Q94518;A0A0B4LEY6	RpL27	0	2	4	3
P52295	Gapdh2;Gapdh1	0	2	2	3
Q9VPN5	lark	0	2	1	3
Q9VEB3	Pen	0	2	3	3
Q8STG9	RpS20	0	2	1	3
Q24439	EFTuM	0	2	1	3
Q9VWH4;Q8T0R3	eIF-4E	0	2	0	3
Q9VRL0	Hsp68;Hsp70Bbb;Hsp70Bb; Hsp70Bc;Hsp70Ba;Hsp70A a;Hsp70Ab;Hsc70-2	0	2	1	3
Q9W048	BEST;LD30049	0	2	2	3
A1Z6H7	RpS7	0	9	12	15
X2JFR6;P41374	FK506-bp1	0	3	1	5
P84040;A0A0B4KFZ9	RpL14	0	4	5	8
Q8MKK1	T-cp1	0	2	2	4
Q9W0E4;Q8IRH0;Q8IRH1	Tom20	0	2	0	4
O44081;E1JGV6;A0A0B4K8B2	RpL30	0	2	4	4
Q9V3W7	Akap200	0	1	0	2
Q9VMH2	Nop60B	0	1	0	2
Q7KVX5;Q9W4N8		0	1	3	2
Q94901	schlank	0	1	1	2
Q9VF28		0	1	0	2
Q9VAC1		0	1	0	2
Q7KW39	CG30185;Gr59f	0	1	0	2
X2JFG0;P05990		0	1	0	2
Q7JRC3;Q7KB18	eIF6	0	1	0	2
Q9VKM8;Q9VKM7	tsr	0	1	0	2
M9PC85;Q9V3V0		0	1	0	2
O02195	epsilonCOP	0	1	0	2
Q9VPQ7	Prp19	0	1	0	2
P20480;A0A0B4LI25	Tina-1	0	1	1	2
X2JF59;Q9V3P0		0	1	2	2
Q9VN50	eIF3-S9	0	1	1	2
A1ZAX1;A0A0B4LFL2	SF2	0	1	3	2
Q9W3Z4	RpL36	0	1	1	2
O76767	sqh;CG3595	0	9	9	21
P25007	RpL7	0	3	5	7
Q9VK04;X2J9M9;X2JZ26;Q9VK06	eIF-4a;eIF-4a-RB	0	3	0	7
Q9W0C3	RpL23	0	2	2	5
Q9W1X9;A0A0B4KF31	tmod;tmod-RC	0	7	17	20
Q9VTU4	Hrb27C	0	2	2	6
Q9VV75	ERp60	0	1	0	3
P53501;P10981;A0A0B4LH50;P83967;P02574;M9PFZ6;P45891	Hrb87F	0	1	0	3

Protein IDs	Gen Namen	MS/MS Count 9186 (400 µM OA)	MS/MS Count 9186 (kein OA)	MS/MS Count GFP (400 µM OA)	MS/MS Count GFP (kein OA)
A1Z9J0;B7YZG6;B7YZG5;E1JH63;A1Z9J1;E1JH64;A1Z9J2;B7YZG4;B7YZG2;B7YZG3;A1Z9I8;E1JH62;A1Z9I9;A0A0B4K7P8;A0A0B4K7Y9;E1JH65;A0A0B4K788;A0A0B4K867;A1Z9J3;A0A0B4K718;A0A0B4K869	Rbp1-like;Rbp1	0	1	1	3
P08928;M9NE89	Arpc1	0	1	0	3
Q9V3P6;A0A0B4KHE9;A0A0B4KI10	Arpc4	0	1	0	3
Q9Y0Y5	ncd	0	1	1	3
Q7KLV9;A0A0B4K7Z5	Lam	0	1	3	3
A8E6M1;A1ZBB4;E1JGL8	Ote	0	1	4	3
Q7K4L8	Sc2	0	1	2	3
Q9W1V3	RpL3	0	2	5	7
Q9W1G7		0	1	1	4
P56538	Tango7	0	1	2	5
Q9V3K3;M9PFN1	bel	0	1	4	6
Q9VJ12	exba	0	1	2	11
P32392	CG12262	0	0	2	0
Q9VXQ5	Cdc5	0	0	2	0
Q9VSY2;Q0E8G6	Vha68-2	0	0	2	0
P48810;E1JIK0	aru	0	0	2	0
A1Z6Z3;A0A0B4KEE1;Q7JR61;A0A0B4KEL0;A0A0B4KF99;A4UZ69;A1Z6Z4;A0A0C4FEI5;A0A0C4DHC8	qkr58E-1	0	0	2	0
O18332	Fib	0	0	1	0
P07487;M9PJN8;P07486	CG14995-RC	0	0	2	0
B6IDV6;E1JHB8;Q7KTI7;M9PCJ1;M9MRE1;Q7KTI8;Q9VLQ8;Q8IPG1;E1JHB6;M9PCX2;E1JHB7		0	0	2	0
P48591		0	0	4	0
Q7JR58		0	0	1	1
Q8IPB1;Q9V3I1	DNA-ligI	0	0	1	1
E1JIR4;A0A0B4KGG8;P13607	vlc	0	0	1	1
P20240	SsRbeta	0	0	1	1
Q9U9Q4	CaBP1	0	0	1	1
Q9V3I2	CG2061	0	0	1	1
Q9VWL0	Bin1	0	0	2	1
P41092;M9MRC9	Spp	0	0	0	1
Q7JV23;A8DY67;A1Z784	Act57B;Act87E;Act88F;Act79B	0	0	0	1
P48148;A4UZI6	CG3902-RA	0	0	1	1
Q24492	Rab1	0	0	1	2
Q9VCK0	CG5642	0	0	1	2
Q9W3N1	Crc	0	0	0	2
Q7KR04		0	0	0	2
Q7K5K3;Q8IML6	KdelR	0	0	0	2
Q7KLW9	abs	0	0	0	2
P26308;A4V4I0	U2af50;LS2	0	0	0	2
Q8MSW0	Map60	0	0	0	2
Q9W0Y1;Q2PE12	Arp87C	0	0	0	2
Q9W0M4;B9EQV3	ncIb	0	0	0	2
Q9VXR5	Ef1beta	0	0	0	2
A1Z6H4;Q7K1T1	Pgam5	0	0	3	2
Q7KLX3	RpS15Ab	0	0	0	2
Q9VFF0	bic	0	0	2	2
Q05547;P12982;Q5LJN2;P48461;A0A0B4KHS9;A8QI94;Q9VQL9	RpL24	0	0	2	2
Q7JZB4;E2QCZ9		0	0	6	2
A0A0B4LFW6;A1Z7S0		0	0	4	2
P48809;E1JHA4	eIF3-S5-1	0	0	0	3
Q9W1I7;A0A0B4LHC9	flw;flw-RB	0	0	0	3
Q9VUZ0		0	0	2	3
Q7KVQ7;Q9W2S1	Pp1-13C;Pp1-87B;Pp1-Y2;Pp1alpha-96A	0	0	0	3
Q9VJ74	RpS24	0	0	3	3
Q9VGH5;Q8INJ6	RpL19	0	0	4	3
P54611;A0A0B4LGS4	CG8798	0	0	3	3
Q27268;M9PC90	Arpc3A	0	0	0	4
Q7K7G0;Q9W555	Arp66B	0	0	1	5

Tabelle 17: Im eGFP-CG9186 Präzipitat angereicherte Proteine aus dem zweiten ColP-Experiment. Inkubation der Zellen ohne Ölsäure. eGFP und eGFP-CG9186 wurden in Kc167 Zellen exprimiert und anschließend präzipitiert. Die Tabelle listet 50 der im ColP Experiment identifizierten Proteine in absteigender Reihenfolge der jeweiligen p-Werte auf.

Protein IDs	Gen-Namen	-Log Student's T-test p-Wert
Q9W0H3	CG9186	6,24399
B6IDV6;E1JHB8;Q7KTI7;M9PCJ1;M9MRE1;Q7KTI8;Q9VLQ8;Q8IPG1;M9PCX2;E1JHB7;E1JHB6	Pvr	5,71569
Q9VWL0;X2JFR0;Q8MZ13;M9PI06	Mec2	4,89817
Q8I0I5;Q9VTS4;E1JHY7;X2JCC3	Pop2	4,40916
O97066	twr	4,34814
Q7K3D4	CG5482	4,23245
Q9VCB6;Q7K112;Q8IMX1;Q8IMX0	twin	4,13775
Q7K172	ste24a	4,0893
Q7K110;A0A0B4LFR4	OstDelta	3,81552
O18335	Rab11	3,75819
Q24319	Ost48	3,50638
M9PD75;Q94920	porin	3,35067
A1Z6Z3;A0A0B4KEL0;A0A0B4KF99;A1Z6Z4;A0A0C4DHC8;A0A0B4KEE1;Q7JR61;A4UZ69;A0A0C4FEI5	Aldh-III	3,34512
Q9VD29	Sar1	3,24884
A0A0B4KHU4;Q8SWX6;Q8IMU2	CG11790	3,09837
Q9V3N6	TM9SF4	2,87976
A0A023GQA5;P24156	I(2)37Cc	2,8556
A8DY82;E2QCN4;A8DY80;A8DY81;A0A0B4LEZ3	Not1	2,81155
A1Z729;Q7JYX2;Q7JUS1;Q8MZG9	CG2070	2,63276
Q7K2E1;Q9VBQ5	CG5112	2,62937
Q9VB46	Hmu	2,61088
Q9VJD4	Sgt	2,58422
A8DYI6;Q0E924;A8DYI7	Phb2	2,54793
A0A0B4LGV1;Q9VHY6	EMC1	2,39861
P22700;A0A0B4LGB7	Ca-P60A	2,36484
Q9VZF1	CG1309	2,33521
Q0E8E8;Q7JUS9	Mpcp	2,2862
A1Z843	CG1371	2,27614
A0A0B4KHD4;Q95R48	Orct2	2,27261
Q9VAY2	Gp93	2,21556
Q9VWD9	Ubqn	2,20929
Q9VN44	Karybeta3	2,16241
M9PCQ1;Q27597;Q8IPJ7	Cpr	2,15442
Q9V3A8	ergic53	2,15004
Q7JRC3	Jheh1	2,14628
A0A0B4KHL7;A0A0B4KGN2;P91928	CG6455	2,05375
O76268;Q9VQI8;M9PBV2;Q8IPZ6	NTPase	2,02727
Q7KMM4	GCS2alpha	1,91719

Protein IDs	Gen-Namen	-Log Student's T-test p-Wert
X2JH42;L0MQ04;Q05825;Q8T4C4	ATPsynbeta;	
M9PBD9;Q9VIW3;M9PD65	ATPsyn-beta	1,82318
Q9W392	RanGAP	1,81703
Q9XZU1	CCT2	1,74521
Q76NQ0	Cas	1,74222
Q9VXQ5	CG33303	1,7134
Q7KB18	Tcp-1zeta	1,51059
Q9VSD6	Jheh2	1,39566
A1ZBJ2	msk	1,35746
A0A0S0WNN6;Q9TVM2	CG7461	1,32628
P13607;E1JIR4;A0A0B4KGG8	emb	1,30392
Q7PLL6	Atpalpha	1,26824
	CG17514	1,21453

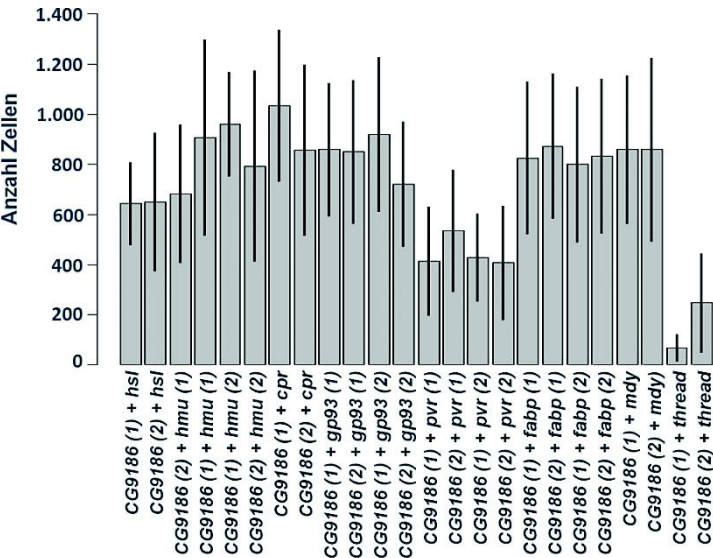


Abbildung 54: Zellzahl nach Doppel RNAi. *Drosophila* Kc167 Zellen wurden mit verschiedenen dsRNAs inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die Zellkerne und LDs mit Hoechst33258 und Bodipy^{493/503} gefärbt. Übersichtsaufnahmen wurden angefertigt und die Anzahl an Zellkernen mit einer Bildsegmentierungssoftware ausgewertet. RNAi von *thread* und *pvr* führt auch unter gleichzeitiger CG9186 RNAi zu einer verminderten Zellzahl (im Vergleich zu *fabp*- oder *mdy* RNAi).

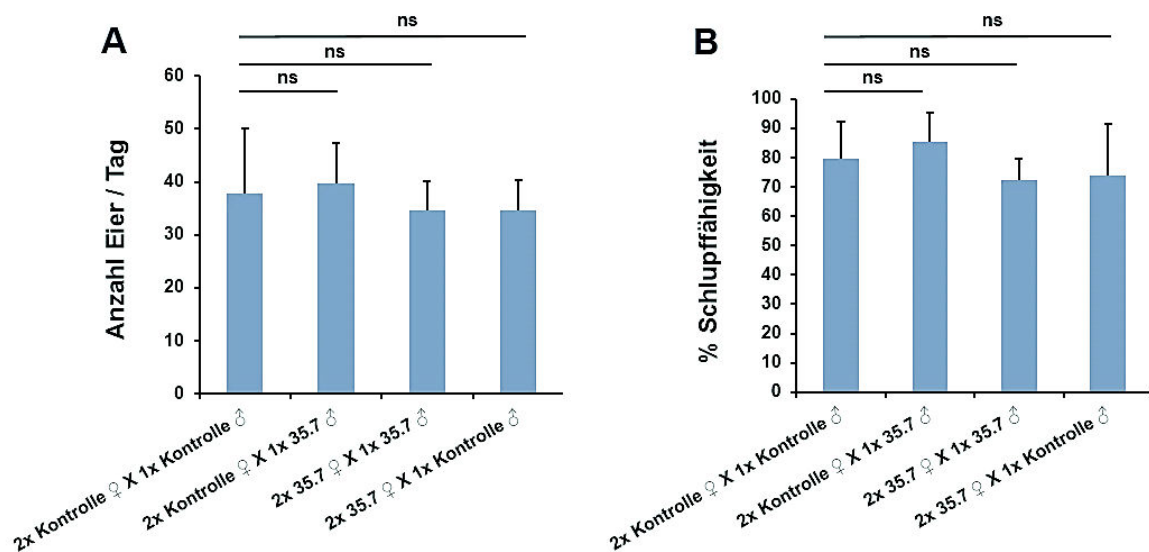


Abbildung 55: Fruchtbarkeit und Schlupffähigkeit. Zwei sieben Tage alte jungfräuliche Weibchen wurden mit einem sieben Tage alten jungfräulichen Männchen in ein Futterröhrchen gegeben und für drei Tage alle 24 Stunden umgesetzt. Die in jedem Röhrchen enthaltenen Eier wurden gezählt. Die Röhrchen wurden bei 25 °C inkubiert und zu einem späteren Zeitpunkt die Anzahl an Puppen quantifiziert. Der Anteil an Puppen an der Zahl der Eier bestimmt die Schlupffähigkeit in Prozent. Es wurden unterschiedliche Kombinationen der Kontrolllinie und dem Allel 35.7 analysiert. Pro Kombination wurden 8 Röhrchen ausgezählt. A zeigt die durchschnittliche Anzahl Eier pro Tag, B die durchschnittliche Schlupffähigkeit. Signifikanzniveaus: ns= nicht signifikant.

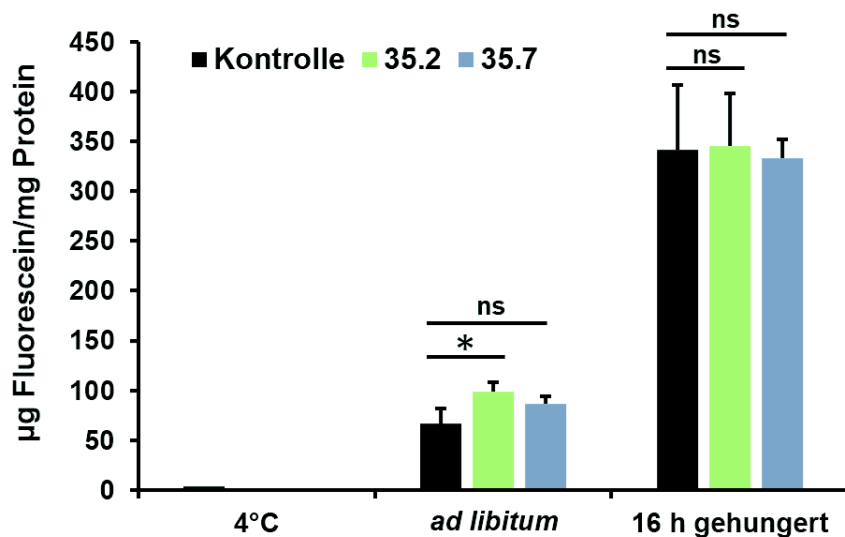


Abbildung 56: Quantifizierung der Futteraufnahme sieben Tage alter männlicher Fliegen. Sieben Tage alte männliche Fliegen wurden in Gruppen von 20 Tieren für 30 min auf Fluorescein-haltiges Futter gesetzt. Die Tiere wurden anschließend homogenisiert die Fluoreszenz-Intensität quantifiziert. Als Positivkontrolle dienten Fliegen, die über Nacht gehungert wurden. Es wurden jeweils drei Röhrchen als technische Replikate gemessen. Als Negativkontrolle wurden Kontrollfliegen auf gekühltes Futter gesetzt und der Versuch bei 4°C durchgeführt. Die Tiere bei 4°C zeigen eine verringerte Futteraufnahme, die vorab gehungerten Fliegen hingegen eine höhere als unter *ad libitum* Bedingungen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und dem Nullallel 35.7 festgestellt werden. Lediglich unter *ad libitum* zeigte Allel 35.2 eine geringfügig höhere Futteraufnahme als die Kontrolllinie. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*)

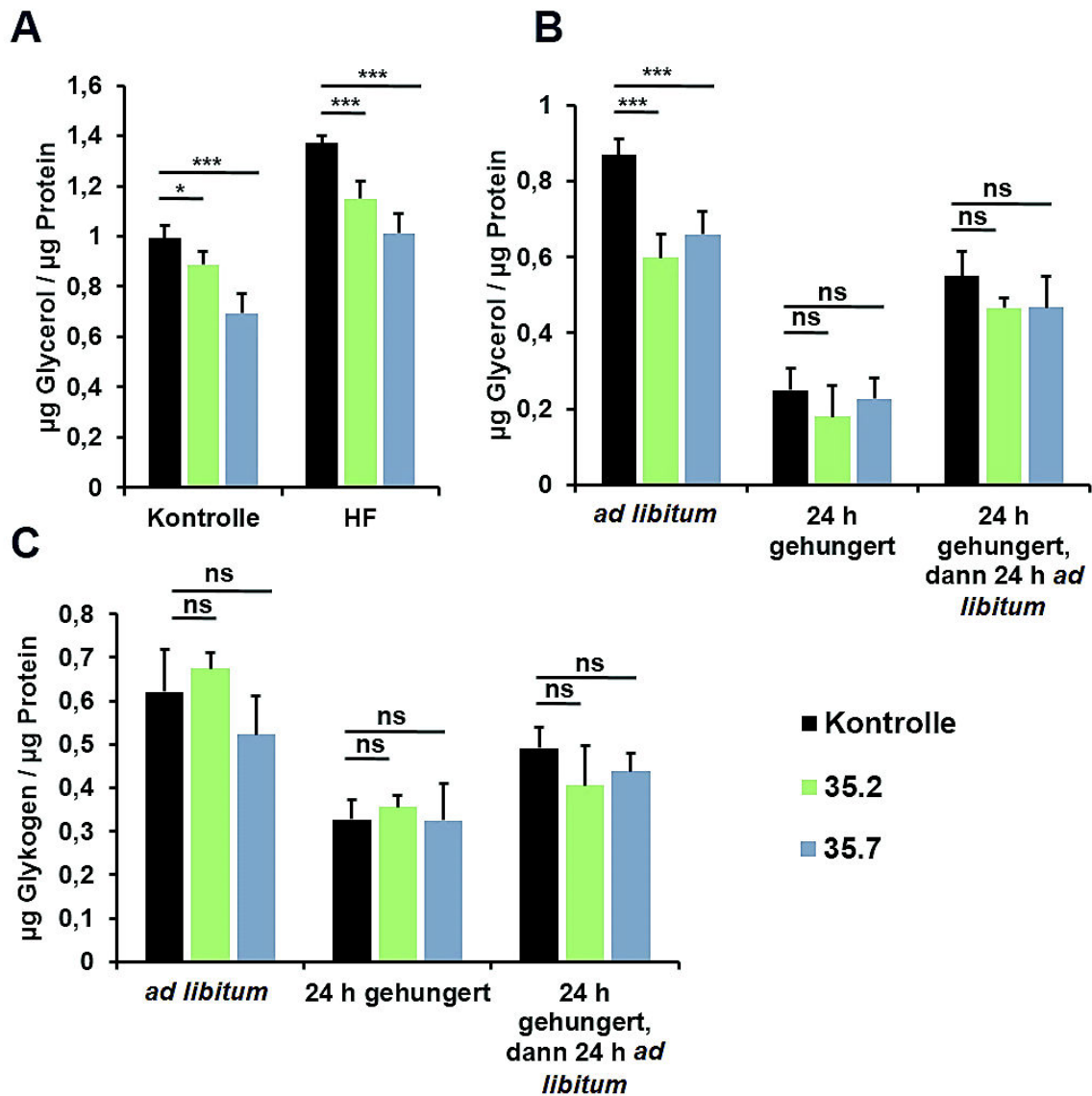


Abbildung 57: Perturbation der Energieverfügbarkeit und anschließende Messung der TAG- und Glykogen-Spiegel in 7 Tage alten Männchen. A: Fliegen wurden nach dem Schlüpfen für sieben Tage auf Futter mit einem hohen Fettanteil (HF) gesetzt. Sowohl die Kontroll- als auch die CG9186 mutanten Tiere (35.2 und 35.7) reagieren mit einem Anstieg der gesamtorganismischen Lipidspeicher. Auch unter HF Futter zeigen die Mutanten eine signifikant niedrigere TAG Menge als die Kontrolle. B: Vor der TAG Messung von sieben Tage alten Männchen wurden die Tiere entweder *ad libitum* gefüttert, für 24 Stunden gehungert oder für 24 Stunden gehungert und anschließend wieder *ad libitum* gefüttert. Das Hungern führt sowohl in den Mutanten als auch in der Kontrolle zu einer drastisch verringerten Lipid- und Glykogen-Speichermenge. Nach der Hungerphase ist bei den TAG Werten kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Allelen 35.2 und 35.7 feststellbar. Das Umsetzen auf Standardmedium führt zu einem erneuten Anstieg der TAG-Mengen. Die Mutante zeigt zu diesem Zeitpunkt wieder eine etwas geringere Lipidspeichermenge als die Kontrolle. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*) $p < 0,001$ (***)

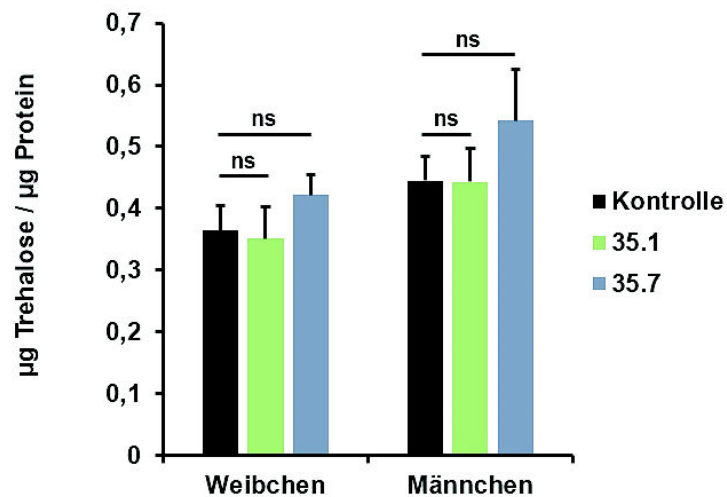


Abbildung 58: Gesamtorganismische Trehalose-Spiegel in sieben Tage alten Tieren. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelen 35.1 bzw. 35.7 und der Kontrolle. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant

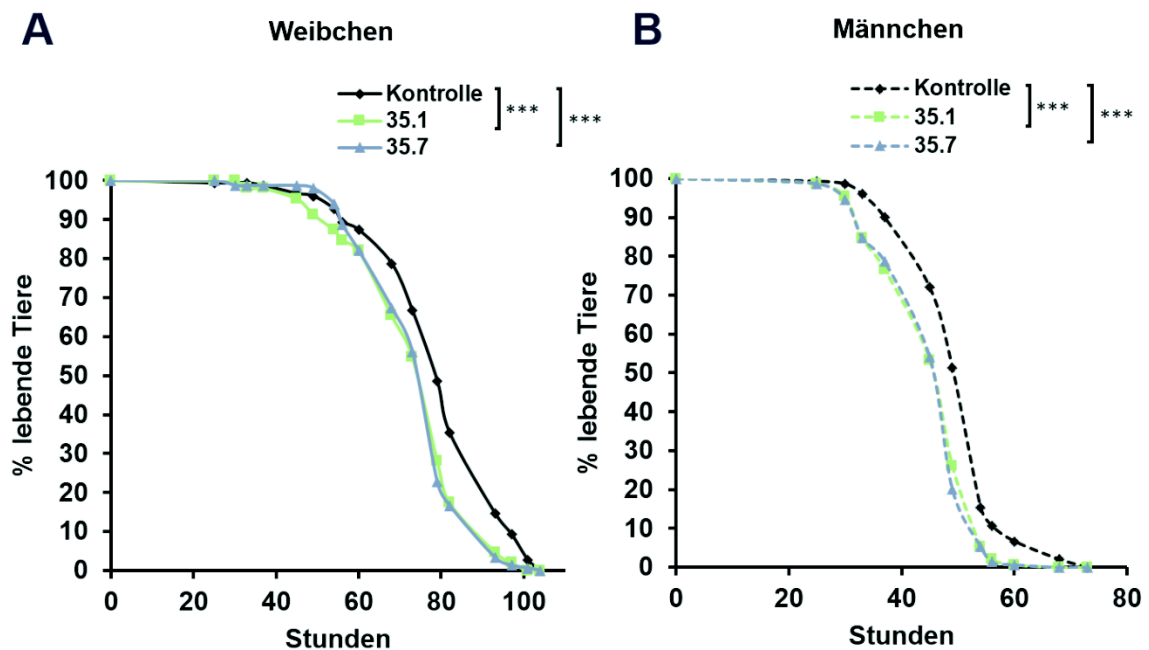


Abbildung 59: Überlebensdauer unter Hungerstress. Sieben Tage alte Tiere wurden in Gruppen von 30 Individuen in ein Röhrchen mit 0,5 % Agarose (in Wasser) gegeben und alle vier bis 12 Stunden tote Tiere ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden fünf Röhrchen (150 Fliegen total) ausgewertet. Das Diagramm zeigt den Anteil lebendiger Fliegen in Abhängigkeit von der Hungerdauer. Sowohl für die mutanten Weibchen als auch Männchen (Allel 35.1 und 35.7) zeigt sich eine signifikante Linksverschiebung der Überlebenskurven. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***)

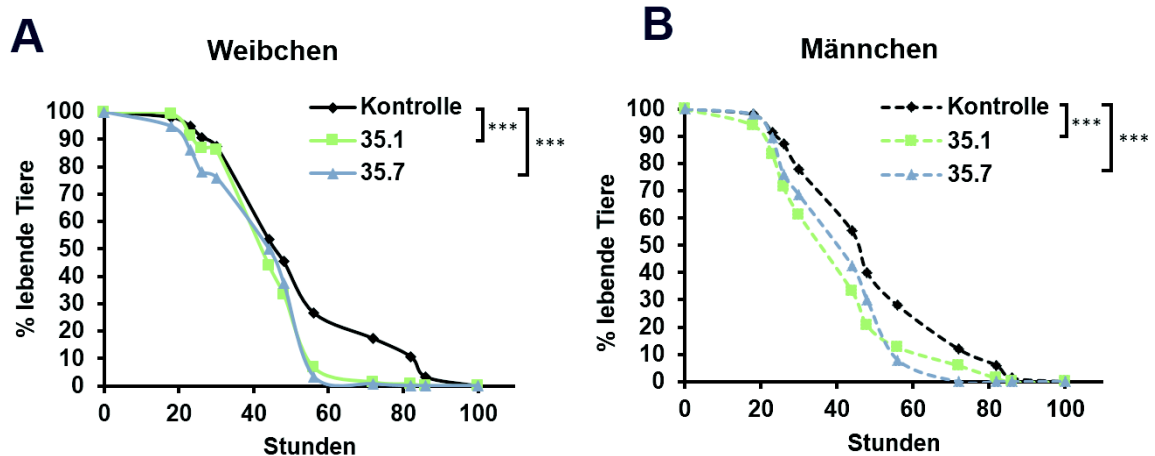


Abbildung 60: Sensitivität gegenüber oxidativem Stress. 30 Tiere (sieben Tage alt) wurden mit 20 mM Paraquat (mit 5 % Saccharose in Wasser) inkubiert und das Überleben der Tiere überwacht. Pro Genotyp und Geschlecht wurden jeweils fünf Röhrchen (150 Tiere) ausgezählt. Paraquat führt schon nach 20 Stunden zu einem Abfall der Überlebenskurven. Hierbei zeigen sich die mutanten Tiere (Allel 35.1 und 35.7) sensibler als die Kontrolle. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***)

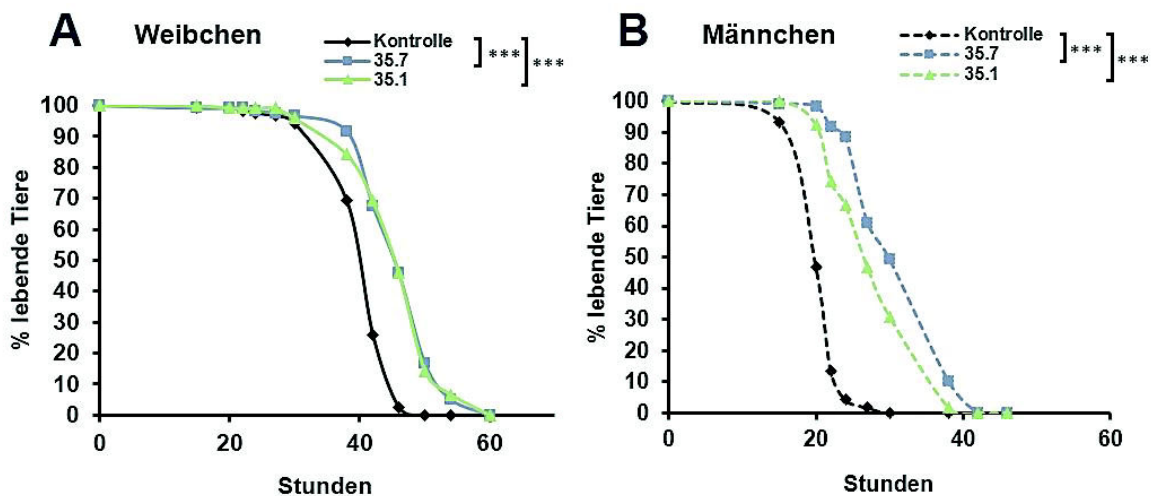


Abbildung 61: Sensitivität gegenüber Trockenstress. 30 Tiere wurden ohne Futter- und Wasserquelle in ein Röhrchen gegeben und tote Tiere alle vier bis zwölf Stunden ausgezählt. Pro Geschlecht und Genotyp wurden vier Röhrchen ausgezählt (120 Tiere). Bei den CG9186 mutanten Weibchen und Männchen zeigt sich eine höhere Resistenz gegenüber Trockenstress und dadurch eine statistisch signifikante Rechtsverschiebung der Überlebenskurven. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***)

Tabelle 18: Nährstoffzusammensetzung der *Drosophila*-Medien der AG Klein (Standardmedium 1), AG Jäckle (Standardmedium 2), sowie des Wenig Hefe (WH) Mediums. Angegeben sind Nährstoff-relevanten Inhaltsstoffe der Medien mit deren Anteil am Nährwert (in kJoule) und Menge an Zucker, Protein und Fett (in g). Die Informationen zu den einzelnen Nährstoffen stammen von den Verpackungen. Zu dem Wenig Zucker Medium (WZ, (Na *et al.*, 2013)) können keine genauen Nährstoff-Angaben gemacht werden, da der Zuckergehalt von Bacto-Pepton und Bacto Yeast Extract nicht bekannt war.

	Nährwert pro 100 ml			g Zucker pro 100 ml			g Protein pro 100 ml			g Fett pro 100 ml		
	Medium 1	Medium 2	WH	Medium 1	Medium 2	WH	Medium 1	Medium 2	WH	Medium 1	Medium 2	WH
Maisschrot	98,8	111,4	111,4	0,1	0,1	0,1	0,6	0,7	0,7	0,1	0,1	0,1
Sojamehl	17,3	18,2	18,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2
Trockenhefe	22,9	24,5	2,4	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	0,1	0,1	0,1	0,0
Rübensirup	50,7	27,9	27,9	2,6	1,5	1,5	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
Malzextrakt	54,7	97,3	97,3	2,0	3,6	3,6	0,2	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0
Summe	244,4	279,2	257,2	4,8	5,2	5,2	2,1	2,3	1,7	0,4	0,5	0,3

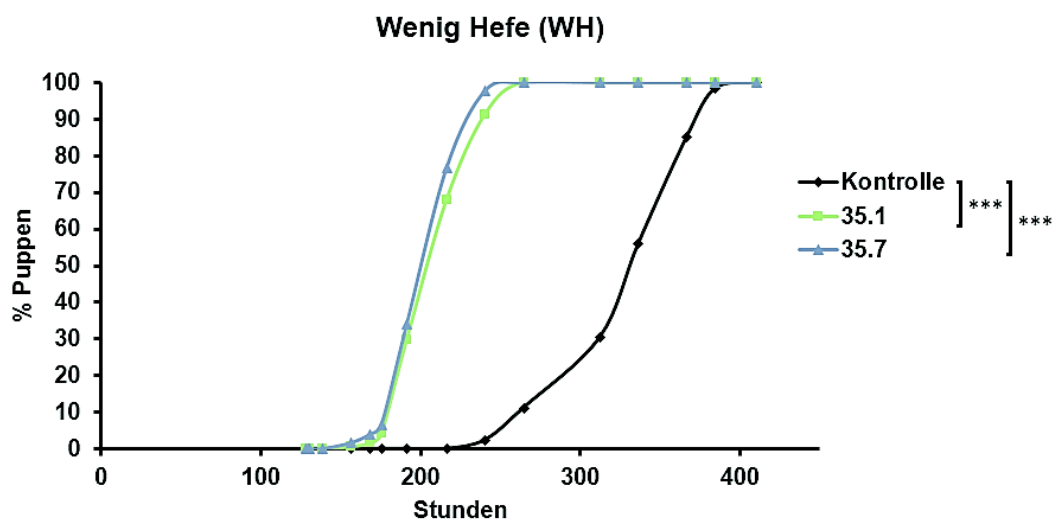


Abbildung 62: Larvale Entwicklungsdauer auf Futter mit wenig Hefe (WH). 50-60 adulte Fliegen (sieben Tage alt) wurden für ca. 16 Stunden auf Futter mit wenig Hefe (Medium 2 mit 90 % weniger Hefe) gehalten und das Auftreten von Puppen gezählt (Inkubation bei 25 °C). Die mutanten Tiere (35.1 und 35.7) entwickeln sich signifikant früher bis zur Verpuppung als die Kontrolltiere. Signifikanzniveaus: $p < 0,001$ (***)

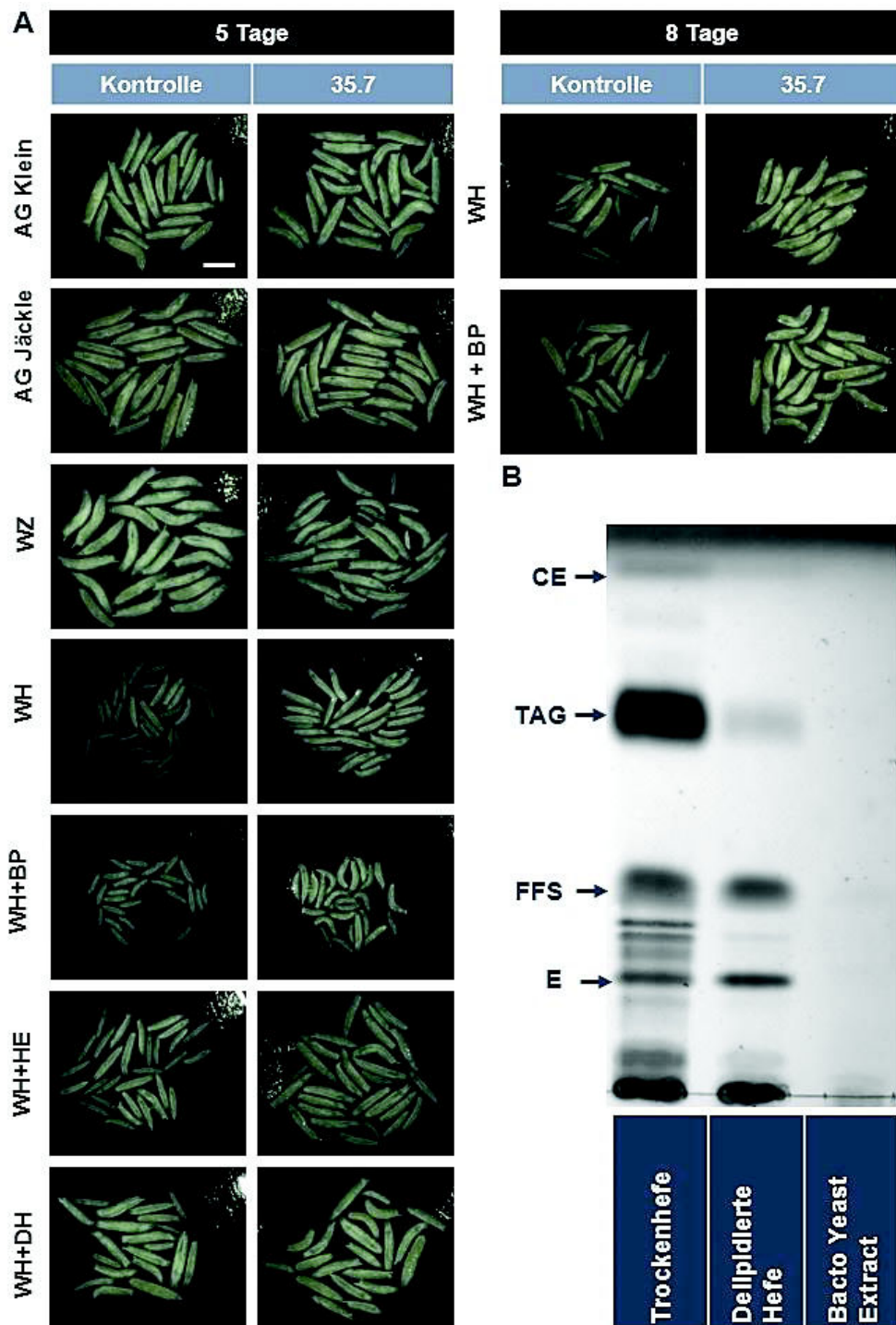


Abbildung 63: Rettungsexperiment für die larvale Entwicklung auf WH-Medium. A: 50-60 adulte Tiere wurden über Nacht auf verschiedene Futter (Standard, WZ, WH sowie WH mit verschiedenen Zusätzen) gesetzt. Nach genau fünf Tagen wurden Bilder von den Larven aufgenommen. Von den Larven auf dem WH sowie WH+BP (BP = Bacto Pepton) Futter wurden nach weiteren drei Tagen (auftreten erster nicht wandernder L3 Larven) erneut Bilder aufgenommen. Auf dem WH Medium kommt es zu einem verlangsamten Wachstum. Dieser Effekt ist in der Kontrolllinie stärker ausgeprägt als in der CG9186 Mutante. Durch Zugabe von delipidierter Hefe (WH+DH) kann das Wachstum gerettet werden, durch Zugabe von Bacto Pepton nicht. Supplementation des WH Mediums mit Bacto Yeast Extract (WH+HE) führt zu einer partiellen Rettung. Der Maßstabsbalken entspricht 2 mm. (B): TLC mit Lipid-Extrakt aus Trockenhefe, delipidierter Hefe und Bacto Yeast Extract. CE= Cholesterol Ester, FFS = freie Fettsäuren, E = Ergosterol.

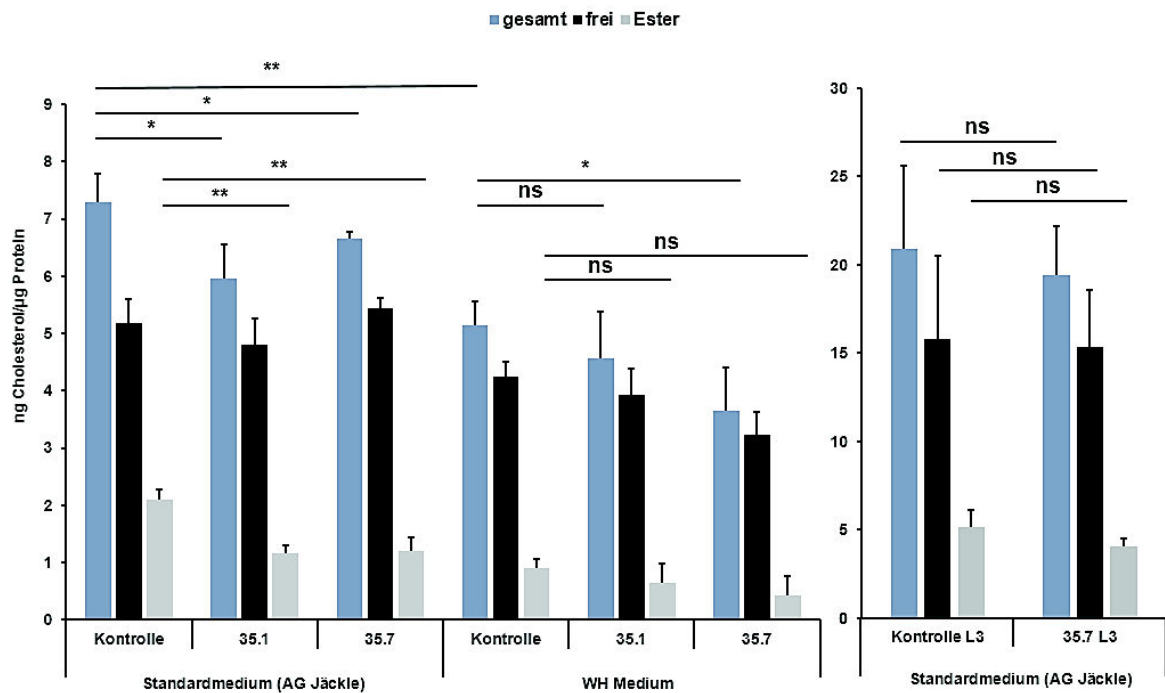


Abbildung 64: Messung von Cholesterol in sieben Tage alten adulten Männchen und L3 Larven. Gemessen wird das Gesamt-Cholesterol und freies Cholesterol, hieraus errechnen sich die Cholesterolester. Die Entwicklung der adulten Tiere fand entweder auf Standardmedium (Medium 2) oder WH Medium statt. Die Entwicklung auf WH Medium hat eine signifikant verringerte Gesamt-Cholesterol Menge zur Folge. Die Allele 35.1 und 35.7 weisen auf Standardmedium geringere Gesamt-Cholesterol- und Cholesterolester Werte auf als die Kontrolllinie. Auf WH Medium sind die Unterschiede nicht signifikant. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)

Abkürzungsverzeichnis

Bezeichnung	Abkürzung
adipokinetisches Hormon	AKH
adipose plasma membrane associated Protein	APMAP
ancient ubiquitous protein 1	AUP1
Arginin	R
Aspartat	D
beziehungsweise	bzw.
Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid)	BCA
Bovines Serum-Albumin	BSA
circa	ca.
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	CRISPR
computed gene	CG
Corpora cardiaca	CC
CRISPR associated endonuclease 9	Cas9
CTP:phosphocholin cytidyltransferase	CCT
Cystein	C
Deoxyribonucleic acid	DNA
Diacylglycerol-O-acyltransferase 2	DGAT2
Diacylglyceroltransferase 1 (DGAT-1, Drosophila Gen: mdy, midway)	DGAT-1
Doppelstrangbruch	DSB
doppelsträngige RNA	dsRNA
Drosophila Insulin Rezeptor	dInR
Drosophila Insulin-like Peptide	DILP
Drosophila protein interaction map	DPIM
Drosophila RNAi Screening Center	DRSC
Dünnschichtchromatographie (engl. thin layer chromatography)	TLC
engl.	Englisch
Umdrehungen (engl.: rounds per minute)	rpm
enhanced green fluorescent protein	eGFP
ER-assoziierten Degradation	ERAD
Escherichia coli	E. coli
et alii	et al.
Ethanol	EtOH
Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	EGTA
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
expression Quantitative Trait Locus	eQTL
expression quantitative trait locus	eQTL
fatty acid binding protein	fabp
Function Analysis and Selection Tool for Single Nucleotide Polymorphisms	FastSNP
Genome Wide Association Studies	GWAS
Glycin	G
guide RNA	gRNA
Histidin	H
Hormone-sensitive lipase	HSL
Horseradish peroxidase	HRP

Insulin producing cell	IPC
Insulin/Insulin-like growth factor Signalweg	IIS
Insulin-like growth factor	IGF
Juvenile hormone epoxide hydrolase	Jheh
Juvenile hormone-inducible protein 1	Jhl-1
kodierende Sequenz (engl.: coding sequence)	CDS
komplementäre DNA	cDNA
Lysin	K
Maximum Intensitäts-Projektion	MIP
mechanistic Target Of Rapamycin	mTOR
midway	mdy
Mouse lipid droplet associated hydrolase	mLDAH
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	SDS-PAGE
offener Leserahmen (engl.: open reading frame)	ORF
Ölsäure (engl.: oleic acid)	OA
P450 Oxidoreduktase	POR
Phosphate buffered saline	PBS
Polymerase chain reaction	PCR
pro analysis	p.a.
Protein-Protein Interaktion	PPI
Revolutions per minute	rpm
Ribonucleic Acid	RNA
RNA Interferenz	RNAi
Serin	S
Silent Information Regulator 2	Sir2
Single Nucleotide Polymorphism	SNP
sterol regulatory element binding protein	SREBP
Stunde(n)	h
target of brain insulin	tobi
Trehalose	Tre
Triacylglycerol	TAG
Unpaired 2	Upd2
Untranslatierter Bereich (engl.: untranslated region)	UTR
Upstream activating sequence	UAS
Vollentsalztes Wasser	VE Wasser
wenig Hefe	WH
wenig Zucker	WZ
zum Beispiel	z.B.

Literaturverzeichnis

- Acconcia, F., Sigismund, S., and Polo, S. (2009). Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp. Cell Res.* **315**, 1610–1618.
- Agrawal, P., and Hardin, P.E. (2016). An RNAi Screen To Identify Protein Phosphatases That Function Within the *Drosophila* Circadian Clock. *G3 (Bethesda)* **6**, 4227–4238.
- Altintas, O., Park, S., and Lee, S.-J.V.J. (2016). The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Rep* **49**, 81–92.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Arrese, E.L., Saudale, F.Z., and Soulages, J.L. (2014). Lipid Droplets as Signaling Platforms Linking Metabolic and Cellular Functions. *Lipid Insights* **7**, 7–16.
- Asakawa, and Matsushita (1979). Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids* **14**, 401–406.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory **1**.
- Atashpour, S., Jahromi, H., Jahromi, Z., and Zarei, S. (2017). Antioxidant effects of aqueous extract of Salep on Paraquat-induced rat liver injury. *World J Hepatol* **9**, 209–216.
- Avila, J.R., Lee, J.S., and Torii, K.U. (2015). Co-Immunoprecipitation of Membrane-Bound Receptors. *Arabidopsis Book* **13**, e0180.
- Bailey, A.P., Koster, G., Guillermer, C., Hirst, E.M., MacRae, J.I., Lechene, C.P., Postle, A.D., and Gould, A.P. (2015). Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* **163**, 340–353.
- Baker, K.D., and Thummel, C.S. (2007). Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab.* **6**, 257–266.
- Bard, M., Woods, R.A., Bartón, D.H., Corrie, J.E., and Widdowson, D.A. (1977). Sterol mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: chromatographic analyses. *Lipids* **12**, 645–654.
- Bartz, R., Li, W.-H.H., Venables, B., Zehmer, J.K., Roth, M.R., Welti, R., Anderson, R.G., Liu, P., and Chapman, K.D. (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* **48**, 837–847.
- Bassett, A.R., and Liu, J.-L.L. (2014). CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J Genet Genomics* **41**, 7–19.
- Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., and Liu, J.-L.L. (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep* **4**, 220–228.
- Begg, M., and Robertson, F. (1950). The nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*.
- Beller, M., Riedel, D., Jänsch, L., Dieterich, G., Wehland, J., Jäckle, H., and Kühnlein, R.P. (2006). Characterization of the *Drosophila* lipid droplet subproteome. *Mol. Cell Proteomics* **5**, 1082–1094.
- Beshel, J., Dubnau, J., and Zhong, Y. (2017). A Leptin Analog Locally Produced in the Brain Acts via a Conserved Neural Circuit to Modulate Obesity-Linked Behaviors in *Drosophila*. *Cell Metab.* **25**, 208–217.

- Bi, K., He, Z., Gao, Z., Zhao, Y., Fu, Y., Cheng, J., Xie, J., Jiang, D., and Chen, T. (2016). Integrated omics study of lipid droplets from *Plasmodiophora brassicae*. *Sci Rep* 6, 36965.
- Billeter, J.-C.C., Atallah, J., Krupp, J.J., Millar, J.G., and Levine, J.D. (2009). Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 461, 987–991.
- Bobyk, K.D., Kim, S.G., Kumar, V.P., Kim, S.-K.K., West, A.H., and Cook, P.F. (2011). The oxidation state of active site thiols determines activity of saccharopine dehydrogenase at low pH. *Arch. Biochem. Biophys.* 513, 71–80.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Brasaemle, D.L., and Wolins, N.E. (2012). Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion. *J. Biol. Chem.* 287, 2273–2279.
- Breier, G. (2000). Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin. Thromb. Hemost.* 26, 553–559.
- Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., and Risau, W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114, 521–532.
- Broughton, S.J., Piper, M.D., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Driege, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D.J., Leivers, S.J., *et al.* (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3105–3110.
- Broughton, S.J., Slack, C., Alic, N., Metaxakis, A., Bass, T.M., Driege, Y., and Partridge, L. (2010). DILP-producing median neurosecretory cells in the *Drosophila* brain mediate the response of lifespan to nutrition. *Aging Cell* 9, 336–346.
- Buch, S., Melcher, C., Bauer, M., Katzenberger, J., and Pankratz, M. (2008). Opposing Effects of Dietary Protein and Sugar Regulate a Transcriptional Target of *Drosophila* Insulin-like Peptide Signaling. *Cell Metabolism* 7, 321–332.
- Buszczak, M., Lu, X., Segraves, W.A., Chang, T.Y., and Cooley, L. (2002). Mutations in the midway gene disrupt a *Drosophila* acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase. *Genetics* 160, 1511–1518.
- Cadwell, K., and Coscoy, L. (2005). Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* 309, 127–130.
- Campbell, N.A., and Reece, J.B. (2009). *Biologie*. Pearson 8th Edition.
- Carvalho, M., Schwudke, D., Sampaio, J.L., Palm, W., Riezman, I., Dey, G., Gupta, G.D., Mayor, S., Riezman, H., Shevchenko, A., *et al.* (2010). Survival strategies of a sterol auxotroph. *Development* 137, 3675–3685.
- Carvalho, M., Sampaio, J.L., Palm, W., Brankatschk, M., Eaton, S., and Shevchenko, A. (2012). Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome. *Mol. Syst. Biol.* 8, 600.
- Celniker, S.E., Dillon, L.A., Gerstein, M.B., Gunsalus, K.C., Henikoff, S., Karpen, G.H., Kellis, M., Lai, E.C., Lieb, J.D., MacAlpine, D.M., *et al.* (2009). Unlocking the secrets of the genome. *Nature* 459, 927–930.
- Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S.P., and Welte, M.A. (2006). The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr. Biol.* 16, 1783–1795.
- Cerqueira, N.M., Oliveira, E.F., Gesto, D.S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H.N., Ramos, M.J., and Fernandes, P.A. (2016). Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* 55, 5483–5506.

- Chatterjee, D., Katewa, S.D., Qi, Y., Jackson, S.A., Kapahi, P., and Jasper, H. (2014). Control of metabolic adaptation to fasting by dILP6-induced insulin signaling in *Drosophila* oenocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 17959–17964.
- Cherbas, L., Willingham, A., Zhang, D., Yang, L., Zou, Y., Eads, B.D., Carlson, J.W., Landolin, J.M., Kapranov, P., Dumais, J., *et al.* (2011). The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines. *Genome Res.* *21*, 301–314.
- Chintapalli, V.R., Wang, J., and Dow, J.A. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* melanogaster models of human disease. *Nat. Genet.* *39*, 715–720.
- Cho, N.K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F., and Krasnow, M.A. (2002). Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* *108*, 865–876.
- Cinnamon, E., Makki, R., Sawala, A., Wickenberg, L.P., Blomquist, G.J., Tittiger, C., Paroush, Z., and Gould, A.P. (2016). *Drosophila* Spidey/Kar Regulates Oenocyte Growth via PI3-Kinase Signaling. *PLoS Genet.* *12*, e1006154.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Léopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* *114*, 739–749.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carré, C., Noselli, S., and Léopold, P. (2005). Antagonistic Actions of Ecdysone and Insulins Determine Final Size in *Drosophila*. *Science* *310*, 667–670.
- Cushman, S.W. (1970). Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell. *J. Cell Biol.* *46*, 326–341.
- Czabany, T., Wagner, A., Zweytick, D., Lohner, K., Leitner, E., Ingolic, E., and Daum, G. (2008). Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *283*, 17065–17074.
- Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J., and Wąsowicz, W. (2015). Today's oxidative stress markers. *Med Pr* *66*, 393–405.
- Dainiak, N., Davies, G., Kalmanti, M., Lawler, J., and Kulkarni, V. (1983). Platelet-derived growth factor promotes proliferation of erythropoietic progenitor cells in vitro. *J. Clin. Invest.* *71*, 1206–1214.
- Della Vedova, M.C., Muñoz, M.D., Santillan, L.D., Plateo-Pignatari, M.G., Germanó, M.J., Rinaldi Tosi, M.E.E., Garcia, S., Gomez, N.N., Fornes, M.W., Gomez Mejiba, S.E., *et al.* (2016). A Mouse Model of Diet-Induced Obesity Resembling Most Features of Human Metabolic Syndrome. *Nutr Metab Insights* *9*, 93–102.
- Ding, Y., Yang, L., Zhang, S., Wang, Y., Du, Y., Pu, J., Peng, G., Chen, Y., Zhang, H., Yu, J., *et al.* (2012a). Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets. *J. Lipid Res.* *53*, 399–411.
- Ding, Y., Wu, Y., Zeng, R., and Liao, K. (2012b). Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* *44*, 394–406.
- Djawdan, M., Chippindale, A.K., Rose, M.R., and Bradley, T.J. (1998a). Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Zool.* *71*, 584–594.
- Djawdan, M., Chippindale, A.K., Rose, M.R., and Bradley, T.J. (1998b). Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Zoology* *71*, 584–594.
- Dobrosotskaya, IY, Seegmiller, AC, Brown, MS, Goldstein, JL, and Rawson, RB (2002). Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science* *296*, 879–883.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.

Du, M., Tillmans, L., Gao, J., Gao, P., Yuan, T., Dittmar, R.L., Song, W., Yang, Y., Sahr, N., Wang, T., *et al.* (2016). Chromatin interactions and candidate genes at ten prostate cancer risk loci. *Sci Rep* 6, 23202.

Echalier, G., and A (1969). Isolement, en cultures in vitro, de lignees cellulaires diploides de *Drosophila melanogaster*. *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris D. Sci. Nat.* 1771–1773.

Echeverri, C.J., Beachy, P.A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S.K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A.G., Hacohen, N., *et al.* (2006). Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods* 3, 777–779.

Elmadfa, I., and Leitzmann, C. (2004). Ernährung des Menschen. Eugen Ulmer Stuttgart 4th Edition.

Enell, L.E., Kapan, N., Söderberg, J.A., Kahsai, L., and Nässel, D.R. (2010). Insulin signaling, lifespan and stress resistance are modulated by metabotropic GABA receptors on insulin producing cells in the brain of *Drosophila*. *PLoS ONE* 5, e15780.

Farese, R.V., and Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855–860.

Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., and Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 319–360.

Fontaine, K.R., Redden, D.T., Wang, C., Westfall, A.O., and Allison, D.B. (2003). Years of life lost due to obesity. *JAMA* 289, 187–193.

Fukata, Y., Kimura, K., Oshiro, N., Saya, H., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1998). Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J. Cell Biol.* 141, 409–418.

Gefen, E., Marlon, A.J., and Gibbs, A.G. (2006). Selection for desiccation resistance in adult *Drosophila melanogaster* affects larval development and metabolite accumulation. *The Journal of Experimental Biology* 209, 3293–3300.

Gloor, Preston, Johnson-Schlitz, Nassif, Phillis, Benz, Robertson, and Engels (1993). Type I repressors of P element mobility. *Genetics* 135, 81–95.

Goo, Y.-H., Son, S.-H., Kreienberg, P., and Paul, A. (2014). Novel Lipid Droplet–Associated Serine Hydrolase Regulates Macrophage Cholesterol MobilizationSignificance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34, 386–396.

Gramates, S., Marygold, S., dos Santos, G., Urbano, J.-M., Antonazzo, G., Matthews, B., Rey, A., Tabone, C., Crosby, M., Emmert, D., *et al.* (2017). FlyBase at 25: looking to the future. *Nucleic Acids Res* 45, D663–D671.

Greene, E.A., Codomo, C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J., Reynolds, S.H., Enns, L.C., Burtner, C., Johnson, J.E., Odden, A.R., *et al.* (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 164, 731–740.

Grönke, S., Beller, M., Fellert, S., Ramakrishnan, H., Jäckle, H., and Kühnlein, R.P. (2003). Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Curr. Biol.* 13, 603–606.

Grönke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Müller, G., Jäckle, H., and Kühnlein, R.P. (2005). Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab.* 1, 323–330.

De Guia, R.M., Rose, A.J., and Herzig, S. (2014). Glucocorticoid hormones and energy homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig* 19, 117–128.

Guruharsha, K.G., Rual, J.-F.F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D.Y., Cenaj, O., *et al.* (2011). A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **147**, 690–703.

Gutierrez, E., Wiggins, D., Fielding, B., and Gould, A.P. (2007). Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* **445**, 275–280.

Gáliková, M., Diesner, M., Klepsatel, P., Hehlert, P., Xu, Y., Bickmeyer, I., Predel, R., and Kühnlein, R.P. (2015). Energy Homeostasis Control in *Drosophila* Adipokinetic Hormone Mutants. *Genetics* **201**, 665–683.

Hales, K.G., Korey, C.A., Larracuente, A.M., and Roberts, D.M. (2015). Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics* **201**, 815–842.

Halliwell, B., and Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **57**, 715S–724S; discussion 724S–725S.

Harris, K.E., Schnittke, N., and Beckendorf, S.K. (2007). Two ligands signal through the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor to ensure proper salivary gland positioning. *Mech. Dev.* **124**, 441–448.

Hartman, I.Z., Liu, P., Zehmer, J.K., Luby-Phelps, K., Jo, Y., Anderson, R.G., and DeBose-Boyd, R.A. (2010). Sterol-induced dislocation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from endoplasmic reticulum membranes into the cytosol through a subcellular compartment resembling lipid droplets. *J. Biol. Chem.* **285**, 19288–19298.

Ten Have, S., Boulon, S., Ahmad, Y., and Lamond, A.I. (2011). Mass spectrometry-based immunoprecipitation proteomics - the user's guide. *Proteomics* **11**, 1153–1159.

Heino, T.I., Kärpänen, T., Wahlström, G., Pulkkinen, M., Eriksson, U., Alitalo, K., and Roos, C. (2001). The *Drosophila* VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes. *Mech. Dev.* **109**, 69–77.

Hentze, J.L., Moeller, M.E., Jørgensen, A.F., Bengtsson, M.S., Bordoy, A.M., Warren, J.T., Gilbert, L.I., Andersen, O., and Rewitz, K.F. (2013). Accessory gland as a site for prothoracicotrophic hormone controlled ecdysone synthesis in adult male insects. *PLoS ONE* **8**, e55131.

Herboso, L., Oliveira, M.M., Talamillo, A., Pérez, C., González, M., Martín, D., Sutherland, J.D., Shingleton, A.W., Mirth, C.K., and Barrio, R. (2015). Ecdysone promotes growth of imaginal discs through the regulation of Thor in *D. melanogaster*. *Sci Rep* **5**, 12383.

Hermes, A., Bosch, M., Ariotti, N., Reddy, B.J., Fajardo, A., Fernández-Vidal, A., Alvarez-Guaita, A., Fernández-Rojo, M.A., Rentero, C., Tebar, F., *et al.* (2013). Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr. Biol.* **23**, 1489–1496.

Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 389–410.

Hildebrandt, A., Bickmeyer, I., and Kühnlein, R.P. (2011). Reliable *Drosophila* body fat quantification by a coupled colorimetric assay. *PLoS ONE* **6**, e23796.

Hobson, RP (1935). On a fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae: Identity of the growth factor with cholesterol. *Biochemical Journal*.

Hoffmann, J., Romey, R., Fink, C., Yong, L., and Roeder, T. (2013). Overexpression of Sir2 in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*. *Aging (Albany NY)* **5**, 315–327.

Holm, C., Belfrage, P., Osterlund, T., Davis, R.C., Schotz, M.C., and Langin, D. (1994). Hormone-sensitive lipase: structure, function, evolution and overproduction in insect cells using the baculovirus expression system. *Protein Eng.* **7**, 537–541.

Hotamisligil, G.S.S., and Bernlohr, D.A. (2015). Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 11, 592–605.

Huang, C., Haritunians, T., Okou, D.T., Cutler, D.J., Zwick, M.E., Taylor, K.D., Datta, L.W., Maranville, J.C., Liu, Z., Ellis, S., *et al.* (2015). Characterization of genetic loci that affect susceptibility to inflammatory bowel diseases in African Americans. *Gastroenterology* 149, 1575–1586.

Huang, H., Lu-Bo, Y., and Haddad, G.G. (2014). A *Drosophila* ABC transporter regulates lifespan. *PLoS Genet.* 10, e1004844.

Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J., and Steigemann, W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 89, 73–101.

Hwangbo, D.S., Gershman, B., Gershman, B., Tu, M.-P.P., Palmer, M., and Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429, 562–566.

Ito, S., Ueda, T., Ueno, A., Nakagawa, H., Taniguchi, H., Kayukawa, N., and Miki, T. (2014). A genetic screen in *Drosophila* for regulators of human prostate cancer progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 548–555.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., and Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315–351.

Jahromi, S.R., Haddadi, M., Shivanandappa, T., and Ramesh, S.R. (2015). Modulatory effect of *Decalepis hamiltonii* on ethanol-induced toxicity in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 80, 1–6.

Jiang, Z., Wu, X.-L.L., Michal, J.J., and McNamara, J.P. (2005). Pattern profiling and mapping of the fat body transcriptome in *Drosophila melanogaster*. *Obes. Res.* 13, 1898–1904.

Jo, Y., Hartman, I.Z., and DeBose-Boyd, R.A. (2013). Ancient ubiquitous protein-1 mediates sterol-induced ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in lipid droplet-associated endoplasmic reticulum membranes. *Mol. Biol. Cell* 24, 169–183.

Jékely, G., Sung, H.-H.H., Luque, C.M., and Rørth, P. (2005). Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration. *Dev. Cell* 9, 197–207.

Kaiser, W.J., Vucic, D., and Miller, L.K. (1998). The *Drosophila* inhibitor of apoptosis D-IAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE. *FEBS Lett.* 440, 243–248.

Kamoshida, Y., Fujiyama-Nakamura, S., Kimura, S., Suzuki, E., Lim, J., Shiozaki-Sato, Y., Kato, S., and Takeyama, K.-I. (2012). Ecdysone receptor (EcR) suppresses lipid accumulation in the *Drosophila* fat body via transcription control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 203–207.

Kannan, K., and Fridell, Y.-W.C.W. (2013). Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Front Physiol* 4, 288.

Kapahi, P., Kaeberlein, M., and Hansen, M. (2016). Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res. Rev.*

Kavanaugh, N.L., Zhang, A.Q., Nobile, C.J., Johnson, A.D., and Ribbeck, K. (2014). Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. *MBio* 5, e01911.

Kayukawa, T., Minakuchi, C., Namiki, T., Togawa, T., Yoshiyama, M., Kamimura, M., Mita, K., Imanishi, S., Kiuchi, M., Ishikawa, Y., *et al.* (2012). Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 11729–11734.

- Kim, J., and Neufeld, T.P. (2015). Dietary sugar promotes systemic TOR activation in *Drosophila* through AKH-dependent selective secretion of Dilp3. *Nat Commun* 6, 6846.
- Kolkhof, P., Werthebach, M., van de Venn, A., Poschmann, G., Chen, L., Welte, M., Stühler, K., and Beller, M. (2017). A Luciferase-fragment Complementation Assay to Detect Lipid Droplet-associated Protein-Protein Interactions. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 16, 329–345.
- Kondo, S., and Ueda, R. (2013). Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics* 195, 715–721.
- Kory, N., Thiam, A.-R.R., Farese, R.V., and Walther, T.C. (2015). Protein Crowding Is a Determinant of Lipid Droplet Protein Composition. *Dev. Cell* 34, 351–363.
- Kory, N., Grond, S., Kamat, S.S., Li, Z., Krahmer, N., Chitraju, C., Zhou, P., Fröhlich, F., Semova, I., Ejising, C., *et al.* (2017). Mice lacking lipid droplet-associated hydrolase, a gene linked to human prostate cancer, have normal cholesterol ester metabolism. *J. Lipid Res.* 58, 226–235.
- Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H.W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D.E., Mann, M., *et al.* (2011). Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab.* 14, 504–515.
- Kühnlein, R. (2010). Energy homeostasis regulation in *Drosophila*: a lipocentric perspective. *Results Probl Cell D* 52, 159–173.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lashmanova, E., Proshkina, E., Zhikrivetskaya, S., Shevchenko, O., Marusich, E., Leonov, S., Melerzanov, A., Zhavoronkov, A., and Moskalev, A. (2015). Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol. Res.* 100, 228–241.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 3, 309–319.
- Lavrynenko, O., Rodenfels, J., Carvalho, M., Dye, N.A., Lafont, R., Eaton, S., and Shevchenko, A. (2015). The ecdysteroidome of *Drosophila*: influence of diet and development. *Development* 142, 3758–3768.
- Lee, G., and Park, J.H. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311–323.
- Leitgeb, B., Kerényi, A., Bogár, F., Paragi, G., Penke, B., and Rákhely, G. (2007). Studying the structural properties of polyalanine and polyglutamine peptides. *J Mol Model* 13, 1141–1150.
- Lemaitre, B., and Miguel-Aliaga, I. (2013). The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Genet.* 47, 377–404.
- LeRoith, D., Kavsan, V.M., Koval, A.P., and Roberts, C.T. (1993). Phylogeny of the insulin-like growth factors (IGFs) and receptors: a molecular approach. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 332–6; discussion 337–8.
- Li, Y., Ma, Q., Cherry, C.M., and Matunis, E.L. (2014a). Steroid signaling promotes stem cell maintenance in the *Drosophila* testis. *Dev. Biol.* 394, 129–141.

- Li, Z., Johnson, M.R., Ke, Z., Chen, L., and Welte, M.A. (2014b). *Drosophila* lipid droplets buffer the H2Av supply to protect early embryonic development. *Curr. Biol.* 24, 1485–1491.
- Lindström, S., Schumacher, F.R., Campa, D., Albanes, D., Andriole, G., Berndt, S.I., Bueno-de-Mesquita, H.B., Chanock, S.J., Diver, W.R., Ganziano, J.M., *et al.* (2012). Replication of five prostate cancer loci identified in an Asian population—results from the NCI Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21, 212–216.
- Lindén, S.K., Sheng, Y.H., Every, A.L., Miles, K.M., Skoog, E.C., Florin, T.H., Sutton, P., and McGuckin, M.A. (2009). MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS Pathog.* 5, e1000617.
- Linford, N.J., Bilgir, C., Ro, J., and Pletcher, S.D. (2013). Measurement of Lifespan in *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp.*
- Lipkin, M. (1971). In “defence” of the gastric mucosa. *Gut* 12, 599–603.
- Liu, Y., Patricelli, M., and Cravatt, B. (1999). Activity-based protein profiling: The serine hydrolases. *Proc National Acad Sci* 96, 14694–14699.
- Liu, Y., Sheng, Z., Liu, H., Wen, D., He, Q., Wang, S., Shao, W., Jiang, R.-J.J., An, S., Sun, Y., *et al.* (2009). Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 136, 2015–2025.
- Liu, Y., Luo, J., Carlsson, M.A., and Nässel, D.R. (2015). Serotonin and insulin-like peptides modulate leucokinin-producing neurons that affect feeding and water homeostasis in *Drosophila*. *J. Comp. Neurol.* 523, 1840–1863.
- Liu, Y., Liao, S., Veenstra, J.A., and Nässel, D.R. (2016). *Drosophila* insulin-like peptide 1 (DILP1) is transiently expressed during non-feeding stages and reproductive dormancy. *Sci Rep* 6, 26620.
- Liu, Z., Li, X., Prasifka, J.R., Jurenka, R., and Bonning, B.C. (2008). Overexpression of *Drosophila* juvenile hormone esterase binding protein results in anti-JH effects and reduced pheromone abundance. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 164–172.
- Lohmann, D., Spandl, J., Stevanovic, A., Schoene, M., Philippou-Massier, J., and Thiele, C. (2013). Monoubiquitination of ancient ubiquitous protein 1 promotes lipid droplet clustering. *PLoS ONE* 8, e72453.
- Long, Q.-Z.Z., Du, Y.-F.F., Ding, X.-Y.Y., Li, X., Song, W.-B.B., Yang, Y., Zhang, P., Zhou, J.-P.P., and Liu, X.-G.G. (2012). Replication and fine mapping for association of the C2orf43, FOXP4, GPRC6A and RFX6 genes with prostate cancer in the Chinese population. *PLoS ONE* 7, e37866.
- Luo, L., and Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* 231, R77–R99.
- Lycett, G.J., McLaughlin, L.A., Ranson, H., Hemingway, J., Kafatos, F.C., Loukeris, T.G., and Paine, M.J. (2006). *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Mol. Biol.* 15, 321–327.
- Löffler, G., Petrides, P.E., and Heinrich, P.C. (2007). *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg 8th Edition.
- Makki, R., Cinnamon, E., and Gould, A. (2014). The Development and Functions of Oenocytes. *Annu Rev Entomol* 59, 405–425.
- Marunde, M.R., Samarajeewa, D.A., Anderson, J., Li, S., Hand, S.C., and Menze, M.A. (2013). Improved tolerance to salt and water stress in *Drosophila melanogaster* cells conferred by late embryogenesis abundant protein. *J Insect Physiol* 59, 377–386.
- Marzec, M., Eletto, D., and Argon, Y. (2012). GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 774–787.

- Matsuda, H., Yamada, T., Yoshida, M., and Nishimura, T. (2015). Flies without trehalose. *J. Biol. Chem.* 290, 1244–1255.
- Maynard, J.C., Pham, T., Zheng, T., Jockheck-Clark, A., Rankin, H.B., Newgard, C.B., Spana, E.P., and Nicchitta, C.V. (2010). Gp93, the *Drosophila* GRP94 ortholog, is required for gut epithelial homeostasis and nutrient assimilation-coupled growth control. *Dev. Biol.* 339, 295–306.
- McMurray, F., Patten, D.A., and Harper, M.-E.E. (2016). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity-Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity (Silver Spring)* 24, 2301–2310.
- Van Meer, G. (2005). Cellular lipidomics. *EMBO J.* 24, 3159–3165.
- Miller, W.L. (2012). P450 oxidoreductase deficiency: a disorder of steroidogenesis with multiple clinical manifestations. *Sci Signal* 5, pt11.
- Miron, M., Verdú, J., Lachance, P.E., Birnbaum, M.J., Lasko, P.F., and Sonenberg, N. (2001). The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 3, 596–601.
- Mirth, C., Truman, J.W., and Riddiford, L.M. (2005). The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15, 1796–1807.
- Mirth, C.K., Tang, H.Y., Makohon-Moore, S.C., Salhadar, S., Gokhale, R.H., Warner, R.D., Koyama, T., Riddiford, L.M., and Shingleton, A.W. (2014). Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 7018–7023.
- Mitchell, S.J., Madrigal-Matute, J., Scheibye-Knudsen, M., Fang, E., Aon, M., González-Reyes, J.A.A., Cortassa, S., Kaushik, S., Gonzalez-Freire, M., Patel, B., *et al.* (2016). Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metab.* 23, 1093–1112.
- Miura, S., Gan, J.-W.W., Brzustowski, J., Parisi, M.J., Schultz, C.J., Londos, C., Oliver, B., and Kimmel, A.R. (2002). Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 277, 32253–32257.
- Mouritsen, O.G., and Zuckermann, M.J. (2004). What's so special about cholesterol? *Lipids* 39, 1101–1113.
- Murphy, D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249, 541–585.
- M'Angale, P.G., and Staveley, B.E. (2017). Overexpression of Buffy enhances the loss of parkin and suppresses the loss of Pink1 phenotypes in *Drosophila*. *Genome* 60, 241–247.
- Na, J., Musselman, L.P., Pendse, J., Baranski, T.J., Bodmer, R., Ocorr, K., and Cagan, R. (2013). A *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genet.* 9, e1003175.
- Nadal, A., Quesada, I., Tudurí, E., Nogueiras, R., and Alonso-Magdalena, P. (2017). Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. *Nat Rev Endocrinol.*
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194–198.
- Newell-Fugate, A.E. (2017). The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. *Reproduction* 153, R133–R149.
- Nian, Z., Sun, Z., Yu, L., Toh, S.Y., Sang, J., and Li, P. (2010). Fat-specific protein 27 undergoes ubiquitin-dependent degradation regulated by triacylglycerol synthesis and lipid droplet formation. *J. Biol. Chem.* 285, 9604–9615.

Nijhout, H.F., Riddiford, L.M., Mirth, C., Shingleton, A.W., Suzuki, Y., and Callier, V. (2014). The developmental control of size in insects. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3, 113–134.

Nässel, D.R., and Vanden Broeck, J. (2016). Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 271–290.

Ohhara, Y., Kobayashi, S., and Yamanaka, N. (2017). Nutrient-Dependent Endocycling in Steroidogenic Tissue Dictates Timing of Metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 13, e1006583.

Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Fujita, A., and Fujimoto, T. (2008). Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100. *J. Cell. Sci.* 121, 2415–2422.

Oldham, S., and Hafen, E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* 13, 79–85.

Ormerod, K.G., LePine, O.K., Abbineni, P.S., Bridgeman, J.M., Coorssen, J.R., Mercier, A.J., and Tattersall, G.J. (2017). *Drosophila* development, physiology, behavior, and lifespan are influenced by altered dietary composition. *Fly (Austin)* 1–18.

Ostrovsky, O., Makarewich, C.A., Snapp, E.L., and Argon, Y. (2009). An essential role for ATP binding and hydrolysis in the chaperone activity of GRP94 in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 11600–11605.

Pahwa, R., Adams-Huet, B., and Jialal, I. (2017). The effect of increasing body mass index on cardio-metabolic risk and biomarkers of oxidative stress and inflammation in nascent metabolic syndrome. *J. Diabetes Complicat.*

Parkash, R., and Aggarwal, D.D. (2012). Trade-off of energy metabolites as well as body color phenotypes for starvation and desiccation resistance in montane populations of *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 161, 102–113.

Peng, J. (2008). Evaluation of proteomic strategies for analyzing ubiquitinated proteins. *BMB Rep* 41, 177–183.

Penney, K.L., Sinnott, J.A., Tyekucheva, S., Gerke, T., Shui, I.M., Kraft, P., Sesso, H.D., Freedman, M.L., Loda, M., Mucci, L.A., *et al.* (2015). Association of prostate cancer risk variants with gene expression in normal and tumor tissue. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24, 255–260.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

Plötz, T., Hartmann, M., Lenzen, S., and Elsner, M. (2016). The role of lipid droplet formation in the protection of unsaturated fatty acids against palmitic acid induced lipotoxicity to rat insulin-producing cells. *Nutr Metab (Lond)* 13, 16.

Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2161–2172.

Post, S., and Tatar, M. (2016). Nutritional Geometric Profiles of Insulin/IGF Expression in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 11, e0155628.

Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G.J., and Feyereisen, R. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14858–14863.

Rajan, A., and Perrimon, N. (2012). *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. *Cell* 151, 123–137.

Regalado, J.M., Cortez, M.B., Grubbs, J., Link, J.A., van der Linden, A., and Zhang, Y. (2017). Increased food intake after starvation enhances sleep in *Drosophila melanogaster*. *J Genet Genomics.*

- Remy, I., and Michnick, S. (2006). A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat Methods* 3, 977–979.
- Riddiford, L.M., and Ashburner, M. (1991). Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 172–183.
- Rion, S., and Kawecki, T.J. (2007). Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 20, 1655–1664.
- Riva, F.T., Cossu, M., Lantini, M.S., and Riva, A. (1985). Fine structure of human deep posterior lingual glands. *J. Anat.* 142, 103–115.
- Robinson, C.J., and Stringer, S.E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell. Sci.* 114, 853–865.
- Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1981). Regulation of energy balance. *Annu. Rev. Nutr.* 1, 235–256.
- Rouault, J.-D.D., Marican, C., Wicker-Thomas, C., and Jallon, J.-M.M. (2004). Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature; a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Genetica* 120, 195–212.
- Ruggiano, A., Mora, G., Buxó, L., and Carvalho, P. (2016). Spatial control of lipid droplet proteins by the ERAD ubiquitin ligase Doa10. *The EMBO Journal* 35, 1644–1655.
- Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A.R., Roesley, S.N., and Sarcevic, B. (2012). Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* 64, 136–142.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Saka, H.A., and Valdivia, R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 411–437.
- Saldanha, A.J., Brauer, M.J., and Botstein, D. (2004). Nutritional homeostasis in batch and steady-state culture of yeast. *Mol. Biol. Cell* 15, 4089–4104.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006). Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *CSH Protoc* 2006.
- Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267–2277.
- Sandoval, H., Yao, C.-K.K., Chen, K., Jaiswal, M., Donti, T., Lin, Y.Q., Bayat, V., Xiong, B., Zhang, K., David, G., *et al.* (2014). Mitochondrial fusion but not fission regulates larval growth and synaptic development through steroid hormone production. *Elife* 3.
- Schaffer, M.H., Noyes, B.E., Slaughter, C.A., Thorne, G.C., and Gaskell, S.J. (1990). The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. *Biochem. J.* 269, 315–320.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T., and Gey, G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine* 97, 695–710.
- Schmidt, C., Ploier, B., Koch, B., and Daum, G. (2013). Analysis of yeast lipid droplet proteome and lipidome. *Methods Cell Biol.* 116, 15–37.

- Seino, A., Ogura, T., Tsubota, T., Shimomura, M., Nakakura, T., Tan, A., Mita, K., Shinoda, T., Nakagawa, Y., and Shiotsuki, T. (2010). Characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase and related genes in the larval development of the silkworm *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1421–1429.
- Servetnick, D.A., Brasaemle, D.L., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., Wolff, J., and Londos, C. (1995). Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 270, 16970–16973.
- Shakhmantsir, I., Massad, N.L., and Kennell, J.A. (2014). Regulation of cuticle pigmentation in *Drosophila* by the nutrient sensing insulin and TOR signaling pathways. *Dev. Dyn.* 243, 393–401.
- Shui, I.M., Lindström, S., Kibel, A.S., Berndt, S.I., Campa, D., Gerke, T., Penney, K.L., Albanes, D., Berg, C., Bueno-de-Mesquita, H.B., *et al.* (2014). Prostate cancer (PCa) risk variants and risk of fatal PCa in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Eur. Urol.* 65, 1069–1075.
- Sieber, M.H., and Spradling, A.C. (2015). Steroid Signaling Establishes a Female Metabolic State and Regulates SREBP to Control Oocyte Lipid Accumulation. *Curr. Biol.* 25, 993–1004.
- Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2010). Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: serine hydrolases as a case study. *J. Biol. Chem.* 285, 11051–11055.
- Singh, G., Kumar, A., Arya, S., Gupta, U.D., Singh, K., and Kaur, J. (2016). Characterization of a novel esterase Rv1497 of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv demonstrating β -lactamase activity. *Enzyme Microb. Technol.* 82, 180–190.
- Slack, C., Werz, C., Wieser, D., Alic, N., Foley, A., Stocker, H., Withers, D.J., Thornton, J.M., Hafen, E., and Partridge, L. (2010). Regulation of lifespan, metabolism, and stress responses by the *Drosophila* SH2B protein, Lnk. *PLoS Genet.* 6, e1000881.
- Small, C.A., Goodacre, J.A., and Yeaman, S.J. (1989). Hormone-sensitive lipase is responsible for the neutral cholesterol ester hydrolase activity in macrophages. *FEBS Lett.* 247, 205–208.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150, 76–85.
- Stahl, B.A., Slocumb, M.E., Chaitin, H., Diangelo, J.R., and Keene, A.C. (2017). Sleep-dependent modulation of metabolic rate in *Drosophila*. *Sleep*.
- Stokes, D.M., and Walker, D.A. (1970). Paraquat toxicity. *British Medical Journal* 3, 462–463.
- Stroud, R.M., Kay, L.M., and Dickerson, R.E. (1974). The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Angstrom and at 2-7 Angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* 83, 185–208.
- Stumpf, M.P., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H.J., Lappe, M., and Wiuf, C. (2008). Estimating the size of the human interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6959–6964.
- Syed, Z.A., Härd, T., Uv, A., and van Dijk-Härd, I.F. (2008). A potential role for *Drosophila* mucins in development and physiology. *PLoS ONE* 3, e3041.
- Sánchez, L., and Guerrero, I. (2001). The development of the *Drosophila* genital disc. *Bioessays* 23, 698–707.
- Ta, M.T., Kapterian, T.S., Fei, W., Du, X., Brown, A.J., Dawes, I.W., and Yang, H. (2012). Accumulation of squalene is associated with the clustering of lipid droplets. *FEBS J.* 279, 4231–4244.
- Tahergorabi, Z., Khazaei, M., Moodi, M., and Chamani, E. (2016). From obesity to cancer: a review on proposed mechanisms. *Cell Biochem. Funct.* 34, 533–545.

- Takata, R., Akamatsu, S., Kubo, M., Takahashi, A., Hosono, N., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Inazawa, J., Kamatani, N., Ogawa, O., *et al.* (2010). Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. *Nat. Genet.* 42, 751–754.
- Talamillo, A., Herboso, L., Pirone, L., Pérez, C., González, M., Sánchez, J., Mayor, U., Lopitz-Otsoa, F., Rodriguez, M.S., Sutherland, J.D., *et al.* (2013). Scavenger receptors mediate the role of SUMO and Ftz-f1 in *Drosophila* steroidogenesis. *PLoS Genet.* 9, e1003473.
- Tan, D.J., Dvinge, H., Christoforou, A., Bertone, P., Martinez Arias, A., and Lilley, K.S. (2009). Mapping organelle proteins and protein complexes in *Drosophila melanogaster*. *J. Proteome Res.* 8, 2667–2678.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44507–44512.
- Teleman, A.A. (2009). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem. J.* 425, 13–26.
- Teleman, A.A., Chen, Y.-W.W., and Cohen, S.M. (2005). 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev.* 19, 1844–1848.
- Tennessen, J.M., Barry, W.E., Cox, J., and Thummel, C.S. (2014). Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods* 68, 105–115.
- Terashima, J., and Bownes, M. (2005). A microarray analysis of genes involved in relating egg production to nutritional intake in *Drosophila melanogaster*. *Cell Death Differ.* 12, 429–440.
- Theopold, U., Samakovlis, C., Erdjument-Bromage, H., Dillon, N., Axelsson, B., Schmidt, O., Tempst, P., and Hultmark, D. (1996). Helix pomatia lectin, an inducer of *Drosophila* immune response, binds to hemomucin, a novel surface mucin. *Journal of Biological Chemistry* 271, 12708–12715.
- Thiam, A.R., and Beller, M. (2017). The why, when and how of lipid droplet diversity. *J. Cell. Sci.* 130, 315–324.
- Thiel, K., Heier, C., Haberl, V., Thul, P.J., Oberer, M., Lass, A., Jäckle, H., and Beller, M. (2013). The evolutionarily conserved protein CG9186 is associated with lipid droplets, required for their positioning and for fat storage. *J. Cell. Sci.* 126, 2198–2212.
- Thorat, L.J., Gaikwad, S.M., and Nath, B.B. (2012). Trehalose as an indicator of desiccation stress in *Drosophila melanogaster* larvae: A potential marker of anhydrobiosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419, 638–642.
- Thul, P.J. (2014). Studien am Lipidtröpfchen-assoziierten *Drosophila melanogaster* Protein CG2254. Inaugural-Dissertation .
- Tnani, H., López, I., Jouenne, T., and Vicient, C.M. (2011). Protein composition analysis of oil bodies from maize embryos during germination. *J. Plant Physiol.* 168, 510–513.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc National Acad Sci* 76, 4350–4354.
- Treimer, J.F., and Zenk, M.H. (1979). Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur. J. Biochem.* 101, 225–233.
- Trindade de Paula, M., Poetini Silva, M.R.R., Machado Araujo, S., Cardoso Bortolotto, V., Barreto Meichtry, L., Zemolin, A.P.P., Wallau, G.L., Jesse, C.R., Franco, J.L., Posser, T., *et al.* (2016). High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 4018157.

- Tu, M.-P.P., Yin, C.-M.M., and Tatar, M. (2005). Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **142**, 347–356.
- Tusun, A., Li, M., Liang, X., Yang, T., Yang, B., and Wang, G. (2017). Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase: a Promising Target for Hemipteran Pest Management. *Sci Rep* **7**, 789.
- Tycko, J., Myer, V.E., and Hsu, P.D. (2016). Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol. Cell* **63**, 355–370.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., *et al.* (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419.
- Uryu, O., Ameku, T., and Niwa, R. (2015). Recent progress in understanding the role of ecdysteroids in adult insects: Germline development and circadian clock in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoological Lett* **1**, 32.
- Uy, and Wold (1977). Posttranslational covalent modification of proteins. *Science* **198**, 890–896.
- Valachovic, M., Garaiova, M., Holic, R., and Hapala, I. (2016). Squalene is lipotoxic to yeast cells defective in lipid droplet biogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 1123–1128.
- Varghese, J., Lim, S.F., and Cohen, S.M. (2010). *Drosophila* miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, sugarbabe. *Genes Dev.* **24**, 2748–2753.
- Varshavsky, A (1997). The ubiquitin system. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Veitia, R.A., and Hurst, L.D. (2001). Accelerated molecular evolution of insect orthologues of *ERG28/C14orf1*: a link with ecdysteroid metabolism? *J. Genet.* **80**, 17–21.
- Verdile, G., Keane, K.N., Cruzat, V.F., Medic, S., Sabale, M., Rowles, J., Wijesekara, N., Martins, R.N., Fraser, P.E., and Newsholme, P. (2015). Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm.* **2015**, 105828.
- Vinci, G., Xia, X., and Veitia, R.A. (2008). Preservation of genes involved in sterol metabolism in cholesterol auxotrophs: facts and hypotheses. *PLoS ONE* **3**, e2883.
- Vishnu Varthini, L., Selvaraju, K., Srinivasan, M., and Nachiappan, V. (2015). *ROG1* encodes a monoacylglycerol lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **589**, 23–30.
- Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C.W. (2008). Principles of Biochemistry. Wiley: Biochemistry *3rd Edition*.
- Voigt, J.-P.P., and Fink, H. (2015). Serotonin controlling feeding and satiety. *Behav. Brain Res.* **277**, 14–31.
- Walker, M.J., Rylett, C.M., Keen, J.N., Audsley, N., Sajid, M., Shirras, A.D., and Isaac, R.E. (2006). Proteomic identification of *Drosophila melanogaster* male accessory gland proteins, including a pro-cathepsin and a soluble gamma-glutamyl transpeptidase. *Proteome Sci* **4**, 9.
- Walther, T.C., and Farese, R.V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687–714.
- Wang, C.-W.W., Purkayastha, A., Jones, K.T., Thaker, S.K., and Banerjee, U. (2016). In vivo genetic dissection of tumor growth and the Warburg effect. *Elife* **5**.
- Wang, F., Chen, Z., Ren, X., Tian, Y., Wang, F., Liu, C., Jin, P., Li, Z., Zhang, F., and Zhu, B. (2017a). Hormone-sensitive lipase deficiency alters gene expression and cholesterol content of mouse testis. *Reproduction* **153**, 175–185.

Wang, H., Bell, M., Sreenivasan, U., Sreenivasan, U., Hu, H., Liu, J., Dalen, K., Londos, C., Yamaguchi, T., Rizzo, M.A., *et al.* (2011). Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 15707–15715.

Wang, N.-N.N., Xu, Y., Yang, K., Wei, D., Zhang, Y.-G.G., Liu, M., Shi, X.-H.H., Liang, S.-Y.Y., Sun, L., Zhu, X.-Q.Q., *et al.* (2013). Susceptibility loci associations with prostate cancer risk in northern Chinese men. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 3075–3078.

Wang, X., Hou, Y., Saha, T.T., Pei, G., Raikhel, A.S., and Zou, Z. (2017b). Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E2709–E2718.

Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* **123**, 309–314.

Weinhouse, S., Warburg, O., Burk, D., and Schade, H.L. (1956). On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* **124**, 267–272.

Weissman, AM (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

Welte, M.A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol.* **25**, R470–81.

Werthebach, M., Mailliet, J., and Beller, M. (2016). Automatisierte Mikroskopie und Bild - analyse der zellulären Lipidspeicherung. *BIOspektrum* **22**, 392–394.

Wessells, R., Fitzgerald, E., Piazza, N., Ocorr, K., Morley, S., Davies, C., Lim, H.-Y.Y., Elmén, L., Hayes, M., Oldham, S., *et al.* (2009). d4eBP acts downstream of both dTOR and dFoxo to modulate cardiac functional aging in *Drosophila*. *Aging Cell* **8**, 542–552.

Wicker-Thomas, C., Garrido, D., Bontonou, G., Napal, L., Mazuras, N., Denis, B., Rubin, T., Parvy, J.-P.P., and Montagne, J. (2015). Flexible origin of hydrocarbon/pheromone precursors in *Drosophila melanogaster*. *J. Lipid Res.* **56**, 2094–2101.

Wijesekera, T.P., Saurabh, S., and Dauwalder, B. (2016). Juvenile Hormone Is Required in Adult Males for *Drosophila* Courtship. *PLoS ONE* **11**, e0151912.

Wilson, C., Leiblich, A., Goberdhan, D.C., and Hamdy, F. (2017). The *Drosophila* Accessory Gland as a Model for Prostate Cancer and Other Pathologies. *Curr. Top. Dev. Biol.* **121**, 339–375.

Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901–906.

World Health Organization (2016). Obesity and Overweight. WHO Fact Sheet No. 311 .

Wu, X., Daniels, G., Lee, P., and Monaco, M.E. (2014). Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol* **2**, 111–120.

Wyatt, G.R., and Kale, G.F. (1957). The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates. *The Journal of General Physiology* **40**, 833–847.

Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K.W., and Grefen, C. (2016). Techniques for the Analysis of Protein-Protein Interactions in Vivo. *Plant Physiol.* **171**, 727–758.

Xu, J., Anciro, A.L., and Palli, S.R. (2015). Nutrition regulation of male accessory gland growth and maturation in *Tribolium castaneum*. *Sci Rep* **5**, 10567.

Yamamoto, R., Bai, H., Dolezal, A.G., Amdam, G., and Tatar, M. (2013). Juvenile hormone regulation of *Drosophila* aging. *BMC Biol.* **11**, 85.

- Yoshida, M., Matsuda, H., Kubo, H., and Nishimura, T. (2016). Molecular characterization of Tps1 and Treh genes in *Drosophila* and their role in body water homeostasis. *Scientific Reports* 6, 30582.
- Yu, J., Zhang, S., Cui, L., Wang, W., Na, H., Zhu, X., Li, L., Xu, G., Yang, F., and Christian, M. (2015). Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1853, 918–928.
- Yue, S., Li, J., Lee, S.-Y.Y., Lee, H.J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T.A., Liu, X., Ratliff, T.L., *et al.* (2014). Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metab.* 19, 393–406.
- Zalesin, K.C., Franklin, B.A., Miller, W.M., Peterson, E.D., and McCullough, P.A. (2008). Impact of obesity on cardiovascular disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37, 663–84, ix.
- Zhang, P., Na, H., Liu, Z., Zhang, S., Xue, P., Chen, Y., Pu, J., Peng, G., Huang, X., Yang, F., *et al.* (2012). Proteomic study and marker protein identification of *Caenorhabditis elegans* lipid droplets. *Mol. Cell Proteomics* 11, 317–328.
- Zhang, X.-H.H., Tee, L.Y., Wang, X.-G.G., Huang, Q.-S.S., and Yang, S.-H.H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids* 4, e264.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
- Zheng, H., Yang, X., and Xi, Y. (2016). Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sci.* 167, 22–31.

Danksagungen

Mein größter Dank gilt Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller für seine uneingeschränkte Unterstützung, seine ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft und für die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. Markus Kollmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die freundliche Aufnahme in sein Institut.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Klein und Prof. Dr. Aberle sowie ihren Arbeitsgruppen für den regen wissenschaftlichen Austausch und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dr. Gereon Poschmann und dem Molecular Proteomics Laboratory danke ich für die hervorragende Unterstützung im Bereich Massenspektrometrie.

Besonders danken möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Mathematische Modellierung Biologischer Systeme / Systembiologie des Fettstoffwechsels. Besonders nennen möchte ich hier Petra, Andrea, Fiona und Lisa. Es waren vier wunderbare Jahre, sowohl an der Laborbank als auch im Kaffeeraum.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem gesamten Lebensweg uneingeschränkt unterstützt haben. Ohne ihren Rückhalt wäre diese Dissertation nicht entstanden.

Meinem Freund Matthias danke ich, dass er während meiner gesamten Promotionszeit stets an meiner Seite stand, und mich nach Rückschlägen fachmännisch wiederaufgebaut hat. Danke für Deine Gelassenheit, vielleicht färbt das ja irgendwann mal ab.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden für die Unterstützung und die nette Abwechslung zwischendurch bedanken.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Publikation:

Kolkhof, P., Werthebach, M., van de Venn, A., Poschmann, G., Chen, L., Welte, M., Stühler, K., and Beller, M. (2017). A Luciferase-fragment Complementation Assay to Detect Lipid Droplet-associated Protein-Protein Interactions. *Molecular & Cellular Proteomics* : MCP 16, 329–345.

Eigenanteil an der Publikation:

Michael Werthebach entwarf Experimente, generierte cDNA-Konstrukte und Zelllinien, führte die Co-Immunpräzipitations- und Immunoblot-Experimente und alle Immunfluoreszenz- und Konfokalmikroskopie-Experimente durch. PK und AV generierten cDNA-Konstrukte und führten die Split-Luciferase-Komplementationsexperimente durch. GP führte die Massenspektrometrie-Messungen und die primäre Massenspektrometrie-Datenanalyse durch. LC trug zur Analyse der Jabba-Aminosäuresequenz bei. Michael Werthebach, AV, GP und MB analysierten und interpretierten die Daten. GP, MW (M. Welte) und MB haben das Manuskript geschrieben. MW (M. Welte), KS und MB betreuten das Projekt.

Publikation:

Werthebach, M., Mailliet, J., and Beller, M. (2016). Automatisierte Mikroskopie und Bildanalyse der zellulären Lipidspeicherung. *BIOspektrum* 22, 392–394.

Eigenanteil an der Publikation:

Michael Werthebach entwarf Experimente, führte die RNA-Interferenz-Experimente und Transfektionen durch, führte die High-Content und Live Cell Imaging Experimente durch und analysierte die Daten. JM lieferte visuelle Vorlagen für Abbildung 1. Michael Werthebach und MB schrieben das Manuskript. MB betreute die Experimente.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, Dezember 2017

Michael Werthebach