

**Modellierung metabolischer Entscheidungsprozesse mit Hilfe  
des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* als  
experimentelles Testsystem**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Lisa Jehrke**  
aus Halberstadt

Düsseldorf, Januar 2019

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

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

Berichterstatter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2019

# Zusammenfassung

Die Physiologie aller Organismen wird durch ihre Reaktionen auf Umgebungsparameter, wie der Nahrungsverfügbarkeit, und innere Parameter, wie der Lebenssituation, bestimmt. Dies wiederum beeinflusst die Ressourcenallokation. Die dem Organismus zur Verfügung stehenden Ressourcen müssen hierbei auf in Konflikt stehende Prozesse aufgeteilt werden, wobei nicht alle Prozesse gleichzeitig optimiert werden können. Zum Beispiel führt bei multizellulären Organismen eine kalorienreduzierte Ernährung zwar zu einer Verlängerung des Lebens, aber auch zu einer verringerten Reproduktionsrate und nur geringen Energiespeicherreserven. Über die übergeordneten regulatorischen Prozesse, die für die Ressourcenallokation verantwortlich sind, ist noch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es mehr über die metabolischen Zusammenhänge zu erfahren. Hierfür wurden zwei Teilprojekte bearbeitet. Im ersten Teilprojekt sollten zunächst im Zusammenhang stehende metabolische Parameter und genomische Varianten untersucht werden, da viele Korrelationen noch unbekannt sind. Diese Informationen können Aufschluss über konkurrierende Parameter und somit mögliche Verteilungen von Ressourcen im Organismus geben. Zu diesem Zweck wurde auf eine Kollektion vollständig sequenzierter, wildtypischer Fliegenlinien zurückgegriffen. Da externe Parameter, wie das Nahrungsangebot, die Ressourcenverteilung beeinflussen können und zur Ausprägung eines veränderten Phänotyps führen, wurden die Zusammenhänge auch in Hinblick auf veränderte Nahrungsbedingungen untersucht. Durch die Phänotyp-Genotyp-Assoziationsstudien konnten Kandidatengene identifiziert und zum Teil durch Validierungsexperimente auch bereits bestätigt werden.

Der Fokus im zweiten Teil dieser Arbeit lag auf der Modellierung des Metabolismus und Wachstums während der larvalen Entwicklung von *Drosophila*. Aufgrund der hohen Komplexität multizellulärer Organismen, beispielsweise durch eine Vielzahl an Organen, ist ein *bottom-up* Ansatz zur Untersuchung der Ressourcenallokation nicht möglich. Daher wurde eine *top-down* Abstraktion in Form eines metabolischen *in silico* Modells gewählt. Die Larven bieten sich für diese Untersuchungen an, da sie die vorhandenen Ressourcen zwischen konkurrierenden Prozessen, wie beispielsweise dem Anlegen von Energiespeichern und dem Wachstum, balancieren müssen, um die Entwicklung zu gewährleisten. Sie sind daher durch eine massive Gewichts- und Größenzunahme, sowie dem Aufbau von energiereichen Speichermetaboliten, die für die Metamorphose benötigt werden, geprägt. Nach Rekonstruktion des Netzwerkes *FlySilico* wurden die Modellparameter, wie beispielsweise Aufnahmeraten von Nahrungsbestandteilen in den larvalen Organismus, an metabolische Parameter und Wachstumsparameter der Larven angeglichen. Erste Vorhersagen in Bezug auf die Wachstumsrate der Larven konnten experimentell validiert werden, wodurch ein hohes prädiktives Potential des Modells bestätigt wurde.

In dieser Arbeit war es möglich metabolische Zusammenhänge aufzudecken und erste Studien in Hinblick auf die Ressourcenallokation mithilfe des metabolischen Modells durchzuführen. Weiterhin deuten die Resultate dieser Arbeit daraufhin, dass die Ressourcenallokation in multizellulären Organismen unter optimalen Bedingungen abläuft.

# Abstract

The physiology of all organisms is determined by their reaction to environmental parameters, such as nutrient availability, and internal parameters, such as their life situation. This affects resource allocation. That is, all resources available to the organism are allocated to different processes which compete with one another. Due to this competition not all processes can be optimized simultaneously. For instance, in multicellular organisms, a calorie restriction results in an overall extended lifespan, but at the same time to reduced reproduction as well as to low energy storage amounts. The overall regulatory processes which are responsible for the resource allocation are poorly understood.

The aim of this thesis was to learn more about the connectivity of metabolic parameters. For this purpose, the work focused on two sub-projects. The first part covered the investigation of correlated metabolic parameters and genome variations, given that many correlations are still unknown. This information can uncover correlated parameters and thus a potential allocation of resources in organisms. Therefore, a collection of fully sequenced, wildtypic fly lines was used. Assuming that external parameters such as nutrient availability can affect the resource allocation and lead to altered phenotypic characteristics, the correlations were investigated with regard to altered nutritional conditions. By using phenotype-genotype association studies it was possible to identify candidate genes under the given conditions in which single candidates were confirmed by validation experiments.

The second part focused on the modelling of the metabolism and growth during the larval development of *Drosophila*. Due to the high complexity of multicellular organisms caused by, for instance, a multitude of organs, a *bottom-up* approach to investigate the resource allocation is not possible. Hence, a *top-down* abstraction in form of a metabolic *in silico* model was used. In order to ensure development, the larvae have to balance the available resources between competing processes such as the deposition of energy depots and the growth. Thus, they show an enormous increase in weight and size coupled with the deposition of energy stores necessary to complete metamorphosis. After the reconstruction of the model *FlySilico* parameters like the uptake rate of nutritional components of the larvae were adapted to metabolic and growth parameters of the larvae. First predictions relating to the growth rate of the larvae were experimentally validated, showing a high predictive potential of the model.

In this thesis it was possible to uncover metabolic correlations and to perform first studies of the resource allocation with the help of a metabolic model. Furthermore, the results of this study suggest that the resource allocation is optimal in multicellular organisms.

# Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, vertreten durch die Institutsleitung und Mentoren, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

**Jehrke L.**, Stewart F. A., Droste A., Beller M. The impact of genome variation and diet on the metabolic phenotype and microbiome composition of *Drosophila melanogaster*. Scientific Reports, 8(1), 2018.

## Tagungsbeiträge

**Jehrke L.**, Stewart F. A., Droste A., Karpinski S., Beller M. Investigating the multidimensional control of metabolism and physiology. Poster - 25th European *Drosophila* Research Conference (EDRC), London, 2017.

Weitere Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in einem fertigen Manuskript zusammengefasst und vorab zur Begutachtung eingereicht:

## Eingereichte Beiträge

Schönborn J. W., **Jehrke L.**, Mettler-Altmann T., Beller M. FlySilico: Flux-balance modeling of *Drosophila* larval growth and resource allocation. Eingereicht bei Scientific Reports, 2019.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lisa Jehrke, versichere hiermit an Eides statt, dass ich diese Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind gekennzeichnet und Ausführungen, die anderen wörtlich oder schriftlich entnommen wurden, sind ebenfalls gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit weder im In- noch im Ausland so bei einer Prüfstelle vorlag.

Ich versichere beim besten Wissen und Gewissen die reine Wahrheit geschrieben zu haben.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

# Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein Dank gilt vor allem:

Meinem Doktorvater Mathias Beller, der es mir ermöglicht hat in seiner Forschungsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen und mir immer mit Rat und Tat beiseite stand. Ohne ihn wäre dies nicht möglich gewesen!

Prof. Dr. Markus Kollmann, der die Zweitkorrektur meiner Doktorarbeit übernommen hat.

Prof. Dr. Thomas Klein und seiner Arbeitsgruppe, bei denen ich jederzeit meine Fliegenarbeiten durchführen konnte. Sowie Dr. Tabea Mettler-Altmann und ihrem Team, die es mir ermöglicht haben meine Proben an ihrem GC-MS Gerät zu messen. Dabei danke ich besonders Katrin Weber, die mir bei den Analysen der Daten sehr geholfen hat.

Außerdem danke ich der ganzen Arbeitsgruppe für die schöne und lustige Zeit. Dabei gilt mein Dank vor allem unseren technischen Assistentinnen Petra Kolkhof, Andrea Droste, Sandra Karpinski und Stefanie Pierlings, die mich in meiner Laborarbeit immer tatkräftig unterstützt haben. Aber auch für die netten und aufmunternden Gespräche, wenn es mal nicht so gut lief. Mein Dank gilt auch Fiona Stewart, mit der ich dieses Projekt begonnen habe und die immer für mich da war, wenn ich Unterstützung und jemandem zum Reden brauchte. Ein weiterer Dank geht an Michael Werthebach, der es mit einem lockeren Spruch immer geschafft hat ein Lächeln auf mein Gesicht zu zaubern.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei meinen tollen Studenten bedanken, die ich während meiner Zeit als Doktorandin betreuen durfte. Ein besonderer Dank gilt dabei Jürgen Schönborn, der durch seine motivierte Arbeitsweise und seine ausgezeichneten Ideen viel zu unserem Projekt beigetragen hat.

Ein weiterer Dank für das Korrekturlesen meiner Arbeit geht an Alina Reese und ebenfalls an Fiona Stewart.

Und zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für die vor allem moralische Unterstützung bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Eltern, Ines und Werner Jehrke. Ihr wart jederzeit für mich da, auch wenn es euch selber nicht immer gut ging.

Vielen Dank!

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>II</b>
<b>Vorveröffentlichungen der Dissertation</b>	<b>III</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>IV</b>
<b>Danksagung</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Hintergrund und Motivation dieser Arbeit . . . . .	1
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	3
1.2.1. Das <i>Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel</i> . . . . .	4
1.2.2. <i>Drosophila</i> als Modellorganismus für Studien der Ressourcenallokation . . . . .	4
1.3. Die Modellierung metabolischer Netzwerke . . . . .	6
1.3.1. <i>Flux Balance Analysis</i> . . . . .	6
1.4. Ein chemisch definiertes <i>Drosophila</i> Medium . . . . .	8
1.5. Ziele dieser Arbeit . . . . .	9
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>11</b>
2.1. Die phänotypische Plastizität von wildtypischen Fliegenlinien . . . . .	11
2.1.1. Entwicklungszeit von wildtypischen Fliegenlinien . . . . .	11
2.1.2. Metabolische Charakterisierung der DGRP Linien . . . . .	13
2.1.3. Phänotypische Korrelationsstudien . . . . .	15
2.1.4. Identifikation metabolischer Gruppen . . . . .	16
2.2. Einfluss auf die metabolischen Parameter durch variierende Ernährungsbedingungen 20	
2.2.1. Etablierung eines experimentellen Systems zur Beobachtung veränderter Nahrungsbedingungen auf den Metabolismus . . . . .	20
2.2.2. Die metabolische Antwort auf veränderte Nahrungsbedingungen von wild- typischen Fliegenlinien . . . . .	22
2.3. Genetische Kontribution zur phänotypischen Merkmalsausbildung . . . . .	25
2.3.1. Initiale Untersuchungen von Kandidatengenomen . . . . .	29
2.4. Das larvale System zur Untersuchung metabolischer Entscheidungsprozesse . . . . .	32
2.4.1. Metabolische Charakterisierung der larvalen Entwicklung auf dem <i>Holidic                 Diet</i> . . . . .	33
2.5. Entwicklung eines metabolischen Modells für <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	35
2.5.1. Rekonstruktion des metabolischen Modells - <i>FlySilico</i> 1.0 . . . . .	35
2.5.2. Initiale Studien zur Identifikation gewebespezifischer Genexpressionsprofile 38	

2.6.	Etablierung des metabolischen Modells mithilfe experimenteller Daten . . . . .	42
2.6.1.	Wachstumsparameter wildtypischer Larven auf <i>Holidic Diet</i> . . . . .	43
2.6.2.	Metabolische Messungen zur Formulierung einer biologischen Zielfunktion . . . . .	45
2.7.	Validierung des metabolischen Netzwerks . . . . .	51
2.7.1.	Simulationen unter veränderten Eingangsparametern . . . . .	51
2.7.2.	Experimentelle Validierung mittels larvaler Wachstumsparameter . . . . .	53
2.8.	Initiale <i>in silico</i> und <i>in vivo</i> Untersuchungen der Ressourcenallokation in <i>Drosophila</i> . . . . .	54
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>60</b>
3.1.	Teil 1 - Der metabolische Phänotyp als Resultat der Ressourcenallokation . . . . .	60
3.1.1.	Das metabolische Profil von wildtypischen Fliegenlinien . . . . .	60
3.1.2.	Einfluss veränderter Nahrungsbedingungen . . . . .	64
3.1.3.	Die genetische Kontribution . . . . .	66
3.2.	Teil 2 - Studien zur Ressourcenallokation mithilfe eines metabolischen Modells . . . . .	68
3.2.1.	<i>FlySilico</i> 1.0 - Ein metabolisches Modell von <i>Drosophila</i> . . . . .	70
3.2.2.	Die biologische Komposition von <i>Drosophila</i> Larven . . . . .	71
3.2.3.	Robustheit und Vorhersagekraft von <i>FlySilico</i> 1.0 . . . . .	72
3.2.4.	Modellerweiterungen und Optimierungen . . . . .	74
3.3.	Fazit und Ausblick . . . . .	78
<b>4.</b>	<b>Methoden</b> . . . . .	<b>80</b>
4.1.	<i>Drosophila melanogaster</i> : Fliegenstämme und Haltung . . . . .	80
4.2.	Futterrezepte . . . . .	80
4.2.1.	Standardfutter . . . . .	80
4.2.2.	Futter mit veränderten Saccharosekonzentrationen . . . . .	80
4.2.3.	<i>Holidic Diet</i> . . . . .	81
4.2.4.	Apfelsaftagarplatten . . . . .	81
4.3.	Aufnahme der Entwicklungszeit . . . . .	82
4.4.	Probenaufbereitung . . . . .	82
4.4.1.	Allgemeines Verfahren . . . . .	82
4.4.2.	Verfahren für die Experimente der Modelletablierung und -validierung . . . . .	82
4.5.	Biochemische Analysemethoden . . . . .	82
4.5.1.	Triglyceride . . . . .	82
4.5.2.	Glycerol . . . . .	83
4.5.3.	Proteine . . . . .	83
4.5.4.	Glucose und Glykogen . . . . .	83
4.5.5.	Lactat . . . . .	84
4.5.6.	Citrat-Synthase Aktivität . . . . .	84
4.6.	Quantifizierung der Eiablage . . . . .	85
4.7.	Genomweite Assoziationsstudien . . . . .	85
4.8.	Ubiquitärer Gen-Knockdown mittels GAL4/UAS-Systems . . . . .	85
4.9.	Metabolische Zeitreihe . . . . .	86
4.10.	Experimente mit einer zusätzlichen Wasserquelle auf HSD . . . . .	86

---

4.11. Etablierung eines DGRP-Mix Stammes zur Untersuchung metabolischer Parameter auf dem <i>Holidic Diet</i> . . . . .	87
4.12. Gewichtsmessungen . . . . .	87
4.13. Größenmessungen . . . . .	87
4.14. Gaschromatographie-Massenspektrometrie . . . . .	87
4.15. Korrelationsanalysen . . . . .	88
4.16. Rekonstruktion des metabolischen Netzwerks . . . . .	88
4.17. Verfahren zur Abbildung von Genexpressionsdaten auf das metabolische Netzwerk	89
4.18. Ermittlung der Biomasse und der Aufnahmearten . . . . .	89
4.18.1. Ermittlung der Biomasse . . . . .	89
4.18.2. Berechnung der Aufnahmearten . . . . .	91
4.19. Bestimmung der experimentellen Wachstumsrate . . . . .	92
4.20. Datenanalyse . . . . .	93
4.21. Statistik . . . . .	93
<b>5. Materialien</b>	<b>94</b>
5.1. Laborgeräte . . . . .	94
5.2. Chemikalien . . . . .	94
5.3. Futterbestandteile . . . . .	96
5.4. Lösungen und Puffer . . . . .	96
5.4.1. Allgemeine Lösungen und Puffer . . . . .	96
5.4.2. Lösungen und Puffer für das <i>Holidic Diet</i> . . . . .	96
5.5. Biochemische Kits . . . . .	98
5.6. Fliegenlinien . . . . .	98
5.7. Software . . . . .	101
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>A. Studien zum metabolischen Phänotyp</b>	<b>122</b>
<b>B. <i>FlySilico</i>: Metabolisches Modell</b>	<b>128</b>

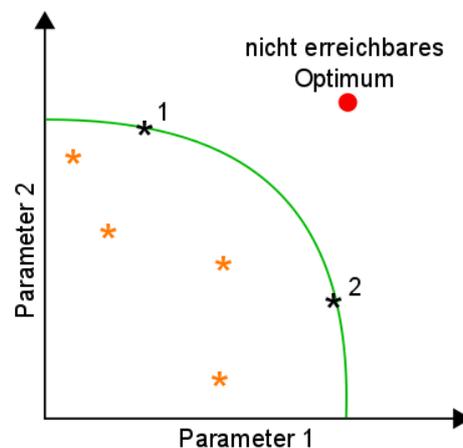
# 1. Einleitung

## 1.1. Hintergrund und Motivation dieser Arbeit

Unter der Allokation von Ressourcen versteht man die Verteilung von verfügbaren Gütern, die für verschiedene Verwendungszwecke genutzt werden. Geprägt durch die Ökonomie, findet dieser Begriff in unterschiedlichen Bereichen Anwendung, wie im Projektmanagement, den Computerwissenschaften, im Finanzwesen und in vielen weiteren Bereichen. In der Biologie beschreibt die Ressourcenallokation die Verteilung von aufgenommenen Nährstoffen aus der Umwelt an unterschiedliche Destinationen im Organismus. Sie ist ein essentieller Prozess des Lebens, der in Abhängigkeit einer situationsangepassten Physiologie zur Ausbildung eines bestimmten Phänotyps führt. Die Verteilung dieser Ressourcen erfolgt nach hoch komplexen Entscheidungsprozessen, bei dem der Organismus extrinsische und intrinsische Informationen aus der Umwelt integriert. Dabei verfolgen alle Organismen das Ziel die Nährstoffe unter Berücksichtigung einer maximalen Fitness zu verteilen, wobei Fitness hier mit Reproduktionsrate gleichgesetzt werden kann. Die Reproduktion von Organismen ist ein Bestandteil der natürlichen Selektion, die eine treibende Kraft der Evolution ist<sup>[39]</sup>. Sie gewährleistet Variationen innerhalb einer Population über Generationen, wobei durch die Umweltbedingungen bestimmt wird, welche Variationen einen reproduktiven Vorteil haben (natürliche Selektion)<sup>[39]</sup>. Je nach Lebensstadium oder Umwelteinflüssen kann die Verteilung der Ressourcen verändert und den jeweiligen Situationen angepasst werden. Holometabole Insekten streben beispielsweise in ihrer larvalen Lebensphase vor allem ein enormes Wachstum und die Speicherung von energiereichen Metaboliten für die Metamorphose an, wohingegen die adulten Tiere auf die Reproduktion fokussiert sind<sup>[2,37]</sup>. Das Verständnis, wie die Ressourcenallokation in den Organismen organisiert wird, ist jedoch noch sehr limitiert. Ein Beispiel hierfür ist der sogenannte „Überfluss-Metabolismus“ (engl. *overflow metabolism*). Dieses Phänomen beschreibt die Absonderung von Fermentationsprodukten, wie Acetat oder Lactat, von schnell wachsenden Zellen, selbst unter aeroben Bedingungen<sup>[15]</sup>. Die Kontroverse dieser Strategie besteht darin, dass die Organismen trotz vorhandenem Sauerstoff Energie anaerob durch Fermentation produzieren und somit ineffizientere Mechanismen zur Energiegewinnung verwenden<sup>[197]</sup>. Viele Studien zur Aufklärung dieses Phänomens wurden durchgeführt und konkurrierende Hypothesen beschreiben mögliche Mechanismen, die den Überfluss-Metabolismus erklären könnten<sup>[130,153,197,222]</sup>. Dennoch konnte der Ursprung, selbst in einfachen Organismen wie *Escherichia coli*, nicht aufgeklärt werden und illustriert das limitierte Verständnis über die Verteilung von Ressourcen<sup>[15]</sup>. In multizellulären Organismen erscheint die Erforschung der Ressourcenallokation noch weitaus komplizierter. Die Gründe hierfür sind vor allem die starke Kompartimentierung, die verschiedenen Zelltypen und Organe und die unterschiedlichen Verhaltensweisen einzelner Individuen.

In Anbetracht der langen Zeitskala der biologischen Evolution kann jedoch angenommen werden, dass die Organismen die aufgenommenen Ressourcen optimal verteilen. Dies wird auch in der Theorie der Lebensgeschichte (engl. *life history theory*) postuliert. Die limitierten Ressourcen

werden dabei an konkurrierende Prozesse - wie Wachstum, Gesundheit und Reproduktion - optimal aufgeteilt, wobei die Organismen unterschiedliche Strategien (engl. *life history strategies*) zur Aufrechterhaltung dieser Prozesse entwickeln<sup>[23,111]</sup>. Optimal bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Bedürfnisse der Organismen mit absteigender Wichtigkeit balanciert werden und eine Maximierung der Fitness erreicht wird. Die das Überleben sichernden Funktionen, das bedeutet der basale Metabolismus, sind fundamental wichtig und haben daher die höchste Priorität in der Zuteilung der Ressourcen. Nur die im Überschuss verfügbaren Nährstoffe können in den weiteren vielfältigen Reaktionen und Funktionen genutzt werden und somit zum Beispiel die Reproduktion, das Wachstum und den Aufbau von energiereichen Speichermetaboliten gewährleisten. Allerdings können nicht alle Prozesse eines Organismus zur selben Zeit maximiert werden. Ein Beispiel ist in höheren Organismen die Anzahl der Nachkommen und die Lebenserwartung. Durch eine Reduktion der täglich aufgenommenen Kalorien (engl. *dietary restriction*) kommt es zu einer Verlängerung der Lebenserwartung, während die Fruchtbarkeit und somit die Anzahl der Nachkommen reduziert wird<sup>[75]</sup>. Solch enge positive und negative Korrelationen kommen in der Natur häufig vor. Ein weiteres Beispiel ist die Balance zwischen dem Wachstum und der Entwicklung von Organismen und dem Aufbau von energiereichen Speichermetaboliten. Die Optimierung von konkurrierenden Parametern wird in Ingenieurs- und Wirtschaftswissenschaften durch das Paretoprinzip beschrieben. Dabei wird aus einer Vielzahl an Parameterkombinationen das Design mit dem besten Kompromiss gewählt (siehe Abbildung 1.1). Eine Optimierung eines Parameters über das Pareto-Optimum hinaus, kann nur auf Kosten eines anderen Parameters realisiert werden.



**Abbildung 1.1.:** Paretodiagramm für zwei konkurrierende Parameter. Die grüne Linie markiert die Pareto-Front, d. h. die optimalen Parameterkombinationen, die erreicht werden können. Dabei ist \*1 optimiert für Parameter 2, wodurch Parameter 1 verringert ist. Wird Parameter 1 verbessert (\*2), kommt es gleichzeitig zu einer Verschlechterung von Parameter 2. Unterhalb der grünen Linie sind zahlreiche nicht optimale Parameterkombinationen möglich (gelbe Sternchen). Der rote Punkt markiert die optimale Parameterkombination, bei der beide Parameter maximiert sind. Dieser Punkt repräsentiert jedoch eine nicht-realisierte Kombination.

Ein besseres Verständnis der Ressourcenverteilung könnte die Frage beantworten, ob die Natur nach dem Pareto-Optimalitätsprinzip arbeitet und Ressourcen, wie beispielsweise Nährstoffe, optimal verteilt werden. Erste Studien konnten die Pareto-Optimalität im bakteriellen Wachstum und Metabolismus<sup>[183]</sup> und in einigen phänotypischen Eigenschaften von multizellulären Organismen<sup>[188,196]</sup> demonstrieren. Dennoch konnte die Pareto-Optimalität in der Natur noch nicht vollständig bewiesen werden<sup>[65]</sup>. Dieses Wissen könnte außerdem potentiell die Möglichkeit bieten metabolische Flüsse in eine gewünschte Richtung zu kanalisieren, das bedeutet Parameterkombinationen zu identifizieren, die einen bestimmten Phänotypen begünstigen. Somit könnte beispielsweise der Ertrag von Pflanzen oder kultivierten Organismen in Bioreaktoren erhöht oder die Gesundheit - zum Beispiel im Hinblick auf metabolische Erkrankungen wie Adipositas oder Typ-2-Diabetes - positiv beeinflusst werden.

Vor allem extrinsische und intrinsische Faktoren haben einen großen Einfluss auf die Allokation von Ressourcen in multizellulären Organismen, was sich in der Ausprägung des Phänotyps zeigt. Allerdings ist nicht ein Faktor allein an der Entstehung eines bestimmten Phänotyps beteiligt, sondern die Kombination von diversen Faktoren, wie beispielsweise die genetische Kontribution, die Nahrungsqualität und -quantität sowie Stress, das Darmmikrobiom oder die Aktivität des Immunsystems bestimmen die Wachstumsstrategie und damit die Verteilung der Ressourcen. Dabei können diese Faktoren sowohl vorteilhafte, als auch schädliche Auswirkungen auf die Organismen ausüben. Im Überschuss vorliegende Nährstoffe können beispielsweise in energiereiche Speichermetabolite, wie Lipide oder komplexe Kohlenhydrate, umgewandelt und für Zeiten der Unterversorgung genutzt werden. Betrachtet man jedoch die humane Lebensweise, die zu einem großen Teil durch eine stetige Überversorgung mit hoch-kalorischen Nahrungsmitteln in Kombination mit zu geringer Bewegung gekennzeichnet ist, kann es zu einer drastischen Erhöhung der Lipidspeichermengen und somit zur Störung der Energiehomöostase kommen, die das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -abgabe beschreibt<sup>[194]</sup>. Das führt wiederum zu negativen gesundheitlichen Konsequenzen, wie Adipositas und deren Folgeerkrankungen (Typ-2-Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Arthritis oder Schlafstörungen)<sup>[29]</sup>. Dementsprechend ist es von essentieller Bedeutung die Allokation von Ressourcen und die metabolischen Regulationsprozesse multizellulärer Organismen besser zu verstehen, um in Zukunft Strategien zur Behandlung von metabolischen Krankheiten zu entwickeln.

## **1.2. *Drosophila melanogaster***

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts hat sich die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu einem Modellorganismus in diversen Gebieten zur Erforschung von biologischen Prozessen etabliert. Dabei reichen die Forschungsfelder von Genetik über Entwicklung, Immunologie, Biomedizin bis hin zu Verhaltensforschung und Studien zu Alterungsprozessen. *Drosophila* hat sich in den letzten Jahrzehnten überdies auch als ein experimentelles System zur Untersuchungen des Metabolismus und von metabolischen Erkrankungen bewährt<sup>[12,136]</sup>. Neben generellen Vorzügen, wie beispielsweise einer kurzen Entwicklungszeit, einer hohen Anzahl an Nachkommen und die Verfügbarkeit diverser genetischer Methoden, die denen anderer multizellulärer Organismen überlegen sind<sup>[107]</sup>, ist die metabolische Regulation von *Drosophila* hoch konserviert. Viele humane

Organe zur Kontrolle von Nahrungsaufnahme, -verarbeitung und Speicherung sind als Homologe in der Fruchtfliege präsent, wie beispielsweise die Fettkörper der Fliege, die ähnliche Funktionen wie die menschliche Leber und das weiße Fettgewebe ausführen<sup>[12]</sup>. Sie speichern im Überschuss vorliegende Fette als Triglyceride (TAG) und dienen als entgiftendes Organ<sup>[124,142]</sup>. Ein Vergleich zwischen dem humanen Genom und dem Genom von *Drosophila* hat außerdem ergeben, dass rund 75 % der menschlichen, krankheitsrelevanten Gene in *Drosophila* konserviert sind<sup>[174]</sup>. Dadurch bietet sich *Drosophila* als Modellorganismus zur Untersuchung des Metabolismus von multizellulären Organismen an.

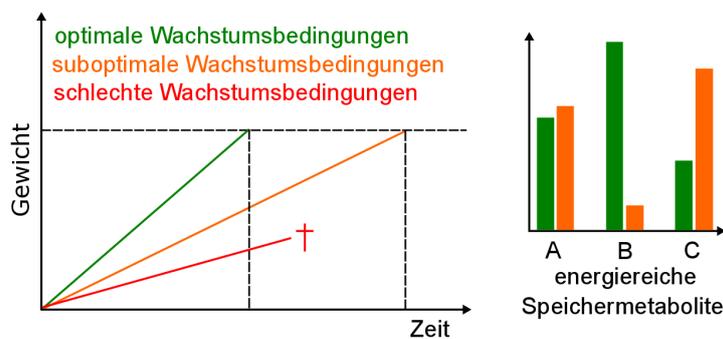
### 1.2.1. Das *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel

Das *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel (kurz: DGRP) ist eine Fliegenkollektion von 205 isogenen Inzuchtlinien, die einer natürlichen Population aus Raleigh, North Carolina, USA, entstammen, und vollständig sequenziert sind<sup>[129]</sup>. Zur Erstellung dieser Fliegenlinien wurden bereits verpaarte Weibchen gesammelt und reinerbige Inzuchtlinien durch Kreuzung ihrer Nachkommen über 20 Generationen generiert<sup>[129]</sup>. Sie dienen dem Zweck, natürlich auftretende genetische Variationen und deren Auswirkungen auf molekularer und phänotypischer Ebene besser zu verstehen<sup>[99]</sup>. Das sogenannte DGRP „Kernset“ besteht aus 40 Linien, von denen die ersten Sequenzdaten aufgenommen wurden<sup>[79]</sup> und die einen Großteil der phänotypischen Plastizität der DGRP Linien widerspiegeln<sup>[99,108]</sup>. Genomweite Assoziationsstudien (engl. *genome-wide association studies*, GWAS) können angewandt werden, um die Assoziation von genetischen Varianten verschiedener Individuen mit quantitativen phänotypischen Merkmalen zu untersuchen. In Verbindung mit den DGRPs wurden bereits diverse Studien zur Identifikation von Genotyp-Phänotyp Assoziationen erfolgreich durchgeführt<sup>[104,108,211]</sup>, um beispielsweise mit metabolischen Merkmalen assoziierte Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP) zu identifizieren.

### 1.2.2. *Drosophila* als Modellorganismus für Studien der Ressourcenallokation

Während der Entwicklung durchläuft das holometabole Insekt *Drosophila melanogaster* vier Stadien. Nach der embryonalen Phase folgen drei Larvenstadien, die von einem massiven Wachstum um das 200-fache ihres Gewichts geprägt sind<sup>[3,49]</sup>. Nach dem dritten Larvenstadium erfolgt die Verpuppung und damit die Einleitung der Metamorphose, die mit dem Schlüpfen der adulten Fliege endet<sup>[103]</sup>. Die Metamorphose ist ein energieaufwändiger Prozess, in dem die Körperstruktur vollständig umgeformt wird und keine Nahrungsaufnahme erfolgt. Demnach müssen im larvalen Stadium große Energiereserven - größtenteils in Form von Triglyceriden und Glykogen - angelegt werden, um die Metamorphose durchlaufen zu können<sup>[137]</sup>. Es ist außerdem erforderlich, dass die aufgenommenen Ressourcen so verteilt werden, dass entgegenstehende Bedürfnisse, wie beispielsweise das Wachstum und die Metabolitspeicherung, balanciert werden. Die Frage, ob die Ressourcen bei diesen Prozessen optimal verteilt werden, ist jedoch noch nicht vollständig beantwortet<sup>[65,188]</sup>. Die larvale Entwicklung von *Drosophila* verläuft nach einem stereotypen Entwicklungsprogramm, das unter vielen Limitierungen, wie metabolische Anforderungen, steht.

Beispielsweise beschreibt das sogenannte kritische Gewicht (engl. *critical weight*) einen minimalen Schwellenwert, den die Larven erreichen müssen, um die Metamorphose durchlaufen zu können<sup>[177]</sup>. Wird dieser Schwellenwert nicht erreicht, kommt es zum frühzeitigen Tod der Tiere. Dabei hängt dieser Schwellenwert nicht signifikant von der Ernährung ab. Larven, die sich unter schlechten Futterbedingungen entwickeln, können ihre Entwicklungszeit verlängern, um das kritische Gewicht zu einem späteren Zeitpunkt zu erreichen als Larven, die sich unter idealen Futterbedingungen entwickeln<sup>[177]</sup>. Doch die Fragen, wie das kritische Gewicht definiert ist und wie die Larve die Anpassung der Entwicklungszeit entscheidet und welche Mechanismen bei diesen Entscheidungen involviert sind, ist noch weitestgehend unbeantwortet. Trotz des stereotypen Entwicklungsprogramms mit den genannten Limitierungen ist die Entwicklung oft durch Variationen in der Umwelt, wie Temperatur, Nahrungsqualität und -quantität, geprägt und eine flexible Antwort in Form eines veränderten Entwicklungsprogramms ist zur selben Zeit notwendig. Um diese Anforderungen zu erfüllen, können die Larven mit unterschiedlichen Strategien reagieren. Eine Möglichkeit ist die bereits erwähnte Verlängerung der Entwicklungszeit bis zum Erreichen der Metamorphose oder eine Anpassung der Speichermetabolite (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2.:** Larvales Wachstum von *Drosophila* in Abhängigkeit der Nahrungsbedingungen. Die Entwicklung der Larven umfasst Gewichts- und Größenzunahme über die Zeit. Die Wachstumsstrategie wird entsprechend der Nahrungsbedingungen (optimale Bedingungen - grün, suboptimale Bedingungen - orange) angepasst, bei der entweder die zeitliche Entwicklung (links) und/oder die Mengen an energiereichen Speichermetaboliten (rechts) beeinflusst werden. Schlechte Wachstumsbedingungen führen zum vorzeitigen Tod der Tiere, wenn nicht ausreichend Nährstoffe zur Verfügung stehen (rote Linie, links).

Die larvalen Stadien von *Drosophila melanogaster* bieten sich daher aufgrund des stereotypen Entwicklungsprogramms, mit dem klaren Ziel des Wachstums, und der ausreichenden Plastizität (zeitliche und metabolische Anpassung an die Umweltbedingungen) für Studien zur Verteilung von Ressourcen an. Jedoch ist die Untersuchung, aufgrund der Komplexität von multizellulären Organismen - beispielsweise durch die starke Kompartimentierung und den diversen Organen - mit einem sogenannten *bottom-up* Ansatz nicht möglich. Eine Abstraktion in Form eines *top-down* Ansatzes sollte fähig sein, grundlegende Mechanismen der Ressourcenverteilung aufzudecken.

### 1.3. Die Modellierung metabolischer Netzwerke

Metabolische Netzwerke dienen der Abstraktion des Metabolismus auf unterschiedlichsten Ebenen: von einfachen Zellen bis hin zu multizellulären Organismen und Organismenkonsortien. Die Rekonstruktion solcher Netzwerke beinhaltet die Abbildung von biochemischen Reaktionswegen und ihrer zugehörigen Metabolite und Enzyme<sup>[64]</sup>. Durch die Rekonstruktion wird der Metabolismus abstrahiert und metabolische Informationen können in Form eines mathematischen Modells dargestellt werden<sup>[9]</sup>. Die Analyse der Netzwerke soll dazu beitragen Einblicke in metabolische Pfade der Organismen zu gewinnen, um beispielsweise die Allokation von Ressourcen besser zu verstehen und die Produktion von Metaboliten in eine gewünschte Richtung zu lenken oder durch Genmanipulationen die Funktion von Genen zu identifizieren.

#### 1.3.1. Flux Balance Analysis

*Flux balance analysis* (FBA) ist ein mathematischer Ansatz um die Flüsse von Metaboliten durch ein metabolisches Netzwerk zu berechnen<sup>[155]</sup>. Dadurch ist es beispielsweise möglich die Wachstumsrate von Organismen oder die Produktion von Metaboliten zu bestimmen. Das Grundprinzip von FBA beruht auf drei Schritten. Zunächst wird das metabolische Netzwerk rekonstruiert. Dies erfolgt in einer mathematischen Repräsentation der metabolischen Reaktionen, wobei die stöchiometrischen Koeffizienten der Reaktionen den Kern der Rekonstruktion bilden und die stöchiometrische Matrix aufspannen. Der nächsten Schritt besteht in der Definition einer biologischen Zielfunktion, die von Interesse ist. Im Falle der Berechnung der Wachstumsrate wäre die Zielfunktion die Produktion von Biomasse<sup>[155]</sup>. Am Ende der Rekonstruktion ergibt sich ein Optimierungsproblem, d. h. welche Lösung unter den gegebenen Bedingungen optimal ist. Dieses Optimierungsproblem wird durch lineare Programmierung gelöst und es werden die Flüsse der Metaboliten berechnet, welche die gesuchte Zielfunktion maximieren (oder minimieren).

#### Grundlegendes Prinzip

*Flux balance analysis* (FBA) wurde in den letzten Jahren erfolgreich angewandt, um biochemische Netzwerke zu analysieren und das biologische Verhalten - wie beispielsweise das Wachstum und die Produktion von Metaboliten - von uni- und multizellulären Organismen<sup>[60,71,164,171]</sup> oder von mutierten Organismen vorherzusagen<sup>[185]</sup>. Zur Analyse der Netzwerke benötigt FBA, im Gegensatz zu dynamischen Modellen, keine Informationen über kinetische Parameter, da die Analysen im stationären Zustand durchgeführt werden und keine Konzentrationsänderungen erfolgen. Die Grundlage von FBA bildet somit die Rekonstruktion eines metabolischen Netzwerkes, welches durch die Abbildung der biochemischen Reaktionen eine stöchiometrische Matrix  $S$  aufspannt. Dabei repräsentieren die Zeilen der Matrix die Metabolite und die Spalten die Reaktionen. FBA arbeitet innerhalb von stationären Zuständen, d. h. die Menge jedes produzierten Metabolits ist gleich der Menge an verbrauchten Metaboliten<sup>[202]</sup>. Mithilfe von FBA lassen sich die Flüsse der Metabolite durch das biochemische Netzwerk bestimmen. Dabei wird das grundlegende Prinzip als mathematische Fluss-Balance-Gleichung ausgedrückt:

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot v = 0 \quad (\text{im stationären Zustand}) \quad (1.1)$$

Wobei  $x$  der Vektor mit den Konzentrationen der Metabolite ist, die sich über die Zeit  $t$  ändern ( $dx/dt$ ). Im stationären Zustand kommt es zu keiner Änderung der Konzentrationen, sodass  $dx/dt = 0$ .  $S$  ist die stöchiometrische Matrix und  $v$  der Vektor mit den Flussraten der Reaktionen.

Den Kern von FBA bilden Limitierungen (engl. *constraints*), die in verschiedenen Formen auf das metabolische Netzwerk einwirken können und die Flussraten der Reaktionen beschränken. Durch diese Beschränkungen wird der Lösungsraum limitiert und es können biologisch sinnvolle Rahmenbedingungen definiert werden. Die Limitierungen, die auf zelluläre Funktionen einwirken, lassen sich in vier Kategorien einteilen<sup>[166]</sup>: (i) physikochemische Limitierungen (bspw. Massen- und Energiebilanz), (ii) Limitierungen aus der Umwelt (Temperatur, pH-Wert, Nährstoffversorgung), (iii) Limitierungen durch die Morphologie von Zellen (Kompartimentierung, Lokalisation der Enzyme) und (iv) thermodynamische Limitierungen (Reversibilität der Reaktionen). Die mathematische Repräsentation dieser Limitierungen erfolgt in zwei fundamentalen Formen: (i) durch die stöchiometrische Matrix, die die Massenbilanz im stationären Zustand darstellt und somit das Gleichgewicht zwischen produzierten und verbrauchten Metaboliten und (ii) als Grenzen, die die Flussraten der Reaktionen beschränken. Jeder Reaktion kann dabei eine untere und obere Grenze zugeordnet werden, welche die Flussraten einschränkt. Sind biologisch realistische Grenzen (bspw. für die Aufnahme von Metaboliten) bekannt, können die Simulationen mit einer höheren Präzision durchgeführt werden. Die mathematische Formulierung der Grenzen ist gegeben durch:

$$\alpha_i \leq v_i \leq \beta_i \quad (1.2)$$

Wobei  $\alpha_i$  und  $\beta_i$  die unteren und oberen Grenzen der Flussraten  $v_i$  der Reaktionen sind. Durch diese Beschränkungen ist es möglich, den sogenannten Nullraum zu definieren, der die Flussverteilungen aller möglichen Phänotypen enthält<sup>[212]</sup>.

## Die Zielfunktion

Das Ziel von FBA in Verbindung mit metabolischen Netzwerken ist es eine Frage von biologischem Interesse, wie die Produktion eines bestimmten Metabolits oder den Verbrauch an Energie, zu beantworten. Die Darstellung dieser Fragen erfolgt in Form einer biologischen Zielfunktion, die optimiert werden soll. Sie wird durch die folgende mathematische Gleichung repräsentiert:

$$\text{Minimierung oder Maximierung: } Z = \sum c^T \cdot v \quad (1.3)$$

Wobei  $Z$  die Zielfunktion mit dem Vektor  $c$  der Gewichtungen (bestimmt, welche Reaktionen an der Zielfunktion beteiligt sind) und den Flussraten  $v$  der Reaktionen ist. In einer realistischen Darstellung eines biochemischen Netzwerkes kommt es typischerweise zur Formulierung eines unterbestimmten Systems, das bedeutet es existieren mehr Reaktionen als Metabolite. Die Optimierung solcher Systeme erfolgt durch Anwendung von linearer Programmierung (LP). Um ein solches Optimierungsproblem zu lösen, wird auf verschiedene Programmsysteme zur mathematischen Optimierung, wie beispielsweise dem *Gurobi Optimizer* (Gurobi Optimization Inc.)<sup>[89]</sup> oder *CPLEX* (IBM)<sup>[101]</sup>, zurückgegriffen (weitere Software siehe<sup>[135]</sup>).

Ein typisches Beispiel für eine biologische Zielfunktion ist die Vorhersage des Wachstums eines Organismus. In diesem Fall ist das Ziel die Maximierung der Biomasseproduktion, d. h. die Rate, mit der metabolische Stoffe in Biomassekomponenten (Lipide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate) umgewandelt werden<sup>[202]</sup>. Aber auch diverse andere Zielfunktionen wurden bereits zur Analyse durch biologische Netzwerke in den unterschiedlichsten Modellsystemen, wie *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*, formuliert. Beispiele sind die Maximierung der Produktion unterschiedlicher Metabolite<sup>[76,213]</sup>, Minimierung oder Maximierung der ATP Produktion zur Untersuchung von Energieverbrauch und -produktion<sup>[117,168]</sup> oder die Minimierung der Aufnahme von Substraten<sup>[165]</sup>.

In dieser Studie liegt der Fokus auf der Ressourcenallokation in multizellulären Organismen. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, eine Zielfunktion zu definieren, die das Wachstum - in Form von Biomasseproduktion - simulieren kann. Zur Formulierung einer Biomasse-Zielfunktion sind Informationen über die Zellkomposition und die energetischen Anforderungen zur Generierung von Biomasse aus metabolischen Grundstoffen notwendig<sup>[70]</sup>. Die Zielfunktion kann dabei in unterschiedlichen Abstraktionsgraden formuliert werden. Die grundlegenden Bestandteile sind Metabolite zum Aufbau von Makromolekülen (Lipide, Kohlenhydrate oder Proteine), wie Aminosäuren, Zucker oder Fettsäuren. Zur Erhöhung der Genauigkeit können die energetischen Anforderungen zur Synthese der Makromoleküle in die Biomasse-Zielfunktion aufgenommen werden. Die Einbindung von Kofaktoren, Vitaminen und Spurenelementen dient ebenfalls zur Erweiterung der Zielfunktion und stellt die Biomasse in biologisch präziserer Weise dar, da diese Faktoren unter anderem zur Erhaltung der zellulären Vitalität dienen<sup>[70]</sup>.

Um die Ressourcenverteilung von multizellulären Organismen in einem theoretischen Ansatz durch metabolische Netzwerke zu modellieren, ist es notwendig, die verfügbaren Nährstoffe aus der Umwelt zu kennen. Durch dieses Wissen können beispielsweise die Biomasse-Zielfunktion oder die Aufnahmerate des Modells biologisch präziser definiert werden. Daher ist es von essentieller Bedeutung, dass die Entwicklung von *Drosophila* auf einem definierten Medium stattfindet.

## 1.4. Ein chemisch definiertes *Drosophila* Medium

*Drosophila melanogaster* ernährt sich in freier Umgebung vorwiegend von gärenden Früchten, Pflanzenbestandteilen und -sekretionen, sowie deren natürlich assoziierten Mikroben<sup>[161]</sup>. Die Zusammensetzung und Quantität der Nahrung ist dabei oft unbekannt. Um die Verteilung der Ressourcen untersuchen zu können, ist jedoch das Wissen über die einzelnen Nahrungsbestandteile unabdingbar. Während der letzten 100 Jahre Insektenforschung wurden diverse Futtersorten entwickelt, die sich in Komplexität, Zusammensetzung und Konsistenz (flüssig oder fest) unterscheiden. Die Komplexität der Futter kann dabei allgemein in drei Gruppen eingeteilt werden<sup>[59]</sup>: (i) undefinierte Futter (engl. *oligidic diet*), die aus komplexen, organischen Rohmaterialien, wie Hefe, Zuckersirup, Malzextrakt, Maismehl und vielem mehr, bestehen<sup>[161]</sup>; (ii) semi-definierte Futter (engl. *meridic diet*), die neben chemisch definierten Bestandteilen mindestens einen undefinierten, komplexen Bestandteil enthalten und (iii) definierte (synthetische) Futter (engl. *holidic diet*), die chemisch vollständig definierte Substanzen enthalten. Während die chemische Komposition von

komplexen und semi-definierten Futtern nicht im Detail bekannt ist, ermöglichen synthetisch erstellte Futter einen vollständigen Überblick über die enthaltenen chemischen Komponenten. Dadurch bieten sie sich im Besonderen auch für *in silico* Studien an, bei denen das Wissen über die aufgenommenen Nährstoffe essentiell ist. Die chemisch definierten Futter sind meist Minimalmedien, die die minimalen Mengen der benötigten Bestandteile zur Entwicklung und Lebenserhaltung abdecken. Für *Drosophila* sind das beispielsweise Kohlenhydrate (als Kohlenstoff- und Energiequelle), Aminosäuren (als Energie-, Kohlenstoff-, Stickstoffquelle), Spurenelemente (bspw. Magnesium, Calcium, Kalium), Vitamine, Sterole (Cholesterol oder Ergosterol) und einige weitere chemische Verbindungen<sup>[123,161]</sup>. Verringerungen der Konzentrationen oder das Fehlen eines Bestandteils würden die minimalen Anforderungen nicht mehr erfüllen und den Tod der Tiere bedeuten. In dieser Arbeit wurde das chemisch definierte Futter von M. Piper *et al.*<sup>[161]</sup> zur Untersuchung der Ressourcenallokation genutzt. Durch dieses Futter ist genau ersichtlich, welche Komponenten vom Organismus aufgenommen werden können. Dieses Wissen ist sowohl für die experimentellen Studien, als auch die *in silico* Untersuchungen ein großer Vorteil. Weiterhin bietet sich das chemisch definierte Futter zur Durchführung von Perturbationsstudien an. Durch die Veränderung der Konzentrationen oder den Austausch von Bestandteilen kann der Einfluss der Nahrungsquelle auf das Wachstum und die Entwicklung von *Drosophila in vivo* und *in silico* getestet werden.

## 1.5. Ziele dieser Arbeit

Der Phänotyp eines Organismus wird durch die Integration von intrinsischen und extrinsischen Informationen, wie beispielsweise die Nahrungsverfügbarkeit, bestimmt. Wie die aufgenommenen Ressourcen verteilt werden und welche Entscheidungen der Organismus trifft, um alle lebenserhaltenden Prozesse ausführen zu können, ist noch nicht bekannt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es somit, anhand von *in vivo* und *in silico* Studien eine Grundlage zur Untersuchung der Ressourcenallokation in multizellulären Organismen zu schaffen. Dabei war die Idee zwei verschiedene Strategien zu verfolgen. Zunächst sollten die metabolischen Profile von wildtypischen Fliegenlinien näher untersucht werden, um Parameter zu identifizieren, die miteinander korrelieren. Dafür wurde auf die DGRP Fliegenkollektion zurückgegriffen, dessen Kernset einen großen Teil der phänotypischen Plastizität abdeckt<sup>[108]</sup>. Da die Verteilung der Ressourcen und damit die Ausprägung eines Phänotyps abhängig von intrinsischen (bspw. Genetik, Mikrobiom) und extrinsischen Faktoren (bspw. Nahrungsqualität- und -quantität, Temperatur) ist, sollten die Fliegen unterschiedlichen Umweltbedingungen - wie einem veränderten Nahrungsangebot - ausgesetzt werden. Um die Frage aufzugreifen, warum Individuen unterschiedlich auf veränderte Umweltbedingungen reagieren, sollte anschließend die genetische Kontribution näher untersucht werden. Ziel war es hierbei, genetische Varianten zu entschlüsseln, die in Zusammenhang mit metabolischen Parametern stehen und einen Einfluss auf den Phänotyp ausüben.

Aufgrund der Komplexität von multizellulären Organismen - beispielsweise durch die starke Kompartimentierung, unterschiedliche Zelltypen und Organe - ist die Untersuchung der Ressourcenallokation durch einen *bottom-up* Ansatz zurzeit ausgeschlossen. Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil der Studie ein theoretischer Ansatz entwickelt werden, um die Allokation von

Ressourcen in mehrzelligen Organismen, wie *Drosophila melanogaster*, zu untersuchen. Dafür sollte zunächst ein metabolisches Modell rekonstruiert und experimentelle Daten zur Definition biologisch sinnvoller Modellparameter erhoben werden. Um zu prüfen, ob das Modell metabolische Verhaltensweisen von *Drosophila* wiedergeben kann, sollten Robustheitsanalysen und Perturbationsstudien durchgeführt und mithilfe von experimentellen Studien belegt werden. Das metabolische *in silico* Modell soll somit als Basis für weitere Studien der Ressourcenallokation dienen, um beispielsweise die Frage zu beantworten, ob die Entwicklung und die Verteilung der Ressourcen in multizellulären Organismen (pareto-)optimal verläuft.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Die phänotypische Plastizität von wildtypischen Fliegenlinien

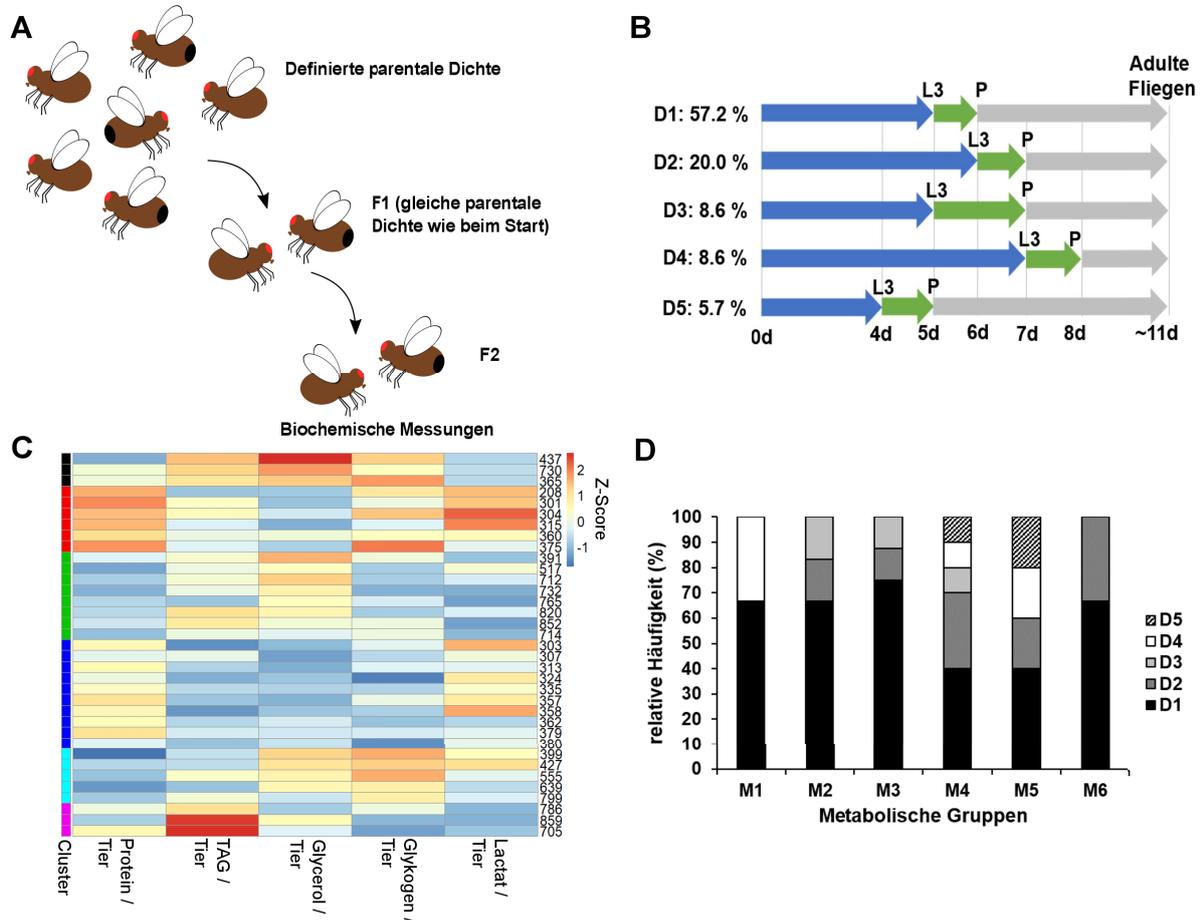
Die Verteilung von Ressourcen erfolgt in Abhängigkeit von extrinsischen und intrinsischen Faktoren, wie beispielsweise dem Angebot von Nährstoffen. Die Ressourcen müssen dabei an in Konflikt stehende Prozesse aufgeteilt werden, wobei nicht alle Prozesse, die miteinander konkurrieren, zur gleichen Zeit maximiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist die Entwicklungsdauer und der Metabolismus. In holometabolen Insekten führen Veränderungen der Entwicklungszeit gleichzeitig zu veränderten Mengen energiereicher Speichermetaboliten. In der Natur kommen solche positiven und negativen Korrelationen häufig vor und sind an der Ressourcenverteilung und somit an der Ausprägung eines Phänotyps beteiligt. Um derartige korrelierende Parameter in multizellulären Organismen zu identifizieren, wurde im ersten Teilprojekt dieser Arbeit das metabolische Profil von wildtypischen Fliegenlinien analysiert und Phänotyp-Genotyp Studien in Abhängigkeit variierender Nahrungsbedingungen durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf der Identifikation von Korrelationen zwischen den gemessenen Metaboliten (Triglyceride, freies Glycerol, freie Glucose, Glykogen, Proteine und Lactat) und zwischen diesen metabolischen Parametern und genomischen Varianten.

Um die phänotypische Plastizität - d. h. unterschiedliche Merkmalsausprägungen - von *Drosophila melanogaster* weitestgehend abzudecken, wurde auf 35 Fliegenlinien des *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panels (DGRP), einer Kollektion von wildtypischen und vollständig sequenzierten Fliegenlinien<sup>[129]</sup>, zurückgegriffen (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.1). Für die ersten Experimente wurden die Fliegen unter basalen Bedingungen, d. h. auf Standardfutter (siehe Methoden Abschnitt 4.2.1) und bei 25 °C, für zwei Generationen mit der gleichen parentalen Dichte gehalten. Dies sollte die Umwelteinflüsse durch variierende Anzuchtbedingungen oder Stress durch eine zu niedrige oder zu hohe Anzahl an Tieren pro Futterröhrchen minimieren (siehe Methoden Abschnitt 4.1 für weitere Erklärungen). Abbildung 2.1 A zeigt ein Schema des Versuchsaufbaus.

#### 2.1.1. Entwicklungszeit von wildtypischen Fliegenlinien

Zunächst wurde die Entwicklung der unterschiedlichen Fliegenlinien näher untersucht, um gegebenenfalls Unterschiede in der Entwicklungszeit zu detektieren. Beispielsweise könnten sich verlängerte Entwicklungszeiten auf den metabolischen Phänotyp auswirken, da diese Fliegenlinien mehr Zeit benötigen, um die metabolischen Anforderungen für die Entwicklung zu erfüllen (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.2). Alle Fliegenlinien benötigten eine vergleichbare Zeitspanne, von zehn bis elf Tagen, zum Abschließen ihrer Entwicklung, das bedeutet dem Schlüpfen der ersten vollständig entwickelten Fliegen. Betrachtet man jedoch die Entwicklungszeiten der Larven und Puppen genauer, ist zu erkennen, dass es zwischen den einzelnen Fliegenlinien Unterschiede gibt. In einigen Linien waren nach vier Tagen schon die ersten wandernden L3 Larven zu sehen,

wobei andere Linien der DGRPs bis zu sieben Tage benötigten. Auch das Puppenstadium zeigte unterschiedliche Zeitspannen, die von Tag fünf bis Tag acht reichten. Die Fliegenlinien konnten, anhand ihrer unterschiedlichen Entwicklungszeiten im larvalen Stadium und Puppenstadium, in fünf verschiedene Entwicklungsgruppen eingeteilt werden (siehe Abbildung 2.1 B).

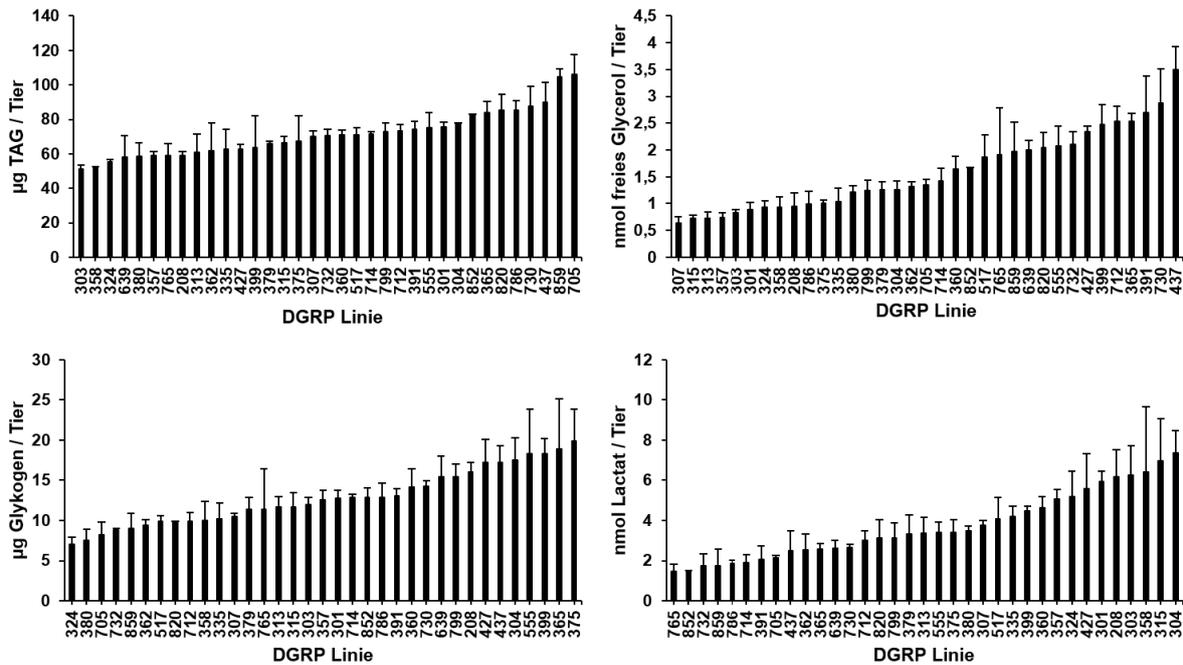


**Abbildung 2.1.:** Untersuchung der Entwicklungszeit der DGRP Fliegenlinien in Abhängigkeit metabolischer Gruppen der späten L3 Larven. (A) Experimentelles Design zur Reduktion umweltbedingter Variabilität. Die parentale Dichte der Fliegenlinien wurde für zwei Generationen konstant gehalten, um Variationen zu minimieren (siehe Methoden Abschnitt 4.1). (B) Die Fliegenlinien wurden entsprechend ihrer Entwicklungszeit in fünf Gruppen unterteilt (D1-5). Bei allen Linien konnte eine konstante Zeit bis zur vollständigen Entwicklung der ersten adulten Tiere beobachtet werden. Unterschiede sind in der Dauer des larvalen Stadiums bzw. des Puppenstadiums zu sehen. (C) Darstellung von metabolischen Gruppen der L3 Larven in einer Heatmap. Jede Zeile repräsentiert eine DGRP Linie, jede Spalte die Messung eines Metabolits. Die metabolischen Messungen wurden mittels z-Transformation spaltenweise normalisiert. Die Larven konnten in sechs metabolische Gruppen unterteilt werden (M1-6). (D) Es wurde getestet, ob eine metabolische Gruppe (M1-6) durch eine Entwicklungsgruppe (D1-5) vollständig bestimmt wird. Dafür wurden die DGRP Linien der Entwicklungsgruppen mit den Linien der metabolischen Gruppen verglichen und die relative Häufigkeit bestimmt.

Da die Umgebungsbedingungen, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Futter und parentale Dichte, konstant gehalten wurden, sollte untersucht werden, ob die Unterschiede in der Entwicklungszeit mit metabolischen Parametern korreliert sind. Dafür wurden wandernde L3 Larven und adulte Tiere (verpaarte Weibchen und Männchen) im Alter von sechs Tagen gesammelt und für die metabolischen Messungen aufbereitet (siehe Methoden Abschnitt 4.4.1). Um einen möglichst großen Anteil der Trockenmasse von *Drosophila* zu quantifizieren, wurden von den Proben die Mengen an Gesamtprotein, Triglycerid (TAG), freiem Glycerol, freier Glucose, Glykogen und Lactat bestimmt (siehe Methoden Abschnitt 4.5). Bei den adulten Tieren wurde zusätzlich die Aktivität der Citrat-Synthase (CS) gemessen. Die CS bestimmt den ersten Schritt des Citratzyklus und katalysiert die Reaktion von Oxalessigsäure und Acetyl-CoA zu Citrat<sup>[122]</sup>. Die Aktivität der CS ist daher ein Indikator für die mitochondriale aerobe Kapazität und nimmt während des frühen Puppenstadiums kontinuierlich ab<sup>[137]</sup>. Erst beim Aufbau adulten Gewebes nimmt die CS Aktivität und somit die aerobe Kapazität wieder zu und bleibt im adulten Stadium konstant. Da die Unterschiede in der Entwicklung vor allem im larvalen Stadium beobachtet wurden, wurden die Fliegenlinien entsprechend ihrer larvalen metabolischen Charakterisierung mithilfe des k-Means-Algorithmus in metabolische Gruppen unterteilt (siehe Abbildung 2.1 C) und mit den Linien der Entwicklungsgruppen verglichen (siehe Abbildung 2.1 D). Die Annahme war hierbei, dass Larven, die sich schnell entwickeln, geringere Mengen an energiereichen Speichermetaboliten - wie TAG oder Glykogen - aufweisen. Jedoch konnte diese Annahme nicht durch die Daten bestätigt werden und eine Kopplung zwischen den Entwicklungsgruppen und der metabolischen Ausprägung der einzelnen Fliegenlinien im larvalen Stadium wurde nicht festgestellt.

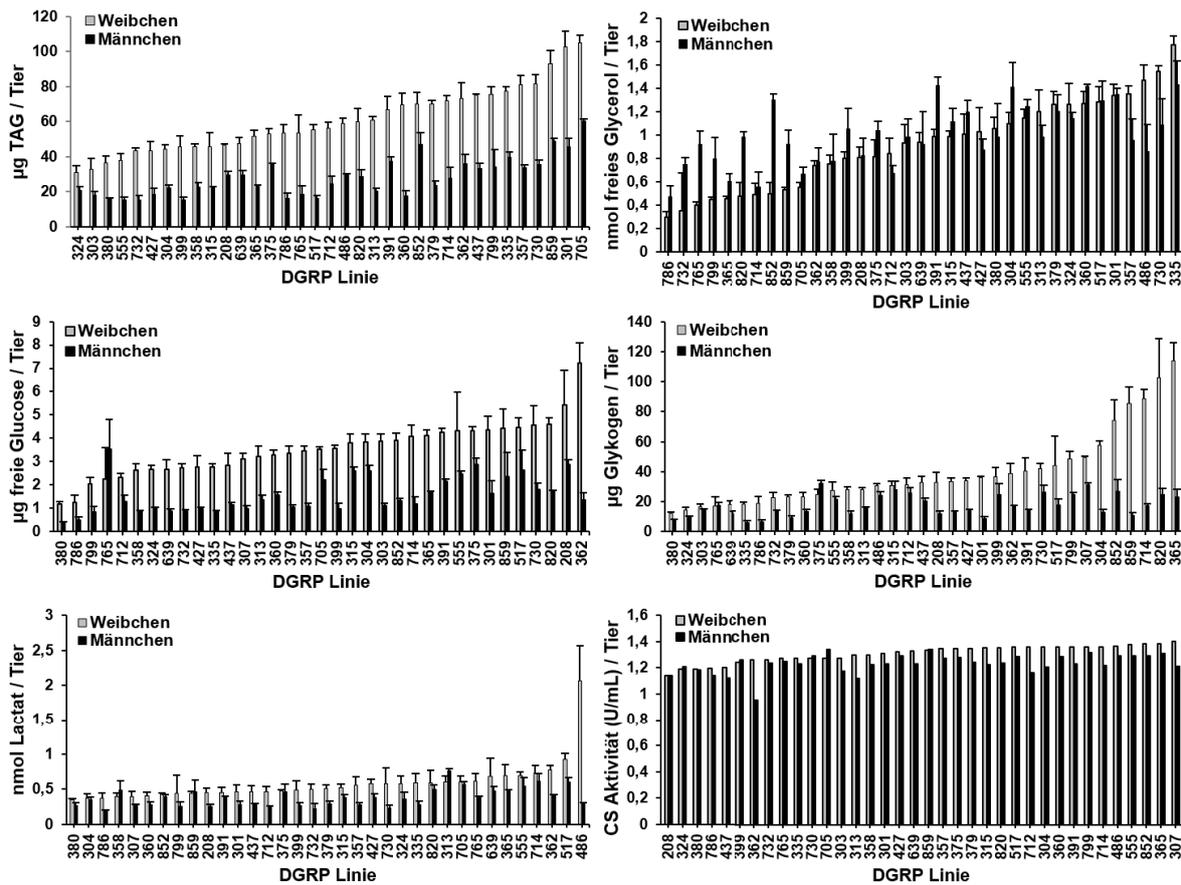
### 2.1.2. Metabolische Charakterisierung der DGRP Linien

Die metabolischen Messungen der DGRPs ergaben eine hohe Spannbreite sowohl zwischen den unterschiedlichen Linien, als auch zwischen den Stadien und Geschlechtern. Zum Beispiel wiesen die Larven einen niedrigeren Gehalt an Glykogen, als die adulten sechs Tage alten Tiere (verpaarte Weibchen und Männchen) auf (siehe Abbildung 2.2 und 2.3). Die Mengen an Glucose waren in den wandernden L3 Larven unterhalb der Nachweisgrenze. Ein weiterer Vergleich zeigt, dass die Mengen an Lactat in den L3 Larven die Lactatmengen in den adulten Tiere teilweise um das 20-fache übersteigen (vgl. Abbildung 2.2 und 2.3). Dies könnte auf eine erhöhte Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in den Larven hindeuten. Die LDH reduziert unter anaeroben Bedingungen Pyruvat zu Lactat und regeneriert somit NAD<sup>+</sup>, welches für die Glykolyse benötigt wird<sup>[1]</sup>. Diese Annahme macht auch biologisch Sinn, da die Lebensweise und Entwicklung der Larven teilweise unter hypoxischen Bedingungen stattfindet<sup>[37]</sup>.



**Abbildung 2.2.:** Metabolische Messungen von späten L3 Larven unter basalen Bedingungen (25 °C, Standardfutter). Gezeigt sind die Messungen von Triglyceriden (TAG), freiem Glycerol, Glykogen und Lactat. Die Messungen sind nach aufsteigenden Werten geordnet und aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Triplikate. Alle Messungen sind normiert auf die Anzahl der Tiere pro Probe ( $n = 5$ ).

Neben den Unterschieden zwischen dem larvalen Stadium und den adulten Tieren sind auch prominente Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu erkennen. So sind die Mengen an Triglyceriden und Glykogen in adulten verpaarten Weibchen und Männchen wesentlich höher als im Vergleich zu den Mengen an freien Metaboliten, wie Glycerol oder Glucose (siehe Abbildung 2.3). Die Weibchen wiesen außerdem im Vergleich zu den Männchen sehr hohe Mengen an Speichermetaboliten (Glykogen, TAG) auf. Diese hohen Mengen an energiereichen Metaboliten stehen vor allem mit der Eiproduktion und Fertilität in Verbindung<sup>[157]</sup> und könnten durch die vorherige Verpaarung begründet sein. Einzig die Citrat-Synthase (CS) Aktivität ist zwischen den Linien und den Geschlechtern weitestgehend konstant. Die Aktivität der CS scheint aufgrund der geringen Variabilität der Messwerte (siehe Abbildung 2.3, unten rechts) unter starker Kontrolle zu stehen.

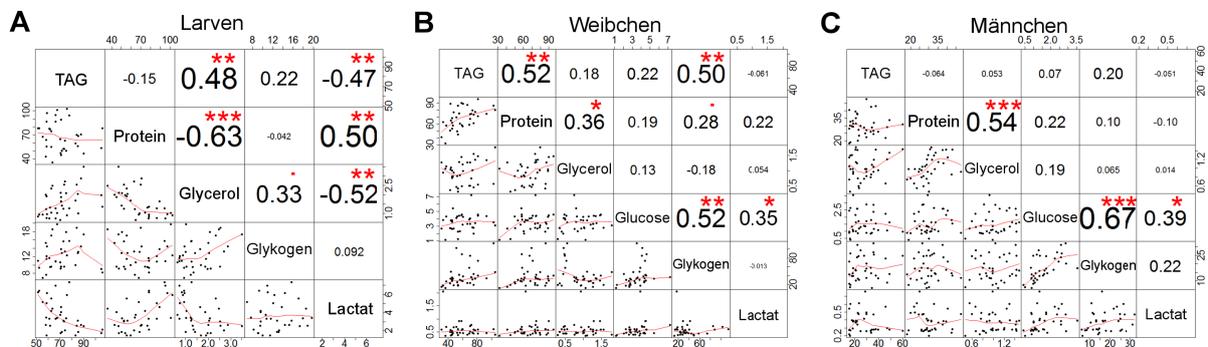


**Abbildung 2.3.:** Metabolische Messungen von sechs Tage alten verpaarten Weibchen (grau) und Männchen (schwarz) unter basalen Bedingungen (25 °C und Standardfutter). Gezeigt sind die Messungen von Triglyceriden, freiem Glycerol, Glykogen, freier Glucose, Lactat und der Citrat-Synthase Aktivität. Die Messungen sind nach aufsteigenden Werten der Weibchen geordnet und aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Triplikate (CS Aktivität nur Unikate). Alle Messungen sind normiert auf die Anzahl der Tiere pro Probe ( $n = 8$ ).

### 2.1.3. Phänotypische Korrelationsstudien

Durch die metabolische Charakterisierung war es möglich mehr über die metabolischen Profile der Fliegenlinien zu erfahren und einen ersten Überblick über die Verteilung der Metabolite zu gewinnen. Um mehr über die mögliche Kopplung der gemessenen Metabolite zu lernen, wurden die metabolischen Messungen paarweise korreliert (siehe Abbildung 2.4). Dabei waren zunächst zwei unterschiedliche Hypothesen zu möglichen Relationen zwischen den Metaboliten vorstellbar: (i) ein sogenannter „sparsamer Genotyp“ (engl. *thrifty genotype*) oder (ii) eine balancierte Verteilung der Speichermetabolite. Bei einem „*thrifty genotype*“ handelt es sich um einen Begriff, der vor allem im Zusammenhang mit Adipositas und Typ-2-Diabetes geprägt wurde<sup>[146,147]</sup>. Die Hypothese besagt, dass dieser „sparsame Genotyp“ den Aufbau an energiereichen Speichermetaboliten, wie Lipiden und Kohlenhydrate, fördert und simultan einen langsamen Abbau begünstigt. Dies macht vor allem bei Organismen Sinn, die limitierenden Nahrungsverhältnissen ausgesetzt sind und mehr energiereiche Speicher zum Überleben aufbauen müssen. Die zweite Annahme der

balancierten Verteilung der Speichermetabolite würde das Gegenteil beinhalten. Hierbei wird davon ausgegangen, dass niedrige Speicher an Kohlenhydraten in hohen Lipidspeichermengen resultieren und anders herum. Die Korrelationen zwischen den Metaboliten wurden abhängig vom Entwicklungsstadium und dem Geschlecht betrachtet. Die sechs Tage alten Weibchen zeigten beispielsweise eine signifikante positive Korrelation zwischen den Triglyceriden und Glykogen ( $p < 0,002$ ; siehe Abbildung 2.4 B), was auf einen „*thrifty genotype*“ hindeutet. Die sechs Tage alten Männchen hingegen zeichnen sich durch die Abwesenheit genau dieser Korrelation aus (siehe Abbildung 2.4 C). Wie im Abschnitt 2.1.2 schon beschrieben, lässt dies darauf hindeuten, dass die Weibchen große Energiereserven für die Reproduktion benötigen. Im Gegensatz zu den adulten Tieren zeigten die späten L3 Larven zum Beispiel signifikante positive Korrelationen zwischen Lactat und Proteinen und zwei signifikante negative Korrelationen zwischen Lactat und Triglyceriden sowie Glycerol (siehe Abbildung 2.4 A). Diese metabolischen Korrelationen weisen erneut auf die Wichtigkeit von Lactat im larvalen Organismus hin (Vergleich Abschnitt 2.1.2).

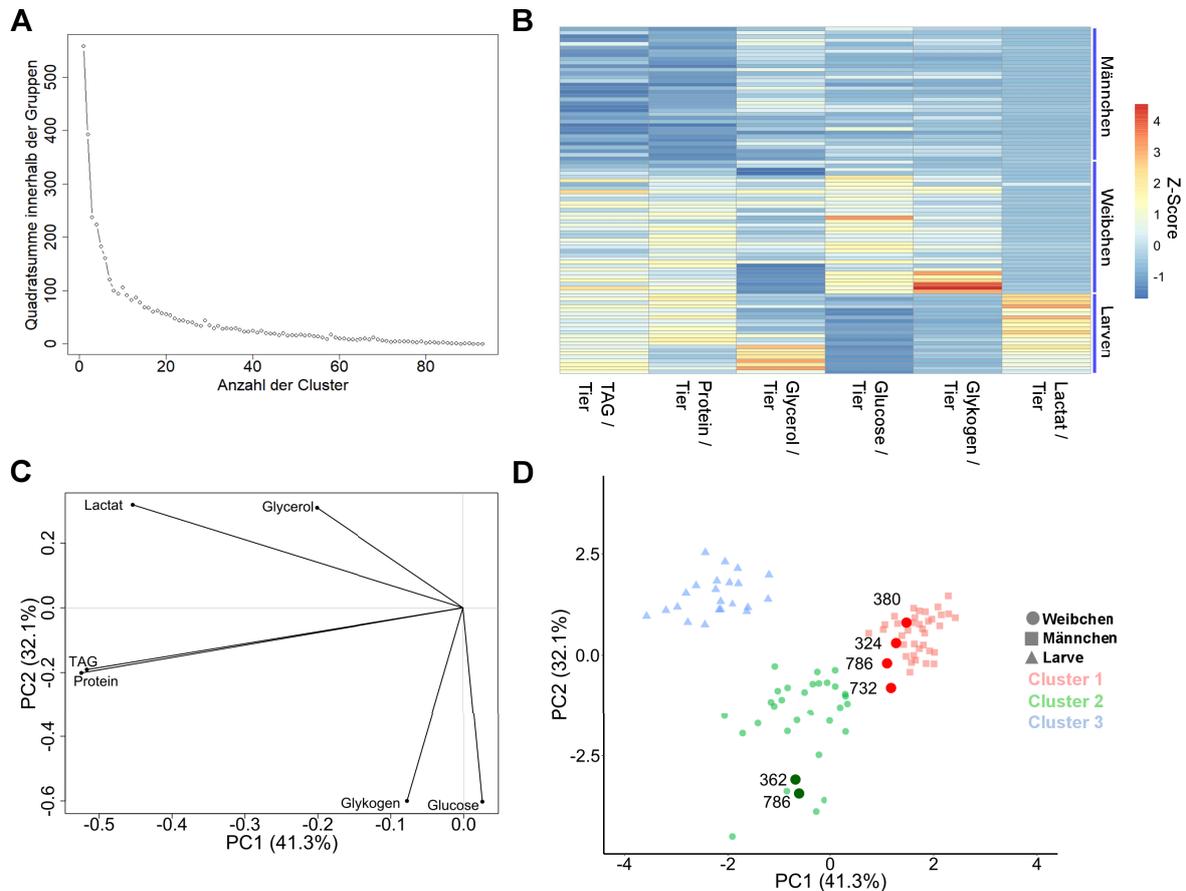


**Abbildung 2.4.:** Korrelationsanalysen von wandernden L3 Larven (A), sechs Tage alten Weibchen (B) und Männchen (C). Die Signifikanzniveaus sind mit den Asterisken gekennzeichnet:  $p \sim 0,05$  ·,  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\* und  $p < 0,001$  \*\*\* basierend auf der t-Test Statistik.

#### 2.1.4. Identifikation metabolischer Gruppen

Durch die Korrelationsanalysen konnten statistisch signifikante Relationen zwischen einzelnen Metaboliten gefunden werden. Nun stellte sich die Frage, ob es zwischen den Fliegenlinien möglich ist, Gruppen zu identifizieren, die ein ähnliches metabolisches Profil aufweisen (sogenannte „Metabotypen“), dass wiederum in anderen Bereichen (Entwicklungszeit, Fortpflanzung) zu einer ähnlichen Regulation führt. Für diese Untersuchungen wurde der k-Means-Algorithmus angewandt, der es zunächst ermöglichte drei distinkte Hauptgruppen zu identifizieren: (i) die späten L3 Larven, (ii) sechs Tage alte Weibchen und (iii) sechs Tage alte Männchen (siehe Abbildung 2.5 A und B). Mittels einer Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*, PCA) konnten diese metabolischen Gruppen grafisch dargestellt werden. Die erste Hauptkomponente PC1 (engl. *principle component*, PC) wird dabei von den Triglyceriden und Proteinen bestimmt, wobei die zweite Hauptkomponente PC2 durch Glucose und Glykogen aufgespannt wird (siehe Abbildung 2.5 C). Neben den drei distinkten Hauptgruppen konnten weitere Metabotypen innerhalb der drei Gruppen festgestellt werden (siehe Abbildungen 2.1 C

und Anhang A.1). Im Falle der Larven wurde untersucht, ob die Metabotypen einen Einfluss auf die Entwicklungszeit haben. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden (siehe Abschnitt 2.1.1).

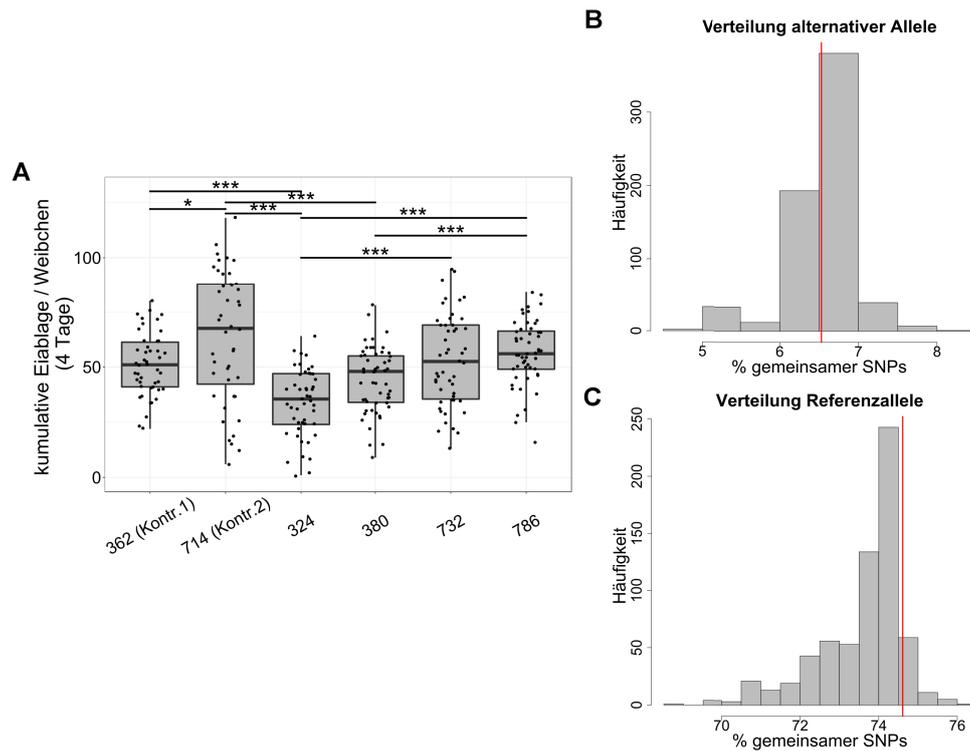


**Abbildung 2.5.:** Multivariate Datenanalyse der metabolischen Daten der DGRP Linien unter basalen Bedingungen. (A) Eigenwertediagramm (engl. *scree plot*) zur Identifikation der Anzahl metabolisch distinkter Gruppen. (B) Darstellung der metabolischen Gruppen in einer Heatmap. Die metabolischen Daten wurden durch spaltenweise z-Transformation (Farbcodierung) standardisiert. Jede Spalte repräsentiert die Messung eines Metabolits. Jede Reihe repräsentiert eine Fliegenlinie (wandernde L3 Larven, Weibchen oder Männchen). (C) *Loading-Plot* der PCA unter basalen Bedingungen. Die *Loadings* enthalten Informationen über den Beitrag der verschiedenen metabolischen Messungen zu den beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2. (D) Der *Score-Plot* der PCA zu den metabolischen Messungen aus Abschnitt 2.1.2. Die drei metabolischen Gruppen sind durch unterschiedliche Farben (rot, grün, blau) gekennzeichnet. Die Proben sind nahezu perfekt in den unterschiedlichen Gruppen aufgeteilt ( $\triangle$ : L3 Larven;  $\circ$ : Weibchen;  $\square$ : Männchen). Einzige Ausnahme bilden vier Weibchen, die im männlichen metabolischen Profil lokalisiert sind (rote Markierungen). Um zu testen, ob die Fertilität der Weibchen mit dem männlichen metabolischen Profil verändert ist, wurden Experimente zur Eiablage durchgeführt und als Kontrolle zwei DGRP Linien mit einem weiblichen metabolischen Profil ausgewählt (grüne Markierungen; siehe Abschnitt 2.1.4 - *Fallstudie: Viragos* und Methoden Abschnitt 4.6).

Bei genauerer Betrachtung der Hauptgruppen in der Heatmap (siehe Abbildung 2.5 B) und in der PCA (siehe Abbildung 2.5 D) fällt weiterhin auf, dass sich vier weibliche DGRP Linien (DGRP ID: 324, 380, 732, 786) im metabolischen Cluster der Männchen befinden (siehe Abbildung 2.5 D, rote Markierungen). Diese Weibchen weisen somit ein männliches metabolisches Profil auf, was durch einen niedrigeren Gehalt an Triglyceriden, Proteinen und Glykogen geprägt ist. Aufgrund der männlichen Ausprägung werden diese Weibchen im weiteren Verlauf als sogenannte „Viragos“ (deutsch: Mannweiber) bezeichnet.

### **Fallstudie: Viragos - Auswirkungen des metabolischen Profils**

Die Identifikation der Viragos wirft die Frage auf, welchen Einfluss ein bestimmtes metabolisches Profil auf weitere Eigenschaften eines Individuums haben kann. Die männliche metabolische Ausprägung der Weibchen lässt auf eine Maskulinisierung schließen. Im menschlichen Organismus ist eine solche Maskulinisierung durch eine erhöhte Produktion von Testosteron geprägt, was wiederum eine verringerte Fertilität und Reproduktion bewirken kann<sup>[187,218]</sup>. Um zu testen, ob sich dieses maskulinisierte metabolische Profil auf die Fertilität der betroffenen weiblichen Linien auswirkt, wurden Experimente zur Bestimmung einer veränderten Eiablagerrate durchgeführt. Dafür wurden die Weibchen der DGRP Linien mit Männchen der wildtypischen Fliegenlinie Oregon R für 24 h vereint und die Anzahl der abgelegten Eier über vier Tage protokolliert (siehe Methoden Abschnitt 4.6). Als Kontrolllinien dienten DGRP Weibchen mit einem weiblichen metabolischen Profil (geprägt durch hohe Triglycerid-, Protein- und Glykogenmengen), die klar vom männlichen metabolischen Cluster getrennt waren (Linien 362, 714; siehe Abbildung 2.5 D, grüne Markierungen). Es wurde die mittlere kumulative Anzahl an abgelegten Eiern pro Weibchen in drei biologisch unabhängigen Experimenten ermittelt (siehe Abbildung 2.6 A). In zwei der vier Virago Linien ist eine signifikant verringerte Eiablage im Vergleich zu den Kontrolllinien zu erkennen (DGRP Linien 324, 380). Dieses Ergebnis ist mit der Aufspaltung der DGRP Linien in der PCA konsistent. Hier sind die DGRP Linien 324 und 380 direkt im männlichen metabolischen Cluster gruppiert, wobei die anderen zwei DGRP Linien (DGRP ID: 732, 786) zwischen dem weiblichen und männlichen Cluster liegen und nur eine Tendenz zur reduzierten Eiablage zeigen. Da die DGRP Linien vollständig sequenziert sind<sup>[99,129]</sup>, stellte sich als nächstes die Frage, ob genetische Unterschiede identifiziert werden können, die einen Einfluss auf das metabolische oder reproduktive Profil der zwei Virago Linien (DGRP ID: 324, 380) haben könnten. Dafür wurden die Informationen über die Einzelnukleotid-Polymorphismen<sup>[99]</sup> (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP) genutzt, um nach einer möglichen Anreicherung oder eines Verlustes von SNPs (alternative Allele oder Referenzallele) in den zwei Virago Linien im Vergleich zu den anderen DGRP Linien zu suchen. Dafür wurden die DGRP Linien paarweise miteinander verglichen, d. h. es wurde nach gleichen alternativen Allelen und Referenzallelen zwischen zwei DGRP Linien gesucht. Die Übereinstimmung von alternativen Allelen bzw. Referenzallelen zwischen zwei Fliegenlinien wurden als Prozente ausgedrückt, d. h. bei einer hohen Übereinstimmung von beispielsweise alternativen Allelen zweier DGRP Linien steigt die Prozentzahl dieses Paares. Die prozentualen Werte der gemeinsamen alternativen Allelen oder Referenzallelen zwischen zwei Linien wurden als Verteilung aufgetragen (siehe Abbildung 2.6 B und C).



**Abbildung 2.6.:** Auswirkungen des metabolischen Profils und der genetischen Kontribution auf die Fertilität der Virago Linien. (A) *Boxplots* zur Darstellung der vier DGRP Weibchen mit männlichen metabolischen Profil (DGRP ID: 324, 380, 732, 786) und den Kontrolllinien (DGRP ID: 362, 714). Aufgetragen sind die einzelnen Messwerte als Punkte im *Boxplot* von drei biologisch unabhängigen Versuchen zur Bestimmung der Eiablage. Für den Test auf Signifikanz wurde eine ANOVA-Analyse mit einem Bonferroni korrigierten Post-hoc-Test angewandt. Die Asterisken kennzeichnen die Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\* und  $p < 0,001$  \*\*\*. Um zu testen, ob es einen Zusammenhang zwischen SNPs und dem männlichen metabolischen Profil der zwei Viragos (DGRP ID: 324, 380) gibt, wurden die Prozente der gemeinsamen alternativen Allele (B) und der Referenzallele (C) berechnet. Die ermittelten Verteilungen wurden mit den Werten der zwei Virago Linien verglichen (rote Markierung).

Bei den alternativen Allelen waren die Prozente der gemeinsamen SNPs der Virago Linien (324, 380) nicht unterschiedlich zu dem häufigsten Ergebnis der nicht-Virago Linien (6,53 % vs. 6,52 %; siehe Abbildung 2.6 B). Die Referenzallele der Virago Linien zeigten nur einen geringen Unterschied zu dem häufigsten Ergebnis der nicht-Virago Linien (74,61 % vs. 73,59 %; siehe Abbildung 2.6 C). Somit konnte keine Anreicherung und kein Verlust von SNPs in den zwei Virago Linien identifiziert werden. Mithilfe der SNP Daten konnte weiterhin untersucht werden, ob es Referenzallele oder alternative Allele gibt, die nur in den zwei Virago Linien vorkommen. Es wurden insgesamt 22 Referenzallele und 418 gemeinsame alternative Allele gefunden, die in keiner anderen DGRP Linie vorkommen. Die identifizierten Allelvarianten könnten einen Einfluss auf die metabolische Ausprägung oder die Fertilität der Fliegenlinien haben. In dieser Studie konnten jedoch keine SNPs detektiert werden, die einen bekannten Einfluss auf den metabolischen oder reproduktiven Phänotyp haben (siehe Anhang Tabelle A.1). Daher ist es erforderlich weitere Untersuchungen anzuschließen, um eine verlässliche Aussage treffen zu können.

## 2.2. Einfluss auf die metabolischen Parameter durch variierende Ernährungsbedingungen

Unter konstanten basalen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass wildtypische Fliegenlinien eine hohe Plastizität im metabolischen Phänotyp aufweisen (siehe Abschnitt 2.1). Verschiedene Umweltbedingungen können den metabolischen Phänotyp weiter verändern und die Entscheidungsprozesse des Organismus beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist die variable Antwort auf Nahrungsbedingungen. So reagieren Menschen auf eine hochkalorische Ernährung in unterschiedlichsten Weisen. Einige zeigen eine hohe Gewichtszunahme auf, wogegen andere kaum oder wenig Auswirkungen verspüren und das trotz ähnlicher Lebensverhältnisse<sup>[22]</sup>. Es stellte sich somit die Frage, in welcher Weise die Nahrungsbedingungen einen Einfluss auf das metabolische Profil der wildtypischen DGRP Linien haben und ob es auch hier Unterschiede zwischen den Fliegenlinien gibt. Um dies zu forcieren, sollten die DGRPs zunächst unter „gesunden“ Nahrungsbedingungen aufwachsen (wenig Kalorien) und danach verschiedenen Futtersorten (niedriger bis hoher Kaloriengehalt) ausgesetzt werden.

### 2.2.1. Etablierung eines experimentellen Systems zur Beobachtung veränderter Nahrungsbedingungen auf den Metabolismus

Zunächst musste ein robustes Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht *Drosophila* Fliegenlinien auf unterschiedlichen Futtersorten anzuziehen und die metabolischen Veränderungen zu beobachten. Dabei wurden verschiedene Futtersorten und Versuchsanordnungen getestet, um ein experimentelles Verfahren zu entwickeln, das auf die 35 DGRP Linien angewandt werden konnte. Da die Bedingungen zum basalen Experiment konstant gehalten werden sollten, wurden keine Futtersorten mit einem erhöhten Fettanteil (durch Zugabe von Kokos- oder Palmöl) verwendet, da sich diese bei einer Temperatur von 25 °C verflüssigen und die Entwicklung der Fliegen einschränken (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden Futtersorten mit veränderten Zuckerkonzentrationen<sup>[141]</sup> getestet (siehe Methoden Abschnitt 4.2). Die Entwicklung der wildtypischen Fliegenlinie Oregon R wurde auf Futter mit zwei verschiedenen Zuckerkonzentrationen - Zucker-reduziert (engl. *low sugar diet*, LSD) mit 0,15 M Saccharose und Zucker-erhöht (engl. *high sugar diet*, HSD) mit 1 M Saccharose - beobachtet und mit dem komplexen Standardfutter (engl. *standard diet*, SD mit 0,15 M Zucker) verglichen (siehe Methoden Abschnitt 4.2). Eine Aufschlüsselung der Nährwertangaben und des Kaloriengehalts der einzelnen Futtersorten befindet sich in den Tabellen 2.1 und 2.2. Um die Entwicklung auch metabolisch zu beobachten, wurden wandernde L3 Larven, sowie ein und sechs Tage alte Männchen für Messungen des Triglyceridgehalts gesammelt. Da überschüssiger Zucker im Organismus in Fette umgewandelt wird, kann eine Veränderung in den Triglyceridmengen bei einer Ernährung mit veränderten Zuckerkonzentrationen beobachtet werden<sup>[141,192]</sup>.

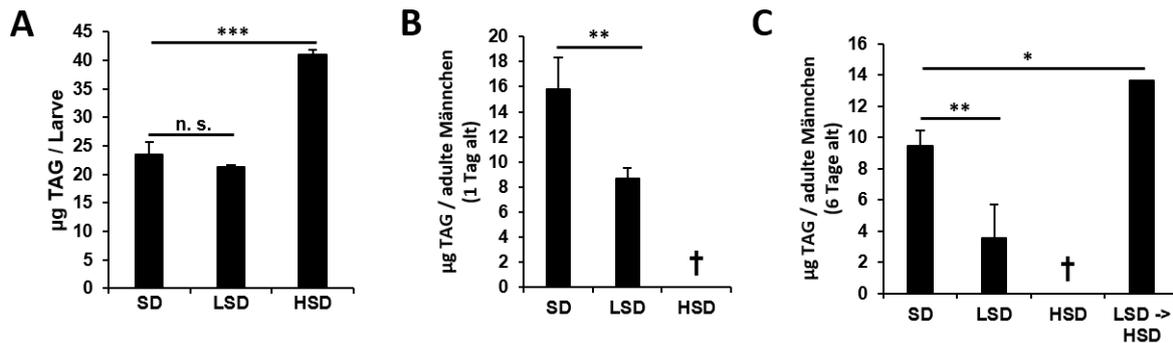
**Tabelle 2.1.:** Nährwerttabelle der Futtersorten LSD und HSD. Alle Werte beziehen sich auf 100 g des entsprechenden Futters. Die Angaben der Nährwerte können je nach Produkt variieren (die verwendeten Produkte sind in den Materialien Abschnitt 5.2 und 5.3) aufgeführt.

Bestandteil	g (LSD   HSD)	Fett [g]	Proteine [g]	Kohlenhydrate [g] (LSD   HSD)	Kalorien [kcal] (LSD   HSD)
Agar	1	0	0,005	0,07	0,26
Hefe	8	0,32	3,2	2,8	30,4
Hefeextrakt	2	0,018	0,48	0,4	3,7
Pepton	2	-	-	-	-
Saccharose	5,13   34,2	0	0	5,13   34,2	20,52   136,8
Gesamtnährwertgehalt	-	0,338	3,685	8,4   37,47	54,88   171,16

**Tabelle 2.2.:** Nährwerttabelle des SDs. Alle Werte beziehen sich auf 100 g des Standardfutters. Die Angaben der Nährwerte können je nach Produkt variieren (die verwendeten Produkte sind in den Materialien Abschnitt 5.2 und 5.3) aufgeführt.

Bestandteil	g	Fett [g]	Proteine [g]	Kohlenhydrate [g]	Kalorien [kcal]
Agar	0,5	0	0,003	0,035	0,13
Polenta	7,1	0,06	0,55	5,25	24,42
Sojamehl	0,95	0,21	0,38	0,14	4,21
Hefe	1,68	0,07	0,67	0,59	6,38
Zuckersirup	4	0,02	0,09	2,76	11,96
Malzextrakt	4,5	0,014	0,23	2,93	13
Gesamtnährwertgehalt	-	0,374	1,923	11,71	60,1

Während des Versuchs konnte festgestellt werden, dass sich auf dem HSD keine adulten Fliegen entwickelten und die Larven teilweise vor oder während der Verpuppung starben (Daten nicht gezeigt). Ein Grund könnte die Sättigung des Futters durch den hohen Zuckergehalt sein, der eine festere Konsistenz des Futters bewirkt und die Futteraufnahme erschwert. Die Larven zeigten eine Zunahme an Triglyceriden mit zunehmendem Zuckergehalt (siehe Abbildung 2.7 A). Bei den ein und sechs Tage alten Fliegen konnte eine signifikante Zunahme vom LSD hin zum SD gemessen werden (siehe Abbildung 2.7 B und C). Zusätzlich wurden ein Tage alte Fliegen vom LSD auf HSD transferiert und für fünf Tage auf dem HSD gelassen, um die Auswirkungen des HSDs auch in den adulten Tieren beobachten zu können. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg an Triglyceriden im Vergleich zum SD (siehe Abbildung 2.7 C), der den höheren kalorischen Gehalt des Futters widerspiegelt. Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass eine Entwicklung auf dem HSD vom larvalen zum adulten Stadium nicht möglich ist, aber der Transfer von ein Tage alten Fliegen vom LSD zum HSD nach fünf Tagen einen Effekt auf die Speichermetabolite zeigt.



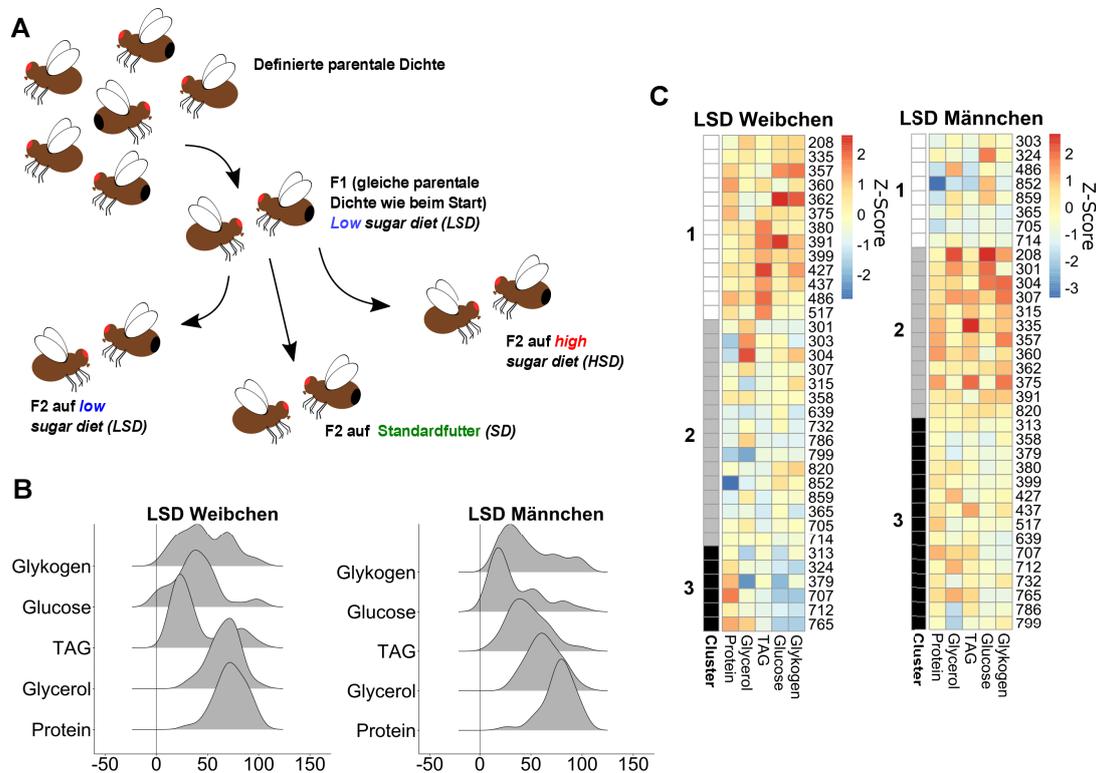
**Abbildung 2.7.:** Experimente zur Etablierung eines Testsystems mit veränderten Nahrungsbedingungen. Wildtypische Fliegen (Oregon R) wurden auf Futter mit unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen angezogen und die Triglyceride von späten L3 Larven (A), ein Tag alten Männchen (B) und sechs Tage alten Männchen (C) gemessen. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Quadruplikate. Die Messungen sind auf die Anzahl der Tiere pro Probe normiert (Larven:  $n = 5$ ; adulte Fliegen:  $n = 8$ ). Für den Test auf Signifikanz wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt. Die Asterisken kennzeichnen die Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\* und  $p < 0,001$  \*\*\*. Abkürzungen: SD = Standardfutter (0,15 M Zucker); LSD = Zucker-reduziertes Futter (0,15 M Saccharose); HSD = Zucker-erhöhtes Futter (1 M Saccharose)

### 2.2.2. Die metabolische Antwort auf veränderte Nahrungsbedingungen von wildtypischen Fliegenlinien

Der Etablierungsversuch (siehe Abschnitt 2.2.1) hat gezeigt, dass ein dauerhaftes Wachstum auf dem hoch-kalorischen Futter mit 1 M Saccharose (HSD) bei wildtypischen Fliegenlinien nicht oder kaum möglich ist. Da außerdem das Interesse bestand die Auswirkungen eines hoch-kalorischen Futters auf die Zunahme energiereicher Speichermetabolite in adulten Tieren zu untersuchen, entwickelten sich die Fliegen zunächst auf dem Futter mit reduziertem Zuckergehalt (LSD) und wurden danach auf Futter mit höherem Kaloriengehalt transferiert (SD und HSD). Wie bei den Untersuchungen unter basalen Bedingungen (siehe Abschnitt 2.1) wurden die DGRPs für zwei Generationen mit gleicher parentaler Dichte auf dem Standardfutter bei 25 °C gehalten. Danach wurden die Fliegen auf das LSD gesetzt und nach Eiablage entfernt. Die frisch geschlüpften Fliegen wurden für fünf Tage entweder auf neues LSD, auf das Standardfutter (SD) oder auf das HSD mit 1 M Saccharose transferiert (siehe Abbildung 2.8 A). Im Anschluss wurden von den sechs Tage alten Weibchen und Männchen die gleichen Metabolite wie unter den basalen Bedingungen gemessen.

Da das SD und das HSD einen höheren kalorischen Gehalt als das LSD haben (siehe Tabellen 2.1 und 2.2), wurde ein Anstieg an energiereichen Metaboliten in den DGRP Linien erwartet. Dies konnte beispielsweise bei den Glucosemengen beobachtet werden (siehe Anhang Abbildung A.2 A). Die Mengen an Triglyceriden und auch an Glykogen zeigten einen geschlechts-spezifischen Effekt. In den Weibchen kommt es zu einem Anstieg an Glykogen mit ansteigender Kalorienzahl des Futters, wobei die Mengen an Triglyceriden weitestgehend konstant bleiben. Bei den Männchen ist der gegenteilige Effekt sichtbar. Ihre Reaktion ist durch einen prominenten Anstieg an

Triglyceriden und eines relativ konstanten Glykogengehalts geprägt (siehe Anhang Abbildung A.2 B und C). Die Mengen an Proteinen und Glycerol sind relativ konstant und scheinen unabhängig von den veränderten Nahrungsbedingungen zu sein (siehe Anhang Abbildung A.2 D und E).



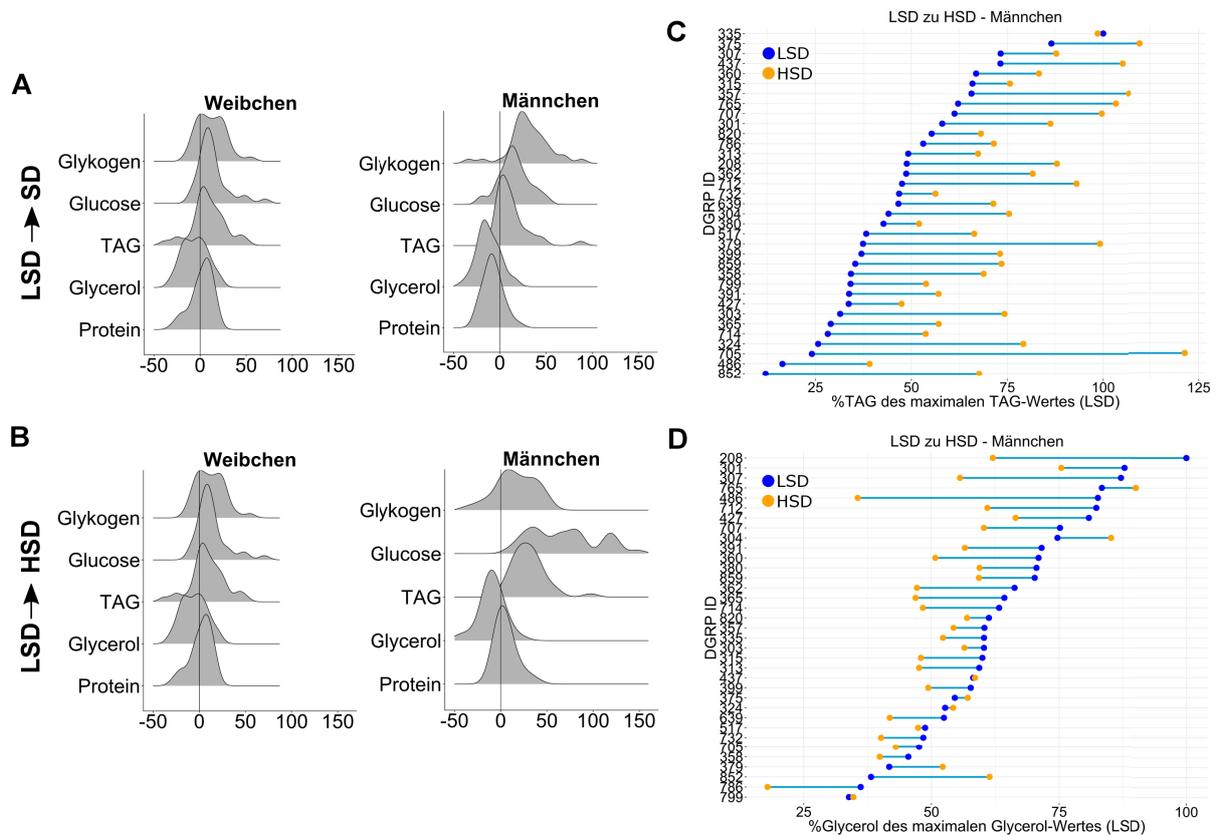
**Abbildung 2.8.:** Reaktionen des metabolischen Phänotyps auf Nahrung mit niedrigem Kaloriengehalt. (A) Experimenteller Aufbau. Wie unter basalen Bedingungen (siehe Abschnitt 2.1 und Abbildung 2.1) wurde die parentale Dichte für zwei Generationen konstant gehalten und danach auf LSD gesetzt. Die frisch geschlüpften Fliegen wurden vom LSD erneut auf LSD oder auf höher kalorische Futter (SD oder HSD) transferiert. Im Anschluss wurden die Mengen an Triglyceriden, freiem Glycerol, Glykogen, freier Glucose und Proteinen in den Proben (jeweils Quadruplikate) bestimmt. (B) Alle Metabolitmessungen wurden auf prozentuale Werte normiert (höchster Messwert des Metabolits = 100 %) und die Verteilung der Metabolite (Glykogen, Glucose, TAG, Glycerol und Protein) der unterschiedlichen DGRP Linien aufgetragen. (C) Durch den k-Means-Algorithmus wurden wie unter basalen Bedingungen metabolische Gruppen identifiziert (Metabotypen 1-3 bei den Weibchen und Männchen). Die metabolischen Messungen wurden durch spaltenweise z-Transformation normalisiert (Farbskala). Die Heatmap visualisiert die Aufspaltung der einzelnen Gruppen.

Da die metabolischen Untersuchungen von Fliegen, die sich auf LSD entwickelt haben, Variationen in den metabolischen Parametern aufwiesen, wurden die Verteilungen der Metabolitmengen in den unterschiedlichen DGRP Fliegenlinien näher untersucht (siehe Abbildung 2.8 B). Dafür wurden die metabolischen Messungen der einzelnen Fliegenlinien auf prozentuale Werte normiert, d. h. die Linie mit dem höchsten Messwert wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Messwerte wurden auf diesen Wert bezogen. Die Metabolite der unterschiedlichen Fliegenlinien zeigten

wie beim basalen Experiment (siehe Abbildungen 2.2 und 2.3) variable Mengen. Beispielsweise haben ein Großteil der DGRP Linien unter LSD Bedingungen relativ geringe Mengen an Triglyceriden gespeichert, was zum ersten Peak in der Verteilung führt. Der zweite Peak zeigt, dass wenige DGRP Linien höhere Mengen Triglyceride speichern können (siehe Abbildung 2.8 B - Weibchen). Die Männchen zeigen eine fast glockenförmige Verteilung der Triglyceridmengen und unterscheiden sich somit deutlich von der weiblichen Verteilung der Triglyceride (siehe Abbildung 2.8 B - Männchen). Die Verteilung von Glucose und Glykogen ist in den Weibchen und in den Männchen sehr variabel und weist eine hohe Plastizität in den Metabolitmengen auf. Einzig die Glycerol- und Proteinmengen zeigen eine eingeschränktere Variabilität, die einer Gauß-ähnlichen Verteilung entsprechen. Zusätzlich zu den Untersuchungen auf Variabilität wurde der k-Means-Algorithmus angewandt, um auch unter LSD Bedingungen metabolische Gruppen zu identifizieren. Wie auch unter basalen Bedingungen war es möglich verschiedene Metabotypen zu identifizieren, die beispielsweise durch hohe (Metabotyp 1 der Weibchen und Metabotyp 2 der Männchen) oder niedrige Mengen (Metabotyp 3 der Weibchen und Metabotyp 1 der Männchen) an Speichermetaboliten, wie Glykogen oder Triglyceriden, charakterisiert sind (siehe Abbildung 2.8 C). Im Vergleich zu den Metabotypen unter basalen Bedingungen (siehe Anhang A.1) gibt es Unterschiede in der Gruppierung der Fliegenlinien, die durch das veränderte Nahrungsangebot mit niedrigeren Kalorien hervorgerufen wurden.

Es ist ein bekanntes Phänomen, dass Individuen variabel auf veränderte Nahrungsbedingungen reagieren können. Es stellte sich die Frage, ob dieses Phänomen auch bei den DGRP Linien auftritt oder ob es zu vergleichbaren Änderungen der Metabolitmengen mit zunehmendem Zuckergehalt der Nahrung kommt. Um diese Frage zu beantworten, wurden zunächst die prozentualen Metabolitmengen der LSD Proben berechnet (höchste metabolische Messung = 100 %). Anschließend wurden die prozentualen Metabolitmengen der SD und HSD Proben auf die vorher ermittelten prozentualen Werte der LSD Proben bezogen. Die Differenzen der prozentualen Mengen zwischen SD und LSD bzw. zwischen HSD und LSD wurden erneut als Verteilungen aufgetragen (siehe Abbildung 2.9 A und B). Zusätzlich wurden die Differenzen der prozentualen Mengen von LSD und SD bzw. LSD und HSD in *Dumbbell-Plots* für eine bessere Visualisierung der einzelnen DGRP Linien aufgetragen. In Abbildung 2.9 C sind exemplarisch zwei *Dumbbell Plots* gezeigt. Bei dem Wechsel von LSD zum SD war bei fast allen DGRP Linien eine Zunahme an Triglyceriden, Glykogen und Glucose zu erkennen (siehe Abbildung 2.9 A). Die Proteinmengen blieben weitestgehend konstant und zeigten eine geringe Variabilität. Allerdings zeigten viele DGRP Linien eine Abnahme der Glycerolmengen. Der Wechsel von LSD zu HSD bewirkte ebenfalls einen Anstieg der Speichermetabolite (Triglyceride und Glykogen) und der Glucose in vielen DGRP Linien (siehe Abbildung 2.9 B). Aber auch hier zeigte sich wieder eine Reduktion der Glycerolmengen in vielen Linien. Betrachtet man die einzelnen DGRP Linien im Detail, erkennt man eine starke Variabilität in der Antwort auf die unterschiedlichen Nahrungsbedingungen. So kommt es bei einigen Linien zu einer Zunahme an Triglyceriden oder Glycerol, bei anderen Linien ist eine Abnahme dieser Metabolite zu erkennen (siehe beispielsweise Abbildung 2.9 C). Dabei scheint die initiale Metabolitmenge (unter LSD Bedingungen) keinen Einfluss auf die Stärke der Zu- oder Abnahme der Metabolite zu haben. Die DGRP Linien 705 und 427 verdeutlichen diese Beobachtung. Die Mengen an Triglyceriden beider Linien liegen im unteren Drittel und ein

Wechsel vom LSD zum HSD bewirkte eine sehr unterschiedliche Zunahme um 95 % (Linie 705) und 14 % (Linie 427) (siehe Abbildung 2.9 C).



**Abbildung 2.9.:** Reaktionen des metabolischen Phänotyps auf veränderte Nahrungsbedingungen. (A) und (B) zeigen die Verteilungen der Metabolite vom Wechsel von LSD zu SD (A) und von LSD zu HSD (B). Die Messwerte der einzelnen Metabolite sind auf prozentuale Werte normiert (höchster Messwert des Metabolits unter LSD Bedingungen = 100 %) und als Verteilung aufgetragen. (C) und (D): Die *Dumbbell Plots* bieten eine alternative Visualisierung der prozentualen Änderungen der einzelnen DGRP Linien (Weibchen und Männchen) auf die veränderten Nahrungsbedingungen (blau: LSD, orange: HSD). Exemplarisch sind die *Dumbbell Plots* der TAG (C) und Glycerol (D) Messungen von sechs Tage alten Männchen vom Wechsel von LSD zu HSD dargestellt.

### 2.3. Genetische Kontribution zur phänotypischen Merkmalsausbildung

Die Variabilität metabolischer Antworten wird nicht nur durch externe Bedingungen beeinflusst, sondern auch von intrinsischen Faktoren bestimmt. Die DGRP Linien wurden, wie bereits unter Abschnitt 2.1.4 erwähnt, vollständig sequenziert und bieten somit die Möglichkeit Veränderungen im Genom zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Merkmalsausprägung der Fliegen haben könnten. Um Varianzen im Genom ausfindig zu machen, die mit der metabolischen Diversität unter den basalen Bedingungen und den veränderten Nahrungsbedingungen assoziiert sind, wurden genomweite Assoziationsstudien (GWAS) von den wandernden L3 Larven und den sechs

Tage alten adulten Tieren (Weibchen und Männchen) mittels Standardmethoden durchgeführt<sup>[99]</sup>. Die DGRP Fliegenlinien haben sich bereits durch etliche Studien zur Identifikation von Phänotyp-Genotyp Assoziationen bewährt<sup>[46,108,211]</sup>. Als Grenzwert für die Signifikanz der Genassoziationen wurde ein p-Wert von  $10^{-5}$  gewählt, da dieser Wert als ein Standardwert für GWAS mit den DGRPs eingeführt wurde<sup>[129]</sup> und die Vergleichbarkeit mit anderen Studien gewährleistet. Damit konnte eine Vielzahl von SNPs gefunden werden, die mit verschiedenen metabolischen Parameter der Larven und adulten Fliegen assoziiert sind. Interessanterweise zeigte die Anzahl an SNPs eine hohe Diversität zwischen den verschiedenen Metaboliten (siehe Tabelle 2.3 und 2.4). So ist die Variation der larvalen Glycerol- und Lactatmengen (siehe Abbildung 2.2) vergleichbar, aber die Anzahl an signifikant-assoziierten SNPs unterscheidet sich stark. Bei Glycerol konnten 71 SNPs gefunden werden, wohingegen bei Lactat kein einziger SNP signifikant war (siehe Tabelle 2.3).

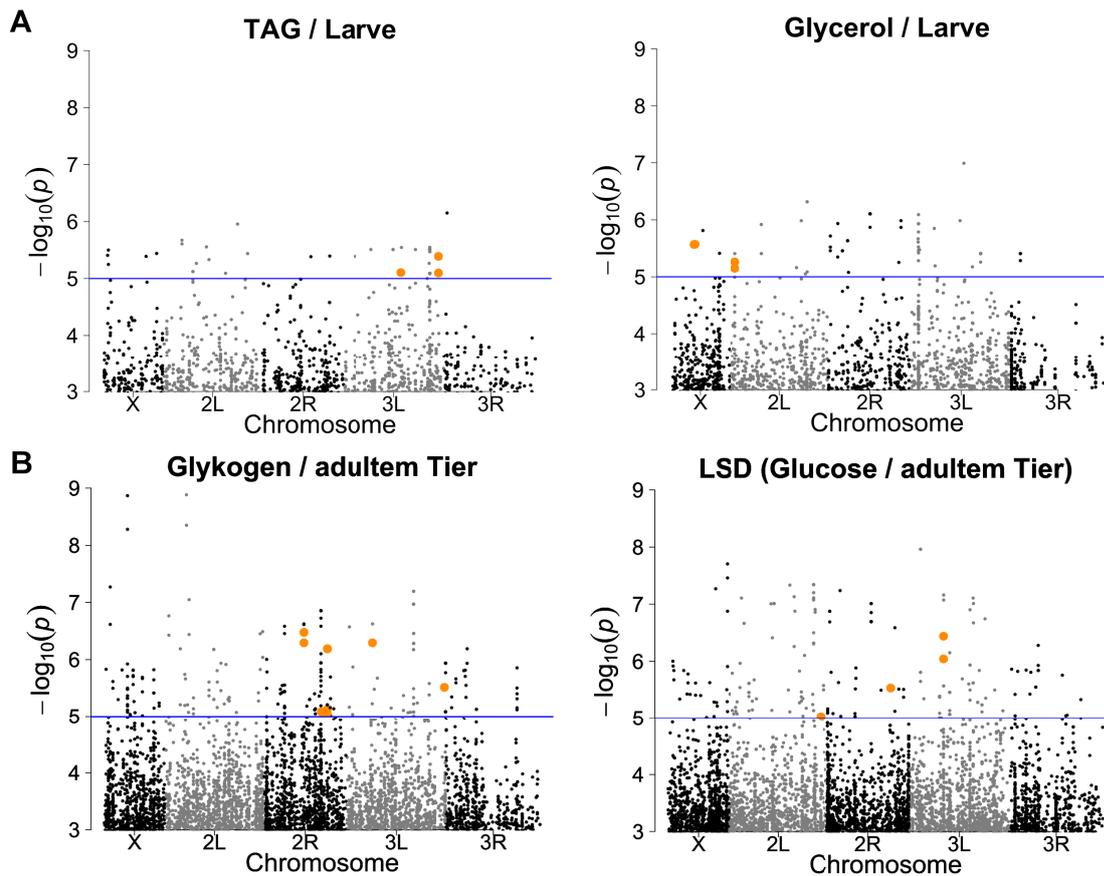
**Tabelle 2.3.:** Signifikant-assoziierte SNPs in den wandernden L3 Larven unter basalen Bedingungen.

Anzahl SNPs	Protein	TAG	Glycerol	Lactat	Glykogen
Gesamt	13	62	71	0	13
Gen-assoziiert	10	57	43	0	6
unklare Assoziation	3	5	28	0	7
% Gen-assoziiert	76,92	91,94	60,56	NA	46,15
% unklare Assoziation	23,08	8,06	39,44	NA	53,85

**Tabelle 2.4.:** Signifikant-assoziierte SNPs in den adulten Tieren. Abk.: Gen-ass. = Gen-assoziiert; unklar Ass. = unklare Assoziation (Region zwischen zwei Genen); - = keine experimentellen Daten vorhanden.

Kondition	Anzahl SNPs	Protein	TAG	Glycerol	Lactat	Glykogen	Glucose	Citrat
Basal	Gesamt	81	39	35	58	149	15	29
	Gen-ass.	44	28	20	37	111	11	20
	unklare Ass.	37	11	15	21	38	4	9
LSD zu LSD	Gesamt	13	161	41	-	33	187	-
	Gen-ass.	9	84	36	-	26	134	-
	unklare Ass.	4	77	5	-	7	53	-
LSD zu SD	Gesamt	98	97	23	-	29	27	-
	Gen-ass.	72	68	13	-	22	8	-
	unklare Ass.	26	29	10	-	7	19	-
LSD zu HSD	Gesamt	55	38	23	-	43	20	-
	Gen-ass.	17	26	15	-	34	16	-
	unklare Ass.	38	12	8	-	9	4	-

Die Tabellen 2.3 und 2.4 zeigen die Anzahl der gefundenen signifikant-assoziierten SNPs in den unterschiedlichen metabolischen Parametern und ob eine Assoziation mit einem Gen vorhanden ist oder ob der SNP in einer Region zwischen den Genen liegt. In Abbildung 2.10 sind vier exemplarische *Manhattan-Plots* zu sehen, die die SNPs visualisieren. Bei einem *Manhattan-Plot* handelt es sich um eine typische Visualisierung von Ergebnissen aus genomweiten Assoziationsstudien, bei denen der negative Logarithmus der p-Werte der Assoziation gegen die chromosomale Position der SNPs aufgetragen wird<sup>[180]</sup>.



**Abbildung 2.10.:** *Manhattan-Plots* ausgewählter Beispiele der GWAS. Die Abbildungen zeigen die SNPs (schwarze und graue Punkte) auf den unterschiedlichen Chromosomen (X, 2L, 2R, 3L, 3R) von *Drosophila*. Die x-Achse beginnt zur Vereinfachung der Abbildung ab einem  $-\log_{10}(p)$ -Wert von 3. (A) SNPs assoziiert mit den Messungen der larvalen Triglyceride und mit Glycerol unter basalen Bedingungen. (B) SNPs assoziiert mit den Messungen von Glykogen unter basalen Bedingungen und Glucose unter LSD Bedingungen von sechs Tage alten Männchen und Weibchen. Der Grenzwert für die Signifikanz ist bei  $10^{-5}$  (blaue Linie). Die orangenen Markierungen kennzeichnen Gen-assoziierte SNPs mit bekannten Einflüssen in metabolischen Prozessen (beispielsweise *slimfast*, *melted*, *smooth*, *short neuropeptide F* und sein Rezeptor).

Neben SNPs, die sich in Regionen zwischen Genen oder in Genen ohne bekannte metabolische Funktion befinden, wurden auch Gen-assoziierte SNPs mit schon bekannter metabolischer Funktion gefunden, die einen prinzipiellen Beweis für die Robustheit dieser Studie liefern (alle SNP Daten befinden sich im Anhang A in Tabelle A.2 auf der beigefügten CD). Beispielsweise wurden für die Larven TAG assoziierte SNPs identifiziert, die mit den Genen *scylla* (*scyl*) und *short neuropeptide F receptor* (*sNPFR*) assoziiert sind. *Scylla* ist ein Mitglied des TOR (engl. *target of rapamycin*) Signalwegs und beeinflusst die Triglyceridmengen der Tiere<sup>[173]</sup>. *sNPFR* ist an der Regulation der Sättigung und des Ernährungsverhaltens (bspw. Nahrungsaufnahme) beteiligt<sup>[121]</sup>, was auf eine Verbindung zur Regulation energiereicher Speichermetabolite hindeutet. In Larven konnten mit Glycerol assoziierte SNPs identifiziert werden, die in den

Genen *neural lazarus* (*NLaz*), *CG1986* und *lysophosphatidylcholine acyltransferase* (*LPCAT*) liegen. Das Gen *neural lazarus* ist ein bekannter metabolischer Regulator, der an der oxidativen Stressantwort und der Triglycerid- und Kohlenhydrathomöostase beteiligt ist<sup>[100,158]</sup>. Über die Gene *CG1968* und *LPCAT* ist zur Zeit noch wenig bekannt<sup>[84]</sup>. *CG1968* ist eine annotierte Lipase und somit potentiell an der Regulation der Fettspeicher beteiligt<sup>[84]</sup>. *LPCAT* ist als ein Mitglied in der Phospholipid-Synthese annotiert<sup>[84]</sup>. Mutationen in diesem Gen haben eine veränderte Morphologie der Lipidtröpfchen und einen Effekt auf die Fettspeichermengen gezeigt<sup>[139]</sup>. Bei den adulten Tieren konnten unter basalen Bedingungen SNPs identifiziert werden, die beispielsweise mit den Genen *smooth* (*sm*; assoziiert mit Glycerol und Glykogen), *slimfast* (*sm*; assoziiert mit Glykogen), *protein tyrosin kinase 99A* (*ptp99A*; assoziiert mit Proteinen), *trehalase* (*treh*; assoziiert mit Glycerol), *fat body protein 2* (*fbp2*; assoziiert mit Lactat) und *retinal homeobox* (*rx*; assoziiert mit Glykogen) assoziiert sind. *Smooth* ist beteiligt an der Regulation der Futteraufnahme und am Überleben der Tiere<sup>[120]</sup>. Das Gen *slimfast* ist an der metabolischen Regulation der Fettspeicherung beteiligt und kontrolliert die Konzentration der Aminosäuren in den Fettkörpern<sup>[90]</sup>. Einige der gefundenen Gene konnte auch in unabhängigen Untersuchungen identifiziert werden. Beispielsweise haben Ugrankar und seine Kollegen einen metabolischen Screen mit physiologischen und genetischen Untersuchungen durchgeführt, um Gene zu finden, die im Glucosemetabolismus der Fliegen involviert sind. Dabei wurden unter anderem die Gene *ptp99A* und *rx* identifiziert<sup>[210]</sup>. Eine Liste mit Genen, die sowohl in dieser GWA-Studie als auch im metabolischen Screen von Ugrankar gefunden wurde, befindet sich in Tabelle A.4.

Auch unter den veränderten Nahrungsbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.2) wurden Gene identifiziert, die in metabolischen Prozessen eine Rolle spielen. Dazu gehören unter anderem *fat body protein 1* (*fbp1*), *melted* (*melt*), *glucose transporter 1* (*glut1*) und *LDL receptor protein 1* (*lrp1*). Das Gen *fbp1* ist nur in späten, wandernden L3 Larven exprimiert und wird direkt von Ecdysteroiden kontrolliert. Das Gen dient als Rezeptor für das Larval Serum Protein 1 (LSP1) und ermöglicht den Transport von Hexamerin in den Fettkörper<sup>[34,91]</sup>. *Melted* ist an der Regulation des Lipidmetabolismus der Fliegen beteiligt<sup>[199]</sup>. Die Mutante *meltΔ1* zeigte eine Verringerung der Körpergröße (10 %) und reduzierte Triglycerid-Werte (40 %) im Vergleich zu Kontrolltieren<sup>[199]</sup>. Das Gen *glucose transporter 1* wurde, wie *rx* und *ptp99A*, ebenfalls in dem metabolischen Screen von Ugrankar gefunden und ist an der Homöostase von Glucose beteiligt<sup>[210]</sup>. *Lrp1* ist ein LDL (engl. *low-density lipoprotein*) Rezeptor-ähnliches Protein und induziert den Transport von LTP (engl. *lipid transfer particle*) durch die Blut-Hirn-Barriere. LTP wiederum ist an der Freisetzung von Insulin-ähnlichen Peptiden beteiligt und somit am Insulin-Signalweg, der unter anderem Wachstum, Entwicklung und Lebenserwartung von *Drosophila* beeinflusst<sup>[28]</sup>.

In der genomweiten Assoziationsstudie wurden insgesamt 656 SNPs unter basalen Bedingungen und 878 SNPs unter veränderten Nahrungsbedingungen gefunden. Es stellte sich die Frage, ob es SNPs bzw. Gene gibt, die unter beiden Bedingungen identifiziert werden können. Es wurden nur sechs SNPs identifiziert, die unter beiden Bedingungen signifikant mit einer metabolischen Messung assoziiert waren. Auf Ebene der Gene konnten insgesamt 256 Gene unter basalen Bedingungen und 377 Gene unter den veränderten Nahrungsbedingungen identifiziert werden, wovon 32 Gene bei beiden Bedingungen festgestellt wurden. Von diesen 32 Genen wurden ein Großteil der Gene bis jetzt noch nicht mit metabolischen Prozessen assoziiert. Dennoch konnten

zwei Gene identifiziert werden, die bekannte Funktionen im Metabolismus besitzen. Darunter ist das Gen *trehalase (treh)*, welches die Trehalose der Hemolymph in Zuckerbausteine abbaut<sup>[226]</sup> und der *leucokinin receptor (lkr)*, der an Regulation der aufgenommenen Nahrungsmenge beteiligt ist<sup>[4]</sup>.

### 2.3.1. Initiale Untersuchungen von Kandidatengenen

Durch die genomweite Assoziationsstudie wurden SNPs in Genen mit bekannten bzw. vermutlichen metabolischen Funktionen identifiziert. Wie in MacKay *et al.*<sup>[129]</sup> aufgeschlüsselt wurde, befinden sich ein Großteil der SNPs in nichtcodierenden Bereichen der Gene (Introns) oder in intergenischen Regionen. Es wurde bereits gezeigt, dass Mutationen in nichtcodierenden Bereichen beispielsweise einen Einfluss auf die mRNA Stabilität<sup>[219]</sup>, die Transkription<sup>[198]</sup> oder das Spleißen haben können<sup>[35,145,193]</sup>. Demnach wurden für die initialen Untersuchungen ausgewählter Kandidaten auch Gene in Betracht gezogen, die SNPs in nichtcodierenden Bereichen aufweisen (siehe Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.5.:** Auswirkungen und Lokalisationen der SNPs ausgewählter Gene. Abk.: MIN = selteneres Allel (engl. *minor allele*); MAJ = häufigstes auftretendes Allel (engl. *major allele*); REF = Referenzallel; A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin.

Gen	Kondition	SNP ID	MIN	MAJ	REF	Pos./Effekt
<i>ptp99a</i>	basal - Protein	3R_25272218_SNP	T	G	G	Intron
<i>sNPF</i>	LSD zu LSD - Glucose	2L_20038031_SNP	C	A	A	Intron
		2L_20038044_SNP	A	T	T	Intron
		2L_20038049_SNP	G	A	A	Intron
		2L_20038051_SNP	G	A	A	Intron
<i>glut1</i>	LSD zu SD - TAG	3L_914355_SNP	C	T	C	Intron
<i>rx</i>	basal - Glykogen	2R_16815797_SNP	T	C	C	Intron
		2R_16815919_SNP	A	G	G	Intron
		2R_16825060_SNP	A	G	A	intergenisch
		2R_16825057_SNP	C	T	C	intergenisch
<i>lrp1</i>	LSD zu LSD - TAG	2R_4107481_SNP	G	C	C	synonym
		2R_4107934_SNP	C	A	A	synonym
		2R_4104596_SNP	A	G	G	synonym
		2R_4114709_SNP	A	G	G	intergenisch
	LSD zu LSD - Glucose	2R_4069439_SNP	T	G	G	intergenisch
	LSD zu HSD - Glycerol	2R_4092300_SNP	T	A	A	intergenisch
<i>fbp2</i>	basal - Lactat	2L_9427824_SNP	T	A	A	3'UTR
		2L_9427827_SNP	G	A	A	3'UTR
<i>treh</i>	basal - Glycerol	2R_16962691_DEL	A	AA	AA	Intron
		2R_16963066_SNP	G	T	T	Intron
	LSD zu LSD - Glucose	2R_16970863_SNP	A	G	G	Intron

Gen	Kondition	SNP ID	MIN	MAJ	REF	Effekt
<i>sm</i>	basal - Glycerol	2R_15469204_SNP	T	A	T	Intron
	basal - Glykogen	2R_15470811_SNP	C	T	T	Intron
<i>slif</i>	basal - Glykogen	3L_22879526_SNP	C	T	C	Intron

Um den Einfluss der identifizierten Gene zu untersuchen, wurden Perturbationsstudien mittels RNA-Interferenzen durchgeführt. Eine Liste mit den ausgewählten Genen, der Anzahl der untersuchten RNAi Konstrukte, sowie die Informationen über die assoziierten Metabolite befinden sich in Tabelle 2.6.

**Tabelle 2.6.:** Übersicht über die getesteten RNAi Konstrukte zur Untersuchung möglicher Effekte der Gen-Knockdowns.

Gen	# RNAi Konstrukte	assoziierte Eigenschaft	Nahrungsbedingung	Stadium	Bemerkung
<i>ptp99A</i>	3	Protein	basal	Adult	-
<i>sNPF</i>	1	Glucose	LSD zu LSD	Adult	-
<i>glut1</i>	2	TAG	LSD zu SD	Adult	-
<i>rx</i>	2	Glykogen	basal	Adult	1 Konstrukt lethal
<i>lrp1</i>	2	TAG, Glucose	LSD zu LSD	Adult	-
		Glycerol	LSD zu HSD	Adult	-
<i>fbp2</i>	2	Lactat	basal	Adult	-
<i>treh</i>	2	Glycerol	basal	Adult	lethal
		Glucose	LSD zu LSD	Adult	
<i>sm</i>	1	Glycerol, Glykogen	basal	Adult	lethal
<i>slif</i>	1	Glykogen	basal	Adult	-

Durch das GAL4/UAS-System wurde ein ubiquitärer Knockdown der Gene durchgeführt (siehe Methoden Abschnitt 4.8) und die sechs Tage alten Tiere (Weibchen und Männchen) metabolisch untersucht (siehe Methoden Abschnitt 4.4.1 und 4.5). Die Fliegenlinien wurden für den gesamten Zeitraum der Untersuchungen unter Standardbedingungen (25°C und Standardfutter) gehalten. Im Anschluss wurden biochemische Quantifizierungen der Triglyceride, Proteine, Glycerol, Glucose und Glykogen durchgeführt. Eine Liste mit den verwendeten Fliegenlinien zur Untersuchung der Gen-Knockdowns befindet sich in den Materialien in Abschnitt 5.6. Die Kreuzungen von vier Responderlinien mit der Actin5c-Gal4 Treiberlinie führte zur Lethalität der homozygoten Tiere. Dadurch konnte der Knockdown der Gene *treh* und *sm* nicht untersucht werden (Daten nicht gezeigt). Durch den Knockdown von *rx*, *sNPF*, *glut1* und *lrp1* konnten nur wenige signifikante Veränderungen der metabolischen Parameter festgestellt werden (siehe Tabelle 2.7). Die vorhergesagten Eigenschaften aus der genomweiten Assoziationsstudie konnten dadurch nur teilweise bestätigt werden. Nur die vorhergesagte Assoziation von *rx* mit Glykogen konnten in den Weibchen mit einer schwach signifikanten Erhöhung bestätigt werden.

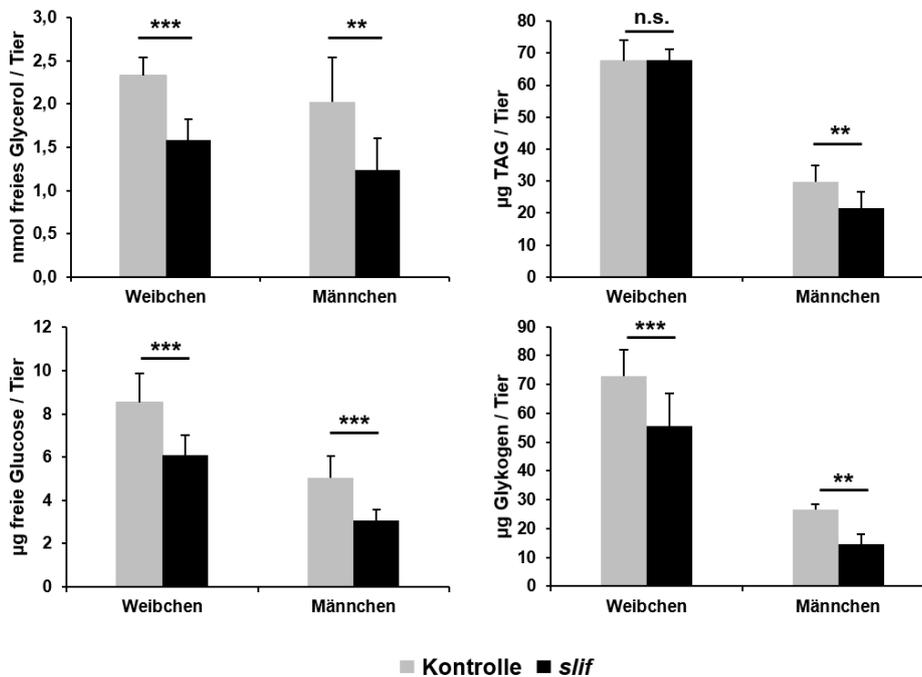
**Tabelle 2.7.:** Ergebnisse der Gen-Knockdowns durch RNAi. Die Knockdowns wurden mit ihrer entsprechenden Kontrolllinie (siehe Materialien 5.6) verglichen. Alle dargestellten Signifikanzen basieren auf den Mittelwerten zweier biologisch unabhängiger Experimente mit Quadruplikaten (insgesamt  $n = 8$ ). Die statistische Signifikanz wurde mit ungepaarten, zweiseitigen t-Tests ermittelt, wobei n.s. = nicht signifikant,  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\* und  $p < 0.001$  \*\*\*. Die Farbe der Asterisken kennzeichnet eine Reduktion (blau) oder eine Erhöhung (rot) der Metabolitmengen im Vergleich zu den Kontrollen.

Gen	Konstrukt #	Protein		TAG		Glycerol		Glucose		Glykogen	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<i>ptp99A</i>	1	**	n.s.	***	**	n.s.	n.s.	***	**	***	**
	2	*	*	*	***	*	n.s.	**	**	**	***
	3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>sNPF</i>	1	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>glut1</i>	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
<i>rx</i>	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
<i>lrp1</i>	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	*	n.s.
	2	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	**
<i>fbp2</i>	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	n.s.
<i>slif</i>	1	n.s.	n.s.	n.s.	**	***	**	***	***	**	***

Das Gen *ptp99A* wurde unter anderem in einem metabolischen Screen von Ugrankar *et al.* identifiziert, der Assoziationen mit dem Glucose-Metabolismus vorhersagte<sup>[210]</sup>. In der GWAS wurde eine signifikante Assoziationen mit Genomvarianten in Protein-codierenden Genen gezeigt. Sowohl die Mengen an Proteinen, als auch an Glucose und Glykogen sind durch den Gen-Knockdown signifikant reduziert. Jedoch konnten diese Ergebnisse nur durch zwei von drei Konstrukten bestätigt werden. Außerdem wurden auch die Mengen an Triglyceriden und Glycerol signifikant verändert. Da die Vitalität der Fliegen durch die Kreuzungen reduziert war (Daten nicht gezeigt, wenig vitale sechs Tage alte Männchen), kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass die Veränderungen des metabolischen Profils durch den Gen-Knockdown induziert sind. Weitere Untersuchungen sollten an dieser Stelle angeschlossen werden.

Dem Gen *slimfast* (*slif*) konnten unter anderem Funktionen im Stoffwechsel der Lipide nachgewiesen werden<sup>[90]</sup>. In der GWAS wurde eine signifikante Assoziation mit Glykogen unter basalen Bedingungen ermittelt. Sowohl die Assoziationen im Lipidstoffwechsel, als auch die signifikante Assoziation mit Glykogen konnte durch den Gen-Knockdown bestätigt werden. Die Mengen an Glycerol und Glykogen sind in den sechs Tage alten Weibchen und Männchen signifikant reduziert (siehe Abbildung 2.11). Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Reduktion der Glucosemengen in beiden Geschlechtern, die mit den veränderten Glykogenmengen in Zusammenhang gebracht werden können. Bei den sechs Tage alten Männchen waren außerdem die Menge an Triglyceriden reduziert. Dieses Verhalten konnte bei den Weibchen jedoch nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 2.11). Die metabolischen Untersuchungen der Gen-Knockdowns durch RNAi konnten die Ergebnisse aus der genomweiten Assoziationsstudie teilweise bestätigen (beispielsweise bei *slimfast*). Einige der erwarteten Ergebnisse konnten hierbei jedoch nicht festgestellt werden. Dabei

ist zu beachten, dass die SNPs neben eines Funktionsverlustes (engl. *loss-of-function*) auch weitere Effekte - wie neue (engl. *gain-of-function*) bzw. verstärkte oder gegenteilige Funktionen - auslösen können. Zur Validierung ist es jedoch notwendig weitere Untersuchungen, zum Beispiel in Form von funktionellen Charakterisierungen, durchzuführen. Als eine Möglichkeit bietet sich dabei das CRISPR/CAS9-System zur gezielten Mutagenisierung (bspw. Entfernung, Ausschaltung) der Gene an<sup>[17]</sup>.



**Abbildung 2.11.:** Auswirkungen des Gen-Knockdowns durch RNAi auf das Gen *slimfast* (*slif*, schwarz). Dargestellt sind die metabolischen Messungen von Glycerol, Triglyceriden, Glucose und Glykogen von sechs Tage alten Weibchen und Männchen. Die Fliegen des Gen-Knockdowns stammen aus einer Kreuzung mit einer Actin5c-Gal4 Linie und wurden mit einer biologisch zugehörigen Kontrolllinie (grau, siehe Materialien 5.6) verglichen. Die Messungen basieren auf zwei biologisch unabhängigen Experimenten. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. In jedem Experiment wurden Quadruplikate mit je acht Fliegen pro Probe untersucht. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurden ungepaarte, zweiseitige t-Tests durchgeführt. Die Asterisken kennzeichnen das Signifikanzniveau:  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*.

## 2.4. Das larvale System zur Untersuchung metabolischer Entscheidungsprozesse

Die Untersuchungen der DGRP Linien haben eine hohe phänotypische Plastizität in der Entwicklung und den metabolischen Parametern der Larven und adulten Tiere (Weibchen und Männchen) unter basalen und veränderten Nahrungsbedingungen gezeigt (siehe Abschnitt 2.1 und 2.2). Durch die Korrelationsstudien konnten ersten Einblicke in Kopplungen zwischen metabolischen Parametern von wildtypischen Fliegenlinien gewonnen werden. Diese Studien können

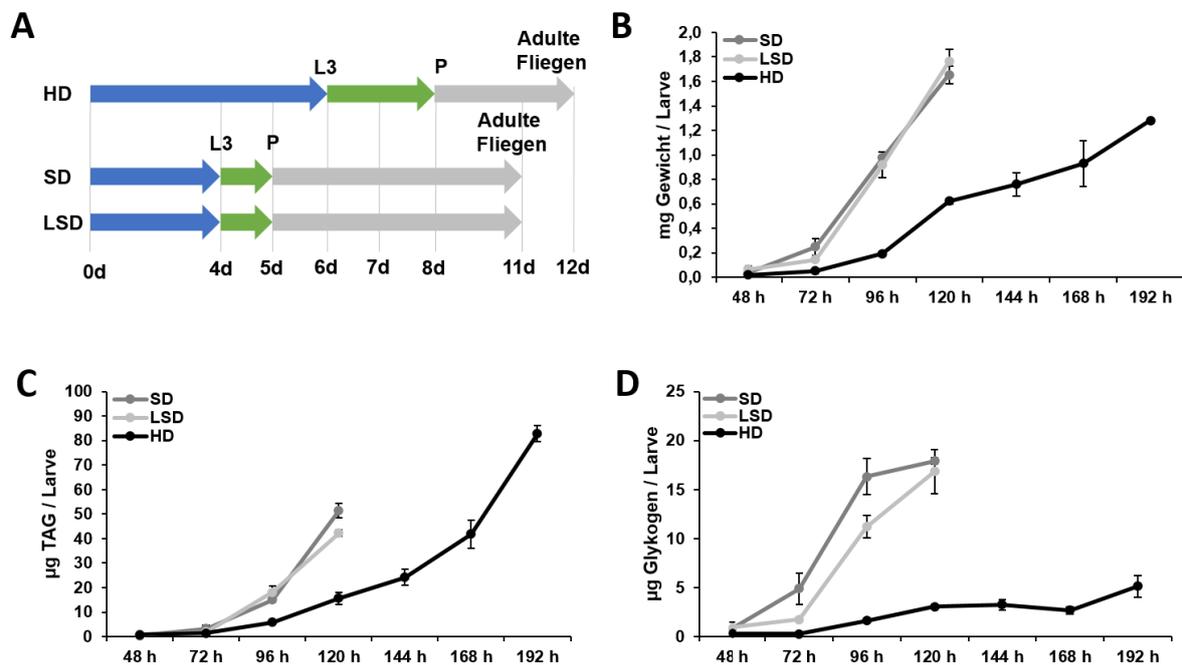
helfen, die Abhängigkeiten verschiedener Metabolite zu identifizieren und näher zu verstehen. So zeigte sich im basalen Experiment zum Beispiel, dass eine starke Kopplung zwischen Glucose und Glykogen besteht, oder Lactat einen weitaus stärkeren Einfluss im larvalen als im adulten Organismus hat (siehe Abschnitt 2.1.3).

Die Allokation von Ressourcen ist ein essentieller Prozess des Lebens, bei dem die vorhandenen Nährstoffe der Umwelt an unterschiedliche Destinationen im Organismus verteilt werden. Die übergeordnete Regulation der Ressourcenverteilung und die Priorisierung ist, vor allem in höheren Organismen, weitestgehend unbekannt und wenig verstanden<sup>[58]</sup>. Aufgrund der hohen Komplexität multizellulärer Organismen - gegeben durch diverse Zelltypen, Organe und eine nahezu unlimitierte Anzahl an möglichen Destination für die Ressourcen - ist ein *bottom-up* Ansatz zur Untersuchung dieser übergeordneten Regulation nicht möglich. Ein *top-down* Ansatz hingegen sollte fähig sein grundlegende Prinzipien der Ressourcenallokation in multizellulären Organismen, wie *Drosophila melanogaster*, aufzudecken. Vor allem die Entwicklung der *Drosophila* Larven bieten sich für diese Untersuchungen an. Die Entwicklung und auch die Allokation von Ressourcen in den Larven ist trotz eines stereotypen Programms sehr flexibel. Beispielsweise können die Larven unter mangelnden Nahrungsbedingungen ihre Entwicklungszeit verlängern und die Zusammensetzung der Metabolite variieren, um das Stadium der Metamorphose zu erreichen (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.2). Außerdem ist die larvale Entwicklung durch eine massive Größen- und Gewichtszunahme in Verbindung mit dem Aufbau umfassender Energiespeicher geprägt, um die Metamorphose durchführen zu können<sup>[137]</sup>. Zur Gewährleistung dieses Größenzunahmes weisen die Larven eine konstante Nahrungsaufnahme auf<sup>[3]</sup>, wodurch wiederum die aufgenommenen Metabolite und die benötigte Energie bestimmt werden können. Die Allokation von Ressourcen soll daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit am Beispiel der *Drosophila* Larven untersucht werden.

#### 2.4.1. Metabolische Charakterisierung der larvalen Entwicklung auf dem *Holidic Diet*

Für die *in silico* Untersuchungen war es notwendig die Ressourcen aus der Umwelt zu kennen, die von den Larven aufgenommen werden können. Daher wurde das *Holidic Diet* (HD), ein chemisch vollständig definiertes Minimalmedium für *Drosophila*<sup>[161]</sup>, ausgewählt (siehe Methoden Abschnitt 4.2.3), um die Entwicklung, sowie die metabolischen Parameter der Larven auf diesem Futter zu untersuchen. Als Vergleich wurde die Entwicklung der Larven auch auf komplexen Hefe basierten Medien, dem Standardfutter (SD) und dem Zucker-reduzierten Futter (LSD), untersucht. Hefe ist ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung und dem Wachstum der Fliegen und wirkt sich auf viele Bereiche, wie beispielsweise der Fertilität oder dem Erreichen des Puppenstadiums, positiv aus<sup>[85,207]</sup>. Die DGRP Linien zeigten in den vorigen Versuchen eine hohe phänotypische Plastizität in der Entwicklungszeit und den gemessenen metabolischen Parametern (siehe Abschnitt 2.1). Um die Kontribution der einzelnen DGRP Linien zu minimieren und eine Mittlung der Population zu generieren, wurden die Linien vor dem Versuch gemischt und auf den verschiedenen Futtersorten für 6 h zur Eiablage verteilt (siehe Methoden Abschnitt 4.11). Die Larven wurden im Abstand von 24 h gesammelt, bis es zur Verpuppung kam. Die Gewichte wurden direkt ermittelt und die metabolischen Profile im Anschluss bestimmt (siehe Methoden Abschnitt 4.5 und 4.12).

Alle Versuche zur Etablierung dieses Verfahrens wurden von Christine Illenseer durchgeführt (Bachelorarbeit 2016, Heinrich-Heine-Universität)<sup>[102]</sup>.



**Abbildung 2.12.:** Metabolische Charakterisierung von Larven des DGRP-Mix auf HD, SD und LSD. (A) Entwicklungszeit des DGRP-Mix auf HD im Vergleich zu SD und LSD (L3 = wandernde L3 Larven, P = Puppen). (B) Gewichtsmessungen der Larven auf den unterschiedlichen Futtersorten. (C) Triglycerid- und (D) Glykogenmessungen der Larven. Aufgetragen sind bei allen Messungen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Triplikate. Alle Messungen sind auf die Anzahl der Tiere pro Probe normiert (L1: 50 Larven; L2: 25 Larven; L3: 8 Larven). Die Tiere wurden nicht mehr gesammelt, sobald die ersten Puppen vorhanden waren (SD und LSD nach 120 h; HD nach 192 h). Abbildungen B, C und D entnommen und modifiziert aus<sup>[102]</sup>.

Die vollständige Entwicklung der Fliegen auf dem HD ist im Vergleich zum LSD und SD nur um einen Tag verzögert. Das Puppenstadium wurde auf dem HD erst nach acht Tagen erreicht und verzögerte sich somit um drei Tage (siehe Abbildung 2.12 A). Eine Verzögerung der Entwicklungszeit auf dem HD (erste Puppen ab 9-10 Tagen) wurde auch in der Publikation von M. Piper *et al.* gezeigt<sup>[161]</sup>. Da das HD ein Minimalmedium ist, ist eine Verlängerung des larvalen Stadiums vermutlich nötig, um die erforderlichen Ressourcen für die Metamorphose aufzubauen. Daten, die diese Hypothese unterstützen, konnten in den Gewichtsmessungen und den metabolischen Tests gesammelt werden. Die Larven benötigten acht Tage auf dem HD um ein vergleichbares Gewicht zu erreichen (siehe Abbildung 2.12 B). Ein Unterschied zeigte sich in den Speichermetaboliten. Die Larven zeigten nach acht Tagen einen erhöhten Gehalt an Triglyceriden im Vergleich zu Larven, die sich auf LSD oder SD entwickelt haben (siehe Abbildung 2.12 C). Die Glykogenmengen sind in den Larven vom HD jedoch nach acht Tagen immer noch stark reduziert und erreichen die Glykogenmengen der Larven vom LSD und SD nicht (siehe Abbildung 2.12 D). Neben dem stereotypen Entwicklungsprozess von *Drosophila melanogaster* kann es gleichzeitig zu

Fluktuationen in der Entwicklungszeit oder im Aufbau von energiereichen Speichermetaboliten in Abhängigkeit von den externen Bedingungen (Temperatur, Futterqualität und -quantität) kommen. Diese Plastizität zeigte sich auch bei der Entwicklung der Tiere auf dem HD im Gegensatz zur Entwicklung auf dem SD oder LSD. Trotz der verzögerten Entwicklungszeit und des veränderten metabolischen Profils sind die Tiere vital und zeigten eine stabile Lebenserwartung wie in der Publikation von M. Piper *et al.*<sup>[161]</sup> gezeigt werden konnte. Das HD bietet sich somit für weitere *in vivo* und *in silico* Untersuchungen an.

## 2.5. Entwicklung eines metabolischen Modells für *Drosophila melanogaster*

### 2.5.1. Rekonstruktion des metabolischen Modells - *FlySilico* 1.0

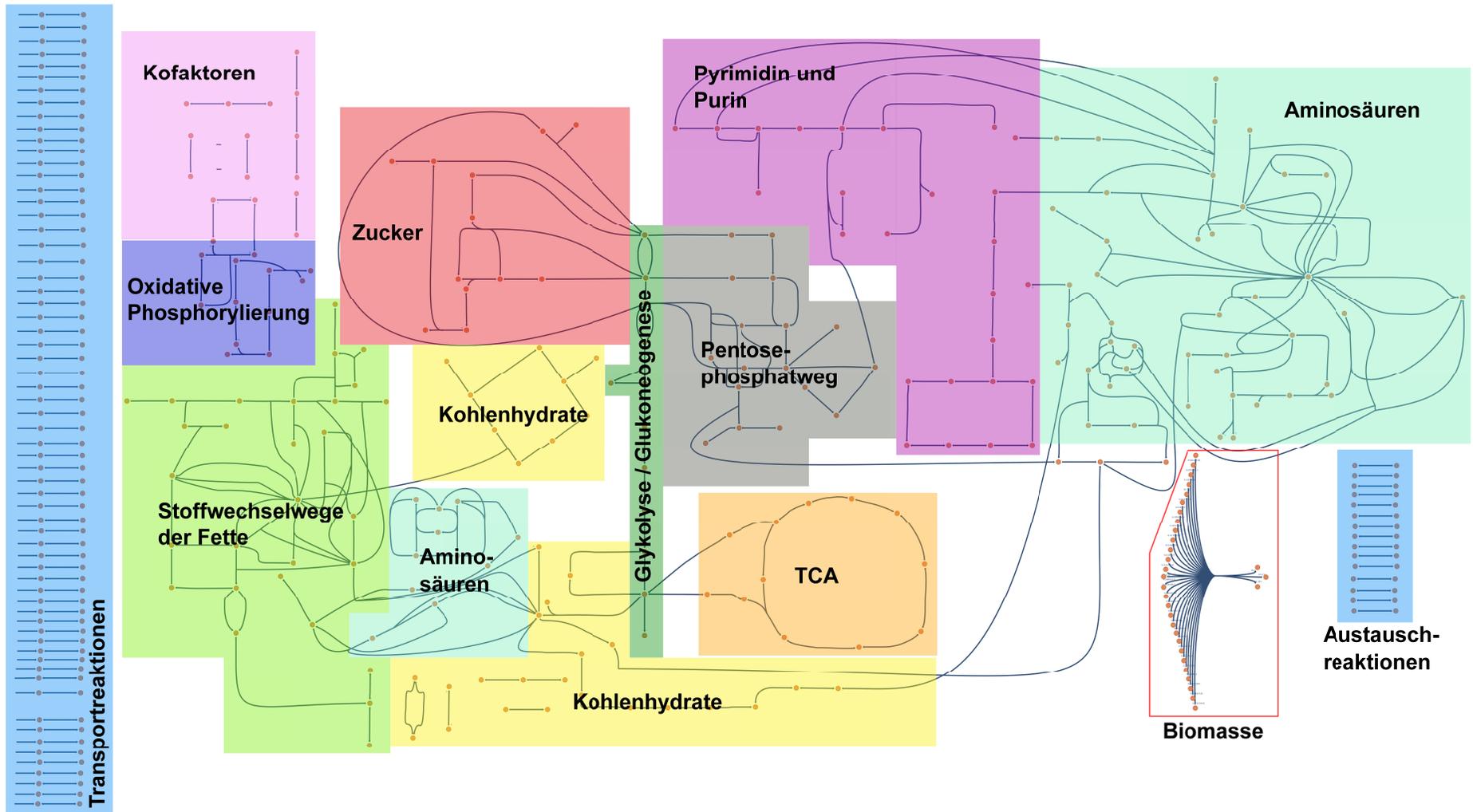
Um das Wachstum und die Allokation von Ressourcen in *Drosophila melanogaster* näher zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit J. Schönborn<sup>[182]</sup> ein metabolisches Netzwerk rekonstruiert. Als Grundlage für die Modellrekonstruktion wurde das Protokoll von Thiele und Palsson verwendet<sup>[202]</sup>. Der erste Schritt der Rekonstruktion basierte auf der Erstellung eines Modellentwurfs mit den Reaktionen und biochemischen Informationen des Organismus. Neben den Reaktionswegen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels (Glykolyse, Glukoneogenese, Citratzyklus, usw.) wurden weiterhin Reaktionsmodule zur Verstoffwechslung der Bestandteile des HDs eingebunden und Reaktionswege von Metaboliten, welche durch die biochemischen Analysen (siehe Methoden Abschnitt 4.5) ermittelt werden können. Dadurch ist es möglich im Nachhinein die Simulationen mit den experimentellen Ergebnissen abzugleichen und eine Modellvalidierung zu ermöglichen (siehe Abschnitt 2.7). Alle Reaktionswege sind in Tabelle 2.8 aufgeführt und in Abbildung 2.13 dargestellt. Die benötigten Informationen zum Erstellen der Reaktionen - wie beispielsweise Reversibilität oder Metabolite und ihre Ladungen - wurden aus unterschiedlichen Datenquellen gewonnen (siehe Anhang Tabelle B.1). Im zweiten Schritt der Rekonstruktion wurde das Modell durch organismusspezifische Informationen manuell verfeinert und fehlende oder unvollständige Reaktionen bearbeitet. Während dieses Prozesses wurde den Reaktionen außerdem ein sogenannter *Confidence Score* (Vertrauenswert) zugeordnet. Dieser Wert gibt einen Überblick über die Menge an Informationen, die zu einer Reaktion spezifisch zu dem gewählten Organismus vorhanden sind. Er kann Werte zwischen 0 (nicht evaluiert) und 4 (hoher Informationsgehalt in Form von biochemischen Daten) annehmen<sup>[202]</sup>.

**Tabelle 2.8.:** Metabolische Module des *FlySilico* 1.0 Netzwerks. Tabelle entnommen aus der Masterarbeit von J. Schönborn<sup>[182]</sup>.

Metabolisches Modul	Anzahl an Reaktionen
Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus	15
Arginin und Prolin Metabolismus	5
Arginin Biosynthese	13
Citratzyklus	9
Cystein und Methionin Metabolismus	3
Fettsäure Biosynthese	2

Metabolisches Modul	Anzahl an Reaktionen
Folat Biosynthese	3
Glycerolipid Metabolismus	17
Glycerophospholipid Metabolismus	8
Glycin, Serin und Threonin Metabolismus	5
Glykolyse/Glukoneogenese	13
Glyoxylat- und Dicarboxylatzyklus	5
Hormonsynthese der Insekten	1
Nikotinsäure und Nikotinamid Metabolismus	2
Stickstoff Metabolismus	1
Oxidative Phosphorylierung	7
Pentosephosphatweg	20
Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese	5
Propionat Metabolismus	8
Purin Metabolismus	11
Pyrimidin Metabolismus	12
Pyruvat Metabolismus	14
Riboflavin Metabolismus	2
Zucker Metabolismus	12
Steroid Biosynthese	1
Synthese und Degradation von Ketonkörpern	3
Transformation von Metaboliten	1
Tyrosin Metabolismus	4
Valin, Leucin und Isoleucin Metabolismus	1
Austauschreaktionen	64
Transportreaktionen (extrazellulär → Cytosol)	64
Transportreaktionen (Cytosol → Mitochondrien)	24

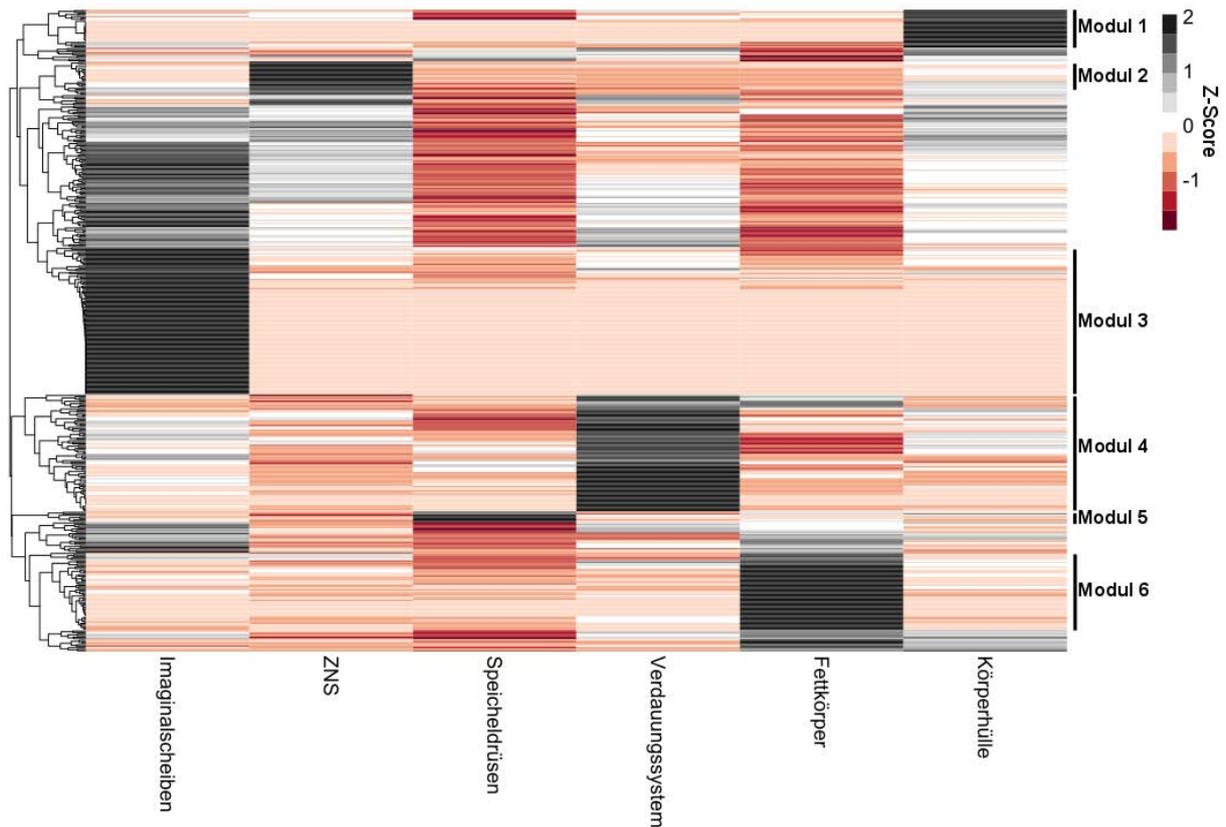
Die Rekonstruktion des metabolischen Netzwerks wurde in einer Excel Kalkulationstabelle (MS Office) durchgeführt. In Tabelle B.2 ist eine Übersicht über die enthaltenen Informationen zu den Reaktionen und Metaboliten des metabolischen Netzwerks gegeben. Die erste Version des *FlySilico* Modells (1.0) enthält 363 Reaktionen und 293 Metabolite und ist in Bezug auf die Informationen zu diesen biochemischen Reaktionen und deren beteiligten Metabolite vollständig manuell kuratiert (siehe Anhang Tabelle B.3 auf der beigefügten CD). Es wurde in drei Kompartimente (extrazellulärer (e), zellulärer (c) und mitochondrialer (m) Bereich) unterteilt. Bei der Rekonstruktion wurde darauf geachtet, dass die Reaktionen ausführbar sind und nur eine minimale Anzahl an *Dead-end* oder blockierten Reaktionen vorhanden sind. Das Modell enthält insgesamt 64 Austauschreaktionen, sieben *Dead-end* Reaktionen, elf blockierte Reaktionen und zwei unbalancierte Reaktionen. Nach dem Rekonstruktionsprozess müssen die gesammelten Daten der Excel Kalkulationstabelle in ein für COBRApy kompatibles Format übertragen werden, um die stöchiometrische Matrix zu erstellen. Dies wurde mithilfe eines angepassten Skriptes basierend auf dem *read\_excel.py* von A. Ebrahim *et al.*<sup>[63]</sup> von J. Schönborn durchgeführt<sup>[182]</sup>.



**Abbildung 2.13.:** Repräsentation des metabolischen Netzwerks *FlySilico* 1.0. Die orangen Knotenpunkte stellen die Metabolite dar, die blauen Kanten repräsentieren die Reaktionen. Die Stoffwechselwege sind in der grafischen Darstellung in verschiedene Module (farblich gekennzeichnet) unterteilt. Abbildung entnommen und modifiziert aus<sup>[182]</sup>.

### 2.5.2. Initiale Studien zur Identifikation gewebespezifischer Genexpressionsprofile

Die Rekonstruktion des metabolischen Netzwerkes von *Drosophila melanogaster* enthält detaillierte Informationen über diverse Reaktionswege innerhalb von drei Kompartimenten (extrazelluläre Matrix, Cytosol und Mitochondrien), ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt gewebeunspezifisch und somit nicht fähig die Funktionen unterschiedlicher Gewebe und deren Interaktionen untereinander abzubilden. Dies wäre jedoch wünschenswert, da jedes Gewebe aufgrund seiner Zellstruktur unterschiedliche Funktionen ausführt und demnach in unterschiedlichen krankheitsrelevanten Prozessen eine Rolle spielt<sup>[54,215]</sup>. Es kann hierbei angenommen werden, dass die Gewebearten je nach ihrer Hauptfunktion unterschiedliche metabolische Präferenzen aufweisen und die Ressourcenverteilung sich demnach ebenfalls unterscheidet. Beispielsweise sind die Nervenzellen des Gehirns auf Zucker zur Energieproduktion angewiesen, wohingegen die meisten Gewebe auch andere Reaktionswege, wie zum Beispiel die  $\beta$ -Oxidation, zur Energiefreisetzung nutzen können. Es stellte sich hierbei die Frage, ob es möglich ist mit Genexpressionsdaten die Unterschiede zwischen den Geweben abzubilden. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Genexpressionsdaten unterschiedlicher Gewebe der *Drosophila* Larven aus öffentlichen Ressourcen genutzt, um gewebespezifische Expressionsmuster zu identifizieren. Da die EC (engl. *enzyme commission*) Nummern der Reaktionen des Modells bekannt waren, konnten die zugehörigen Gene von *Drosophila melanogaster* aus einer Datei mit den Gennamen, EC Nummern und *Gene Ontology* (GO) Informationen (erhalten von Josh Goodman, Flybase Projektmanager, Indiana Universität Bloomington) extrahiert werden. Zu den identifizierten Genen konnten die entsprechenden Expressionsdaten (basierend auf RNA-Seq Daten vom modENCODE Projekt) aus der web-basierten Datenbank DGET (*Drosophila Gene Expression Tool*)<sup>[98]</sup> exportiert werden (siehe Methoden Abschnitt 4.17). Dabei lag das Hauptaugenmerk auf Geweben, wie dem zentralen Nervensystem, dem Verdauungssystem und dem Fettkörper, des larvalen Organismus. Diese Gewebe decken physiologisch unterschiedlichen Funktionen ab, wie beispielsweise dem Aufbau von Speichermetaboliten (Fettkörper) oder dem Austausch von chemischen Substanzen mit der Umwelt (Verdauungssystem). Dadurch sollte sichergestellt sein, dass sich die Genexpressionsprofile voneinander unterscheiden. Von anfänglichen 466 Genen, die mit den 146 EC Nummern aus dem *FlySilico* Modell assoziiert waren, konnten am Ende die Expressionswerte von 422 Genen extrahiert werden. Die Expressionsdaten aller Gene wurden in einer Heatmap dargestellt und durch hierarchische Clusteranalyse gruppiert (siehe Abbildung 2.14). Es konnten dadurch Gene mit ähnlichen Expressionsmustern identifiziert werden, die gewebespezifische Funktionen ausführen. Auffällig waren dabei Genmodule mit besonders hohen Expressionswerten, die eindeutig einzelnen Geweben zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 2.14). Es stellt sich hierbei die Frage, welche Gene befinden sich in diesen Modulen und mit welchen Reaktionswege sind sie assoziiert? In Tabelle B.4 sind alle Gene der Module und deren zugehörigen Reaktionswege aufgeführt.

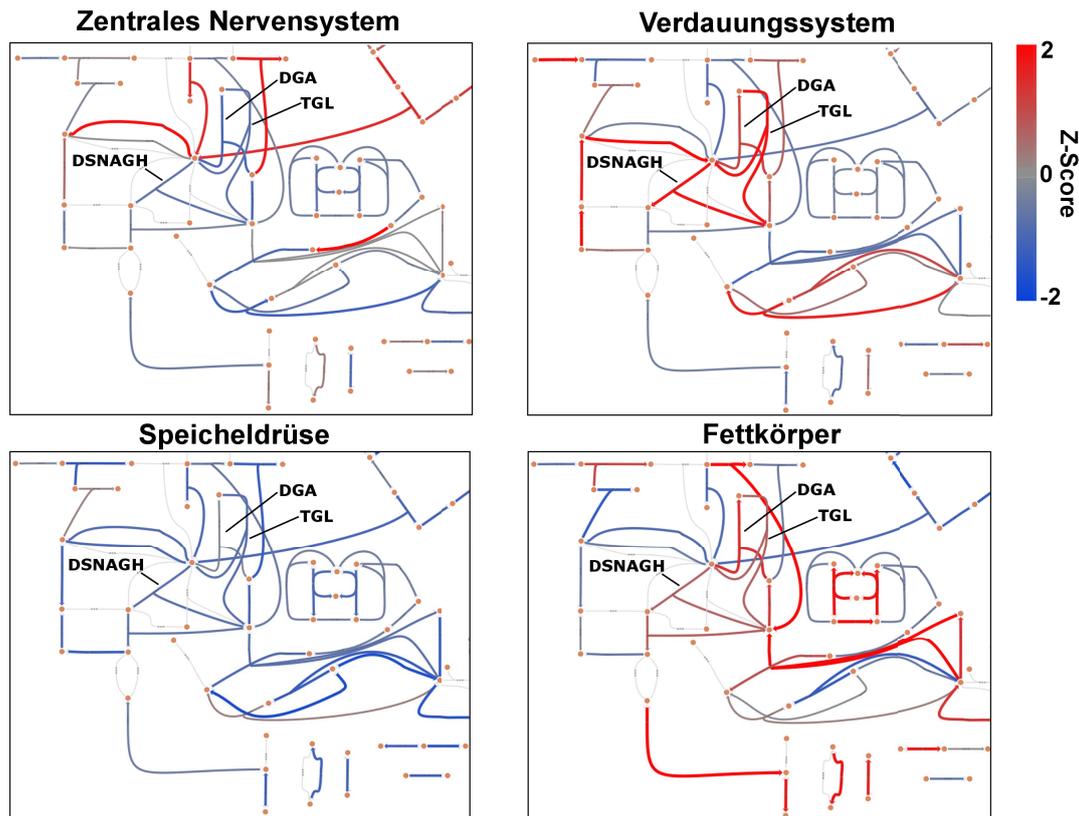


**Abbildung 2.14.:** Heatmap von Expressionsdaten von Genen in larvalen Geweben. Jede Zeile repräsentiert ein Gen (insgesamt 422 Gene) und jede Spalte ein larvales Gewebe. Dargestellt sind die Expressionsdaten der Imaginalscheiben, des zentralen Nervensystems (ZNS), der Speicheldrüsen, des Verdauungssystems, der Fettkörper und der Körperhülle. Alle Expressionsdaten sind durch zeilenweise z-Transformation normalisiert (Farbskala) und mittels hierarchischem Clustering gruppiert.

So konnten beispielsweise im Fettkörper und im Verdauungssystem erhöhte Expressionswerte vor allem in Reaktionswegen des Fettstoffwechsels, wie dem Glycerolipid-/ Glycerophospholipid-metabolismus und der Biosynthese von Fettsäuren, identifiziert werden (siehe Abbildung 2.14 Modul 4 und 6). Außerdem weisen die Fettkörper auch erhöhte Expressionswerte von Genen in Stoffwechselwegen der Kohlenhydrate und Aminosäuren auf. Diese Expressionswerte könnten erklärt werden, da überschüssige Kohlenhydrate als langfristige Energiespeicher in Fette umgewandelt und einige Aminosäuren aus Metaboliten der Glykolyse, wie beispielsweise Alanin oder Leucin aus Pyruvat, synthetisiert werden<sup>[178]</sup>. In den Imaginalscheiben weisen die Gene, die an Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung und dem Stoffwechsel von Kohlenhydraten beteiligt sind, erhöhte Expressionswerte im Gegensatz zu den anderen Geweben auf (siehe Abbildung 2.14 Modul 3). Eine mögliche Erklärung könnte hierfür die hohe Proliferationsrate der Imaginalscheiben sein<sup>[5]</sup>, für die zusätzliche Energie benötigt wird. Diese zelluläre Energie wird unter anderem aus der oxidativen Phosphorylierung oder dem Abbau von Zuckern gewonnen. In der Körperhülle, im zentralen Nervensystem und in den Speicheldrüsen waren die Module mit erhöhten Genexpressionen im Vergleich zu den Modulen der anderen Geweben weitaus kleiner (Körperhülle: 25 Gene, Speicheldrüsen: 8 Gene, ZNS: 18 Gene *vs.* Fettkörper: 60 Genen;

siehe Abbildung 2.14 Modul 1, 2 und 5). Die Gene dieser Module waren mit verschiedenen Reaktionswegen des Kohlendhydrat- und Fettstoffwechsels oder von Ko-Faktoren assoziiert, die keine eindeutige Präferenz für einen bestimmten Reaktionsweg andeuteten. Dennoch können mithilfe der Genexpressionsdaten distinkte Genmodule identifiziert werden, die spezifisch für eines der Gewebe sind.

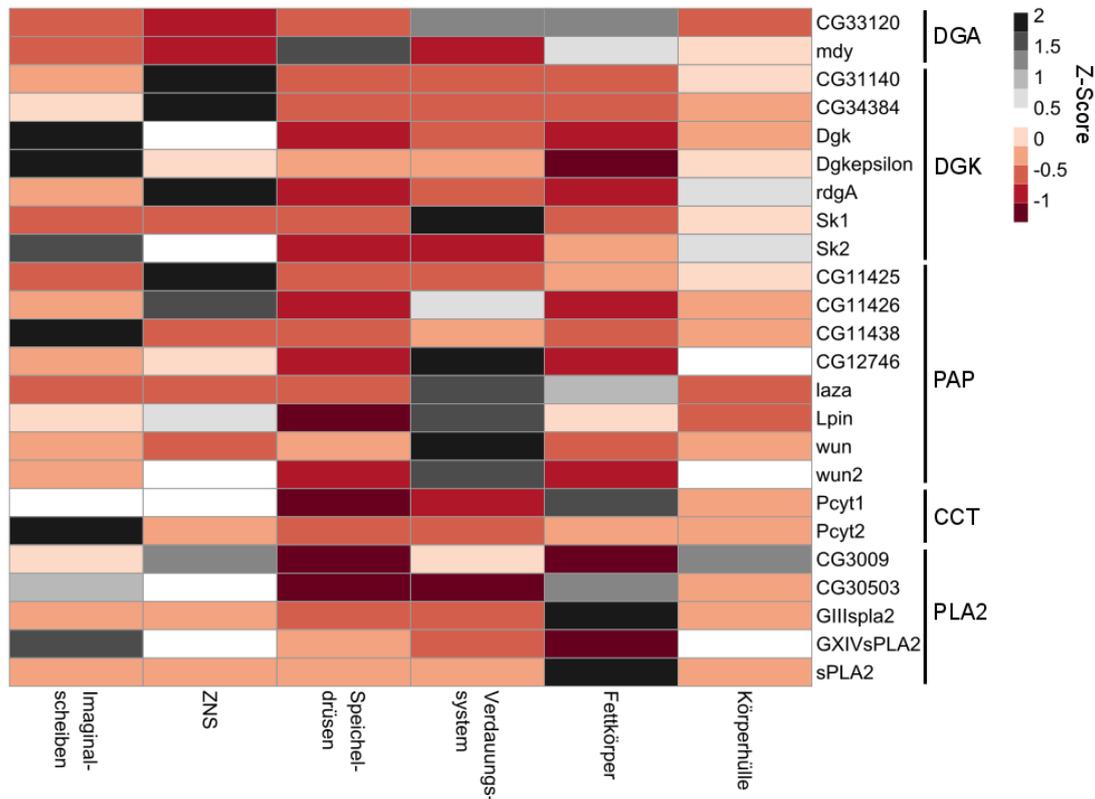
Als eine alternative Visualisierung wurden die Genexpressionsdaten auf das metabolische Modell übertragen. Hierbei wurden zunächst die mittleren Expressionswerte der Gene, die an der Reaktion beteiligt sind, ermittelt und anschließend auf die entsprechende Reaktion abgebildet (siehe Methoden Abschnitt 4.17). Da das *FlySilico* 1.0 Modell zur Zeit noch keine Gen-Protein-Reaktions-Regeln (engl. *gene-protein-reaction rules*, GPR) enthält, wurde zunächst diese vereinfachte Darstellungsweise angewandt. Die GPRs beschrieben die Zusammenhänge zwischen Genen, Proteinen und den Reaktionswegen. Die mathematische Darstellung erfolgt durch boolesche Operatoren (*AND* oder *OR*)<sup>[38]</sup> und bestimmt, ob Gene einen Reaktionsweg nur in Verbindung aktivieren oder sich gegenseitig inhibieren und somit einander ausschließen. In Abbildung 2.15 sind Ausschnitte aus dem *FlySilico* 1.0 Netzwerk (siehe Abbildung 2.13) dargestellt, die den Glycerolipid- und Glycerophospholipidmetabolismus, die Biosynthese von Fettsäuren und Teile aus Reaktionswegen der Aminosäuren abbilden.



**Abbildung 2.15.:** Visualisierung der Expressionsdaten von Genen in larvalen Geweben auf das *FlySilico* 1.0 Modell. Die mittleren Expressionsdaten der unterschiedlichen Geweben wurden durch z-Transformation normalisiert und anschließend auf das metabolische Modell übertragen. Die Abbildungen zeigen die Visualisierung der normalisierten Expressionsdaten des zentralen Nervensystems, des Verdauungssystems, der Speicheldrüse und der Fettkörper. Reaktionswege mit fehlenden Informationen über die assoziierten Gene sind in hellgrau dargestellt.

Die Expressionsprofile im zentralen Nervensystem und in der Speicheldrüse unterscheiden sich von denen des Verdauungssystems und des Fettkörpers deutlich. So zeigen die Speicheldrüsen und das zentrale Nervensystem niedrige bis moderate Expressionsprofile im Glycerolipid-, Glycerophospholipidmetabolismus und in der Biosynthese der Fettsäuren. Höhere Genexpressionen sind im Verdauungssystem und in den Fettkörpern an vielen Reaktionen erkennbar. In den Fettkörpern beispielsweise wurden hohe Expressionswerte auf dem Reaktionsweg zum Aufbau von Triglyceriden identifiziert (Reaktionsabkürzung im Modell: *DGA*). Diese Reaktion wird durch das Gen *midway* (*mdy*) katalysiert, welches die Umwandlung von Diglyceriden in Triglyceride bewirkt. Die Abwesenheit des Gens führt unter anderem zu reduzierten Lipidspeichern<sup>[36]</sup>. Im Verdauungssystem sind die Expressionsdaten entgegengesetzter Reaktionswege (Reaktionsabkürzung im Modell: *DSNGAH* und *TGL*) erhöht. In diesen Reaktionen wird der Abbau von Triglyceriden zu Di- und Monoglyceride katalysiert. Das Gen *brummer* (*bmm*) codiert für die Lipidtröpfchen-assoziierte TAG Lipase Brummer und bewirkt den Abbau der Triglyceride<sup>[88]</sup>. Dennoch muss bei dieser Visualisierungsform beachtet werden, dass zur Zeit nur die mittleren Expressionsdaten der Gene auf die Reaktionen abgebildet sind. Die Gene der enzymatische Reak-

tionsschritte sind in der Regel jedoch differentiell exprimiert, wie in Abbildung 2.16 dargestellt wurde.



**Abbildung 2.16.:** Visualisierung der Expressionsdaten von Genen gleicher enzymatischer Reaktionsschritte. Jede Zeile repräsentiert ein Gen (insgesamt 24 Gene) und jede Spalte ein larvales Gewebe. Dargestellt sind die Expressionsdaten der Imaginalscheiben, des zentralen Nervensystems (ZNS), der Speicheldrüsen, des Verdauungssystems, der Fettkörper und der Körperhülle von Genen aus Reaktionswegen des Glycerolipid- und Glycerophospholipidmetabolismus. Alle Expressionsdaten sind durch zeilenweise z-Transformation normalisiert (Farbskala). Abkürzungen: DGA = 1,2-Diacylglycerol-Acyltransferase; DGK = Diacylglycerol Kinase; PAP = Phosphatidat-Phosphatase; CCT = Cholinphosphat-Cytidylyltransferase; PLA2 = Phospholipase A2.

Diese initialen Studien zeigen jedoch, dass gewebespezifische Expressionsprofile mithilfe von unterschiedlichen Darstellungsformen identifiziert werden konnten, was zu einer klaren Unterscheidung der Gewebe führt.

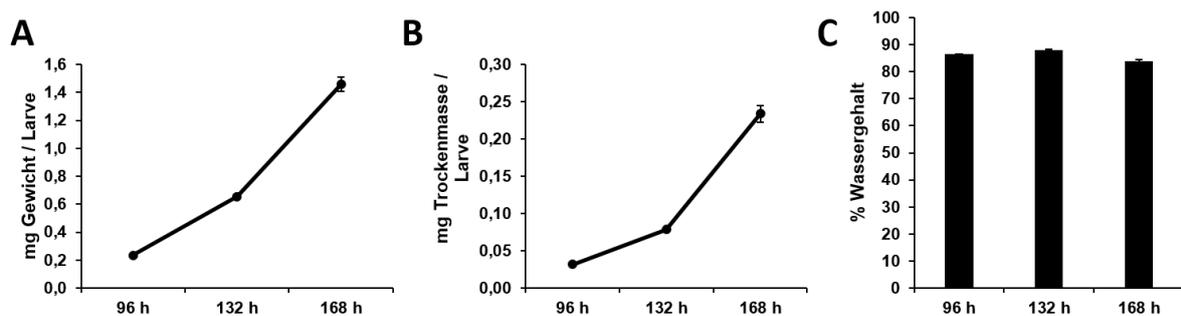
## 2.6. Etablierung des metabolischen Modells mithilfe experimenteller Daten

Das Ziel dieser Arbeit war die Allokation von Ressourcen in *Drosophila melanogaster* zu untersuchen. Um das Modell und somit die Ressourcenallokation möglichst präzise an den larvalen Organismus anzupassen, wurden zu diesem Zweck die Modellparameter durch das Einbinden von experimentellen Daten etabliert. Dafür wurden wildtypische Fliegen auf das HD zur Eiablage

transferiert (siehe Methoden Abschnitt 4.4.2). Die vollständige larvale Entwicklung bis zum Erreichen des Puppenstadiums beträgt auf dem HD rund 190 h (siehe Abschnitt 2.4.1). Um das Wachstum und die metabolischen Parameter der Larven über die Zeit zu bestimmen, wurden an drei verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung (96 h, 132 h und 168 h nach Eiablage) Larven gesammelt. Von den Larven wurden die Wachstumsparameter Größe und Gewicht, sowie verschiedene metabolische Parameter aufgenommen.

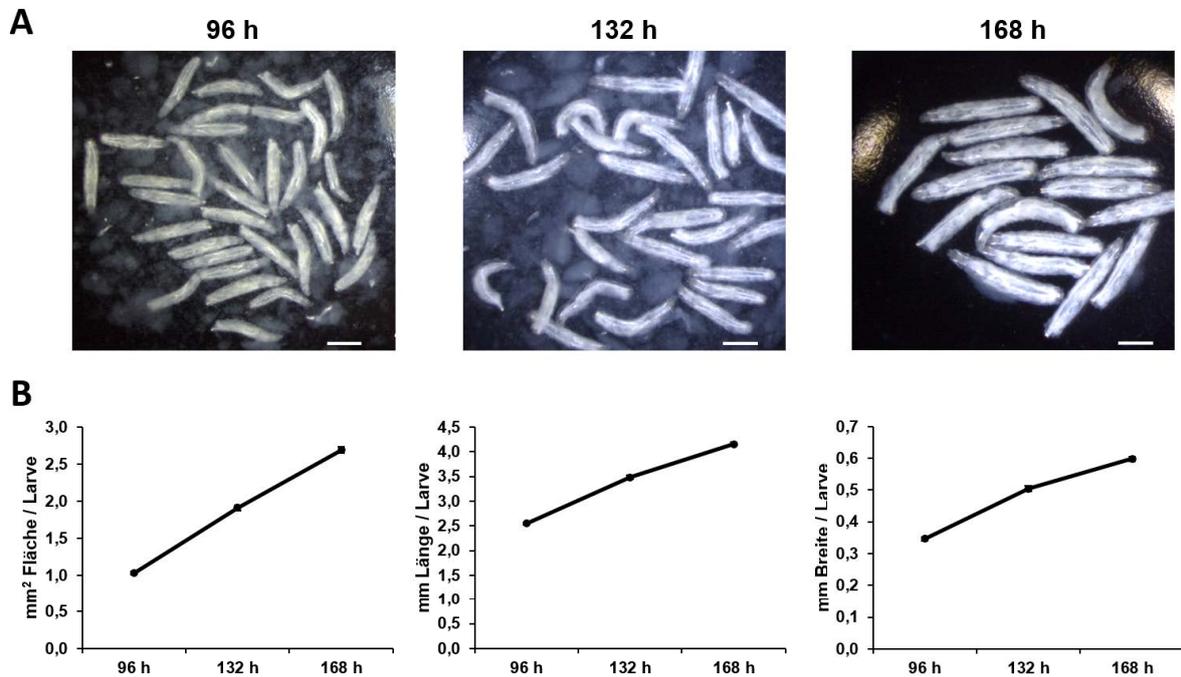
### 2.6.1. Wachstumsparameter wildtypischer Larven auf *Holidic Diet*

Das Wachstum der Larven wurde mithilfe von Größen- und Gewichtsmessungen verfolgt. Das Gewicht und die Trockenmasse der Larven nehmen über die Zeit annähernd linear zu (siehe Abbildung 2.17 A und B). Auf dem HD kommt es im Zeitraum von 96 h zu 168 h zu einer Gewichtszunahme um das Sechsfache. Der Wasseranteil in den Larven bleibt über den Entwicklungszeitraum mit 84 % bis 88 % weitestgehend konstant (siehe Abbildung 2.17 C). Durch die Messung des Trockengewichts konnte die experimentelle Wachstumsrate bestimmt werden (siehe Methoden Abschnitt 4.19). Sie betrug  $\mu_{Exp.} = 0,0882 \frac{1}{h}$ .



**Abbildung 2.17.:** Gewichtsmessungen von Larven an drei unterschiedliche Zeitpunkten (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage) auf HD. Gezeigt sind die Messungen des Gesamtgewichts (A), der Trockenmasse (B) und die Bestimmung des Wassergehalts in % (C) der Larven. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Quadruplikate von drei biologisch unabhängigen Experimenten. Die Messungen wurden auf die Anzahl der Larven pro Probe normiert (96 h: 100 Larven, 132 h und 168 h: 40 Larven).

Neben den Gewichtsmessungen wurden auch die Größenparameter Länge, Breite und Fläche der Larven aufgenommen. Auch in diesen drei Eigenschaften war das Wachstum über den Zeitraum von 72 h zu beobachten (siehe Abbildung 2.18).



**Abbildung 2.18.:** Größenmessungen von Larven zu drei unterschiedliche Zeitpunkten (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage) auf HD. (A) Mikroskopische Aufnahmen der Larven zur Visualisierung des Größenwachstums. (B) Gemessen wurde die Fläche, die Länge und die Breite der Tiere. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von drei biologisch unabhängigen Experimenten. Die Messungen wurden auf die Anzahl der Larven pro Zeitpunkt normiert (bei allen Zeitpunkten 20 bis 30 Larven).

Für die Berechnung der Wachstumsrate war es notwendig, die Aufnahmeraten der einzelnen HD Bestandteile einer Larve über die Zeit zu kennen. Für diesen Schritt mussten zwei Fragen beantwortet werden: (i) Welche Nährstoffe stehen den Larven zur Verfügung und (ii) wie viel kann von dem larvalen Organismus aufgenommen werden? Durch das HD war klar definiert, welche Bestandteile die Larven aufnehmen können. Da diese Studie mit Larven durchgeführt wurde, war es jedoch schwer die Futtermenge zu bestimmen, die von ihnen tatsächlich aufgenommen wird. Dies lag daran, dass die meisten, bekannten Methoden zur Bestimmung der aufgenommenen Futtermengen nur für Fliegen getestet wurden und nicht eins zu eins auf die Larven adaptiert werden können. Aus diesem Grund wurde die zweite Frage mit einem theoretischen Ansatz beantwortet. Dafür wurde berechnet, wie viel Kapazität der Mundraum der Larve hat und wie oft die Larve Futter in einer Stunde aufnimmt. Zur Berechnung des maximalen Mundvolumens der Larven wurden die mittlere Breite der Larven von Zeitpunkt 96 h bis 168 h (siehe Abbildung 2.18 B, rechts) verwendet. Der Mundraum der Larven wurde als annähernd zylindrisch betrachtet und der Radius zur Berechnung aus der mittleren Breite ermittelt (siehe Methoden Abschnitt 4.18.2). Außerdem wurde der Futterkontakt pro Minute einer Publikation von M. Fellowes *et al.*

entnommen: er beträgt bei Larven im Alter von 42 h bis 72 h ca. 110 *Kontakte/min*<sup>[72]</sup>.

Allerdings führte die Annahme, dass der Mundraum der Larven mit jedem Futterkontakt vollständig gefüllt wird, zu einer Überschätzung der berechneten Aufnahmeraten. Des Weiteren ist nicht klar, mit welcher Rate die einzelnen Futterbestandteile durch die Darmbarriere in den Organismus transportiert werden können. Daher wurde ein Korrekturfaktor zur Limitierung der Aufnahmeraten eingeführt, um physiologisch sinnvolle Nahrungsaufnahmen zu simulieren. Die Berechnung des Korrekturfaktors erfolgt durch J. Schönborn und wurde in einem iterativen Prozess aus Simulation der Wachstumsrate im Vergleich zu der errechneten experimentellen Wachstumsrate ( $\mu_{Exp.} = 0,0882 \frac{1}{h}$ ) bestimmt (siehe Methoden Abschnitt 4.18.2)<sup>[182]</sup>. Durch den Korrekturfaktor  $\chi = 0,122$  konnte eine *in silico* Wachstumsrate von  $\mu_{Sim.} = 0,088 \frac{1}{h}$  simuliert werden.

## 2.6.2. Metabolische Messungen zur Formulierung einer biologischen Zielfunktion

Zur Untersuchung der Ressourcenallokation lag der Fokus dieser Studie auf dem Wachstum der *Drosophila* Larven, welches sie im Laufe der Entwicklung als klares Ziel verfolgen, um die Verpuppung zu erreichen. Zur Vorhersage des Wachstums war es essentiell eine biologische Zielfunktion zur Produktion der Biomasse (= Biomasse-Zielfunktion) zu definieren, da die Wachstumsrate die Zunahme an Biomasse pro Zeiteinheit beschreibt<sup>[155]</sup>. Die Biomasse setzt sich dabei aus verschiedenen Komponenten zusammen, wobei Kohlenhydrate, Fette und Proteine den Großteil ausmachen. Die Komponenten der Zielfunktion für *Drosophila* wurden auf Grundlage der Biomasse-Zielfunktion des metabolischen Netzwerks iMM904 der Hefe<sup>[138]</sup> identifiziert und mithilfe von metabolischen Messungen, in Form von absoluten Quantifizierungen und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), bestimmt (siehe Methoden Abschnitt 4.5 und 4.14).

### **Bestimmung freier Metabolite durch GC-MS**

Durch die GC-MS Messungen konnten 33 Metabolite, wie beispielsweise proteinogene Aminosäuren und Metabolite des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels, quantifiziert werden. Die GC-MS Messungen wurden von Tabea Mettler-Altmann (Institut für Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) durchgeführt. Eine Liste mit den analysierten Metaboliten und deren Anwesenheit im *FlySilico* 1.0 Modell ist in Tabelle 2.9 dargestellt.

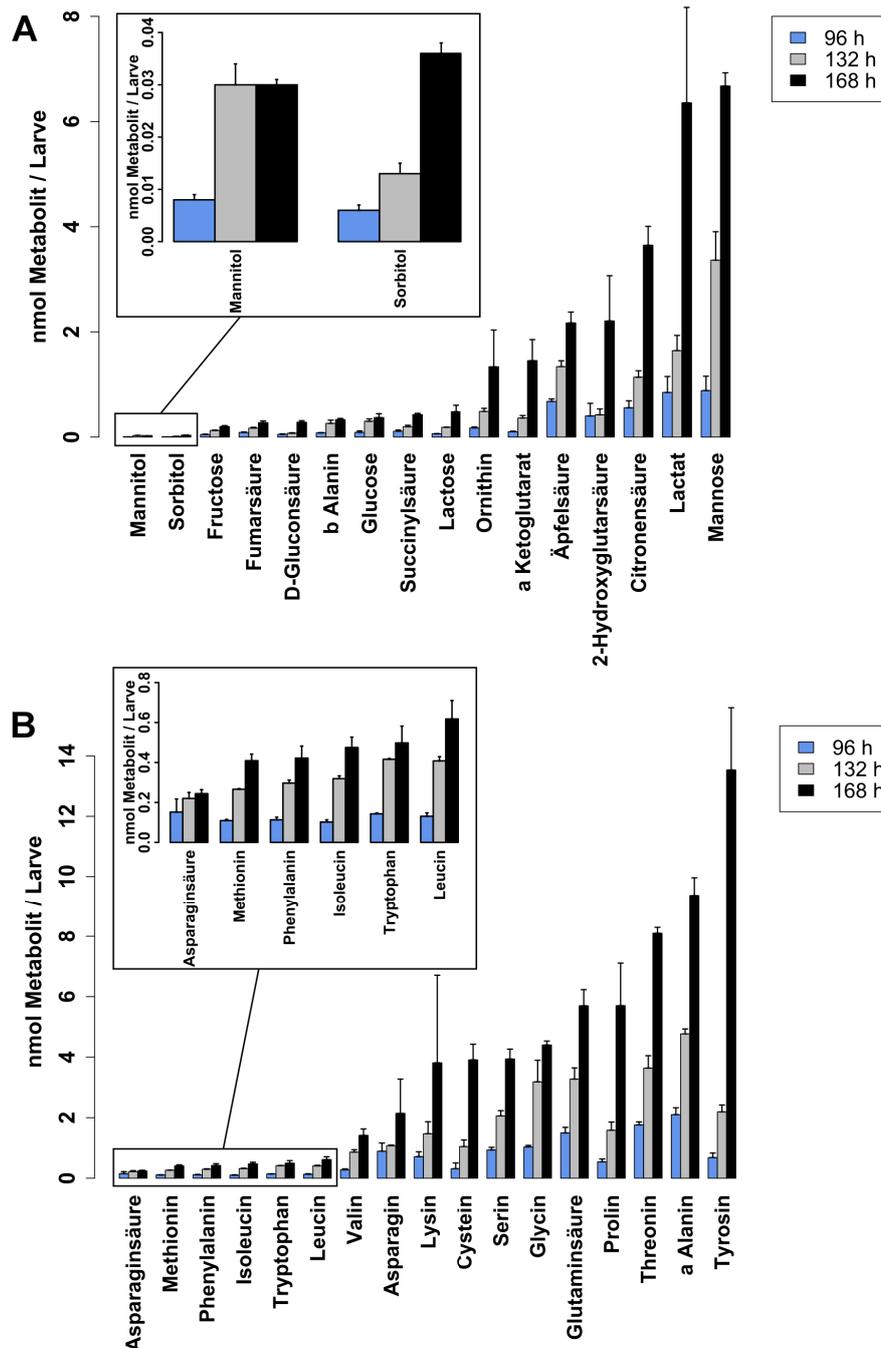
**Tabelle 2.9.:** Metabolite der GC-MS Messung und Informationen über die Anwesenheit und Lokalisation im *FlySilico* 1.0 Modell.

Metabolit	Abk. im Modell	metabolisches Modul
Lactat	lac-L	Pyruvat Metabolismus
Succinylsäure	asuccin	Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus
Fumarsäure	fum	Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus, Arginin Biosynthese, Tyrosin Metabolismus, Citratzyklus
$\beta$ -Alanin	nicht im Modell	-

Metabolit	Abk. im Modell	metabolisches Modul
Äpfelsäure	nicht im Modell	-
2-Hydroxyglutarsäure	nicht im Modell	-
$\alpha$ -Ketoglutarsäure	akg	Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus, Arginin und Prolin Metabolismus, Arginin Biosynthese, Citratzyklus, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese
Ornithin	L-orn	Arginin und Prolin Metabolismus, Arginin Biosynthese,
Citronensäure	cit	Citratzyklus
Fructose	fru	Zucker Metabolismus
Mannose	nicht im Modell	-
Glucose	glc-D	Glykolyse/Glukoneogenese, Zucker Metabolismus, Pentosephosphatweg
Mannitol	nicht im Modell	-
Sorbitol	nicht im Modell	-
D-Gluconsäure	glc	Pentosephosphatweg
Lactose	nicht im Modell	-
$\alpha$ -Alanin	ala	Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus, Arginin Biosynthese, Glycin, Serin und Threonin Metabolismus
Valin	val	nur in Transport- und Austauschreaktionen
Leucin	leu	nur in Transport- und Austauschreaktionen
Isoleucin	ile	nur in Transport- und Austauschreaktionen
Prolin	pro	nur in Transport- und Austauschreaktionen
Glycin	gly	Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus, Glycin, Serin und Threonin Metabolismus
Serin	ser	Cystein und Methionin Metabolismus, Glycin, Serin und Threonin Metabolismus
Threonin	thr	Glycin, Serin und Threonin Metabolismus
Methionin	met	Cystein und Methionin Metabolismus
Asparaginsäure	asp	Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus, Arginin Biosynthese
Cystein	cys	Cystein und Methionin Metabolismus
Glutaminsäure	nicht im Modell	-
Phenylalanin	phe	Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese
Asparagin	asn	Alanin, Aspartat und Glutamat Metabolismus
Tyrosin	tyr	Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan

Metabolit	Abk. im Modell	metabolisches Modul
		Biosynthese
Lysin	lys	nur in Transport- und Austauschreaktionen
Tryptophan	trp	nur in Transport- und Austauschreaktionen

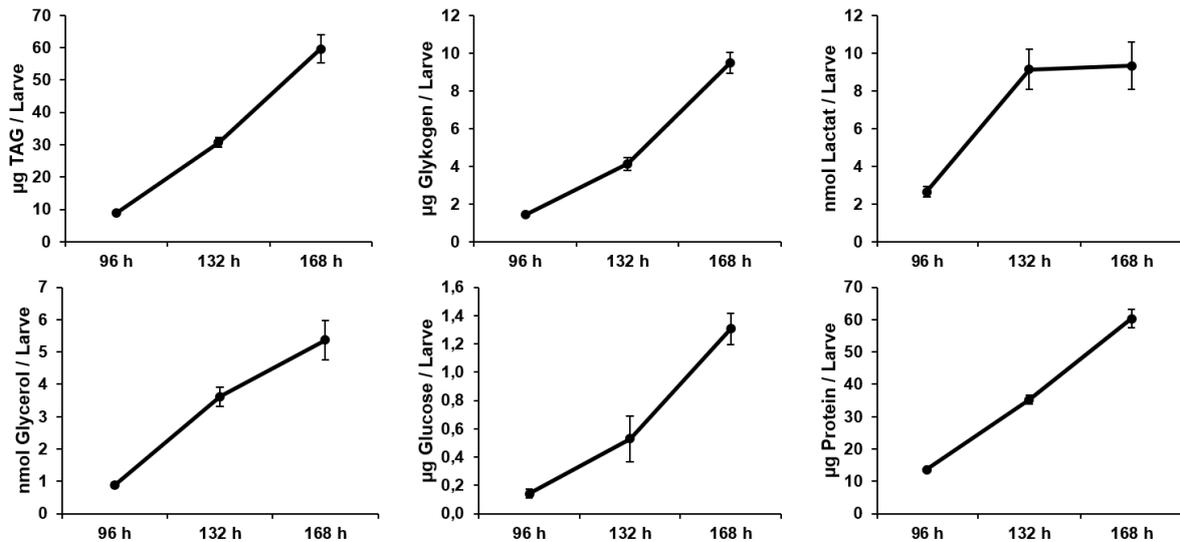
Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte durch die Erstellung von Standardreihen (siehe Methoden Abschnitt 4.14). Alle Metabolite zeigen in den GC-MS Analysen einen Anstieg der Menge von 96 h zu 168 h (siehe Abbildung 2.19 A). Auch die Mengen an freien Aminosäuren stiegen innerhalb der 72 h kontinuierlich an (siehe Abbildung 2.19 B). Dabei zeigte sich, dass einige Metabolite abundanter sind als andere. Beispielsweise findet sich in den Larven eine hohe Menge an Lactat (wie auch in Abschnitt 2.1.2) im Gegensatz zu anderen Metaboliten wie Laktose, Fumarsäure oder Fructose. Dies spiegelt sich auch in den Mengen der Aminosäuren wider.



**Abbildung 2.19.:** Metabolische Messung freier Metabolite von Larven auf HD via GC-MS. Gezeigt sind die absoluten Quantifizierungen von (A) verschiedenen Metaboliten, wie Glucose und Lactat und (B) von den proteinogenen Aminosäuren an drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung der *Drosophila* Larven (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Quadruplikate. Die Messwerte sind normiert auf die Anzahl der Larven pro Probe (96 h: 25 Larven, 132 h und 168 h: 8 Larven) und sortiert nach aufsteigenden Werten des Zeitpunkts 168 h. Die Messungen wurden von Tebea Mettler-Altmann (Institut für Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) durchgeführt.

### Absolute Quantifizierungen

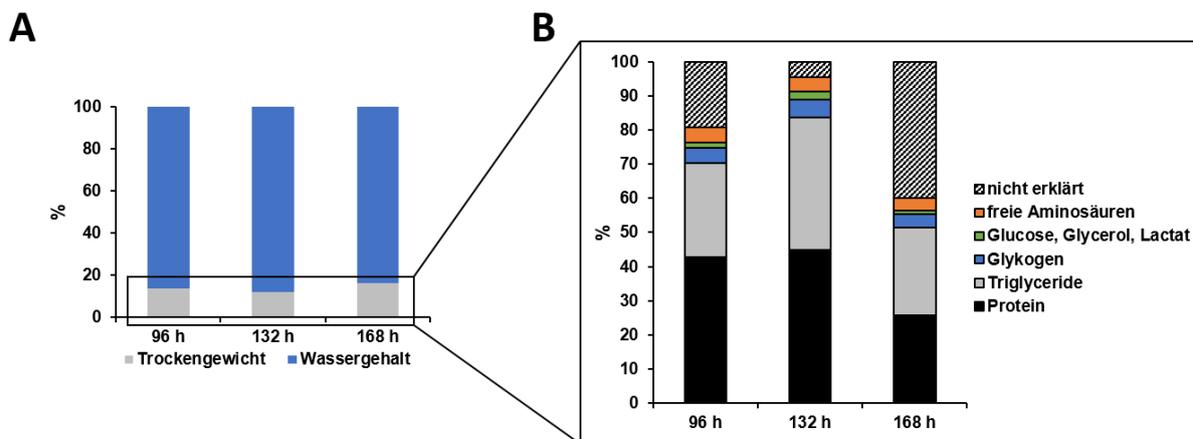
Da bei den GC-MS Messungen nur freie Metabolite gemessen wurden, sollten mit den zusätzlichen biochemischen Messungen unter anderem auch gebundene Metabolite und der Gesamtprotein-gehalt bestimmt werden. Bei den absoluten Quantifizierungen wurden Triglyceride, Glycerol, Glucose, Glykogen und Lactat bestimmt. In nahezu allen Messungen ist ein Anstieg der Metabolite über die Zeit von 96 h zu 168 h nach Eiablage zu erkennen (siehe Abbildung 2.20). Einzige Ausnahme bildet das Metabolit Lactat. Hier stagniert die Menge und erreicht ein Plateau ab einem Zeitpunkt von 132 h nach Eiablage (siehe Abbildung 2.20, oben rechts).



**Abbildung 2.20.:** Metabolische Messungen von Larven auf HD. Gezeigt sind die absoluten Quantifizierungen von Triglyceriden, Glykogen, Lactat, freiem Glycerol, freier Glucose und Proteinen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung der *Drosophila* Larven (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Quadruplikate von drei biologisch unabhängigen Experimenten. Die Messungen wurden auf die Anzahl der Larven pro Probe normiert (96 h: 25 Larven, 132 h und 168 h: 8 Larven).

### Entwicklung der Biomasse-Zielfunktion

Zur Entwicklung der Zielfunktion sollte zunächst untersucht werden, ob die metabolischen Messungen und die GC-MS Messungen fähig sind, die Zusammensetzung der Biomasse weitestgehend zu erklären. Dafür wurden das Trockengewicht und der Wassergehalt in Prozent auf das Gesamtgewicht bezogen und anschließend ermittelt wie viel Prozent des Trockengewichts durch die metabolischen Messungen und die GC-MS Messungen erklärt werden können. In allen Zeitpunkten konnte ein Großteil der Biomasse erklärt werden (96 h: 81,0 %, 132 h: 95,6 %, 168 h: 60,3 %), wobei der Hauptteil durch Triglyceride und Proteine bestimmt wird (siehe Abbildung 2.21). Die hier durchgeführten Messungen können somit im weiteren Verlauf für die Modellierung der Biomasse in *Drosophila* genutzt werden.



**Abbildung 2.21.:** Darstellung der prozentualen Anteile von Wassergehalt, Trockengewicht und Metabolitmengen am Gesamtgewicht der Larven. Aufgetragen sind die Prozente der Mittelwerte der metabolischen Messungen aus drei biologisch unabhängigen Experimenten und den GC-MS Messungen. (A) Das Gesamtgewicht ist bestimmt durch das Trockengewicht und den Wassergehalt der Larven. (B) Das Trockengewicht der Larven kann durch die metabolischen Messungen und die GC-MS Messungen im Mittel zu rund 79 % erklärt werden (96 h: 81 %; 132 h: 95,6 %; 168 h: 60,3 %).

Die Koeffizienten der Biomasse-Zielfunktion wurden anhand der Messungen der freien und gebundenen Metabolite der Larven bestimmt (siehe Methoden Abschnitt 4.18.1). Zusätzlich zu den experimentell bestimmten Komponenten dieser Arbeit wurden außerdem Messungen des larvalen Cholesterolgehalts (von Michael Werthebach, unveröffentlichte Daten; Institut Mathematische Modellierung biologischer Systeme, AG Systembiologie des Fettstoffwechsels, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mit in die Berechnungen der Zielfunktion aufgenommen. Da *Drosophila melanogaster* ein Cholesterol-auxotropher Organismus ist<sup>[179]</sup>, war die Aufnahme von Cholesterol in die Biomasse-Zielfunktion essentiell. Zudem wurde der Energieverbrauch durch wachstumsabhängige Prozesse (engl. *growth associated maintenance requirements*, GAM), wie beispielsweise die Polymerisation von Aminosäuren zu Proteinen oder die Synthese von Nukleinsäuren<sup>[70]</sup>, in die Biomasse-Zielfunktion aufgenommen. Da die experimentelle Bestimmung der GAM in den *Drosophila* Larven aufgrund ihrer Komplexität noch nicht möglich war, wurden als Näherung

die Werte der GAM aus dem metabolischen Modell iMM904 des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[138]</sup> entnommen. Die Methode zur Umwandlung der metabolischen Daten in Biomassekoeffizienten wurde von J. Schönborn entwickelt<sup>[182]</sup>. Die endgültige Zielfunktion von *FlySilico* 1.0 zur Ermittlung der Biomasse ist:

$$\begin{aligned}
& \underline{0,22812057} \text{ ala} + \underline{0,07253130} \text{ arg} + \underline{0,08889074} \text{ asn} + \underline{0,0952444} \text{ asp} + \underline{59,276} \text{ atp} \\
& + \underline{0,01249848} \text{ clr} + \underline{0,05497961} \text{ cys} + \underline{0,03341084} \text{ glc} - D + \underline{0,08582346} \text{ gln} - L \\
& + \underline{0,12450671} \text{ glu} - L + \underline{0,20685442} \text{ gly} + \underline{0,02221020} \text{ glycerol} \\
& + \underline{0,24597306} \text{ glycogen} + \underline{59,276} \text{ h2o} + \underline{0,03930321} \text{ his} + \underline{0,08637180} \text{ ile} \\
& + \underline{0,06077100} \text{ lac} - L + \underline{0,15631814} \text{ leu} + \underline{0,10210655} \text{ lys} + \underline{0,03615874} \text{ met} \\
& + \underline{0,04767442} \text{ phe} + \underline{0,14173310} \text{ pro} + \underline{0,20435090} \text{ ser} + \underline{0,27972171} \text{ tag} \\
& + \underline{0,14520307} \text{ thr} + \underline{0,01216300} \text{ trp} + \underline{0,09935594} \text{ tyr} + \underline{0,12118853} \text{ val} \\
& \rightarrow \underline{59,276} \text{ adp} + \underline{58,7} \text{ h} + \underline{59,305} \text{ pi}
\end{aligned} \tag{2.1}$$

Wobei die Koeffizienten aus folgenden Quellen ermittelt wurden: (i) biochemische Messungen und GC-MS (  ), (ii) nur biochemische Messungen (  ) oder (iii) adaptiert aus dem iMM904 Hefe Netzwerk<sup>[138]</sup> (  , entspricht der GAM). Die Abkürzungen in der Zielfunktion entsprechen den hier aufgeführten Komponenten: ala = Alanin, arg = Arginin, asn = Asparagin, asp = Asparaginsäure, atp = ATP, clr = Cholesterol, cys = Cystein, glc-D = D-Glucose, gln-L = L-Glutamin, glu-L = L-Glutaminsäure, gly = Glycin, glycerol = Glycerol, glycogen = Glykogen, h2o = Wasser, his = Histidin, ile = Isoleucin, lac-L = L-Lactat, leu = Leucin, lys = Lysin, met = Methionin, phe = Phenylalanin, pro = Prolin, ser = Serin, tag = Triglycerid, thr = Threonin, trp = Tryptophan, tyr = Tyrosin, val = Valin, adp = ADP, h = Wasserstoff, pi = Hydrogenphosphat.

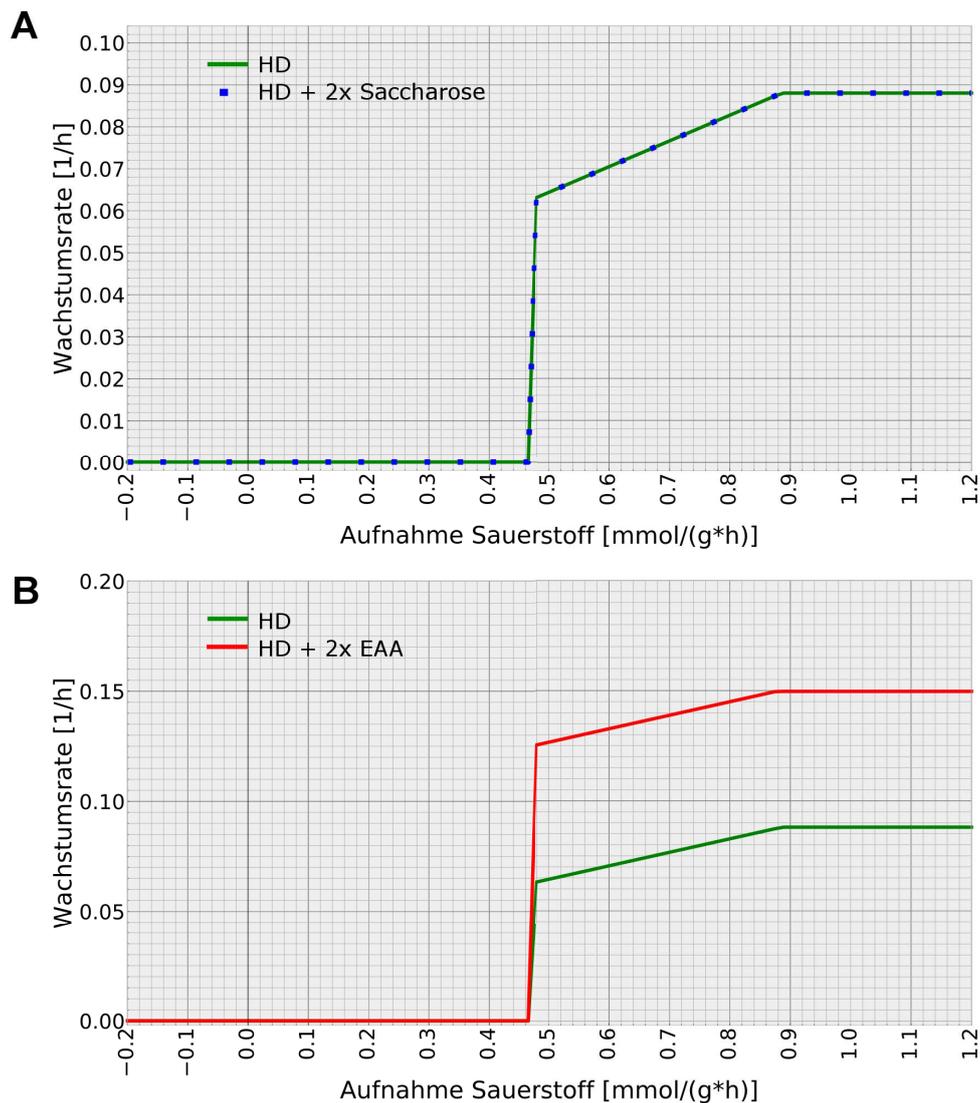
## 2.7. Validierung des metabolischen Netzwerks

Nach der Etablierung des metabolischen Netzwerks ist die Verifizierung und Validierung ein essentieller Teil zur Überprüfung der Verlässlichkeit des Systems und erster Simulationen. Die Verifizierung des *FlySilico* 1.0 Modells erfolgte durch Robustheitsanalysen von J. Schönborn<sup>[182]</sup>, bei denen zunächst die Eingangsparameter variiert wurden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass ohne die Aufnahme von Cholesterol keine Biomasse produziert werden kann und kein Wachstum erfolgt (siehe Anhang Abbildung B.1 A). Dieses Ergebnis wurde durch die Aufnahme von Cholesterol in die Biomasse-Zielfunktion erzeugt und simuliert somit die Cholesterol-Auxotrophie von *Drosophila melanogaster*<sup>[179]</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass die essentielle Aminosäure Threonin, im Gegensatz zu einer nicht-essentiellen Aminosäure (Asparaginsäure), einen Einfluss auf die Wachstumsrate hat (siehe Anhang Abbildung B.2). Als nächster Schritt sollten die Simulationsergebnisse mithilfe von experimentellen Daten validiert werden.

### 2.7.1. Simulationen unter veränderten Eingangsparametern

Um die Vorhersagekraft des Modells zu testen, wurden die Eingangsparameter variiert und die Wachstumsraten unter den veränderten Bedingungen ermittelt. Da sowohl die essentiellen

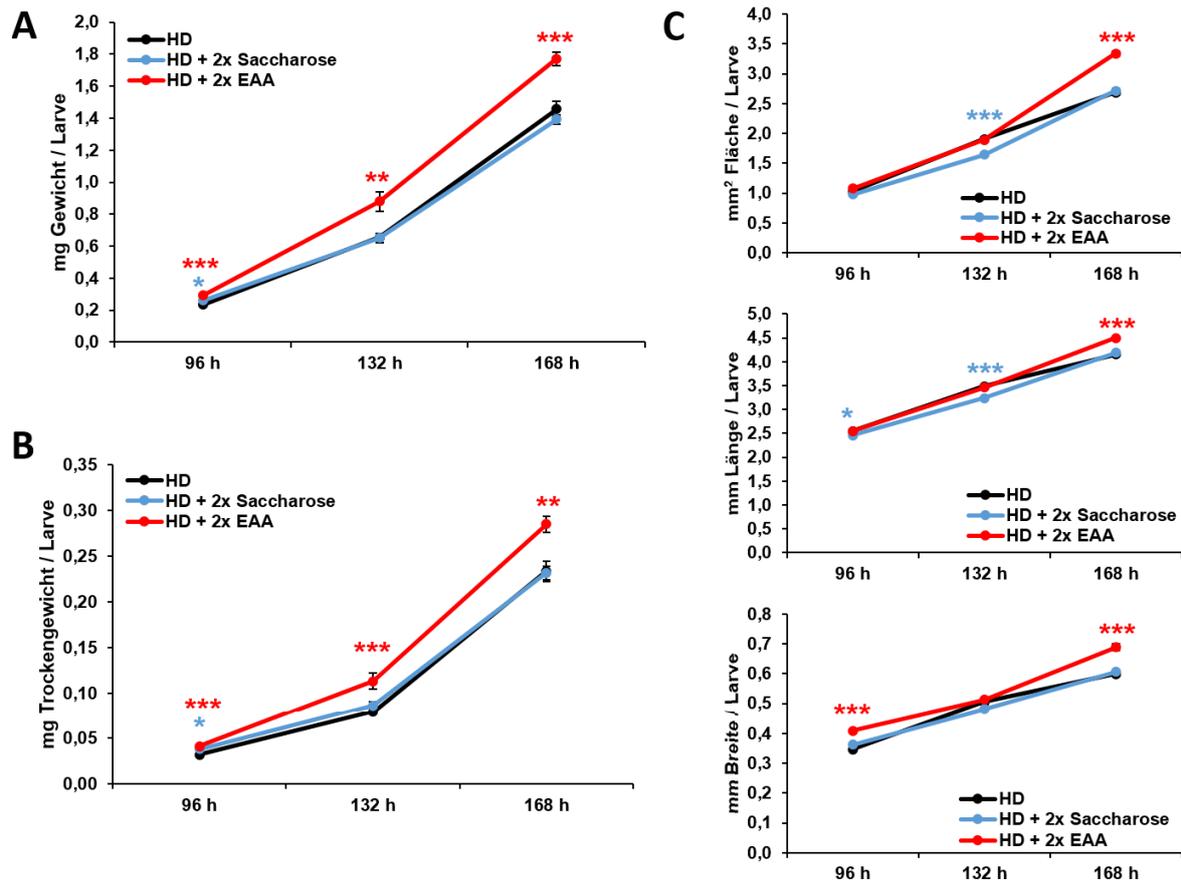
Aminosäuren, als auch Kohlenhydrate in Form von Zuckern (hier Saccharose) einen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung von *Drosophila* haben<sup>[133,143,162]</sup>, wurden diese beiden Komponenten variiert und im HD entweder Saccharose oder die essentiellen Aminosäuren verdoppelt. Die Ergebnisse der Simulationen wurden in Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme betrachtet und mit den Ergebnissen unter normalen *Holidic Diet* Bedingungen verglichen. Die Verdopplung der Aufnahme von Saccharose zeigte keinen Effekt auf die Wachstumsrate (siehe Abbildung 2.22 A). Die Verdopplung der essentiellen Aminosäuren hingegen führt zu einem Anstieg der Wachstumsrate um 41,22 % ( $\mu_{HD} = 0,088 \frac{1}{h}$ ,  $\mu_{HD+2xEAA} = 0,1497 \frac{1}{h}$ ) bei Erreichen des Plateaus ab einer Sauerstoffaufnahme von  $0,889 \frac{mmol}{(g \cdot h)}$  (siehe Abbildung 2.22 B).



**Abbildung 2.22.:** Robustheitsanalyse unter veränderten Sauerstoffaufnahmeleistungen. (A) Simulation des normalen *Holidic Diets* (HD, grün) und einem HD mit doppelter Menge an Saccharose (HD + 2x Saccharose, blau). (B) Simulation des normalen *Holidic Diets* (HD, grün) und einem HD mit doppelter Menge an essentiellen Aminosäuren (HD + 2x EAA, rot). Grafiken entnommen und modifiziert aus<sup>[182]</sup>.

### 2.7.2. Experimentelle Validierung mittels larvaler Wachstumsparameter

Die Simulationen aus der Robustheitsanalyse haben gezeigt, dass veränderte Aufnahmeraten unterschiedliche Auswirkungen auf die Wachstumsrate haben. So zeigte die Verdopplung von Saccharose keinen Effekt auf die Wachstumsrate, wohingegen die Verdopplung der Aufnahmeraten an essentiellen Aminosäuren zu einer erhöhten Wachstumsrate führte (siehe Abbildung 2.22 A und B). Um die Simulationsergebnisse zu validieren, wurde der experimentelle Versuchsaufbau an den theoretischen Aufbau angepasst. Dafür entwickelten sich die *Drosophila* Larven auf normalem HD sowie auf HD mit entweder doppelter Menge an Saccharose oder doppelter Menge an essentiellen Aminosäuren. Die Larven wurden an drei unterschiedlichen Zeitpunkten (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage) gesammelt und die Wachstumsparameter Gewicht (Gesamt- und Trockengewicht) und Größe (Fläche, Länge und Breite) bestimmt. Sowohl das Gesamtgewicht als auch das Trockengewicht der Larven zeigten auf dem HD mit doppelter Menge an essentiellen Aminosäuren eine signifikante Erhöhung an allen drei Zeitpunkten (siehe Abbildung 2.23 A und B). In den Größenparametern Fläche, Länge und Breite der Larven konnte im letzten Zeitpunkt (168 h nach Eiablage) eine signifikante Erhöhung auf dem HD mit doppelten essentiellen Aminosäuren im Gegensatz zum normalen HD ermittelt werden (siehe Abbildung 2.23 C). Die Larven, die sich auf dem HD mit doppelter Menge an Saccharose entwickelten, zeigten keinen Unterschied im Gewicht zu den Larven vom normalen HD (siehe Abbildung 2.23 A und B). Es zeigte sich, dass diese Ergebnisse konsistent zu den Simulationen des *FlySilico* 1.0 Modells sind, was ein hohes prädiktives Potential dieses Modells bestätigt.



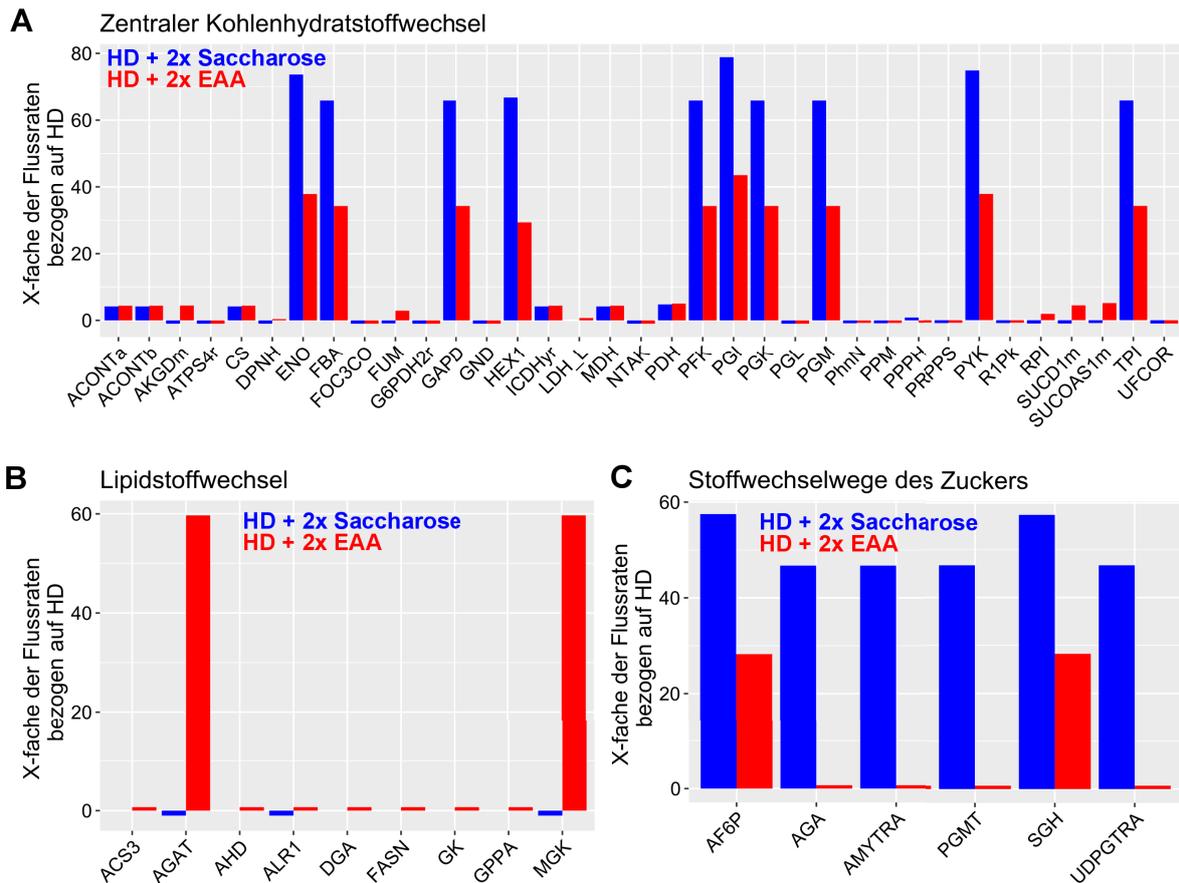
**Abbildung 2.23.:** Larvale Wachstumsparameter unter veränderten Nahrungsbedingungen zur Validierung des Modells. Die *Drosophila* Larven entwickelten sich entweder auf normalem *Holidic Diet* (HD, schwarz), auf HD mit doppeltem Saccharosegehalt (HD + 2x Saccharose, blau) oder auf HD mit doppelter Menge an essentiellen Aminosäuren (HD + 2x EAA, rot). Die Wachstumsparameter Gewicht und Größe wurden von Larven unterschiedlicher Zeitpunkte (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage) aufgenommen. (A) Gesamtgewicht, (B) Trockengewicht und (C) Darstellung unterschiedlicher Größenparameter (Fläche, Länge und Breite) der Larven. Die Messungen basieren auf drei biologisch unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Jedes Experiment bestand aus Quadruplikaten mit 100 (96 h) oder 40 Larven (132 h, 168 h) pro Probe bei den Gewichtsmessungen und 20 bis 30 Larven pro Zeitpunkt bei den Größenbestimmungen. Für den Test auf statistische Signifikanz wurde eine ANOVA-Analyse mit einem Bonferroni korrigierten Post-hoc-Test zu jedem Zeitpunkt zwischen den Messungen der unterschiedlichen Nahrungsbedingungen angewandt, wobei  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\* und  $p < 0.001$  \*\*\*.

## 2.8. Initiale *in silico* und *in vivo* Untersuchungen der Ressourcenallokation in *Drosophila*

Im Folgenden wurde getestet, ob das *FlySilico* 1.0 Modell fähig ist Differenzen in den Verteilungen der Ressourcen durch Veränderungen des *Holidic Diets* wiederzugeben. Dafür wurden die Eingangsparameter verändert und die Aufnahmeraten erneut an die verschiedenen Futter-

kompositionen (HD, HD + 2x Saccharose und HD + 2x EAA) angepasst. Anschließend wurde das Modell im Hinblick auf eine maximale Biomasse gelöst und die Verteilungen der Flussraten betrachtet (durchgeführt von J. Schönborn<sup>[182]</sup>). Es wurden im nächsten Schritt die Verhältnisse der Flussdifferenzen zwischen dem (i) HD und HD + 2x Saccharose und dem (ii) HD und HD + 2x EAA gebildet, um Reaktionen zu identifizieren, die sich durch die variierenden Eingangsparameter unterscheiden. Die metabolischen Reaktionen wurden in funktionelle Gruppen (hier: zentraler Kohlenhydratstoffwechsel, Stoffwechsel der Zucker und Lipidstoffwechsel) unterteilt und die Differenzen ausgewählter Reaktionen mit einem Schwellenwert einer mindestens 0,5-fachen Veränderung zum HD in einer Grafik abgebildet (siehe Abbildung 2.24).

Die Simulationen ergaben, dass es im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel diverse Reaktionen gibt, die durch die unterschiedlichen Eingangsparameter veränderte Flussraten aufweisen. Zwischen den Futterkompositionen sind jedoch wenige Unterschiede erkennbar. Einzig bei den erhöhten Flussraten zeigte sich, dass die Flussraten des HDs mit 2x Saccharose immer höher sind, als die Flussraten des HDs mit 2x EAA. Ein weiterer Unterschied lässt sich bei der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (AKGDm) erkennen. Sie reagiert mit einer erhöhten Flussrate auf dem HD + 2x EAA im Gegensatz zum HD mit 2x Saccharose, bei dem sich eine Reduktion der Flussrate von AKGDm zeigte (siehe Abbildung 2.24 A). Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase katalysiert die Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat mit Coenzym A zu Succinyl-CoA im Citratzyklus und hat dadurch einen indirekten regulatorischen Effekt auf die oxidative Phosphorylierung und die Produktion von ATP<sup>[205]</sup>. Weiterhin ist eine leicht erhöhte Flussrate der Lactatdehydrogenase zu erkennen (siehe Abbildung 2.24 A), was auf erhöhte Lactatmengen hindeuten könnte. Im Lipidstoffwechsel führte die doppelte Menge an essentiellen Aminosäuren zu einer Erhöhung der Flussraten in der Acylglycerol O-Acyltransferase (AGAT) und in der Acylglycerol-Kinase (MGK), was auf eine erhöhte Lipidspeicherung hindeutet. Die Flussraten des Lipidstoffwechsels bleiben bei Aufnahme der doppelten Menge an Saccharose nahezu unverändert (siehe Abbildung 2.24 B). Auf den Stoffwechsel des Zuckers hat, wie zu erwarten, vor allem die Simulation mit doppeltem Saccharosegehalt einen stärkeren Einfluss (siehe Abbildung 2.24 C).



**Abbildung 2.24.:** Simulationen zur Allokation von Ressourcen. (A) Reaktionen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels (Citratzyklus, Glykolyse, Pyruvat- und Pentosephosphatweg), (B) Reaktionen des Lipidstoffwechsels und (C) Reaktionen aus Stoffwechselwegen des Zuckers. Die dargestellten Flussraten zeigen das X-fache der Flussraten von HD + 2x Saccharose (blau) sowie HD + 2x EAA (rot) bezogen auf das HD. Grafik entnommen und modifiziert aus<sup>[182]</sup>. Die Abkürzungen in den Grafiken entsprechen den aufgeführten Reaktionen in Tabelle 2.10.

**Tabelle 2.10.:** Reaktionswege und deren Abkürzungen. Die Tabelle zeigt Reaktionen, deren Flussraten beim HD + 2x Saccharose bzw. HD + 2x EAA im Vergleich zum HD verändert sind.

Abkürzung	Name	metabolisches Modul
<i>(A) Zentraler Kohlenhydratstoffwechsel:</i>		
ACONTa	Aconitat-Hydratase A	Citratzyklus
ACONTb	Aconitat-Hydratase B	Citratzyklus
AKGdm	$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase	Citratzyklus
ATPS4r	ATP-Synthase	Oxidative Phosphorylierung
CS	Citrat-Synthase	Citratzyklus
DPNH	NADH:Coenzym-Q-Oxidoreduktase	Oxidative Phosphorylierung
ENO	Enolase	Glykolyse/Glukoneogenese
FBA	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	Glykolyse/Glukoneogenese

Abkürzung	Name	metabolisches Modul
FOC3CO	Cytochrom-c-Oxidase	Oxidative Phosphorylierung
FUM	Fumarase	Citratzyklus
G6PDH2r	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Pentosephosphatweg
GAPD	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Glykolyse/Glukoneogenese
HEX1	Hexokinase	Glykolyse/Glukoneogenese
ICDHyr	Isocitrat-Dehydrogenase	Citratzyklus
LDH_L	Lactatdehydrogenase	Pyruvat Metabolismus
MDH	Malatdehydrogenase	Citratzyklus
NTAK	Nukleosidtriphosphate-Adenylat-Kinase	Oxidative Phosphorylierung
PDH	Pyruvatdehydrogenase	Glykolyse/Glukoneogenese
PFK	Phosphofruktokinase	Glykolyse/Glukoneogenese
PGI	Glucose-6-phosphat-Isomerase	Glykolyse/Glukoneogenese
PGK	Phosphoglyceratkinase	Glykolyse/Glukoneogenese
PGL	6-Phosphogluconolactonase	Pentosephosphatweg
PGM	Phosphoglyceratmutase	Glykolyse/Glukoneogenese
PhnN	Ribose-1,5-bisphosphat-Phosphokinase	Pentosephosphatweg
PPM	Phosphopentomutase	Pentosephosphatweg
PPPH	Diphosphat-Phosphohydrolase	Oxidative Phosphorylierung
PRPPS	Ribosephosphat-Diphosphokinase	Pentosephosphatweg
PYK	Pyruvatkinase	Glykolyse/Glukoneogenese
R1Pk	Ribose-1-Phosphokinase	Pentosephosphatweg
RPI	Ribose-5-phosphat-Isomerase	Pentosephosphatweg
SUCD1m	Succinat-Dehydrogenase	Citratzyklus
SUCOAS1m	Succinyl-CoA-Synthetase	Citratzyklus
TPI	Triosephosphatisomerase	Glykolyse/Glukoneogenese
UFCOR	Coenzym Q: Cytochrom-c-Oxidoreduktase	Oxidative Phosphorylierung

*(B) Lipidstoffwechsel:*

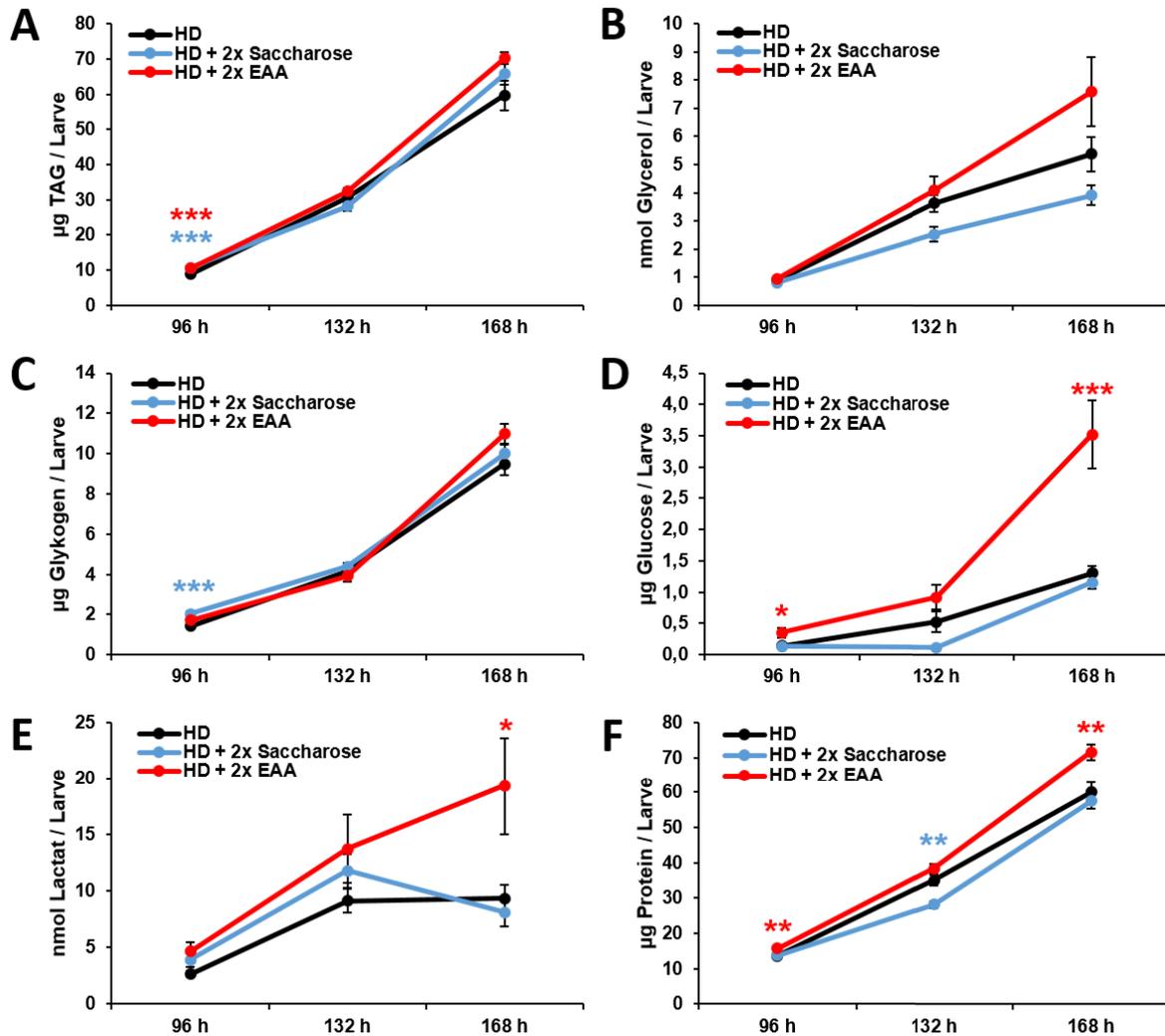
ACS3	Acyl-CoA-Synthetase	Fettsäure Biosynthese
AGAT	Acylglycerol-O-Acyltransferase	Glycerolipid Metabolismus
AHD	Aldehyd-Dehydrogenase	Glycerolipid Metabolismus
ALR1	Alkoholdehydrogenase	Glycerolipid Metabolismus
DGA	Diacylglycerol-O-Acyltransferase	Glycerolipid Metabolismus
FASN	Fettsäure-Synthase	Fettsäure Biosynthese
GK	Glycerinkinase	Glycerolipid Metabolismus
GPPA	Glycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase	Glycerolipid Metabolismus
MGK	Acylglycerol-Kinase	Glycerolipid Metabolismus

*(C) Stoffwechselwege des Zuckers:*

AF6P	D-Fructose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase	Zucker Metabolismus
AGA	$\alpha$ -Glucosidase	Zucker Metabolismus
AMYTRA	1,4- $\alpha$ -D-Glucan:1,4- $\alpha$ -D-Glucan 6- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-Glucano)-transferase	Zucker Metabolismus

Abkürzung	Name	metabolisches Modul
PGMT	$\alpha$ -Phosphoglucomutase	Zucker Metabolismus
SGH	Sucrose- $\alpha$ -Glucosidase	Zucker Metabolismus
UDPGTRA	UDP-Glucose-Glykogen-Glucosyltransferase	Zucker Metabolismus

Um die Vorhersagen der Simulationen zu überprüfen, wurden absolute Quantifizierungen metabolischer Parameter von *Drosophila* Larven auf den unterschiedlichen Futterkompositionen durchgeführt (siehe Methoden Abschnitt 4.4.2). Dabei wurden Triglyceride, Glycerol, Glucose, Glykogen, Lactat und Proteine untersucht (siehe Abbildung 2.25). Die Larven, die sich auf HD mit doppelter Menge an essentiellen Aminosäuren entwickelten, zeigten einen signifikanten Anstieg der Proteinmenge (siehe Abbildung 2.25 F). Auch die Menge an Triglyceriden pro Larve war auf dem HD mit 2x EAA im Gegensatz zu HD und HD mit 2x Saccharose erhöht (siehe Abbildung 2.25 A). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Simulationen, die eine erhöhte Aktivität in Reaktionen des Lipidstoffwechsels vorhergesagt haben (siehe Abbildung 2.24 B, AGAT und MGK). Die Simulationen zeigten auch erhöhte Flussraten in Reaktionen des Zuckerstoffwechsels durch die Aufnahme der doppelten Menge an Saccharose (siehe Abbildung 2.24 C). Die Quantifizierung der Mengen an Glucose und Glykogen zeigte, dass die Metabolite von dem HD mit doppelter Saccharosemenge unbeeinflusst sind (siehe Abbildung 2.25 C und D). Dies könnte erneut auf die erhöhte Aktivität der Glykolyse und einem Abbau der überschüssigen Kalorien hindeuten. Die Mengen an Lactate bildeten auf dem normalen HD nach 132 h (nach Eiablage) ein Plateau. Auf dem HD mit 2x Saccharose kam es nach 132 h zu einem Abfall der Lactatmengen. Im Gegensatz hierzu zeigten die Mengen an Lactat auf HD mit 2x EAA einen kontinuierlichen Anstieg (siehe Abbildung 2.25 E). Dieses Ergebnis ist wiederum konsistent mit den Modellvorhersagen, bei denen außerdem gezeigt wurde, dass die Flussrate der Lactatdehydrogenase (LDH-L) auf dem HD mit doppelter Menge an essentiellen Aminosäuren leicht erhöht ist (siehe Abbildung 2.24 A).



**Abbildung 2.25.:** Metabolische Messungen der Larven unter veränderten Nahrungsbedingungen zur Validierung des Modells. Zur Validierung entwickelten sich die *Drosophila* Larven entweder auf normalem *Holidic Diet* (HD, schwarz), auf HD mit doppeltem Saccharosegehalt (HD + 2x Saccharose, blau) oder auf HD mit doppelter Menge an essentiellen Aminosäuren (HD + 2x EAA, rot). Gemessen wurden (A) Triglyceride, (B) Glycerol, (C) Glykogen, (D) Glucose, (E) Proteine und (F) Lactat von Larven unterschiedlicher Zeitpunkte (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage). Die Messungen basieren auf drei biologisch unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Jedes Experiment bestand aus Quadruplikaten mit 25 (96 h) oder acht Larven (132 h, 168 h) pro Probe. Für den Test auf statistische Signifikanz wurde eine ANOVA-Analyse mit einem Bonferroni korrigierten Post-hoc-Test zu jedem Zeitpunkt zwischen den Messungen der unterschiedlichen Nahrungsbedingungen angewandt, wobei  $p < 0.05$  \*,  $p < 0.01$  \*\* und  $p < 0.001$  \*\*\*.

## 3. Diskussion

Die Allokation von Ressourcen beschreibt in der Biologie die Verteilung von aus der Umgebung aufgenommenen Nährstoffen an unterschiedlichste Destinationen im Organismus. Dieser Prozess ist dabei abhängig von Umweltbedingungen und somit externen Parametern, wie beispielsweise dem Nahrungsangebot, und von intrinsischen Parametern, wie der genetischen Kontribution, dem Mikrobiom oder der Aktivität des Immunsystems des Organismus. Die aufgenommenen Nährstoffe müssen dabei häufig an in Konflikt stehende Prozesse, wie beispielsweise dem Wachstum und der Energiespeicherung, aufgeteilt werden. Ein weiteres Beispiel bezieht sich auf die Reproduktionsrate und Lebenserwartung höherer Organismen. Die Reproduktion ist ein Prozess der viele Nährstoffe und dementsprechend Energie erfordert. Eine Reduktion der aufgenommenen Kalorien führt demnach zu einer verringerten Fertilität und gleichzeitig zu einer Verlängerung der Lebenserwartung<sup>[75]</sup>. Diese Vorgänge werden durch hoch komplexe Entscheidungsprozesse realisiert, bei denen die Nährstoffe in biochemischen Reaktionen verarbeitet und durch eine situationsangepasste Priorisierung an die unterschiedlichen Destinationen weitergeleitet werden. Die Ressourcenallokation resultiert dabei in der Ausbildung eines bestimmten Phänotyps. Zwar sind die grundlegenden biochemischen Reaktionswege zur Verarbeitung der Nährstoffe heutzutage gut verstanden, jedoch ist die übergeordnete Regulation, die zur Verteilung der Ressourcen führt, noch weitestgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden mithilfe von *in vivo* und *in silico* Studien verschiedene Aspekte der Ressourcenallokation näher betrachtet. Zunächst wurde der metabolische Phänotyp als Ergebnis der Ressourcenallokation einer Kollektion wildtypischer Fliegenlinien erforscht und unter der Berücksichtigung verschiedener intrinsischer und extrinsischer Faktoren untersucht. Sowohl die genetische Kontribution als auch das Nahrungsangebot wirken sich nachweislich auf den metabolischen Phänotyp aus<sup>[108,141,142,172,211]</sup>. Weiterhin wurden Korrelationen zwischen verschiedenen Metaboliten sowie zwischen metabolischen Parametern und genetischen Varianten untersucht. Durch Korrelationen ist es möglich konkurrierende und nicht-konkurrierende Prozesse im Organismus aufzudecken, welche die Ressourcenallokation mit bestimmen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden *in silico* Studien zur Untersuchung der Ressourcenallokation in *Drosophila* durchgeführt. Durch diesen *top-down* Ansatz ist es möglich die Verteilung der Ressourcen durch Simulationen nachzuverfolgen und Studien zur Optimalität und Priorisierung von metabolischen Prozessen durchzuführen.

### 3.1. Teil 1 - Der metabolische Phänotyp als Resultat der Ressourcenallokation

#### 3.1.1. Das metabolische Profil von wildtypischen Fliegenlinien

Um einen Überblick über den metabolischen Phänotyp von wildtypischen *Drosophila* zu erhalten, wurde zunächst eine metabolische Charakterisierung durchgeführt. Hierbei wurden die Mengen unterschiedlicher Metabolite (Triglyceride, Proteine, Glycerol, Glucose, Glykogen, Lactat) von

35 DGRP Linien - eine Kollektion wildtypischer Fliegenlinien<sup>[129]</sup> - mithilfe von biochemischen Analysen (siehe Methoden Abschnitt 4.5) unter definierten Bedingungen (= basale Bedingungen, d. h. 25 °C, Standardfutter, gleiche parentale Dichte über zwei Generationen) bestimmt. Wie in vorigen Publikationen berichtet<sup>[108,129]</sup>, konnte eine erhebliche phänotypische Plastizität in Bezug auf die Mengen verschiedener Metabolite in den Fliegenlinien identifiziert werden (siehe Ergebnisse Abbildung 2.2 und 2.3). Zwischen der phänotypischen Plastizität und der Entwicklungszeit der DGRP Linien wurde ein Zusammenhang in Betracht gezogen, da die Entwicklungszeit einen Einfluss auf das metabolische Profil haben könnte und umgekehrt. Vor allem die Dauer des Larven- und Puppenstadiums ist zwischen den Fliegenlinien sehr variabel (siehe Ergebnisse Abbildung 2.1 B). Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der Entwicklungszeit und den metabolischen Profilen festgestellt werden (siehe Ergebnisse Abbildung 2.1 D). Demnach könnten die Unterschiede in den metabolischen Profilen durch andere Faktoren, wie beispielsweise genetische Varianten, hervorgerufen sein.

Neben der phänotypischen Plastizität zwischen den verschiedenen Fliegenlinien ist zu erwarten, dass diese Plastizität auch entlang der zeitlichen Entwicklung ausgeprägt ist. Die Bedürfnisse der Fliegen ändern sich über die Zeit und mit jedem Stadium. So steht im Fokus der larvalen Entwicklung das Wachstum und die Anreicherung von energiereichen Speichermetaboliten<sup>[3,49]</sup>, um das Stadium der Verpuppung zu erreichen und den energieaufwändigen Prozess der Metamorphose vollenden zu können. In dieser Zeit kommt es zu keiner Nahrungsaufnahme und die gespeicherten Energiereserven werden genutzt, um die Körperstruktur vollständig umzuformen<sup>[24,176]</sup>. Die adulten Tiere zeichnen sich durch eine Anzahl vielfältiger Aktivitäten aus, wie beispielsweise dem Fliegen, der diskontinuierlichen Nahrungsaufnahme, der zirkadianen Rhythmik oder der Reproduktion. Mit steigendem Alter ist davon auszugehen, dass sich die Aktivität der Fliegen verändert und somit auch die Energiespeicher beeinflusst sein könnten. Ein Beispiel hierfür ist die Fertilität der weiblichen Fliegen. Für die Eiproduktion werden große Mengen an energiereichen Speichermetaboliten benötigt<sup>[152]</sup>. Damit eine hohe reproduktive Rate im Verlaufe des Lebens der *Drosophila* Weibchen erreicht werden kann, müssen die Mengen an energiereichen Speichermetaboliten für einen langen Zeitraum ausreichend konstant gehalten werden. Eine Reduktion der Speichermengen wird jedoch ab einem höheren Alter erwartet, wenn auch die Eiablagereate reduziert ist. Dementsprechend könnte sich auch die Ressourcenallokation verändern, nicht nur mit dem Stadium der Entwicklung, sondern auch mit dem Alter der adulten Tiere. Daher wäre es von weiterem Interesse, die Allokation der Ressourcen auch über die Zeit zu betrachten und die zeitliche Dynamik der metabolischen Plastizität zu untersuchen. Erste Experimente konnten in diese Richtung schon durchgeführt werden. In einem Pilotversuch wurde die Plastizität der Triglyceride über die Zeit von (i) Oregon R bzw. *white [-]* Fliegen (als Vergleich zu den Oregon R) und (ii) ausgewählten DGRP Linien (mit niedrigen, mittleren und hohen Triglyceridmengen unter basalen Bedingungen, siehe Ergebnisse Abbildung 2.3) betrachtet (siehe Methoden Abschnitt 4.9). In beiden Fällen konnte festgestellt werden, dass die Mengen der Triglyceride über die Lebenszeit und zwischen den Stadien signifikant variieren (siehe Anhang Abbildung A.3). In den adulten Weibchen wurden jedoch relativ konstante Triglyceridmengen bis 18 Tage (nach dem Schlüpfen) festgestellt. Dies bestätigt die Vermutung, dass die weiblichen Fliegen über einen langen Zeitraum konstante Mengen an energiereichen Speichermetaboliten für die Eiproduktion benötigen. Eine

Reduktion dieser Metabolitmengen wird demnach erst beim Erreichen eines höheren Altern angenommen. Beispielsweise wurde in einer Publikation von Wayne *et al.* eine stetige Reduktion der Eiablage erst ab einem Alter von über 16 Tagen ermittelt<sup>[220]</sup>. Um die zeitliche Veränderung der phänotypischen Plastizität und der damit verbundenen Ressourcenallokation genauer zu untersuchen, müssen demnach weitere Experimente angeschlossen werden.

Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurden Korrelationsstudien von den metabolischen Daten der wandernden L3 Larven und der sechs Tage alten Weibchen und Männchen durchgeführt (siehe Ergebnisse Abbildung 2.4). Mithilfe dieser Analysen ist es möglich, mehr über Kopplungen zwischen den Metaboliten zu erfahren. Dadurch können zum einen sogenannte Biomarker identifiziert werden, d. h. charakteristische biologische Merkmale, die als Indikatoren für bestimmte Prozesse dienen können. Im Falle einer Korrelation kann durch die Bestimmung eines Metabolits auf das Verhalten eines anderen Metabolits geschlossen werden. Des Weiteren ist es möglich durch die Korrelationsstudien Parameter zu identifizieren, die sich entweder gleich verhalten (positive Korrelation) oder konkurrierend (negative Korrelation) sind. Dieses Wissen kann beispielsweise Aufschluss über die mögliche Verteilung von Ressourcen im biologischen Organismus geben. Da Glucose und Glycerol Untereinheiten von Glykogen bzw. Triglyceriden sind, wurden statistisch signifikante Korrelationen zwischen diesen Metaboliten erwartet. Tatsächlich konnte eine positive Korrelation zwischen Glucose und Glykogen in den sechs Tage alten Weibchen und Männchen identifiziert werden. Glykogen dient hierbei vor allem als kurz- bis mittelfristiger Energiespeicher, die bei energieaufwändigen Prozessen, wie dem Fliegen, bereitgestellt werden<sup>[8,116,221]</sup>. Weiterhin wurde auch eine positive Korrelation zwischen den Triglyceriden und Glycerol in den wandernden L3 Larven identifiziert. Neben den erwarteten Korrelationen konnten auch weitere signifikante Korrelationen zwischen Metaboliten detektiert werden (siehe Ergebnisse Abbildung 2.4). Dazu gehörten unter anderem die positiven Korrelationen zwischen Lactat und TAG bzw. Glycerol sowie zwischen Lactat und den Proteinen in wandernden L3 Larven. Die Korrelationen von drei metabolischen Parametern mit Lactat könnten durch die teilweise hypoxische Lebensweise der Larven<sup>[37]</sup> hervorgerufen sein, was zudem die generell höheren Lactatmengen im larvalen Organismus im Gegensatz zu den adulten Tieren erklären könnte (siehe im Vergleich Ergebnisse Abbildungen 2.2 und 2.3). Auch das Fehlen von Korrelationen kann aufschlussreich sein. Beispielsweise wurde eine positive Korrelation zwischen den Triglyceriden und Glycerol in den Larven identifiziert, die in den adulten Tieren (Weibchen und Männchen) nicht vorhanden war. Dies könnte bei den Larven auf eine höhere Aktivität der Lipogenese und somit dem verstärkten Aufbau von Fettspeichern in Form von Triglyceriden hindeuten, für welchen große Mengen an freiem Glycerol benötigt werden. In adulten Tieren ist der Metabolismus nicht allein auf das Anlegen von Fettspeichern ausgelegt, sondern verbraucht diese zur Bereitstellung von Energie durch eine erhöhte lipolytische Aktivität, was das Fehlen der Korrelation erklären könnte.

Die aufgenommenen metabolischen Daten der DGRP Linien waren ausreichend, um die Larven und die sechs Tage alten Weibchen und Männchen in drei eindeutige Gruppen zu unterteilen (siehe Ergebnisse Abbildung 2.5). In vorigen Publikationen wurde der Sexualdimorphismus in *Drosophila melanogaster* bereits in verschiedenen Studien, beispielsweise des Lipidoms, des Transkriptom und in ersten metabolischen Analysen, untersucht<sup>[97,157,225]</sup>. Die hier erhobenen Daten der wildtypischen Fliegenkollektion validieren und erweitern die vorangegangenen Daten auf

metabolischer Ebene signifikant. Neben der eigentlichen, sehr klaren Abtrennung der Weibchen und Männchen in zwei unterschiedliche Gruppen konnten jedoch vier weibliche DGRP Linien mit einem männlichen Metabolitenprofil ermittelt werden (sogenannte Virago Linien; siehe Ergebnisse Abbildung 2.5, rote Markierungen). Da eine Maskulinisierung oft mit einer veränderten Fertilität einhergeht<sup>[13]</sup>, wurde die Eiablage der Virago Linien untersucht. Für zwei der vier Virago Linien konnte eine signifikante Reduktion der Eiablage nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse Abbildung 2.6). Da bei den anderen zwei Virago Linien keine veränderte Eiablagereate detektiert werden konnte, scheinen die metabolischen Veränderungen nicht ausschließlich auf den erhöhten metabolischen Anforderungen der Eiproduktion zu basieren. Durch die Untersuchungen der genomischen Daten der DGRP Linien konnten keine Gen-assoziierten SNPs identifiziert werden, die einen bekannten Bezug zu metabolischen oder reproduktiven Regulationen besitzen (für die Gen-assoziierten SNPs siehe Anhang Tabelle A.1). Aus diesen Gründen sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Zusammenhang zwischen dem metabolischem Profil und der Reproduktion besser zu verstehen. Eine mögliche Vorgehensweise wäre ein gezielter Gen-Knockdown durch RNA-Interferenzen bzw. die Überexpression ausgewählter Gene dieser Analyse, die noch unbekannte Funktionen ausüben, durch GAL4/UAS-Studien (siehe Methoden Abschnitt 4.8). Durch die Überexpression bzw. den Knockdown könnten Gene identifiziert werden, die einen Einfluss auf die reproduktiven oder metabolischen Eigenschaften der Fliegen haben. Zudem ist es möglich direkte Untersuchungen am Juvenilhormon-Signalweg durchzuführen. Als Steroidhormon der Insekten reguliert das Juvenilhormon (JH) neben der Metamorphose auch die sexuelle Reproduktion. In *Drosophila* Weibchen reguliert und koordiniert das JH die reproduktive Reifung der Ovarien<sup>[167]</sup>, die Synthese von Pheromonen und hierdurch das sexuelle Verhalten<sup>[14,19,175]</sup> und die Eiproduktion<sup>[19]</sup>. Eine veränderte Expression von Komponenten dieses Signalweges könnten die Maskulinisierung der Weibchen begünstigen und das metabolische Profil verändern, bzw. das veränderte metabolische Profil könnte Einfluss auf die Regulation des JH-Signalweges nehmen.

Im Allgemeinen kann jedoch gesagt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem reproduktiven Erfolg und dem Metabolismus von multizellulären Organismen besteht. Beispielsweise wurden im Menschen durch diverse Studien bestätigt, dass Frauen mit nachweislicher Magersucht (*Anorexia nervosa*) ein erhöhtes Risiko haben diverse Defizite in ihrer Fruchtbarkeit zu entwickeln. Dies beginnt schon bei menstrualen Unregelmäßigkeiten und äußert sich weiterhin in einem überdurchschnittlich hohen Anteil an Fehl- oder Frühgeburten<sup>[96]</sup>, sowie im niedrigeren Geburtsgewicht der Neugeborenen im Gegensatz zu denen von Kontrollgruppen<sup>[33]</sup>. Jedoch weisen auch Frauen mit Adipositas eine reduzierte Fertilität auf, die sich in einer unregelmäßigen Menstruation, Ovulationsschwierigkeiten und Schwangerschaftskomplikationen äußert<sup>[92,214]</sup>. Demnach hat das metabolische Profil einen prominenten Einfluss auf die Fertilität und Reproduktion. Dies konnte auch bei zwei Virago Linien mit männlichen Metabolitenprofil, dass durch geringe Energiespeichermengen (niedrige Mengen an Triglyceriden und Glykogen) geprägt ist, bestätigt werden (siehe Ergebnisse Abbildung 2.6). Die Eiproduktion ist ein energieaufwändiger Prozess, der durch ausreichende Mengen an Speichermetaboliten abgedeckt werden muss. Bei unzureichenden Energiereserven kann demnach die Reproduktion beeinträchtigt sein.

### 3.1.2. Einfluss veränderter Nahrungsbedingungen

Viele Umweltfaktoren, wie beispielsweise die Nahrungsbedingungen, können einen Einfluss auf die Ausbildung des Phänotyps ausüben. In vielen Organismen zeigt sich, dass es trotz gleicher Kalorienaufnahme zu einer individuellen metabolischen Antwort kommen kann<sup>[22]</sup>. Die Frage, warum manche Individuen unterschiedlich auf gleiche Nahrungsbedingungen reagieren, ist bis jetzt noch nicht beantwortet. Mithilfe der DGRP Linien konnten die Effekte von Nahrungsquellen mit unterschiedlicher Zuckerkonzentration (LSD, SD, HSD) auf den metabolischen Phänotyp untersucht werden. Dabei wurden die DGRP Linien zunächst auf dem kalorienarmen Futter (LSD) angezogen und dann auf die unterschiedlichen Futtersorten (LSD, SD oder HSD) übertragen, um den Einfluss auf den Metabolismus durch den Kaloriengehalt der Futter zu verstärken. Als Ergebnis wurden DGRP Linien identifiziert, die prominente Unterschiede in der metabolischen Antwort auf die Futtersorten zeigten (siehe Ergebnisse Abbildung 2.8 und 2.9). Jedoch wurde auch festgestellt, dass bei dem Futterwechsel von niedrigem Kaloriengehalt (LSD) zu dem Futter mit dem höchstem Kaloriengehalt (HSD) nicht immer der erwartete Anstieg der Metabolitmengen in den einzelnen DGRP Linien erfolgte (siehe beispielsweise Ergebnisse Abbildung 2.9 D, Anhang Abbildung A.2 und A.4 A und B). Da das HSD einen sehr hohen Saccharosegehalt von 1 M (entspricht 34,2 g auf 100 mL) hat, wirkt sich dies auch auf die Konsistenz und den Wassergehalt des Futters aus. Um auszuschließen, dass die Fliegen aufgrund des mangelnden Wasserangebots osmotischem Stress ausgesetzt sind und es somit zu einem negativen Effekt auf die Metabolitmengen kommt, wurde ein erstes Experiment mit einer zusätzlichen Wasserquelle im HSD durchgeführt. Dabei wurde eine Pipettenspitze mit 1 % Agar gefüllt und im HSD nahe der Futteroberfläche platziert (siehe Methoden Abschnitt 4.10). Dadurch war es den Fliegen jederzeit möglich auf die zusätzliche Wasserquelle zurückzugreifen. Für diesen Versuch wurden DGRP Linien ausgewählt, die bezogen auf die Glykogenmengen unterschiedlich auf den Wechsel vom LSD zum HSD reagiert haben (siehe Anhang Abbildung A.4 A und B, rote Markierungen). Die Fliegen wurden auf LSD angezogen und danach entweder auf LSD, HSD oder dem HSD mit der zusätzlichen Wasserquelle übertragen und anschließend die Mengen des Glykogens der sechs Tage alten Fliegen bestimmt (siehe Methoden Abschnitt 4.5.4). Bei dieser Analyse wurde jedoch festgestellt, dass die zusätzliche Wasserquelle keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Glykogenmengen im Vergleich zum einfachen HSD hat (siehe Anhang Abbildung A.4 C und D). Ein ähnlicher Versuch von T. Bass *et al.*<sup>[16]</sup> bestätigt diese Beobachtung. In dieser Studie wurde untersucht, ob eine zusätzliche Wasserquelle in Futtern mit hohen Nährstoffkonzentrationen die Fertilität und Lebensspanne einer wildtypischen *Drosophila* Linie positiv beeinflussen kann. Auch hier konnte das zusätzliche Angebot von Wasser keinen Effekt erzielen<sup>[16]</sup>. Demnach müsste weiterhin noch getestet werden, ob die festere Konsistenz des HSDs die Futterraufnahme erschwert und dadurch niedrigere Metabolitmengen gespeichert werden können. Mögliche Methoden wären hier die Markierung der Futterbestandteile mit Radioisotopen<sup>[80]</sup>, die kolorimetrische Bestimmung der Futterraufnahme<sup>[66]</sup> oder die Beobachtung der Rüsselkontakte der Fliegen mit dem Futter (engl. *proboscis extension*, PE)<sup>[223]</sup>.

In dieser Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass sich *Drosophila* als experimentelles Modell zur Untersuchung von Nahrungseinflüssen auf den metabolischen Phänotyp eignet. Die verschiedenen Nahrungsbedingungen bewirken dabei prominente Änderungen in den metabolischen Antworten

der DGRP Fliegenlinien. Generell ist zu sagen, dass die Nahrungsqualität und -quantität, neben Effekten auf den metabolischen Phänotyp, auch weitere Eigenschaften, wie beispielsweise die Reproduktion oder Lebensspanne von multizellulären Organismen beeinflusst<sup>[48,190]</sup>, wobei die limitierten Ressourcen aus der Nahrung an die unterschiedlichen Destinationen aufgeteilt werden müssen. Ein genaueres Verständnis dieser Prozesse könnte dazu beitragen, die grundlegenden Mechanismen metabolischer Erkrankungen, wie Adipositas oder Typ-2-Diabetes, aufzudecken und die Gesundheit positiv zu beeinflussen. Diverse Studien zur Erforschung von ernährungsbedingten Einflüssen auf den Metabolismus wurden bereits mithilfe von *Drosophila* durchgeführt<sup>[21,141,143]</sup>. Dabei zeigte sich, dass *Drosophila* als experimenteller Modellorganismus dazu geeignet ist, die Pathophysiologie von humanen Erkrankungen - wie Adipositas, Typ-2-Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen oder Hyperglykämie - darzustellen<sup>[31]</sup>. Wie jedoch auch in dieser Studie bestätigt wurde, ist die Ernährung nicht allein an der Ausbildung eines metabolischen Phänotyps beteiligt. Die Frage, welche Faktoren diese unterschiedlichen metabolischen Antworten auslösen, muss in nachfolgenden Studien noch geklärt werden. Als weitere mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Antworten trotz konstanter Rahmenbedingungen (siehe Beschreibung in Ergebnisse Abschnitt 2.2.2) könnten unter anderem auch intrinsische Faktoren, wie genetische Varianten, das Mikrobiom oder das Immunsystem der Individuen, in Betracht gezogen werden.

### Kontribution des Mikrobioms

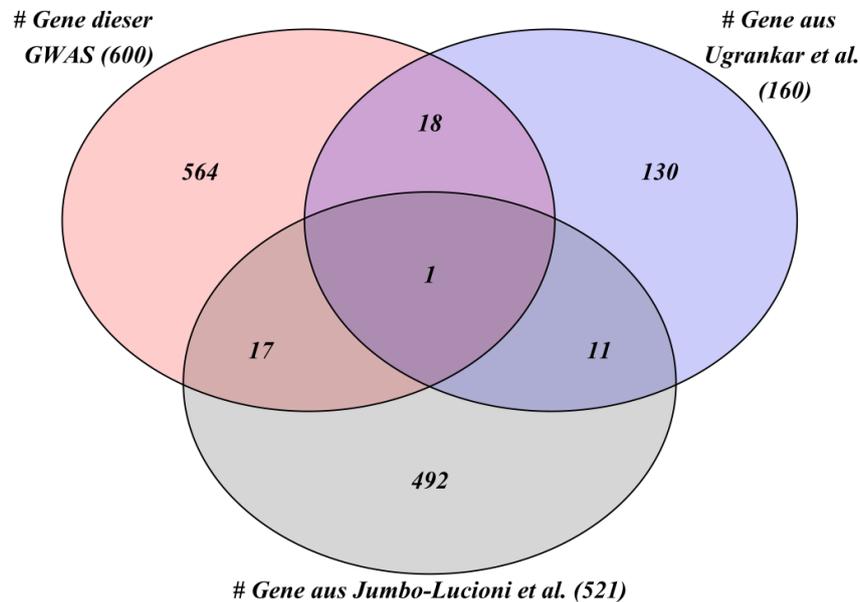
Vor allem das Darmmikrobiom (Bakterien des Darms) ist von besonderem Interesse, da es nachweislich den Metabolismus und die Entwicklung vieler multizellulärer Organismen beeinflusst<sup>[62,134,204,216]</sup>. Ein weiterer Aspekt, der in dieser Studie durch F. Stewart (Institut Mathematische Modellierung biologischer Systeme, AG Systembiologie des Fettstoffwechsels, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) bearbeitet wurde, war demnach die Untersuchung des Darmmikrobioms und dessen Einfluss auf den metabolischen Phänotyp<sup>[106]</sup>. Von vier ausgewählten Repräsentanten der DGRP Linien - mit unterschiedlichen metabolischen Profilen unter basalen und veränderten Nahrungsbedingungen - wurden 16S rRNA-Gen Sequenzierungen durchgeführt<sup>[106]</sup>. Über Korrelationsstudien wurde der Zusammenhang zwischen den metabolischen Messungen der unterschiedlichen Bedingungen und den identifizierten Bakterienspezies getestet. Wie zuvor beschrieben (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.1.3), wurden diverse Korrelationen zwischen den metabolischen Parametern (siehe Anhang Abbildung A.5 A und B) identifiziert. Trotz der geringen Anzahl an verwendeten DGRP Linien für die Sequenzierungen, konnten zudem Korrelationen zwischen verschiedenen Bakterienspezies (siehe Anhang Abbildung A.5 B) sowie zwischen metabolischen Parametern und Bakterienspezies identifiziert werden. Darunter sind beispielsweise die positiven Korrelationen von freier Glucose mit *Lactobacillus homohiochii* bzw. *Lactobacillus pentosus* (siehe Anhang Abbildung A.5 A). Eine Erweiterung dieser Studie durch eine höhere Anzahl an DGRP Linien könnte den Informationsgehalt erhöhen und neue, noch nicht entdeckte Korrelationen hervorbringen. Um genauere Zusammenhänge zwischen dem Mikrobiom und dem metabolischem Profil bzw. die Auswirkungen auf metabolische Antworten gegenüber der Nahrung zu erhalten, sollten demnach weitere Analysen angeschlossen werden. Diese Studien könnten dazu beitragen, den Einfluss des Mikrobioms auf den Metabolismus besser zu verstehen. Frühere Studien haben in diesem Zusammenhang schon gezeigt, dass die Zusammensetzung

des Mikrobioms Signalwege des Wirts beeinflussen und somit ein verändertes Verhalten - beispielsweise in Bezug auf die Entwicklungsrate, die Körpergröße oder das Fressverhalten - sowie einen veränderten Metabolismus in *Drosophila* hervorrufen kann<sup>[186]</sup>. Daher ist es möglich, dass eine bestimmte Mikrobiomzusammensetzung als eine Art ungünstiger Umweltfaktor agiert, der beispielsweise eine erhöhte Kalorienaufnahme verursacht und zudem die Energiespeicher des Wirts beeinflusst<sup>[11,208]</sup>. Dies wiederum hat Einwirkungen auf die Gesundheit des Wirts und kann beispielsweise Adipositas oder Typ-2-Diabetes begünstigen. Die komplexen regulatorischen Zusammenhänge zwischen Mikrobiom, Ernährung und Metabolismus sind jedoch noch weitestgehend unbekannt und müssen weiter untersucht werden. Korrelationsstudien, wie sie beispielsweise in dieser Arbeit durchgeführt wurden, können helfen generelle Gesetzmäßigkeiten aufzuklären und somit Parameterkombinationen zu identifizieren, die Auswirkung auf den Metabolismus haben.

### 3.1.3. Die genetische Kontribution

Die genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) ermöglichten die Identifikation von genetischen Variationen, die mit den metabolischen Merkmalen unter basalen und veränderten Nahrungsbedingungen assoziiert waren (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.3). Die SNPs befanden sich dabei sowohl in Regionen zwischen Genen oder in Introns, als auch in codierenden Bereichen (Exons). Da bereits in früheren Veröffentlichungen der Einfluss von Punktmutationen in nichtcodierenden Bereichen gezeigt wurde<sup>[35,145]</sup>, lag der Fokus dieser Studie nicht ausschließlich auf SNPs in codierenden Bereichen, sondern auch auf SNPs in Introns. Unter den Gen-assoziierten SNPs wurden diverse Gene identifiziert, denen ein metabolischer Phänotyp durch Perturbationen der Gene nachgewiesen werden konnte und die somit einen Beweis für die Robustheit der angewandten Methode liefern (engl. sogenanntes *proof-of-principle*). Darunter sind zum Beispiel die Gene *retinal homeobox*<sup>[210]</sup> oder *melted*<sup>[199]</sup>. Zwischen den basalen und den veränderten Nahrungsbedingungen konnten gemeinsame SNPs und SNP-assoziierte Gene identifiziert werden, die unter beiden Bedingungen signifikant mit den metabolischen Merkmalen assoziiert sind. Insgesamt waren es jedoch nur sechs SNPs und 32 SNP-assoziierte Gene. Die geringe Überschneidung deutet darauf hin, dass unter den beiden Bedingungen unterschiedliche Gene von Bedeutung sind. Dies konnte bereits auch in anderen Studien gezeigt werden, die den Einfluss des Nährstoffangebots auf die metabolischen Gene uni- und multizellulärer Organismen untersucht haben<sup>[127,128,228]</sup>. Auch andere Studien von verschiedenen Forschungsgruppen haben die DGRP Linien für Untersuchungen von Phänotyp-Genotyp Interaktionen im Hinblick auf metabolische Parameter genutzt<sup>[108,211]</sup>. Ein Vergleich mit den Ergebnissen ist jedoch, wie in dieser Studie gezeigt wurde, aufgrund der Unterschiede in der Futterzusammensetzung schwierig. Beispielsweise wurde in der Studie von Jumbo-Lucioni *et al.* ein Maismehl-Molasse-Hefe-Agar Medium verwendet<sup>[108]</sup>, wobei die genaue Zusammensetzung des Futters nicht angegeben wurde. Das Standardfutter dieser Studie ist etwas komplexer und enthält weitere bzw. andere Komponenten, wie Sojamehl statt Maismehl (siehe Methoden 4.2.1). Dennoch konnten einige SNP-assoziierte Gene identifiziert werden, die auch in Studien von Jumbo-Lucioni *et al.*<sup>[108]</sup> und Ugrankar *et al.*<sup>[210]</sup> detektiert wurden (siehe Abbildung 3.1 und Anhang Tabellen A.3 und A.4). Darunter befinden sich Gene, die bereits mit metabolischen Parametern assoziiert werden konnten (wie beispielsweise *ptp99a*, *rx*

oder *fbp1*), aber auch Gene denen vorher noch keine metabolische Funktion nachgewiesen wurde. Die Überschneidungen zwischen den unterschiedlichen Studien und dieser Studie sind jedoch verhältnismäßig gering (siehe Abbildung 3.1), wie aufgrund der schon erwähnten Schwierigkeiten durch die Futterzusammensetzung.



**Abbildung 3.1.:** Relationen der SNP-assoziierten Gene unterschiedlicher metabolischer Studien. Das Venn-Diagramm zeigt die Überschneidungen von Genen dieser Studie (unter basalen und veränderten Nahrungsbedingungen) mit den Ergebnissen der Studien von Jumbo-Lucioni *et al.*<sup>[108]</sup> und Ugrankar *et al.*<sup>[210]</sup>.

Dennoch konnte ein Gen ermittelt werden, dass in allen drei Studien identifiziert wurde. Es handelt sich hierbei um das Gen *longitudinals lacking* (Abk.: *lola*). Lola agiert als Transkriptionsfaktor, der unter anderem das Wachstum von Axonen und die axonale Wegfindung reguliert. Beispielsweise führen Mutationen des Gens *lola* zu Defekten in der Entwicklung von Axonen im zentralen Nervensystem von *Drosophila* Embryonen<sup>[53,82]</sup>. Bisher konnte *lola* jedoch noch nicht mit metabolischen Funktionen assoziiert werden.

Ob die SNP-assoziierten Gene tatsächlich eine Rolle in metabolischen Prozessen spielen oder ob sie robuste falsch-positive Ergebnisse darstellen, muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Daher wurde als Startpunkt ein erster Pilotversuch aufgebaut, um den generellen Einfluss der identifizierten SNP-assoziierten Gene auf den Metabolismus zu untersuchen. Dafür wurden Perturbationsstudien mittels RNAi und GAL4/UAS-System durchgeführt (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.3.1). Durch das GAL4/UAS-System kann eine zeitliche und räumliche Expression der Gene ermöglicht werden. Dabei bindet das Protein GAL4 spezifisch an die UAS (engl. *Upstream Activating Sequence*) Region, hinter der das Gen von Interesse kloniert ist (siehe auch Methoden Abschnitt 4.8). In Verbindung mit RNAi ist es zudem möglich einen Gen-Knockdown auszulösen. Dabei bewirkt das GAL4/UAS-System die Expression eines RNAi-Konstruktes, was wiederum zur Degradation der mRNA des Zielgens führt. Bei den Genen *sNPF* und *lrp1* wurden in der GWAS Assoziationen mit Triglyceriden, Glycerol und Glucose identifiziert, die in diesem Versuchsaufbau jedoch nicht bestätigt werden konnten. Der Einfluss des Futters könnte dabei eine größere Rolle spielen, welches eine nachweisliche Auswirkung auf metabolische Gene haben

kann<sup>[127,128,228]</sup>. Die Assoziationen aus der GWAS wurden unter veränderten Nahrungsbedingungen (LSD oder HSD) ermittelt. In diesem experimentellen Aufbau entwickelten sich die Fliegen jedoch auf Standardfutter. Auch der vorhergesagte Einfluss von *ptp99A* auf die Proteine und die von Ugrankar *et al.* ermittelte Assoziation mit dem Glucose-Metabolismus<sup>[210]</sup> konnten nicht mit Sicherheit bestätigt werden (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.3.1). Ein Grund könnte die beobachtete reduzierte Vitalität der Fliegen (vor allem der Männchen, Daten nicht gezeigt) durch den aktivierten ubiquitären Knockdown sein. Die Auswirkungen von Sequenz-unabhängigen Nebeneffekten durch RNAi auf die Lebenszeit der Fliegen wurden schon in anderen Studien berichtet<sup>[6]</sup>. Einige Gen-Knockdowns, wie zum Beispiel von *rx* oder *glut1*, zeigten keinen oder nur einen geringen Einfluss auf metabolische Parameter. Um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, die beispielsweise durch unzureichende Expression des RNAi Transgens hervorgerufen werden<sup>[95]</sup> und somit einen nicht effektiven Knockdown des Zielgens bewirken, sind Folgeexperimente nötig. Eine mögliche Vorgehensweise wäre die Untersuchung der Transkriptlevel des Zielgens via quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), die durch den Knockdown reduziert sein sollten.

In der GWAS wurde eine Assoziation von SNPs des Gens *slif* mit Glykogen identifiziert. Außerdem haben frühere Studien gezeigt, dass *slif* an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt ist<sup>[90]</sup>. Diese Daten konnten durch die RNAi Studien bestätigt werden (siehe Ergebnisse Abbildung 2.11). Weitere Experimente zur Validierung der Ergebnisse der RNAi Studien sind jedoch notwendig. Beispielsweise konnte durch die Analyse der Knockdown-Effizienz in anderen Publikationen gezeigt werden, dass über 90 % der *in vivo* Linien aus öffentlich zugänglichen RNAi Ressourcen verbleibende Geneexpressionen von 25 % und mehr aufweisen<sup>[159]</sup>. Somit kommt es durch RNAi oft nur zur Ausbildung von hypomorphen Phänotypen. Weiterhin muss beachtet werden, dass ein SNP allein meist nicht die Ursache für einen Phänotyp ist. Viele SNPs befinden sich in nicht-codierenden Bereichen oder haben keinen Effekt auf die Aminosäuresequenz. Die Kombinatorik von mehreren SNPs in codierenden und nicht-codierenden Bereichen kann zur Veränderung des Phänotyps beitragen oder sogar Krankheiten, wie im Fall von Osteoporose begünstigen<sup>[191]</sup>. Um die Effizienz des Knockdowns zu erhöhen bzw. Nullallele zu generieren oder kombinatorische Effekte von genetischen Varianten zu untersuchen, können funktionelle Charakterisierungen durch das CRISPR/Cas-System durchgeführt werden. Dieses System konnte in viele Studien zur Mutagenisierung von Genen in *Drosophila* erfolgreich angewandt werden<sup>[18,86,184,227]</sup>. Es muss jedoch weiterhin beachtet werden, dass SNPs nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer *loss-of-function* Mutation führen. Beispielsweise können SNPs auch nur einen partiellen Verlust der Genfunktion (hypomorph) hervorrufen oder neue Funktionen (neomorph) bzw. verstärkte (hypermorphe) oder sogar gegenteilige (antimorphe) Effekte auslösen<sup>[93]</sup>.

### 3.2. Teil 2 - Studien zur Ressourcenallokation mithilfe eines metabolischen Modells

Das larvale Stadium von *Drosophila* ist durch eine starke Zunahme des Gewichts (um das 200-fache<sup>[3,49]</sup>) und der Größe durch konstante Nahrungsaufnahme geprägt. Dies ist ein notwendiger Prozess, um die benötigten Ressourcen für die Metamorphose zu akkumulieren und das adulte Stadium zu erreichen<sup>[3,49]</sup>. Die larvale Entwicklung unterliegt dabei strengen biologischen Limi-

tierungen, wie beispielsweise metabolischen Anforderungen, die erreicht werden müssen, um die vollständige Entwicklung zu gewährleisten. Eine dieser Limitierungen beschreibt beispielsweise das kritische Gewicht (engl. *critical weight*)<sup>[177]</sup>. Hierbei muss ein minimaler Schwellenwert erreicht werden, um die Verpuppung durchführen zu können. Wird dieser Schwellenwert nicht erreicht, kommt es zum frühzeitigen Tod der Tiere. Wie das kritische Gewicht, also der Zeitpunkt ab dem weiteres Füttern nicht mehr die Verpuppung beeinflusst, definiert und eingestellt wird, ist noch weitestgehend unbeantwortet. Bekannt ist jedoch, dass die Detektion des Ernährungszustandes von der Aktivität des TOR (engl. *target of rapamycin*) Signalwegs im Fettkörper abhängig ist<sup>[119]</sup>. Unter schlechten Ernährungsbedingungen kommt es zur TOR-vermittelten Reduktion des Insulin/IGF Signalwegs (IIS)<sup>[51]</sup> und damit zu einer Verringerung der Insulin-ähnlichen Signalpeptide (engl. *insulin-like peptides*), die wiederum den Insulinrezeptor (InR) aktivieren und durch die damit aktivierten Signaltransduktionskaskaden unter anderem das Wachstum steuern<sup>[81]</sup>. Trotz dieser Limitierungen können die Larven auf Variationen in der Umwelt reagieren. Beispielsweise kann die Zeit zum Erreichen eines minimalen Gewichts oder bestimmter Metabolitmengen unter schlechten Nahrungsbedingungen verlängert werden. Auch dies erfolgt über den TOR Signalweg. Unzureichende Nahrungsbedingungen resultieren, wie bereits erwähnt, in einer Reduktion der TOR Signalaktivität, welche zusätzlich die Produktion von Steroidhormonen verringert<sup>[119]</sup>. Die Hormone sind jedoch für den Übergang zwischen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien notwendig<sup>[203,224]</sup> und eine Reduktion führt demnach zu einer Verzögerung des Entwicklungsprogramms, wodurch das angestrebte kritische Gewicht erreicht werden kann<sup>[119]</sup>. Neben der Anpassung der Wachstumszeit können die Larven auch die relativen Metabolitmengen variieren (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.2 und Abbildung 1.2). Demnach werden die Ressourcen aus der Nahrung je nach Umweltbedingungen und Anforderungen an die jeweilige Lebenssituation verteilt, um alle Bedürfnisse für die Entwicklung abzudecken.

Dieses Verhalten zeigte sich auch in den initialen Untersuchungen der *Drosophila* Larven auf unterschiedlichen Futtersorten. Die Tiere entwickelten sich hierbei auf LSD, SD oder dem chemisch definierten Futter (engl. *holidic diet*, HD). Das LSD und SD sind komplexe Hefe-Futter, die sich in der Zusammensetzung und im Zucker zu Hefe Verhältnis unterscheiden. Das SD hat im Gegensatz zum LSD ein hohes Zucker:Hefe Verhältnis (2,8:1), wobei das LSD einen hohen Anteil an Hefe und weniger Zucker enthält (Zucker:Hefe Verhältnis ist hier 1:1,5). Der Kaloriengehalt unterscheidet sich zwischen den Futtersorten wiederum kaum (54 bzw. 60 kcal; siehe Ergebnisse Tabelle 2.1, 2.2 und Methoden Abschnitt 4.2). Diese komplexen Hefe-Futter dienen als Vergleich zum HD. Zwischen dem SD und LSD wurden keine Unterschiede in der Entwicklungszeit festgestellt (siehe Ergebnisse Abbildung 2.12 A). Das HD ist jedoch ein Minimalmedium<sup>[161]</sup> und das Erreichen des Puppenstadiums war um drei Tage verlängert, um das erforderliche Gewicht zu erreichen (siehe Ergebnisse Abbildung 2.12 A und B). Das auch die Ressourcenallokation beeinflusst ist, wurde hier deutlich. Die Mengen an Triglyceriden waren gegenüber den anderen Futtersorten erhöht, wobei die Glykogenmengen verringert waren (siehe Ergebnisse Abbildung 2.12 C und D). Dies zeigt, dass je nach Futter eine Anpassung der Entwicklungsstrategie möglich und nötig ist.

Um die Metamorphose erreichen zu können, durchlaufen die *Drosophila* Larven ein stereotypes Entwicklungsprogramm, das durch eine massive Größen- und Gewichtszunahme und dem Anlegen großer Mengen energiereicher Speichermetabolite geprägt ist<sup>[137]</sup>. Die Tiere müssen dabei die

aufgenommenen Ressourcen so verteilen, dass auch konkurrierende Bedürfnisse, wie beispielsweise das Wachstum und die Metabolitspeicherung, balanciert werden. Dabei verfolgen sie stets ein klares Ziel: Wachstum. Aus diesen Gründen bietet sich das larvale Entwicklungsstadium von *Drosophila melanogaster* für Studien der Ressourcenallokationen an.

### 3.2.1. *FlySilico* 1.0 - Ein metabolisches Modell von *Drosophila*

Die Rekonstruktion eines metabolischen Modells von Eukaryoten ist im Gegensatz zu einzelligen Organismen aufgrund der höheren Komplexität, der Vielzahl an Kompartimenten und der meist fehlenden Informationen in Bezug auf die detaillierten biochemischen Reaktionen, wie beispielsweise die Reversibilität, schwieriger<sup>[156]</sup>. Vor allem aber die Formulierung einer Zielfunktion ist in multizellulären Organismen durch die vielen Freiheitsgrade, d. h. vielfältigere physiologische Funktionen (bspw. Reproduktion, Bewegung, Nahrungsaufnahme) im Gegensatz zu einzelligen Organismen, die als klares Ziel das Wachstum anstreben, weitaus herausfordernder. Dennoch konnte in dieser Studie das larvale Stadium von *Drosophila* als ein geeignetes System zur Untersuchung der Ressourcenallokation identifiziert werden, da auch die Larven als Ziel das Wachstum, unter Berücksichtigung der Balance zwischen konkurrierenden Parametern (wie Wachstum und Metabolitspeicherung), verfolgen (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.2 und Diskussion voriger Abschnitt).

Die Rekonstruktion eines dynamischen Modells zur Untersuchung dieser Prozesse wäre durchaus von besonderem Interesse gewesen, um beispielsweise die zeitliche Entwicklung in Bezug auf den Metabolismus und somit die Ressourcenallokation zu verfolgen. Im späteren Verlauf wäre es zudem wünschenswert gewesen, das dynamische Modell zu nutzen, um die Verbindungen zwischen Parametern, die einen Einfluss auf die Ressourcenallokation haben - wie beispielsweise die Ernährung, den Metabolismus oder das Mikrobiom - zu untersuchen. Aufgrund fehlender kinetischer Informationen konnte dieses Vorhaben jedoch nicht realisiert werden. Daher wurde nach einer Analyseverfahren für metabolische Netzwerke gesucht, die mit einer geringeren Menge an Informationen auskommt. In den letzten Jahren haben sich vor allem *constraint-based models*, wie zum Beispiel *flux balance analysis* (FBA), etabliert<sup>[112,154,169]</sup>. FBA benötigt keine kinetischen Informationen, sondern basiert einzig auf dem Wissen über die Reaktionen und deren Metabolite sowie den Genen, die für die Enzyme des metabolischen Modells kodieren. Mithilfe von FBA wurden bereits metabolische Modelle von unizellulären<sup>[71,140,171]</sup>, aber auch von multizellulären Organismen<sup>[60,138,164,189]</sup> rekonstruiert und analysiert. Vor allem bei den multizellulären Organismen findet FBA immer größere Anwendungen und wird zur Vorhersage metabolischen Verhaltens, wie dem Wachstum<sup>[32,151]</sup>, der ATP- bzw. Biomasseproduktion<sup>[32,69,164]</sup> oder der Vorhersage von Phänotypen mittels Gen-Knockout Studien<sup>[189]</sup> genutzt. Beispielsweise wurden in der Veröffentlichung von Nilsson *et al.*<sup>[151]</sup> Simulationen zur menschlichen Entwicklung in Bezug auf die Vorhersage des Wachstums von Neugeborenen mithilfe eines metabolischen Modells aus einer Publikation von Mardinoglu *et al.*<sup>[131]</sup> und später durch das humane *RECON3D* Modell<sup>[32]</sup> durchgeführt. Die Vorhersagen der Modelle, in Hinsicht auf das metabolische Verhalten, sind dabei oft konsistent mit den experimentellen Daten<sup>[32,67,151]</sup>.

Von *Drosophila melanogaster* wurden bereits zwei FBA Modelle erstellt. Ein computergeneriertes,

genomweites Modell<sup>[20]</sup>, welches entsprechend nicht kuratiert ist und viele redundante Reaktionswege enthält und ein weiteres metabolisches Modell, dass zur Untersuchung von Hypoxie und ATP-generierenden Prozessen etabliert wurde<sup>[52,68,69]</sup>. Da der Fokus dieser Studie nicht auf ATP-generierende Prozesse lag und zudem von J. Schönborn gezeigt wurde, dass es sich bei dem computergenerierten Modell um ein Perpetuum mobile handelt, welches die Biomasseproduktion ohne jegliche Aufnahme von Nährstoffen vorhersagt<sup>[182]</sup>, wurden diese Modelle nur als Orientierung zum Aufbau eines neuen Modells genutzt. Als Ausgangspunkt wurde ein metabolisches Netzwerk rekonstruiert und kuratiert, wobei besonders auf die Vollständigkeit der Reaktionswege zur Verstoffwechslung von Komponenten des *Holidic Diets* (HD) geachtet wurde, da auf Grundlage dieses Futters die Modellvalidierung durchgeführt werden sollte. Das *FlySilico* Modell ist mit seinen 363 Reaktionen und 293 Metaboliten zwar weitaus kleiner als das computergenerierte, genomweite Modell von *Drosophila* (6198 Reaktionen und 2873 Metabolite)<sup>[20]</sup>, dennoch konnten mit *FlySilico* die Wachstumsraten und metabolischen Antworten unter verschiedenen Nahrungsbedingungen vorhergesagt werden (siehe Ergebnisse Abbildungen 2.22, 2.24). Zur Generierung der benötigten Metabolite zur Biomasseproduktion und somit zum Wachstum (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.6.2 - Entwicklung der Biomasse-Zielfunktion) wurden die Kernreaktionswege zur Produktion von Kohlenhydraten, Energie und Lipiden eingefügt (Citratzyklus, Glykolyse, Glycerolipidmetabolismus usw.). Außerdem wurden Transportreaktionen und Reaktionswege zur Produktion der hier gemessenen Metabolite (siehe Methoden Abschnitt 4.5 und 4.14), sowie zur Aufnahme und Verstoffwechslung der Bestandteile des HDs hinzugefügt. Komplexe und undefinierte Futterbestandteile erschweren die Identifikation der Nährstoffe, die in das biologische System sowie in das metabolische Modell gehen können. Durch das chemisch definierte Futter ist klar bestimmbar, welche Nährstoffe aufgenommen werden können. Da das HD ein Minimalmedium ist<sup>[161]</sup>, müssen alle Nährstoffe zur Lebenserhaltung in den Organismus gehen. Auf Grundlage von metabolischen Daten durch absolute biochemische Quantifizierungen und GC-MS Messungen, sowie durch die Aufnahme von verschiedenen Wachstumsparametern (Größe und Gewicht) der Larven, konnten die Modellparameter von *FlySilico* definiert werden. Dadurch war es möglich die optimale Wachstumsrate des Modells an die experimentelle Wachstumsrate anzupassen und diese Basis als Ausgangspunkt für die Prädiktion der metabolischen Antwort unter veränderten Bedingungen zu nutzen.

### 3.2.2. Die biologische Komposition von *Drosophila* Larven

Zur Etablierung und Validierung des *FlySilico* Modells wurden Wachstumsparameter und metabolische Daten von *Drosophila* Larven an drei unterschiedlichen Zeitpunkten (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage) der Entwicklung ermittelt. Der Wassergehalt der Larven entspricht im Mittel rund 86 % (96 h: 86 %, 132 h: 88 %, 168 h: 84 %) und macht den größten Anteil des Gesamtgewichts aus (siehe Ergebnisse Abbildung 2.17 C und 2.21 A). Dies konnte auch in einer Studie von Pierce *et al.* gezeigt werden, in welcher der Wassergehalt von wandernden L3 Larven auf Bananen-Zuckersirup-Futter im Durchschnitt 78,4 % betrug<sup>[160]</sup>. Der Unterschied in dem durchschnittlichen Wassergehalt zwischen den Studien könnte durch die unterschiedlichen Futtersorten oder dem Alter der Larven hervorgerufen sein. Dass die Ernährung und das Alter einen nachweislichen Effekt auf den Wassergehalt haben, zeigt sich beispielsweise auch

im humanen Organismus. Der Wassergehalt unterscheidet sich hier zwischen Neugeborenen (ca. 78 %) [77,78] und Erwachsenen (ca. 65 %) [77] und ist außerdem abhängig von der Lebensweise, Ernährung und Wasseraufnahme des Individuums. Der hohe Wassergehalt von Organismen ist darin begründet, dass Wasser zur Aufrechterhaltung unterschiedlicher Körperfunktionen benötigt wird. Es dient hierbei unter anderem als primärer Baustein der Zellen, als essentielles Molekül zur Aufrechterhaltung der Funktionen diverser Metabolite [45], als Lösungsmittel für wasserlösliche Moleküle oder bei homoiothermen Organismen als Temperaturregler durch Transpiration.

Die restliche Masse der Larven wird durch das Trockengewicht bestimmt, was wiederum aus den verbleibenden Komponenten (Metabolite, Nukleinsäuren, Proteine) besteht. Die gezielten metabolischen Messungen und die GC-MS Messungen erklären im Mittel rund 79 % der Trockenmasse der Larven. Dabei wird das Trockengewicht zu einem großen Teil von den Lipiden (im Mittel rund 31 %) und Proteinen (im Mittel rund 38 %) bestimmt (siehe Ergebnisse Abbildung 2.21 B). Die noch fehlenden 21 % beinhalten Substanzen, die nicht gemessen wurden, wie Nukleinsäuren (DNA, RNA), Chitin oder weitere Metabolite, wie beispielsweise Trehalose oder Cholesterol. In anderen multizellulären Organismen wurde gezeigt, dass die Nukleinsäuren rund 6-12 % der Trockenmasse ausmachen können [55], was rund ein Viertel bis die Hälfte der fehlenden 21 % erklären würde. Auffallend ist die Reduktion des erklärten Anteils der Trockenmasse bei einem Alter der Larven von 168 h nach Eiablage (60 % erklärt; vorher: 81 % (96 h) und 95 % (132 h) erklärt; siehe Ergebnisse Abbildung 2.21 B). Die metabolischen Messungen und die GC-MS Messungen zeigen jedoch einen konstanten Anstieg der Metabolite (siehe Ergebnisse Abbildung 2.19 und 2.20). Eine mögliche Erklärung könnte ein Metabolit sein, dass überproportional im Vergleich zu den anderen Metaboliten ansteigt und hier nicht gemessen wurde. Diese Hypothese kann nicht ausgeschlossen werden, solange nicht die restlichen 21 % des Trockengewichts erklärt sind. Dafür müssten weitere metabolische Messungen und Messungen der Nukleinsäuren durchgeführt werden. Die Analysen konnten jedoch dazu beitragen einen Großteil des Gewichts der *Drosophila* Larven zu erklären und dienten somit zur Etablierung des Modells und als Basis zur Entwicklung einer Biomasse-Zielfunktion (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.6).

### 3.2.3. Robustheit und Vorhersagekraft von *FlySilico* 1.0

Mithilfe der experimentell erhobenen Daten der *Drosophila* Larven (metabolische Messungen, GC-MS und Wachstumsparameter) war es möglich das Modell, in Hinblick auf die Aufnahmeraten und die Biomasse-Zielfunktion, zu etablieren (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.6). Dies ermöglichte die Simulation einer biologisch sinnvollen Wachstumsrate, die an die experimentelle Wachstumsrate unter HD Bedingungen angepasst ist ( $\mu_{Sim.} = 0,088 \frac{1}{h}$  im Vergleich zu  $\mu_{Exp.} = 0,0882 \frac{1}{h}$ ). Die Frage stellte sich jedoch, ob das Modell auch grundlegendes biologisches Verhalten der Larven wiedergeben kann. Hierfür wurden von J. Schönborn Robustheitsanalysen durchgeführt [182]. *Drosophila* ist ein Cholesterol-auxotropher Organismus [179] und die Aufnahme von Cholesterol aus der Nahrung ist lebensnotwendig. Eine Entwicklung der Larven ist somit auf Nahrungsquellen ohne Cholesterol [50] oder auf Cholesterol-reduzierten Futtern [41] nicht möglich. Daher wurde Cholesterol in die Biomasse-Zielfunktion aufgenommen und die Simulationen zeigten, wie zu erwarten war, dass ohne Cholesterol keine Biomasse produziert werden kann (siehe Anhang

Abbildung B.1). Auch die essentiellen Aminosäuren sind für die Entwicklung der Larven lebensnotwendig und ohne sie kommt es zu keinem Wachstum, was den Tod der Tiere bedeutet<sup>[30]</sup>. In den Robustheitsanalysen konnte dieses Verhalten ebenfalls simuliert werden. Beispielsweise ist ohne die essentielle Aminosäure Threonin keine Produktion der Biomasse möglich (siehe Anhang Abbildung B.2 A). Andere Metabolite, wie beispielsweise die nicht-essentielle Aminosäure Asparaginsäure, zeigten keinen Einfluss auf das Wachstum (siehe Anhang Abbildung B.2 B). Auch dieses Verhalten wurde in einer Studie zur Etablierung des *Holidic Diets* experimentell belegt<sup>[161]</sup>. Somit ist das *FlySilico* 1.0 Modell in der Lage grundlegende biologische Prozesse wiederzugeben.

Um die Vorhersagekraft des Modells zu testen, wurden Simulationen mit veränderten Eingangsparmetern durchgeführt und mit experimentellen Daten der *Drosophila* Larven verglichen (siehe Ergebnisse Abbildungen 2.23, 2.24 und 2.25). Im Gegensatz zu den veränderten Mengen an essentiellen Aminosäuren, kam es bei der erhöhten Menge an Saccharose zu keinen Auswirkungen auf die Wachstumsrate in den Simulationen (siehe Ergebnisse Abbildung 2.22). Im Vergleich zum basalen HD erhöhten sich die Flussraten teilweise im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel (Glykolyse und Citratzyklus) und, wie zu erwarten war, in den Stoffwechselwegen der Zucker (siehe Abbildung 2.24 A und C). Dies weist auf einen erhöhten Verbrauch der zusätzlichen aufgenommenen Kalorien hin. Auch experimentell hat die erhöhte Menge an Saccharose keinen Einfluss auf die beobachteten Parameter. Das Gewicht und die Größe der Larven ist vergleichbar mit den Larven des basalen HDs und auch in den Metabolitmengen sind kaum Unterschiede erkennbar (siehe Abbildung 2.23 und 2.25). Einzig die Mengen an Glycerol, Glucose und der Proteine zeigen bei 132 h alten Larven eine Reduktion. Dass die erhöhte Zuckerkonzentration im Futter sogar einen negativen Effekt auf die Entwicklung von *Drosophila* ausüben kann, wurde ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt (siehe Ergebnisse Abbildung 2.7). Auch andere Studien belegen eine inhibitorische Wirkung erhöhter Zuckermengen auf die Entwicklung von *Drosophila*<sup>[158]</sup>. Die Simulationen mit erhöhten Mengen an essentiellen Aminosäuren zeigten, wie auch unter den erhöhten Zuckermengen beobachtet, erhöhte Flussraten im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel und im Stoffwechsel der Zucker (siehe Abbildung 2.24 A und C). Allerdings sind die Raten hier niedriger im Vergleich zur doppelten Menge an Saccharose. Dies kann daran liegen, dass die aufgenommenen Aminosäuren zunächst über mehrere Reaktionsschritte in Glucose umgewandelt werden müssen, um im Kohlenhydratstoffwechsel metabolisiert werden zu können<sup>[54,178]</sup> und zudem in anderen Reaktionswegen genutzt werden. Saccharose ist ein Disaccharid, dass durch die Invertase (auch Saccharase, Enzym zur Hydrolyse von Saccharose) direkt zu den Einfachzuckern Glucose und Fructose gespalten und im Stoffwechsel der Kohlenhydrate genutzt werden kann<sup>[150,181]</sup>.

Zusätzlich sind im Lipidstoffwechsel Flussraten von Reaktionen zum Aufbau von Lipiden erhöht (siehe Abbildung 2.24 B). Die metabolischen Messungen bestätigen die Simulationsergebnisse. Die Larven auf dem HD mit erhöhten Mengen an essentiellen Aminosäuren speichern mehr Triglyceride als unter den beiden anderen Konditionen. Auch die Mengen an Glucose sind signifikant erhöht, wohingegen die Glykogenmengen nahezu unbeeinflusst sind (siehe Ergebnisse Abbildung 2.25). Eine mögliche Erklärung könnte ein erhöhtes Angebot an freien Fettsäuren durch die erhöhten Flussraten im Lipidstoffwechsel sein, die den Abbau von freier Glucose

hemmen. Dieser Mechanismus wurde schon 1963 von Randle *et al.* als Glucose-Fettsäure-Zyklus beschrieben<sup>[170]</sup>. Durch die erhöhten Mengen an essentiellen Aminosäuren im HD kommt es zudem zu einem Anstieg der Lactatmengen in den Larven. Auch *in silico* konnte dieses Verhalten bestätigt werden. Die Flussraten der Lactatdehydrogenase (LDH-L) sind im Vergleich zu den anderen Futterkonditionen erhöht. Wie zuvor schon in den metabolischen Untersuchungen von wildtypischen *Drosophila* Fliegenlinien gezeigt wurde (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.1.2, 2.1.3), hat Lactat eine wichtige Bedeutung im larvalen Organismus. Die Lebensweise der Larven ist teilweise anaerob<sup>[37]</sup> und zeichnet sich durch konstante Bewegungen aus<sup>[206]</sup>. Lactat dient hierbei als Energiequelle, um die massive Gewichtszunahme (um das 200-fach<sup>[49]</sup>) zu unterstützen<sup>[201]</sup>. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass es mit dem *FlySilico* 1.0 Modell möglich ist sinnvolle Vorhersagen zu treffen und es sich somit als ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Ressourcenallokation in *Drosophila melanogaster* anbietet.

Per Definition folgt die Analyse von biologischen Netzwerken mittels FBA den Prinzipien der Optimalität. Das *FlySilico* 1.0 Modell ist in der Lage biologisch sinnvolle Verhaltensweisen der *Drosophila* Larven wiederzugeben (oben diskutiert). Daher stellen sich am Ende die Fragen, ob die simulierten optimalen Flussverteilungen auch biologisch optimal sind und ob die Verteilung der Ressourcen nach dem Prinzip der Pareto-Optimalität verläuft? Um diese Fragen zu beantworten, können weitere *in vivo* Studien angeschlossen werden. Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Ressourcenverteilung *in vivo* sind beispielsweise metabolische Flussanalysen. Dabei können mithilfe von radioaktiv markierten und mit der Nahrung aufgenommenen Metaboliten - wie Glucose, Fett- oder Aminosäuren - die Verteilung der Metabolite untersucht werden. Erste Studien zur Untersuchung der Pareto-Optimalität im bakteriellen Organismus wurden mittels <sup>13</sup>C-basierten Flussanalysen durchgeführt<sup>[183]</sup>. Auch in *Drosophila* konnten erste Ansätze zu metabolischen Flussanalysen erfolgreich demonstriert werden<sup>[125,126]</sup>.

### 3.2.4. Modellerweiterungen und Optimierungen

Durch die Modellvalidierung (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.7) und erste initiale Experimente zur Untersuchung der Ressourcenallokation (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.8) konnte gezeigt werden, dass das *FlySilico* Modell zum jetzigen Zeitpunkt fähig ist sinnvolle Vorhersagen in Bezug auf grundlegendes biologisches Verhalten von *Drosophila* wiederzugeben. Dennoch ist es möglich durch Modellerweiterungen und -optimierungen das Modell auszubauen und die Präzision in Bezug auf die Ressourcenallokation weiter zu erhöhen. Zudem beinhaltet das *FlySilico* 1.0 Modell Parameter, wie den Korrekturfaktor der Aufnahmeraten oder die benötigten Energiekosten zur Aufrechterhaltung von wachstumsabhängigen und -unabhängigen Prozessen (GAM und NGAM), die nicht an den Organismus der *Drosophila* Larven angepasst sind. Diese Parameter wurden vorerst, aufgrund fehlender Informationen/Experimente, als Approximation zur Durchführung der Modellierung eingesetzt und geben nicht das biologische Verhalten der Larven wieder. In Zukunft wäre es daher wünschenswert diese Parameter mit experimentell ermittelten Daten der Larven zu ersetzen, um die Präzision des Modells zu erhöhen. Welche Modellerweiterungen durchgeführt werden können, soll in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

## Metabolische Reaktionswege

Das *FlySilico* 1.0 Modell beinhaltet zum jetzigen Zeitpunkt 363 Reaktionen, wovon rund 17 % Austauschreaktionen und 6.7 % blockierte, unbalancierte oder sogenannte *Dead-end* Reaktionen sind. Um die Austauschreaktionen zu minimieren und die unausführbaren Reaktionen zu eliminieren, könnten Erweiterungen des Modells von Vorteil sein, da viele Informationen durch ungenau definierte oder unvollständige Reaktionswege verloren gehen. Chemische Substanzen, die vom Modell zur Zeit nicht metabolisiert werden können, werden durch die Austauschreaktionen exportiert. Zusätzliche Reaktionswege könnten diese Metabolite nutzen und mit anderen Reaktionsmodulen verbinden. Dadurch wäre es möglich die Präzision des Modells zu erhöhen.

## Aufnahmeraten

Die Definition von biologisch sinnvollen Aufnahmeraten ist für die Modellierung und Prädiktion von Zielfunktionen (wie beispielsweise der Wachstumsrate) von essentieller Bedeutung. Die Aufnahmeraten sollen dabei die Nährstoffaufnahme aus der Umgebung durch das intestinale System wiedergeben. Zum jetzigen Zeitpunkt konnten die Aufnahmeraten von Larven auf *Holidic Diet* (HD) aufgrund von fehlenden experimentellen Methoden (noch) nicht bestimmt werden. Daher wurde ein theoretischer Ansatz zur Ermittlung der Aufnahmeraten gewählt (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.6.1 und Methoden Abschnitt 4.18). Da der theoretische Ansatz zur Berechnung der Aufnahmeraten davon ausgeht, dass das Mundvolumen der Larven mit jedem Futterkontakt vollständig gefüllt wird und nicht berücksichtigt wird, mit welcher Rate die Futterbestandteile durch die Darmbarriere in den Organismus gehen, war die Definition eines Korrekturfaktors unerlässlich. Dieser wurde durch einen iterativen Prozess aus Simulation der Wachstumsrate im Vergleich zur experimentell bestimmten Wachstumsrate von J. Schönborn ermittelt<sup>[182]</sup>. Dieser Korrekturfaktor beschreibt den prozentualen Wert an Nährstoffen, die effektiv in den Metabolismus der *Drosophila* Larven gehen können. Da nur wenig Daten zur Futtermittelaufnahme und -konversion von *Drosophila* vorhanden sind, wurde zum Vergleich auf Daten von *Lepidoptera* (Schmetterlingen) zurückgegriffen. In verschiedenen *Lepidoptera* wurde die Effizienz der Konversion von aufgenommener Nahrung gemessen und reichte von 2 bis 38 %<sup>[217]</sup>. Mit einem Wert von 12 % liegt der hier ermittelte Korrekturfaktor für *Drosophila* somit innerhalb dieser experimentell erhobenen Daten. Dennoch wäre es von großem Vorteil experimentelle Daten zur Nahrungsaufnahme und -konversion von *Drosophila* Larven zu erheben, um den Korrekturfaktor zu ersetzen und somit die Präzision des Modells zu erhöhen. In adulten Fliegen wurden viele Methoden entwickelt, um die Aufnahme von unterschiedlichen Futtern zu bestimmen. Zu diesen Methoden gehören unter anderem das CAFE System (engl. *capillary feeder*)<sup>[57,105]</sup>, die Markierung der Nahrung mit Radioisotopen<sup>[80]</sup>, kolorimetrische Bestimmungen<sup>[66]</sup> oder die Beobachtung der Rüsselkontakte der adulten Fliegen mit dem Futter (engl. *proboscis extension*, PE)<sup>[223]</sup>. Die kolorimetrische Bestimmung und die Aufnahme der Kontakte der Mundwerkzeuge mit der Nahrung bieten sich im larvalen System nicht an, da diese Methoden zu ungenau sind<sup>[56]</sup> oder nicht für die Larven angewandt werden können. Auch das CAFE System kann in Verbindung mit den Larven nicht verwendet werden, da das Prinzip auf einem Flüssigfutter in Kapillaren beruht<sup>[57,105]</sup>, die nicht als Nahrungsquelle für die Larven geeignet sind. Einzige Methode, die sich für die Untersuchungen der Futtermittelaufnahme anbieten würde, wäre demnach die Markierung

der Nahrung mit Radioisotopen. Diese Methode wurde außerdem als beste und zuverlässigste Anwendung für die Ermittlung der Futteraufnahme in *Drosophila* beschrieben<sup>[56]</sup>.

### Kompartimentierung

*FlySilico* 1.0 besteht aus drei Kompartimenten: (i) dem extrazellulären Raum, (ii) dem Cytosol und (iii) den Mitochondrien. In diesen drei Kompartimenten finden die Reaktionen abhängig von der Lokalisation ihrer Enzyme statt. Beispielsweise sind in Eukaryoten die Reaktionen des Citratzyklus in den Mitochondrien lokalisiert<sup>[73]</sup>. Im *FlySilico* Modell finden die meisten Reaktionen im Cytosol statt. Einzig die Reaktionen des Citratzyklus und einige Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung sind in den Mitochondrien lokalisiert. Die Aufnahme von zusätzlichen Kompartimenten in das *FlySilico* Netzwerk trägt zum Aufbau eines biologisch realistischeren Modells bei und beeinflusst unter anderem die Reaktions- und Transportwege. Durch die zusätzlichen Kompartimente wäre es von essentieller Bedeutung weitere Transportreaktionen einzufügen. Diese könnten wiederum die Allokation von Ressourcen zwischen den Kompartimenten und den Energieverbrauch des Modells beeinflussen. Transportreaktionen können passiv - entlang eines Konzentrations- oder Potentialgefälles und durch Carrier- oder Kanalproteine -, aber auch aktiv - entgegen eines Konzentrations- oder Potentialgefälles und durch aktive Carrier- oder Kanalproteine - unter Energieverbrauch stattfinden<sup>[195]</sup>. In dem letzteren Fall könnten die Ressourcenverteilungen durch zusätzliche Energiekosten beeinflusst werden. Die Aufwendung von Energie für den Transport von Metaboliten ist Teil von wachstumsunabhängigen Prozessen (engl. *non-growth associated maintenance requirements*, NGAM). Sowohl die Energiekosten für wachstumsunabhängige Prozesse, als auch für wachstumsabhängige Prozesse (engl. *growth associated maintenance requirements*, GAM) sind zum jetzigen Zeitpunkt des *FlySilico* Modells nicht an *Drosophila* angepasst. Als Approximation wurden die Werte für GAM aus dem metabolischen Modell iMM904 der Hefe<sup>[138]</sup> und für NGAM aus dem *E. coli* Modell<sup>[154]</sup> entnommen, da die experimentelle Bestimmung aufgrund der Komplexität des Modellorganismus *Drosophila* schwierig erscheint. Im Falle von *E. coli* ist es beispielsweise möglich GAM und NGAM über Wachstumsexperimente im Chemostaten (kontinuierliche Kultur) zu bestimmen<sup>[202]</sup>. Diese Methode ist jedoch für *Drosophila* nicht anwendbar. Zur Bestimmung der GAM könnte daher ein theoretischer Ansatz verfolgt werden, der im Protokoll von I. Thiele *et al.*<sup>[202]</sup> beschrieben wird. GAM beinhaltet unter anderem die Energie, die zur Synthese von Makromolekülen (Proteine, DNA, RNA) gebraucht wird. Zur Bestimmung der benötigten Energie muss zunächst die Gesamtmenge an Makromolekülen im Organismus, entweder über experimentelle Analysen (biochemische Methoden, RNA/DNA-Extraktionen) oder mittels Literaturangaben, ermittelt werden. Von Neidhardt *et al.*<sup>[148]</sup> sind die Mengen an Phosphatbindungen aufgelistet, die zur Synthese von Makromolekülen benötigt werden (allerdings nur für bakterielle Zellen). Die Anzahl der Phosphatbindungen kann mit der Gesamtmenge der Makromoleküle multipliziert werden und ergibt die Werte für die GAM. Wie in I. Thiele *et al.* beschrieben wird, muss beachtet werden, dass dieser theoretische Ansatz zur Unterbestimmung der GAM führt, da weitere wachstumsabhängige Prozesse ATP benötigen<sup>[202]</sup>.

Simulationen von J. Schönborn haben jedoch gezeigt, dass sowohl GAM als auch NGAM zum jetzigen Zeitpunkt einen nur limitierten Einfluss auf die Biomasseproduktion haben<sup>[182]</sup> und erst bei hohen Werten zu einer Änderung der Wachstumsrate beitragen (siehe Anhang Abbildung

B.3 A). Als Vergleich zeigt das metabolische Modell iMM904 der Hefe<sup>[138]</sup> bei geringeren Werten von GAM und NGAM einen Einfluss auf die Wachstumsrate (siehe Anhang Abbildung B.3 B). Demnach könnten verschiedene Hypothesen zur Erklärung dieser Resultate angenommen werden. Eine mögliche Erklärung wären die Unterschiede in der Größe und im Aufbau der Modelle. Das Hefe Modell ist mit 1412 Reaktionen und 1228 Metaboliten weitaus größer als das *FlySilico* Modell mit 363 Reaktionen und 293 Metaboliten. Außerdem ist das Hefe Modell biologisch weitaus präziser in Bezug auf die Kompartimentierung. Es beinhaltet neben den drei Kompartimenten, die auch im *FlySilico* Modell zu finden sind (extrazelluläre Matrix, Cytosol und Mitochondrien), weitere fünf Kompartimente: (i) die Peroxisomen, (ii) das endoplasmatische Retikulum, (iii) den Nukleus, (iv) den Golgi-Apparat und (v) die Vakuolen<sup>[138]</sup>. Aus den oben beschriebenen Gründen, dass der Transport zwischen den Kompartimenten die Energiekosten des Modells beeinflussen kann, könnte auch der Einfluss von GAM und NGAM auf die Wachstumsrate verändert sein.

### Modellierung von Gewebe

Mit Ausblick auf mögliche Erweiterungen dieser Studie wäre es zudem wünschenswert die Ressourcenallokation auch auf gewebespezifischer Ebene zu betrachten, um präzisere Analysen - auch im Hinblick auf den Gesundheitsstatus von multizellulären Organismen - durchführen zu können. Jedes Gewebe führt aufgrund seiner spezialisierten Zellstrukturen unterschiedliche Funktionen aus und spielt demnach in unterschiedlichen krankheitsrelevanten Prozessen eine Rolle<sup>[54,215]</sup>. Beispielsweise wurde in anderen Studien die Darstellung von unterschiedlichen Zelltypen in metabolischen Modellen bereits erfolgreich gezeigt<sup>[26,83,118]</sup>. Das *FlySilico* 1.0 Modell ist zur Zeit Zell- und gewebeunspezifisch und somit biologisch nicht präzise genug, um metabolische Vorgänge und die Allokation von Ressourcen in und zwischen Geweben darzustellen. Als einen ersten Schritt hin zur Modellierung von multiplen Gewebestrukturen wurde getestet, ob es möglich ist mithilfe von Genexpressionsdaten von *Drosophila* Larven, Unterschiede zwischen Geweben darzustellen (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.5.2). Dabei konnten Gene mit ähnlichen Expressionsmustern identifiziert werden, die gewebespezifische Funktionen ausführen. Beispielsweise zeigten der Fettkörper und das Verdauungssystem erhöhte Expressionswerte in der Biosynthese und Degradation von Fetten, wobei die Expressionsmuster dieser Gewebe dabei ein antagonistisches Verhalten widerspiegeln (siehe Ergebnisse Abbildung 2.15). In metabolischen Modellen werden die Zusammenhänge von Genen, Proteinen und Reaktionen mithilfe von Gen-Protein-Reaktions-Regeln (engl. *gene-protein-reaction rules*; GPR) beschrieben. Die mathematische Darstellung erfolgt dabei über boolesche Operatoren, wie *AND* oder *OR*<sup>[38]</sup>. Zwei Gene können beispielsweise einen Enzymkomplex bilden und somit nur in Verbindung funktional sein (*AND*) oder sich gegenseitig inhibieren und damit einander ausschließen (*OR*). Die Reaktionen werden nur katalysiert, wenn die entsprechenden Gene aktiviert oder deaktiviert und damit die GPRs erfüllt sind. Bei der Verknüpfung von Genexpressionsdaten mit dem *FlySilico* Modell wurden die Gen-Protein-Reaktions-Regeln aufgrund fehlender Informationen (noch) nicht angewandt. Auf die Reaktionswege des Modells wurden zur Vereinfachung zunächst nur die mittleren Genexpressionsdaten abgebildet (siehe Methoden Abschnitt 4.17) und sie stellen dadurch nur einen approximierten Wert dar. Da durch die Genexpressionsdaten dennoch Unterschiede in den Geweben identifiziert wurden, wäre die Einbindung von gewebespezifischen Informationen zu Reaktionen, Metaboliten und Genen zur Erhöhung der Präzision wünschenswert. Dadurch könnten neue Einblicke in metabolische

Wechselwirkungen und die Allokation von Ressourcen zwischen unterschiedlichen Geweben in multizellulären Organismen gewonnen werden. Dieses Wissen könnte zudem genutzt werden, um die Gesundheit - zum Beispiel im Hinblick auf metabolische Krankheiten, wie Adipositas oder Typ-2-Diabetes - positiv zu beeinflussen.

### 3.3. Fazit und Ausblick

Alle Organismen benötigen Ressourcen, beispielsweise in Form von Nährstoffen, zur Aufrechterhaltung ihres basalen Metabolismus, dem Wachstum, der Reproduktion und vieler weiterer Prozesse. Die Ressourcen stehen den Organismen dabei nur in limitierter Form zur Verfügung und müssen häufig auf in Konflikt stehende Prozesse aufgeteilt werden. Viele Studien wurden durchgeführt, um die Allokation von Ressourcen und deren Einfluss auf die Physiologie bzw. die sogenannten *Life-History Traits* (wie Wachstum, Reproduktion und Gesundheit)<sup>[23,24,25]</sup> zu verstehen. Die übergeordnete Regulation, die zur Verteilung der Ressourcen führt, ist bis heute jedoch weitestgehend unbekannt und wenig erforscht.

In dieser Arbeit wurden Aspekte der Ressourcenallokation anhand des holometabolen Insekts *Drosophila melanogaster* untersucht. Durch Studien des metabolischen Phänotyps als ein Resultat der Ressourcenallokation war es möglich in wildtypischen Fliegenlinien konkurrierende und nicht-konkurrierende Parameter zu identifizieren und erste Einblicke in die Kontribution von genetischen Varianten und den Nahrungsbedingungen auf das metabolische Profil zu erhalten (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.1 bis 2.3). Mithilfe des metabolischen Modells *FlySilico* 1.0 konnten im weiteren Verlauf dieser Arbeit erste Simulationen zur Ressourcenallokation durchgeführt werden, deren Robustheit mit *in vivo* Analysen von *Drosophila* Larven bestätigt werden konnten (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.4 bis 2.8). Zudem konnte durch diese beiden Teilprojekte gezeigt werden, dass unterschiedliche Verfahren möglich und nötig sind, um die komplexen Einflüsse auf Ressourcenverteilungen, die beispielsweise durch Umgebungsparameter (bspw. Nahrungsbedingungen) und innere Parameter (bspw. Genetik, Mikrobiom) gegeben sind, zu erforschen.

In biologischen Systemen ist die optimale Verteilung von Ressourcen ein essentieller Faktor zur Aufrechterhaltung der evolutionären Fitness, also der Anpassung an Umweltbedingungen, welche durch die Reproduktionsrate geprägt ist. Hierbei wird durch diverse Studien postuliert, dass die Verteilung der Ressourcen zwischen konkurrierenden Parametern durch das Prinzip der Pareto-Optimalität beschrieben werden kann. Dies konnte beispielsweise im bakteriellen Organismus<sup>[183]</sup> und einigen Eigenschaften von multizellulären Organismen<sup>[196]</sup> demonstriert werden. Dennoch konnte die Pareto-Optimalität in biologischen Systemen noch nicht vollständig bewiesen werden<sup>[65]</sup>. Die Organismen stehen außerdem unterschiedlichsten Umweltbedingungen gegenüber, welche einen prominenten Einfluss auf die Ressourcenallokation haben, sodass diese jederzeit den entsprechenden Bedingungen angepasst werden muss. Des Weiteren ist oft nicht bekannt welche Parameter in Konkurrenz zueinander stehen, welche Prinzipien oder molekularen Mechanismen diesen konkurrierenden Parametern zugrunde liegen und welchen Einfluss diese Parameter auf die evolutionäre Fitness ausüben<sup>[15]</sup>. Ein besseres Verständnis dieser komplexen regulatorischen Prozesse würde dazu beitragen, Variationen in metabolischen Phänotypen unter variierenden Umweltbedingungen oder zwischen Individuen zu verstehen. Durch dieses Wissen

könnte es zudem möglich sein, metabolische Flüsse in eine bestimmte Richtung zu kanalisieren, um die Gesundheit - beispielsweise in Hinblick auf metabolische Erkrankungen - positiv zu beeinflussen oder die Produktion von pharmazeutischen oder biotechnologischen Produkten aus Pflanzen oder Bakterien zu steigern. Auch in dieser Studie deuten die Ergebnisse der Modellierung bereits darauf hin, dass die Ressourcenverteilung in multizellulären Organismen unter optimalen Bedingungen abläuft, da per Definition die Analyse von metabolischen Netzwerken mittels FBA auf den Prinzipien der Optimalität beruht. Ob es sich hierbei auch um Pareto-Optimalität handelt und ob die simulierten Verteilungen auch biologisch optimal sind, ist hierbei noch offen und erfordert weitere Untersuchungen. Dabei könnten tiefer gehende Erkenntnisse zur Aufdeckung genereller Prinzipien der Ressourcenverteilung beitragen, die dementsprechend nicht nur eine Relevanz für den Modellorganismus *Drosophila* haben.

## 4. Methoden

### 4.1. *Drosophila melanogaster*: Fliegenstämme und Haltung

In dieser Arbeit wurde mit 35 Fliegenlinien aus dem 40 Linien umfassenden Kernsets (engl. *core set*) des *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel (DGRP) gearbeitet (siehe Materialien Tabelle 5.4). Insgesamt besteht die DGRP Fliegenkollektion aus rund 200 vollständig sequenzierten Inzuchtlinien von *Drosophila melanogaster*. Die DGRPs wurde unter Leitung von Trudy Mackay etabliert<sup>[129]</sup> (siehe Einleitung Abschnitt 1.2.1). Für die Studien dieser Arbeit wurden die Fliegen vor den Experimenten für zwei Generationen mit gleicher parentaler Dichte (15 Männchen und 30 Weibchen pro Fliegenröhrchen) gehalten. Dadurch sollten die Umwelteinflüsse durch variierende Anzuchtbedingungen oder Stress durch eine zu hohe oder niedrige Anzahl an parental Tieren pro Fliegenröhrchen minimiert werden. Für die initiale Untersuchungen von Kandidatengenomen aus der genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.3 und 2.3.1) wurde mit verschiedenen RNAi Fliegenlinien (siehe Materialien Tabelle 5.3) gearbeitet. Alle Fliegenlinien wurden vom Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC) erhalten.

Für die Experimente zur Modelletablierung und -validierung wurde mit der wildtypischen Fliegenlinie Oregon R gearbeitet. Auch diese Linie wurde für die Experimente mit gleicher parentaler Dichte (15 Männchen und 30 Weibchen pro Fliegenröhrchen) auf das chemisch definierte Futter (engl. *holidic diet*, HD) gesetzt, um auch hier die Umwelteinflüsse durch variierende Anzuchtbedingungen und Stress zu minimieren (siehe oben).

Alle Fliegenlinien wurden unter Standardbedingungen (25 °C, 12 h Tag-/Nachtrhythmus und 60-70 % Luftfeuchtigkeit) und auf einem Standardfutter (siehe Abschnitt 4.2.1) gehalten. Die Futterbedingungen wurden entsprechend der verschiedenen Experimente variiert.

### 4.2. Futterrezepte

#### 4.2.1. Standardfutter

Alle Fliegenlinien wurden auf Standardfutter (engl. *standard diet*, SD) gehalten und nur für die entsprechenden Experimente auf andere Futter umgesetzt. Das SD besteht aus 0,5 g Agar, 7,1 g Polenta, 0,95 g Sojamehl, 1,68 g Hefe, 4 g Zuckersirup, 4,5 g Malzextrakt, 0,45 mL Propionsäure und 1,5 mL Nipagin (1:10 verdünnt in 70 % Ethanol) pro 100 mL Futter.

#### 4.2.2. Futter mit veränderten Saccharosekonzentrationen

Für die Experimente mit den DGRP Linien wurde neben dem SD auch ein Futter mit erhöhtem Saccharose-Gehalt (engl. *high sugar diet*, HSD) und ein Zucker-reduziertes Futter (engl. *low sugar diet*, LSD) verwendet (siehe Vergleich in Tabelle 4.1). Diese Futtersorten basieren auf dem semi-definierten Futter von Bloomington<sup>[10]</sup> mit Änderungen der Zuckerkonzentrationen<sup>[141]</sup>. Das Basisfutter enthält (pro 100 mL) 1 g Agar, 8 g Hefe, 2 g Hefeextrakt, 2 g Pepton, 200 µL [1 M]

$MgSO_4$ , 340  $\mu\text{L}$  [1 M]  $CaCl_2$ , 600  $\mu\text{L}$  Propionsäure, 1,5 mL Nipagin und 5,13 g Saccharose für das LSD bzw. 34,2 g Saccharose für das HSD.

**Tabelle 4.1.:** Die Futterrezepte im Vergleich.

Bestandteil (pro 100 mL Futter)	SD	LSD	HSD
Agar	0,50 g	1 g	1 g
Hefe	1,68 g	8 g	8 g
Polenta	7,10 g	-	-
Sojamehl	0,95 g	-	-
Zuckersirup	4,00 g	-	-
Malzextrakt	4,50 g	-	-
Hefeextrakt	-	2 g	2 g
Pepton	-	2 g	2 g
Saccharose	-	5,13 g	34,2 g
$MgSO_4$ [1 M]	-	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
$CaCl_2$ [1 M]	-	340 $\mu\text{L}$	340 $\mu\text{L}$
Propionsäure	450 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$
Nipagin	1,5 mL	1,5 mL	1,5 ml

#### 4.2.3. *Holidic Diet*

Für die Experimente zur Etablierung und Validierung des metabolischen Netzwerks wurde ein chemisch definiertes Minimalmedium (engl. *holidic diet*, HD) von Matthew Piper<sup>[161]</sup> verwendet und nach dessen Angaben hergestellt. Einzige Ausnahme war, dass das Cholesterol erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt wurde, da es sich andernfalls nicht gelöst hat. Es wurde die Hefe-ähnliche Aminosäurezusammensetzung (engl. *Yeast-like amino acid*, Yaa) gewählt. Für die Validierungsexperimente wurde das HD wie folgt verändert: (i) Zugabe der doppelten Menge an Saccharose (HD + 2x Saccharose) und (ii) Zugabe der doppelten Menge an essentiellen Aminosäuren (HD + 2x EAA). Alle Chemikalien und Lösungen, die für das Futter verwendet wurden, sind in Kapitel 5 - Materialien aufgeführt.

#### 4.2.4. Apfelsaftagarplatten

Für die Etablierung eines DGRP-Mix Stammes (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.4 und Methoden Abschnitt 4.11) wurden Apfelsaftagarplatten für die Fliegenkäfige angefertigt. Das Medium (1,36 L) enthält 1 L Wasser, 40 g Agar, 17 g Saccharose, 340 mL Apfelsaft und 20 mL Nipagin (1:10 verdünnt in 70 % Ethanol). Wasser, Agar und Saccharose wurden gemischt und in einer Mikrowelle aufgeköcht bis der Agar vollständig gelöst war. Danach wurde der Apfelsaft hinzugegeben. Nach dem Abkühlen auf unter 60 °C wurde das Nipagin hinzugefügt und der Apfelsaftagar in die Petrischalen gefüllt.

### 4.3. Aufnahme der Entwicklungszeit

Für die Quantifizierung der Entwicklungszeit der DGRP Linien wurden die Fliegenröhrchen jeden Tag zur gleichen Zeit fotografiert bis die ersten Fliegen geschlüpft waren. Basierend auf den Entwicklungszeiten wurden die einzelnen Fliegenlinien in fünf verschiedene Entwicklungsgruppen unterteilt (siehe Ergebnisse 2.1.1).

### 4.4. Probenaufbereitung

#### 4.4.1. Allgemeines Verfahren

Für die biochemischen Messungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, fünf späte L3 Larven und acht adulte Fliegen (Männchen oder Weibchen) pro Probe gesammelt. Die Larven wurden in PBS gewaschen und getrocknet, um Futterreste von der Oberfläche zu entfernen. Die Tiere wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ °C}$  bis zur weiteren Aufbereitung gelagert. Die Homogenisation erfolgte in  $400\ \mu\text{L}$   $0,05\%$  Tween<sup>®</sup>-20 mithilfe einer Keramikugel ( $\varnothing$  7 mm) pro Probe und der Fast Prep FP120 Rüttelzentrifuge (Bio101 Savant). Danach wurden die Proben bei  $70\text{ °C}$  hitzeinaktiviert und zentrifugiert (1 min,  $2400 \times g$ ). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (3 min,  $4\text{ °C}$ ,  $18,8 \times g$ ) und für die entsprechenden Analysen genutzt.

#### 4.4.2. Verfahren für die Experimente der Modelletablierung und -validierung

Für die Experimente zur Unterstützung der Modellierung (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.6 - 2.8) wurden Oregon R Larven an drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage) gesammelt. Die Fliegen wurden mit gleicher parentaler Dichte pro Fliegenröhrchen (15 Männchen und 30 Weibchen) auf das HD gesetzt und für 6 h bei  $25\text{ °C}$  auf dem Futter inkubiert. Dieser kontrollierte Zeitraum sollte sicherstellen, dass genügend Larven für die Experimente gesammelt werden können (ausreichende Eiablage), die sich zudem von der zeitlichen Entwicklung (Zeitpunkt des Schlüpfens) nicht stark voneinander unterscheiden. Pro Zeitpunkt wurden Quadruplikate mit je 25 Larven (96 h) bzw. acht Larven (132 h und 168 h) gesammelt. Die Larven wurden gewaschen, getrocknet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei  $-80\text{ °C}$ . Für die Homogenisation der Larven wurde  $1\text{ mL}$   $0,05\%$  Tween<sup>®</sup>-20 verwendet. Die weitere Vorgehensweise ist identisch zu Abschnitt 4.4.1.

### 4.5. Biochemische Analysemethoden

#### 4.5.1. Triglyceride

Die Quantifizierung der Triglyceride (TAG) wurde mit dem *Triglyceride Reagent* (Thermo Scientific, 981786) durchgeführt. Dabei wurden die Proben unverdünnt oder in einer 1:2 Verdünnung (abhängig vom Homogenisationsvolumen, siehe Tabelle 4.3) in eine Mikrottestplatte (Sarstedt) überführt und  $200\ \mu\text{L}$  des *Triglyceride Reagents* hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 45 min wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen. Zur Bestimmung

der absoluten Mengen diente eine serielle Verdünnung (1:2 mit 0,05 % Tween<sup>®</sup>-20; Startkonzentration: 1,25 mg/mL) eines Glycerolstandards (Sigma-Aldrich, G7793). Als Leerwert diente, wie in allen biochemischen Messungen, 0,05 % Tween<sup>®</sup>-20.

#### 4.5.2. Glycerol

Der Glycerol-Gehalt der Proben wurde mithilfe des *Glycerol Assay Kits* (Sigma-Aldrich, MAK117) gemäß der Anleitung des Herstellers für die fluorometrische Detektion bestimmt. Alle Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Der Glycerolstandard wurde nach den Angaben in Tabelle 4.2 hergestellt.

**Tabelle 4.2.:** Glycerolstandard zur fluorometrischen Bestimmung von Glycerol.

#	Glycerolstandard (1 mM)	Wasser	Endkonzentration (Glycerol)
1	50 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	0,050 mM
2	30 $\mu\text{L}$	970 $\mu\text{L}$	0,030 mM
3	15 $\mu\text{L}$	985 $\mu\text{L}$	0,015 mM
4	7,5 $\mu\text{L}$	992,5 $\mu\text{L}$	0,0075 mM
5	3,8 $\mu\text{L}$	996,2 $\mu\text{L}$	0,0038 mM
6	1,9 $\mu\text{L}$	998,1 $\mu\text{L}$	0,0019 mM
7	0 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	0 mM

#### 4.5.3. Proteine

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurden mithilfe des *Pierce BCA Assay Kits* (Life Technologies, 23225) nach Angaben der Hersteller bestimmt. Zur Bestimmung der absoluten Mengen wurde Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) als Standard in einer seriellen Verdünnung (1:2 mit 0,05 % Tween<sup>®</sup>-20; Startkonzentration: 1 mg/mL) verwendet. Die Verdünnung der Proben war abhängig vom Homogenisationsvolumen (siehe Tabelle 4.3).

#### 4.5.4. Glucose und Glykogen

Für die Messungen von Glucose und Glykogen wurde mit dem *GO Assay Reagent* (Sigma-Aldrich, GAGO20) und einem abgeänderten Protokoll von J. Tennessen gearbeitet<sup>[200]</sup>. Die Proben wurden entsprechend der Angaben in Tabelle 4.3 verdünnt. Der Glucosestandard des *GO Assay Reagents* und ein Glykogenstandard wurden zur Bestimmung der absoluten Mengen verwendet. Zur Erstellung des Glykogenstandards wurde Glykogen (Sigma-Aldrich, G0855) in Wasser gelöst und eine Stammlösung mit 1 mg/mL erstellt. Es wurden 84  $\mu\text{L}$  0,05 % Tween<sup>®</sup>-20 mit 16  $\mu\text{L}$  des Glucose- bzw. Glykogenstandards (je 1 mg/mL) vermischt. Anschließend erfolgte eine serielle 1:2 Verdünnung. Zu 30  $\mu\text{L}$  Glucose- bzw. Glykogenstandard und den Proben wurden zur Bestimmung der freien Glucose 100  $\mu\text{L}$  des GO Reagenzes (siehe Herstellerangaben) zugegeben. Für die Bestimmung der Gesamtglucose wurden 100  $\mu\text{L}$  GO Reagenz mit Amyloglucosidase (Sigma-Aldrich, A1602) hinzugefügt (pro mL GO Reagenz 1  $\mu\text{L}$  Amyloglucosidase). Die Proben wurden bei 37 °C 1 h inkubiert und die Reaktion mit 100  $\mu\text{L}$  12 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgestoppt. Anschließend

wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und der Glykogengehalt durch Subtraktion der freien Glucose von der Gesamtglucose bestimmt.

#### 4.5.5. Lactat

Die absoluten Mengen an Lactat wurden fluorometrisch mit dem *Lactate Assay Kit* (Biovision, K607-100) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proben wurden gemäß Tabelle 4.3 verdünnt. Zur Bestimmung der absoluten Mengen wurde eine Standardreihe nach den Herstellerangaben für die fluorometrische Messung erstellt. Dafür wurde der im *Lactate Assay Kit* enthaltene Lactat-Standard (Konzentration: 100 nmol/ $\mu$ L) verwendet.

#### 4.5.6. Citrat-Synthase Aktivität

Für die Bestimmung der Citrat-Synthase Aktivität wurden fünf Fliegen (Weibchen oder Männchen) in 100  $\mu$ L PBS homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation wurden 20  $\mu$ L der Proben in eine Mikrottestplatte überführt und 200  $\mu$ L eines Reaktionsmixes aus<sup>[137]</sup> hinzugegeben. Der Reaktionsmix besteht aus 100 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 0,1 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB); 0,2 mM Acetyl-Coenzym A und 0,5 mM Oxalessigsäure (engl. *oxalacetic acid*, OAA). Die Proben wurden in einem Zeitraum von 2 min und bei einer Wellenlänge von 412 nm jede Sekunde gemessen (120 Datenpunkte). Die Bestimmung der Citrat-Synthase Aktivität erfolgte durch die Aufnahme der Absorptionsänderung, die durch die Reduktion von DTNB (Sigma-Aldrich, D8130-1G) erfolgte.

$$\text{Citrat - Synthase Aktivität} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}}\right) \cdot V_{\text{Reaktion}}(\text{mL}) \cdot \text{dil}}{\epsilon(\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot L(\text{cm}) \cdot V_{\text{Probe}}(\text{mL})} \quad (4.1)$$

Für die Berechnung der Citrat-Synthase Aktivität wurde die Formel (4.1) verwendet, wo  $\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}}$  die Absorptionsänderung pro Minute beschreibt,  $V_{\text{Reaktion}}$  das Gesamtvolumen der Reaktion (hier: 0,22 mL) ist,  $V_{\text{enz}}$  das Volumen der Probe (0,02 mL) ist,  $\text{dil}$  den Verdünnungsfaktor der Probe angibt und  $L$  die Dicke der Mikrottestplatte (ca. 0,63 cm) ist. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beschreibt die Abschwächung des Lichts durch eine chemische Lösung basierend auf der Weglänge und entspricht einem Wert von  $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei  $\text{TNB}^{2-}$ .

**Tabelle 4.3.:** Verdünnungen für die biochemischen Testverfahren in Abhängigkeit vom Homogenisationsvolumen (1 mL oder 400  $\mu$ L).

biochemisches Verfahren	L3 Larven (1 mL)	L3 Larven (400 $\mu$ L)	adulte Weibchen (400 $\mu$ L)	adulte Männchen (400 $\mu$ L)
TAG	unverdünnt	1:2	1:2	1:2
Glycerol	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt
Protein	unverdünnt	1:2	1:2	1:2
Glykogen	unverdünnt	1:2	1:10	1:3
Glucose	unverdünnt	unverdünnt	1:2	unverdünnt
Lactat	1:50	1:15	1:10	1:10

## 4.6. Quantifizierung der Eiablage

Die Eiablage wurde von vier DGRP Fliegenlinien (Linien 324, 380, 732, 786) mit einem männlichen metabolischen Profil quantifiziert (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.1.4). Dafür wurden die weiblichen Jungfrauen der DGRP Linien gesammelt und zur sexuellen Reifung zwei Tage unabhängig von den Männchen gealtert. Nach den zwei Tagen wurde je ein Weibchen mit zwei Männchen des gleichen Alters der Linie Oregon R vereint. Durch die Nutzung der Oregon R Männchen ist gewährleistet, dass die Variationen in der Eiablage von den Weibchen stammen. Nach 24 h Eiablage wurden die Fliegen in ein neues Fliegenröhrchen umgesetzt und die Anzahl der Eier gezählt. Die Eiablage wurde für vier Tage beobachtet und pro DGRP Linie wurden 15 bis 20 Fliegenröhrchen angesetzt. Der Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt. Als Kontrolllinien dienten zwei DGRP Linien (362, 714), die ein weibliches metabolisches Profil aufwiesen (siehe Ergebnisse Abbildung 2.5 D, grüne Markierungen). Tote Männchen wurden während des Experimentes ausgetauscht, Fliegenröhrchen mit toten Weibchen wurden vom Versuch ausgeschlossen.

## 4.7. Genomweite Assoziationsstudien

Durch eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP) detektiert, die signifikant mit einem metabolischen Merkmal assoziiert waren. Diese Studien wurden mithilfe eines web-basierten Tools speziell für die DGRP Fliegenlinien (<http://dgrp2.gnets.ncsu.edu/>) durchgeführt<sup>[99,129]</sup>. Die Liste der signifikant-assoziierten SNPs wurde mit einem Signifikanzwert (P) von mindestens  $P < 10^{-5}$  gefiltert, sodass nur die statistisch signifikantesten Treffer übrig blieben. Eine Liste mit den identifizierten SNPs und den SNP-assoziierten Gene ist im Anhang in Tabelle A.2 auf der beigefügten CD zu finden. Die *Manhattan-Plots* wurden mit dem R Paket „*qqman*“ (R core team 2014; Version 3.3.1) erstellt<sup>[209]</sup>.

## 4.8. Ubiquitärer Gen-Knockdown mittels GAL4/UAS-Systems

Für initiale Untersuchungen der Kandidatengene aus den genomweiten Assoziationsstudien (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.3) wurde ein ubiquitärer Knockdown ausgewählter Gene mithilfe des GAL4/UAS-Systems durchgeführt. Dieses System ermöglicht eine gezielte räumliche und zeitliche Expression der Gene in *Drosophila melanogaster*<sup>[27]</sup>. GAL4 ist ein hefespezifischer Transkriptionsfaktor, der unter die Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors gesetzt wird. Das Protein GAL4 bindet spezifisch an die sogenannte UAS (engl. *Upstream Activating Sequence*) Region, hinter der das Gen von Interesse kloniert ist. Dadurch steht das zu untersuchende Gen unter der indirekten Kontrolle des gewebespezifischen Promotors. Neben der gezielten Expression bzw. Überexpression von Genen ist es auch möglich einen Gen-Knockdown durch RNA-Interferenzen durchzuführen, um eine zielgerichtete Abschaltung von Genen auszulösen<sup>[40,144]</sup>. In dieser Arbeit wurde das GAL4/UAS-System verwendet, um einen Knockdown ausgewählter Gene der GWAS durchzuführen. Dafür wurden weibliche Jungfrauen der Actin5c-GAL4 Treiberlinie (ubiquitäre Expression) gesammelt und mit Männchen der Responderlinien (enthalten die UAS-Region und das RNAi-Konstrukt) vereint (je 15 Jungfrauen und 5 Männchen pro Fliegenröhrchen). Die

Fliegen der F1 Generation mit dem Knockdown wurden gesammelt und für die weiteren metabolischen Untersuchungen (siehe Abschnitt 4.5) genutzt. Als Kontrollen dienten entsprechende TRiP-Fliegenlinien. Alle Fliegenlinien sind in den Materialien Abschnitt 5.6 aufgeführt.

## 4.9. Metabolische Zeitreihe

Zur Beobachtung der metabolischen Plastizität über die Zeit wurden zwei Experimente durchgeführt: (i) Analyse von Oregon R und *white[-]* Fliegen (dienten als Vergleich zu den Oregon R) und (ii) Analyse von ausgewählten DGRP Fliegenlinien. Für die Experimente entwickelten sich alle Fliegen auf Standardfutter bei 25 °C. Nach dem Sammeln der Tiere wurden die Proben, wie unter Abschnitt 4.4.1 beschrieben, aufbereitet und die Triglyceride (siehe Abschnitt 4.5.1) gemessen. Pro Kondition wurden Quadruplikate analysiert.

### Analyse von Oregon R und *white[-]* Fliegen

Von den Oregon R und *white[-]* Fliegen wurden L1 Larven (n = 30), L2 Larven (n = 15), L3 Larven (n = 5) sowie Puppen (n = 8) und adulte Fliegen (gepaarte Weibchen und Männchen) im Alter von einem Tag, sechs und 18 Tagen (je n = 8) gesammelt.

### Analyse der DGRP Fliegenlinien

Die DGRP Linien wurden nach den Triglyceridmengen der Weibchen unter basalen Bedingungen (siehe Ergebnisse Abbildung 2.3) ausgewählt. Es wurden Fliegenlinien mit niedrigen (DGRP ID: 303, 315, 324), mittleren (DGRP ID: 712, 799, 820) und hohen (DGRP ID: 301, 705, 859) Mengen an Triglyceriden verwendet. Für die Analyse der DGRP Fliegen wurden L3 Larven (n = 5), Puppen (n = 5) und adulte Tiere (gepaarte Weibchen und Männchen) im Alter von einem Tag, sechs und 18 Tagen (je n = 8) gesammelt.

## 4.10. Experimente mit einer zusätzlichen Wasserquelle auf HSD

Da die Saccharosekonzentration im HSD mit 1 M (entspricht 34,2 g auf 100 mL) im Gegensatz zu den anderen Futtersorten (LSD und SD mit 0,15 M) sehr hoch ist, wurde in diesem experimentellen Aufbau getestet, ob die Fliegen einem Wassermangel und somit schlechteren Bedingungen ausgesetzt sind. Dafür wurden ausgewählte DGRP Fliegenlinien verwendet, die bezogen auf die Glykogenmengen unterschiedlich auf den Wechsel von LSD zu HSD reagiert haben (siehe Anhang Abbildung A.4 A und B, rote Markierungen). Die Fliegen wurden zunächst auf LSD angezogen und die frisch geschlüpften Tiere (Weibchen und Männchen) wurden entweder auf LSD, HSD oder HSD mit einer zusätzlichen Wasserquelle übertragen. Als Wasserquelle wurde eine 200  $\mu$ L Pipettenspitze gefüllt mit 1 % Agar (1 g auf 100 mL) verwendet, wie in Bass *et al.*<sup>[16]</sup> beschrieben. Die Pipettenspitze wurde entsprechend passend abgeschnitten und ins Futter gesteckt, sodass sich der Agar direkt an der Futteroberfläche befand und die Fliegen die Wasserquelle ungehindert erreichen konnten. Es wurden nach fünf Tagen je acht Fliegen (gepaarte Weibchen und Männchen) pro Probe gesammelt und entsprechend Abschnitt 4.4.1 aufbereitet. Anschließend wurden die Glykogenmengen, wie in Abschnitt 4.5.4 beschrieben, gemessen. Pro Kondition wurden Triplikate analysiert.

### 4.11. Etablierung eines DGRP-Mix Stammes zur Untersuchung metabolischer Parameter auf dem *Holidic Diet*

Zur Untersuchung der Entwicklung von wildtypischen Fliegenlinien auf dem *Holidic Diet* (HD) wurde ein DGRP-Mix Stamm erzeugt. Dadurch wurde eine Mittlung der phänotypischen Plastizität generiert und die Kontribution der einzelnen Fliegenlinien minimiert. Die 35 DGRP Linien wurden dafür in einem Fliegenkäfig mit einer Apfelsaftagarplatte vereint (je ein Fliegenröhrchen pro Linie). Nach 24 h wurde die gemischten DGRP Fliegen für 6 h auf Fliegenröhrchen mit HD zur Eiablage aufgeteilt. Danach wurden die DGRP-Mix Larven im Abstand von 24 h gesammelt und Gewichtsmessungen (siehe Abschnitt 4.12) und metabolische Messungen (siehe Abschnitt 4.5) durchgeführt.

### 4.12. Gewichtsmessungen

Bei den Gewichtsmessungen wurden die Fliegenlarven zunächst in 0,05 % Tween<sup>®</sup>-20 gewaschen, getrocknet und in ein vorher gewogenes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde erneut an einer analytischen Waage (Kern ABJ-NM/ABS-N) gewogen (entspricht dem Nass- bzw. Gesamtgewicht, engl. *wet weight*, ww) und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach einer Trocknung bei 60 °C und 24 h wurden die Reaktionsgefäße mit den Larven erneut gewogen (entspricht dem Trockengewicht, engl. *dry weight*, dw). Zur Bestimmung des Wassergehalts wurde das Trockengewicht vom Gesamtgewicht der Larven subtrahiert. Pro Kondition wurden Quadruplikate à 100 Larven (96 h Zeitpunkt) bzw. 40 Larven (132 h und 168 h Zeitpunkt) gesammelt.

### 4.13. Größenmessungen

Für die Bestimmung unterschiedlicher Größenparameter wurden die Larven an einem Binokular (Zeiss SteREO Discovery.V8) fotografiert. Die Larven wurden dafür in eine kalte Sammelschale mit eiskaltem PBS gelegt, damit der Körper gestreckt bleibt und Bewegungen der Tiere minimiert werden. Die Datenauswertung erfolgte mit der Zeiss Zen Software (Zen 2.3 lite - blue edition) und es wurden die Parameter Fläche, Länge und Breite der Larven aufgenommen. Pro Kondition wurden 20 bis 30 Larven ausgemessen und der Versuch wurde dreimal wiederholt.

### 4.14. Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Für die Metabolitmessungen via Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurden die Larven der drei Zeitpunkte (96 h, 132 h, 168 h nach Eiablage) in 105  $\mu\text{L}$  Chloroform und 245  $\mu\text{L}$  Methanol extrahiert und 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zugabe von 560  $\mu\text{L}$  Wasser (HPLC gradient grade, Fisher Chemical, W/0106/17) wurden die Proben zentrifugiert (2 min, 4 °C und 21,1 x g) und die flüssige Phase für die GC-MS Messungen abgenommen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, sodass am Ende 1300  $\mu\text{L}$  Extrakt vorhanden waren. Die Analyse der Metabolite erfolgte mithilfe eines GC-MS Systems (7200 GC-QTF von Agilent) nach dem

Protokoll von O. Fiehn *et al.*<sup>[74]</sup>. Die Messungen wurden durch Tabea Mettler-Altmann (Institut für Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) durchgeführt. Die absolute Quantifizierung erfolgte über einen Standardmix der in fünf verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) gemessen wurde. Für jedes Metabolit wurde eine eigene Standardreihe erstellt und die absoluten Konzentrationen in den Proben bestimmt.

## 4.15. Korrelationsanalysen

Es wurden Korrelationsstudien mit den metabolischen Messungen der DGRP Linien unter basalen Bedingungen durchgeführt. Die Analysen wurden in R (R core team 2014, Version 3.4.3) ausgeführt und es wurden die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt, da nicht zwingend von einem linearen Zusammenhang zwischen den Parametern ausgegangen wurde.

## 4.16. Rekonstruktion des metabolischen Netzwerks

Die Rekonstruktion des metabolischen Netzwerkes erfolgte zur Untersuchung der Ressourcenallokation in Larven von *Drosophila melanogaster*. Dabei wurde nach dem Protokoll zur Erstellung von metabolischen Netzwerken von I. Thiele und B. Palsson vorgegangen<sup>[202]</sup>. Die Rekonstruktion teilt sich in drei Prozesse auf:

- (i) **Rekonstruktion des Modellentwurfs:** In diesem Schritt wurden die benötigten Reaktionswege und ihre zugehörigen biochemischen Informationen gesammelt und in einer Excel Kalkulationstabelle (MS Office) übertragen. Diese Kalkulationstabelle gilt als Basis für die Rekonstruktion und enthält alle wichtigen Informationen über die Reaktionen und Metabolite. Eine Zusammenfassung mit allen enthaltenen Informationen befinden sich im Anhang in Tabelle B.2. Die Informationen wurden aus verschiedenen Datenbanken (siehe Anhang Tabelle B.1) gewonnen.
- (ii) **Verfeinerung des Modells:** In diesem Schritt wurde das Modell durch *Drosophila*-spezifische Informationen verfeinert und die Reaktionen auf ihre Ausführbarkeit geprüft. Dabei wurde darauf geachtet, dass sogenannte *Dead-end*, blockierte oder unausgeglichene Reaktionen vermieden werden. Blockierte Reaktionen können in Simulationen nicht ausgeführt werden, da die Flussrichtung falsch ist und somit das Produkt nicht weiter transportiert werden kann. Auch in *Dead-end* Reaktionen kann kein Transport eines Produktes stattfinden, was zu keinem Fluss in der Simulation führt. *Dead-end* Reaktionen gehören zur Gruppe der blockierten Reaktionen. Diese Reaktionen können durch manuelles oder automatisiertes *gap-filling* vermieden werden<sup>[154]</sup>.
- (iii) **Transformation in ein mathematisches Modell:** Das metabolische Netzwerk wurde mithilfe eines angepassten Skriptes von J. Schönborn<sup>[182]</sup> (basierend auf dem *read\_excel.py* Skriptes von Ebrahim *et al.*<sup>[63]</sup>) und COBRApy in eine stöchiometrische Matrix umgewandelt. Die Spalten der stöchiometrischen Matrix beschreiben die Reaktionen, die Zeilen repräsentieren die Metabolite.

## 4.17. Verfahren zur Abbildung von Genexpressionsdaten auf das metabolische Netzwerk

Für die Visualisierung von Genexpressionsdaten von larvalen Geweben auf das *FlySilico* 1.0 Netzwerk wurden die EC (engl. *enzyme commission*) Nummern des Modells genutzt, um Informationen über die Gene, die an den jeweiligen Reaktionen beteiligt sind, zu erhalten. Dafür wurden die EC Nummern mit einer Datei, die Informationen über die Gennamen, EC Nummern und *Gene Ontology* (GO) (erhalten von Josh Goodman, Flybase Projektmanager, Indiana Universität Bloomington) enthält, abgeglichen. Im nächsten Schritt wurden die Genexpressionsdaten der Larven in unterschiedlichen Geweben (Speicheldrüse, Fettkörper, zentrales Nervensystem (ZNS), Verdauungssystem, Imaginalscheiben und Körperhülle) aus dem *Drosophila Gene Expression Tools* (kurz DGET, <https://www.flyrnai.org/tools/dget/web/>)<sup>[98]</sup> exportiert. Die Expressionsdaten basieren auf Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung (RNA-Seq) und stammen aus unterschiedlichen Quellen, wie dem modENCODE Projekt<sup>[44,47,87]</sup> und von den Arbeitsgruppen von A. Spradling<sup>[132]</sup> und N. Buchon<sup>[61]</sup>. Die Expressionswerte der Gene, die an einer Reaktion beteiligt sind, wurden gemittelt und durch z-Transformation normalisiert. Die normalisierten Daten wurden auf das *FlySilico* 1.0 Netzwerk (metabolische Karte erstellt in Escher<sup>[115]</sup> von J. Schönborn<sup>[182]</sup>) auf die Reaktionswege übertragen. Die Datenverarbeitung und die Visualisierung der Daten auf dem metabolischen Netzwerk erfolgten mithilfe von eigens erstellten Skripten in R (Version 3.4.3) und Python (Version 2.7.13).

## 4.18. Ermittlung der Biomasse und der Aufnahmeraten

Die Berechnungen zur Ermittlung der Biomasse und deren Koeffizient sowie der Aufnahmeraten wurden von Jürgen Schönborn in seiner Masterarbeit entwickelt und getestet<sup>[182]</sup>.

### 4.18.1. Ermittlung der Biomasse

Die Biomasse steht im Fokus des metabolischen Modells von *Drosophila melanogaster* und dient als Zielfunktion zur Ermittlung der Wachstumsrate. Zur Erstellung der Biomasse wurden verschiedene Metabolite an drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung der Larven gemessen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass sich der larvale Körper aus den Hauptkomponenten Wasser, Proteine, Kohlenhydrate und Fette zusammensetzt. Der Wassergehalt der Larven konnte, wie unter Abschnitt 4.12 beschrieben, bestimmt werden. Die Messungen der weiteren Komponenten erfolgten via biochemischer Analysemethoden (siehe Abschnitt 4.5) oder mithilfe von GC-MS (siehe Abschnitt 4.14), wodurch weitere Metabolite des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels und nahezu alle freien Aminosäuren (ausgenommen Arginin, Glycin und Histidin) gemessen werden konnten. Hierdurch wurden die folgenden Parameter in die Zielfunktion Biomasse aufgenommen: (i) freie und gebundene Aminosäuren (GC-MS und Proteinmessungen), (ii) Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels (Glucose, Glykogen, Lactat), (iii) Triglyceride und (iv) Cholesterol. Für die Ermittlung der gebundenen Aminosäuren wurden, wie in der Masterarbeit von J. Schönborn beschrieben<sup>[182]</sup>, die Frequenzen der Aminosäuren auftretend in allen Proteinen von *Drosophila melanogaster* ermittelt und zur weiteren Berechnung genutzt. Eine Liste mit den

berechneten Frequenzen ist ebenfalls in der Masterarbeit von J. Schönborn zu finden<sup>[182]</sup>.

Die Zunahme der Biomasse wurde in einem Zeitraum von 72 h in der Entwicklung der Larven (Startzeitpunkt 96 h, Endzeitpunkt 168 h) betrachtet. Dieser Zeitraum deckt einen Großteil der Entwicklung und somit eine starke Zunahme der Biomasse der Larven ab, bevor sie die Verpuppung erreichen. Dafür wurden zunächst die Metabolitmengen berechnet:

$$m_{\Delta Metabolit_i} = m_{168h, Metabolit_i} - m_{96h, Metabolit_i} \quad (4.2)$$

Wobei  $m_{\Delta Metabolit_i}$  die Differenz der Mengen in  $g$  der Metabolite  $i$  vom Zeitpunkt 96 h ( $m_{96h, Metabolit_i}$ ) zu 168 h ( $m_{168h, Metabolit_i}$ ) darstellt.

Für die Berechnung der gebundenen Aminosäuren wurde die Differenz der Proteinmengen ( $m_{\Delta Protein}$ ) im Zeitraum der 72 h gebildet und mit den ermittelten Frequenzen aus<sup>[182]</sup> multipliziert.

$$m_{\Delta Metabolit_i} \hat{=} m_{AA_i} = m_{\Delta Protein} \cdot f_{AA_i} \quad (4.3)$$

Mittels dieser Angaben konnten die Biomassekoeffizienten aus den biochemischen Analyseverfahren berechnet werden.

$$x_{Assay, Metabolit_i} = \frac{\frac{m_{\Delta Metabolit_i}}{M_{Metabolit_i}}}{m_{\Delta dw}} = \frac{n_{Metabolit_i}}{m_{\Delta dw}} \quad (4.4)$$

Wobei  $x_{Assay, Metabolit_i}$  der Biomassekoeffizient basierend auf den biochemischen Analysemethoden ist,  $M_{Metabolit_i}$  die molekulare Masse der Metabolite in  $g/mmol$  ist,  $m_{\Delta dw}$  die Differenz des Trockengewichts der Zeitpunkte 96 h und 168 h in  $g$  ist und  $n_{Metabolit_i}$  die Stoffmenge der Metabolite in  $mmol$  ist.

Die Bestimmung der Anteile der freien Metabolite an den Biomassekoeffizienten wurde aus den GC-MS Messungen bestimmt. Dabei wurde zunächst die Differenz der Stoffmengen pro Tier der gemessenen Komponenten von den Zeitpunkten 96 h und 168 h gebildet:

$$n_{\Delta Metabolit_i} = n_{168h, Metabolit_i} - n_{96h, Metabolit_i} \quad (4.5)$$

$n_{\Delta Metabolit_i}$  entspricht hier der Differenz der Stoffmengen der gewählten Zeitpunkte (96 h und 168 h).  $n_{96h, Metabolit_i}$  und  $n_{168h, Metabolit_i}$  entsprechen der Stoffmenge eines Metabolits zum Zeitpunkt 96 h oder 168 h. Die Stoffmengen pro Tier sind in  $mmol$  angegeben.

Mithilfe der berechneten Differenz konnten dann die Koeffizienten der freie Metabolite  $x_{GCMS, Metabolit_i}$  in  $mmol/g$  nach folgender Formel berechnet werden:

$$x_{GCMS, Metabolit_i} = \frac{n_{\Delta Metabolit_i}}{m_{\Delta dw}} \quad (4.6)$$

Wobei  $n_{\Delta Metabolit_i}$  die Differenz der Stoffmengen zwischen den Zeitpunkten 96 h und 168 h in  $mmol$  ist und  $m_{\Delta dw}$  der Differenz des Trockengewichts vom Zeitpunkt 96 h zu 168 h entspricht.

Die endgültigen Koeffizienten der Biomasse können durch die berechneten Werte der Formeln 4.4 und 4.6 bestimmt werden:

$$x_{Metabolit_i} = x_{Assay, Metabolit_i} + x_{GCMS, Metabolit_i} \quad (4.7)$$

Da *Drosophila melanogaster* ein Cholesterol auxotropher Organismus ist<sup>[179]</sup>, wurde in der Zielfunktion außerdem Cholesterol aufgenommen. Dieser Schritt soll sicherstellen, dass Cholesterol zum Aufbau der Biomasse gebraucht wird und ohne Cholesterol kein Wachstum möglich ist. Die experimentellen Daten, die für die Integration von Cholesterol in die Biomasse benötigt werden, wurden durch biochemische Messungen von Michael Werthebach (unveröffentlichte Daten, Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme, AG Systembiologie des Fettstoffwechsels, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) generiert. Die Berechnung der Koeffizienten für Cholesterol wurde, wie in Formel 4.8 angegeben, bestimmt.

$$x_{Cholesterol} = \frac{\frac{c_{Cholesterol/Protein} \cdot m_{\Delta Protein}}{M_{Cholesterol}}}{m_{\Delta dw}} \quad (4.8)$$

Bei dieser Formel ist  $x_{Cholesterol}$  der Biomassekoeffizient für Cholesterol in  $mmol/g$ ,  $c_{Cholesterol/Protein}$  ist die Menge an Cholesterol (in  $g$ ) normiert auf die Menge der Proteine (in  $g$ ) der Probe,  $m_{\Delta Protein}$  die Differenz der Menge an Protein zwischen 96 h und 168 h,  $M_{Cholesterol}$  die molekulare Masse von Cholesterol ( $M_{Cholesterol} = 386,65 \text{ g/mol}$ ) und  $m_{\Delta dw}$  die Differenz der Trockengewichte von 96 h und 168 h.

#### 4.18.2. Berechnung der Aufnahmeraten

Die Aufnahmeraten begrenzen das Modell in Hinblick auf die Metabolitmengen, die aufgenommen werden können. Durch das HD ist es möglich genau zu definieren welche Metabolitmengen maximal in das System gehen können.

Die Berechnung der möglichen Futteraufnahme in den Mundraum der Larven wurde mit den Formeln 4.9 und 4.10 ermöglicht. Zunächst wird das maximale Mundvolumen  $V_{Mund}$  in  $mm^3$  der Tiere errechnet.

$$V_{Mund} = \pi \cdot r^2 \cdot h \quad (4.9)$$

Die Berechnung erfolgte unter der Annahme, dass der Mundraum der Larven von *Drosophila melanogaster* eine annähernd zylindrische Form hat, wobei  $\pi$  der Kreiszahl entspricht (3,142),  $r^2$  dem quadrierten Radius in  $mm$  und  $h$  der Länge der Mundhöhle in  $mm$ .

Der Radius  $r$  des Mundraumes konnte durch die Messungen der Breite der Larven annähernd bestimmt werden (Daten siehe Ergebnisse Abschnitt 2.6 und Abbildung 2.18). Da es während der Entwicklung zum Größenwachstum der Larven kommt, wurde die mittlere Breite der Larven von Zeitpunkt 96 h zu Zeitpunkt 168 h ermittelt. Der mittlere Radius des Mundraumes wurde als die Hälfte der mittleren Breite der Larven angenommen. Der Radius beträgt somit  $r = 0,118 \text{ mm}$ . Die Länge  $h$  des Mundraumes konnte mithilfe von Messungen von W. Alpatov bestimmt werden<sup>[7]</sup>.

Dabei wurde die Länge der Mundhöhle als Mittelwert der mittleren Länge des L2 und L3 Stadiums angenommen und beträgt  $h = 0,253 \text{ mm}$ .

Die Häufigkeit der Futteraufnahme konnte mit Daten aus einer Publikation von M. Fellowes *et al.*<sup>[72]</sup> bestimmt werden und beträgt einen Wert von  $f_{\text{Futterkontakt}} = \frac{110}{\text{min}}$ .

$$m_{\text{Futter}} = V_{\text{Mund}} \cdot f_{\text{Futterkontakt}} \cdot \rho_{\text{HD}} \quad (4.10)$$

Wobei die Futteraufnahme  $m_{\text{Futter}}$  in  $g/h$  durch das Mundvolumen  $V_{\text{Mund}}$  in  $mm^3$ , der Anzahl an Futterkontakten  $f_{\text{Futterkontakt}}$  (hier 110 pro Minute) und die Summe der Massenkonzentrationen der HD Bestandteile  $\rho_{\text{HD}}$  in  $g/\mu L$  bestimmt wird. Bei dieser Berechnung wurde davon ausgegangen, dass alle HD Bestandteile homogen verteilt sind und die Anteile immer gleich und somit unabhängig vom aufgenommenen Volumen sind. Die Anteile jedes HD Bestandteils wurden von J. Schönborn berechnet und sind der Masterarbeit zu entnehmen<sup>[182]</sup>.

Da davon ausgegangen wird, dass die Mundhöhle der Larven mit jedem Futterkontakt vollständig gefüllt wird, kommt es bei den Berechnungen zu einer Überschätzung. Daher wird im Folgenden ein Korrekturfaktor  $\chi$  eingeführt, der beschreibt, wie viel von der aufgenommenen Nahrung verwendet werden kann. Der Korrekturfaktor wurde von J. Schönborn in seiner Masterarbeit bestimmt und beträgt  $\chi = 0.122$ <sup>[182]</sup>. Mit dieser Annahme kann die Aufnahme der einzelnen Futterbestandteile berechnet werden:

$$m_{\text{Futter, Bestandteil}_i} = m_{\text{Futter}} \cdot \chi \cdot p_{\text{Bestandteil}_i} \quad (4.11)$$

Wobei  $m_{\text{Futter, Bestandteil}_i}$  die Aufnahme an Bestandteil  $i$  in  $g/h$  ist,  $m_{\text{Futter}}$  ist die allgemeine Futteraufnahme in  $g/h$ ,  $\chi$  ist der Korrekturfaktor mit  $\chi = 0.122$  und  $p_{\text{Bestandteil}_i}$  ist der Anteil des Bestandteils  $i$  im HD.

Um die berechneten Futteraufnahmen für das metabolische Netzwerk nutzen zu können, müssen sie in Aufnahmeraten umgewandelt werden, die später als Grenzwerte eingesetzt werden können.

$$v_{\text{Aufnahme},i} = \frac{m_{\text{Futter, Bestandteil}_i}}{M_{\text{Bestandteil},i} \cdot m_{\Delta dw}} \quad (4.12)$$

Wobei  $v_{\text{Aufnahme},i}$  die Aufnahmerate eines Bestandteils  $i$  in  $mmol/g \cdot h$  ist,  $m_{\text{Futter, Bestandteil}_i}$  die Aufnahme eines Bestandteils  $i$  in  $g/h$  ist,  $M_{\text{Bestandteil},i}$  die molare Masse des Bestandteils  $i$  in  $g/mmol$  ist und  $m_{\Delta dw}$  ist die Differenz des Trockengewichts von 168 h und 96 h in  $g$ .

## 4.19. Bestimmung der experimentellen Wachstumsrate

Die experimentelle Wachstumsrate kann mithilfe der Messungen des Trockengewichts bestimmt werden.

$$\mu_{\text{Exp.}} = \frac{\frac{m_{t2,dw} - m_{t1,dw}}{\Delta t}}{m_{t1,dw}} \quad (4.13)$$

Dabei beschreibt  $m_{t_2,dw}$  die Trockenmasse bei Zeitpunkt  $t_2$  und  $m_{t_1,dw}$  die Trockenmasse bei Zeitpunkt  $t_1$  in  $g$ .  $\Delta t$  ist die Differenz zwischen den Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$  in  $h$ . Die Einheit der Wachstumsrate ist angegeben in  $1/h$ .

## 4.20. Datenanalyse

Alle Datenanalysen erfolgten mit eigens erstellten Programmen in R (R core team 2014, Version 3.4.3), Python (Python Software Foundation, Version 2.7.13) oder mithilfe von MS Excel (Version 2013).

## 4.21. Statistik

Die Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen zwei unabhängigen Proben erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mittels ungepaarten, zweiseitigen t-Tests. Die statistische Signifikanz von Vergleichen mehrerer Proben wurde durch eine ANOVA mit anschließendem Bonferroni korrigiertem Post-hoc-Test berechnet. Die unterschiedlichen p-Werte sind mit Asterisken gekennzeichnet und geben die Stärke der Signifikanz an:  $p > 0,05$  nicht signifikant (n.s.),  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\* und  $p < 0,001$  \*\*\*.

## 5. Materialien

### 5.1. Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Modelltyp	Hersteller
Analytische Waage	ABJ-NM/ABS-N	Kern
Binokular	steREO Discovery.V8	Zeiss
GC-MS Gerät	7200 GC-QTF	Agilent
Handhomogenisator	Kontes™ Pellet Pestle™ Motor	Kimble Chase
Inkubator	IPP110Plus	Memmert
Inkubator	Heraeus B12	Thermo Scientific
pH-Meter	PB-11	Sartorius
Plattenlesegerät	SynergyMX	BioTek
Rüttelzentrifuge	Fast Prep FP120	Bio101 Savant
Tiefkühlschrank (-80°C)	Model 905	Thermo Scientific
Trockenschrank	Heratherm OGS100	Thermo Scientific
Wasserbad	JB Academy JBA18	Grant
Zentrifuge	Heraeus Pico21	Thermo Scientific
Zentrifuge	Heraeus Fresco21	Thermo Scientific

### 5.2. Chemikalien

Chemikalie	Artikelnr.	Hersteller
Acetyl Coenzym A (Acetyl-CoA)	A2056	Sigma-Aldrich
Agar	214010	Becton Dickinson
Amyloglucosidase ( <i>Apergillus niger</i> )	A1602	Sigma-Aldrich
Biotin	B4501	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$	12074	Sigma-Aldrich
Calcium-Pantothenat	21210	Sigma-Aldrich
Chloroform	22711.290	AnalaR NORMAPUR®
Cholesterol	C8667-1MG	Sigma-Aldrich
Cholinchlorid	C1879	Sigma-Aldrich
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	D8130	Sigma-Aldrich
Eisensulfat, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	F7002	Sigma-Aldrich
Essigsäure	20104.298	AnalaR NORMAPUR®
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	A3553	AppliChem
Ethanol	2246.1000	Chemsolute
Folsäure	F7876	Sigma-Aldrich
Glykogen	G0855	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	212750	Becton Dickinson
Inosin	I4125	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat, $KH_2PO_4$	12017	Grüssing

Chemikalie	Artikelnr.	Hersteller
Kupfersulfat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	197722500	Acros Organics
L-Alanin	A7627	Sigma-Aldrich
L-Arginin	A5131	Sigma-Aldrich
L-Asparagin	A0884	Sigma-Aldrich
L-Asparaginsäure	A6683	Sigma-Aldrich
L-Cystein	C1276	Sigma-Aldrich
L-Glutamat	G5889	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	G3126	Sigma-Aldrich
L-Glycin	G7126	Sigma-Aldrich
L-Histidin	H8000	Sigma-Aldrich
L-Isoleucin	CC10025	Carbolution
L-Leucin	L8912	Sigma-Aldrich
L-Lysin (HCL)	L5626	Sigma-Aldrich
L-Methionin	M9625	Sigma-Aldrich
L-Phenylalanin	P2126	Sigma-Aldrich
L-Prolin	P0380	Sigma-Aldrich
L-Serin	S4500	Sigma-Aldrich
L-Threonin	T206.1	Roth
L-Tryptophan	T0254	Sigma-Aldrich
L-Tyrosin	T3754	Sigma-Aldrich
L-Valin	V0500	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat, $MgSO_4$	12094	Grüssing
Manganchlorid, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	M3634	Sigma-Aldrich
Methanol	32213	Sigma-Aldrich
Myo-Inositol	I7508	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$	A3590	AppliChem
Nicotinsäure	N4126	Sigma-Aldrich
Nipagin (Methyl 4-hydroxybenzoate)	H3647-100G	Sigma-Aldrich
Oxalessigsäure (OAA)	O4126	Sigma-Aldrich
Pepton	212677	Becton Dickinson
Propionsäure	220130010	Acros Organics
Pyridoxin	P9755	Sigma-Aldrich
Riboflavin	R4500	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure, $H_2SO_4$	20700.298	AnalaR NORMAPUR®
Saccharose	4661.1	Roth
Thiamin	T4625	Sigma-Aldrich
TRIZMA BASE	10313895	Honeywell
Tween®-20	T7949	Sigma-Aldrich
Uridin	U3750	Sigma-Aldrich
Wasser (HPLC gradient grade)	W/0106/17	Fisher Chemical
Zinksulfat, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Z0251	Sigma-Aldrich

### 5.3. Futterbestandteile

Futterbestandteil	Hersteller
Hefe	Bruggeman
Polenta	Alnatura
Sojamehl	Bauckhof
Zuckersirup	Grafschafter
Malzextrakt	Demeter

### 5.4. Lösungen und Puffer

Alle Reagenzien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in vollentsalztem (VE) Wasser gelöst.

#### 5.4.1. Allgemeine Lösungen und Puffer

PBS (10x), 1 L	80 g	$NaCl$
pH 7,4	2 g	$KCl$
	14,4 g	$Na_2HPO_4$
	2,4 g	$KH_2PO_4$
Tween <sup>®</sup> -20 (0,05 %), 100 mL	50 $\mu$ L	Tween <sup>®</sup> -20
Nipaginlösung, 100 mL (Lösung in 70 % Ethanol)	10 g	Nipagin

#### 5.4.2. Lösungen und Puffer für das *Holidic Diet*

Alle Lösungen und Puffer für das HD wurden nach den Angaben von Piper *et al.* (2013)<sup>[161]</sup> angesetzt.

Acetat Puffer (10x), 100 mL	3 mL	Essigsäure
pH 4	3 g	$KH_2PO_4$
	1 g	$NaHCO_3$
Cholesterollösung (66,67x), 10 mL (Lösung in absolut Ethanol p.a.)	0,2 g	Cholesterol

Essentielle Aminosäuren, 100 mL pH 4,5	1,52 g	Phenylalanin
	1,12 g	Histidin
	2,87 g	Lysin
	0,56 g	Methionin
	2,35 g	Arginin
	2,14 g	Threonin
	2,21 g	Valin
	0,73 g	Tryptophan
Nichtessentielle Aminosäuren, 100 mL pH 4,5	2,63 g	Alanin
	1,39 g	Aspartat
	1,79 g	Glycin
	1,39 g	Asparagin
	0,93 g	Prolin
	3,01 g	Glutamin
	1,26 g	Serin
Cysteinlösung, 100 mL pH 4,5	5 g	Cystein
Glutamatlösung, 100 mL pH 4,5	10 g	Glutamat
Metallionen-Lösungen, je 10 mL	2,5 g	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$
	2,5 g	$MgSO_4$
	0,025 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
	0,01 g	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$
	0,25 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
	0,25 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
Bei den Metallionen handelt es sich um einzelne Lösungen.		
Vitaminlösung (125x), 1 L	0,1 g	Thiamin
	0,05 g	Riboflavin
	0,6 g	Nicotinsäure
	0,775 g	Calcium-Pantothemat
	0,125 g	Pyridoxin
	0,01 g	Biotin
Nukleinsäuren-/lipidähnliche-Metabolit- Lösung (125x), 100 mL	0,625 g	Cholinchlorid
	0,063 g	Myo-Inositol
	0,813 g	Inosin
	0,750 g	Uridin
Folsäurelösung, 100 mL	0,05 g	Folsäure

Nipaginlösung, 100 mL  
(Lösung in 95 % Ethanol)                      10 g                      Nipagin

## 5.5. Biochemische Kits

Produktname	Bestandteile	Artikelnr.	Hersteller
GO Assay Reagent	Glucose Standard (1 mg/mL) Glucose Oxidase/Peroxidase Reagenz o-Dianisidine Reagenz	GAGO20	Sigma-Aldrich
Glycerol Assay Kit	Assay Puffer Enzym Mix Farbreagenz Glycerol Standard (100 mM) ATP	MAK117	Sigma-Aldrich
Pierce BCA Assay Kit	Reagenz A Reagenz B BSA Standard (2 mg/mL)	23225	Thermo Scientific
Triglyceride Reagent	TAG Reagenz	981786	Thermo Scientific
Lactate Assay Kit	Lactate Assay Puffer Lactate Probe Lactate Enzym Mix L(+)-Lactate Standard (100 nmol/ $\mu$ L)	K607	Biovision

## 5.6. Fliegenlinien

Wenn nicht anders vermerkt, stammen alle RNAi Fliegenlinien vom Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC). Die DGRP Fliegenlinien sind eine erzeugte Fliegenkollektion von T. Mackay<sup>[129]</sup>.

Bezeichnung	externe Stocknr.	interne Stocknr.	Genotyp
LPCAT RNAi-Linie	BL62918	MBD479	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMJ24158}attP40/CyO
CG1986 RNAi-Linie	BL65900	MBD523	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC06162}attP40
Ptp99A RNAi-Linie (JF01858)	BL25840	MBD544	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF01858}attP2
Ptp99A RNAi-Linie (HMS01923)	BL39006	MBD557	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01923}attP2/TM3,Sb[1]

Bezeichnung	externe Stocknr.	interne Stocknr.	Genotyp
Ptp99A RNAi-Linie (HMS04496)	BL57299	MBD570	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS04496}attP40
sNPFR RNAi-Linie	BL25867	MBD545	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF01906}attP2
Glut1 RNAi-Linie (JF03060)	BL28645	MBD548	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF03060}attP2
Glut1 RNAi-Linie (HMS02152)	BL40904	MBD558	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS02152}attP40
Rx RNAi-Linie (JF03089)	BL28674	MBD549	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF03089}attP2
Rx RNAi-Linie (HMC03995)	BL55308	MBD568	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC03995}attP2
Lrp1 RNAi-Linie (JF01628)	BL31151	MBD550	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF01628}attP2
Lrp1 RNAi-Linie (HMS02875)	BL44579	MBD564	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS02875}attP2
Fbp2 RNAi-Linie (HMS02769)	BL44052	MBD562	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS02769}attP40
Fbp2 RNAi Linie (GLC01665)	BL50545	MBD565	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.GLC01665}attP2
Treh RNAi-Linie (GLC01707)	BL50585	MBD566	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.GLC01707}attP2
Treh RNAi-Linie (HMC03381)	BL51810	MBD567	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC03381}attP40
sm RNAi-Linie	BL64524	MBD572	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC05543}attP40
slif RNAi-Linie	BL64972	MBD573	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC05846}attP40
TRiP-Kontrolllinie	BL36303*	MBD261	y[1] v[1]; P{y[+t7.7]=CaryP}attP2
TRiP-Kontrolllinie	BL36304*	MBD223	y[1]v[1];P{y[+t7.7]=CaryP}attP40
Actin5C-Gal4	MBD390**	MBD75	w[-]; actin5C-Gal4 / CyO, ftz lacZ
Oregon R	-	MBD292	Wildtyp
<i>white</i> [-]	VDRC60000	MBD65	w[1118]

\* TRiP-Kontrolllinien (engl. *Transgenic RNAi Project*)

\*\* erhalten von Dr. Ralf Pflanz (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen)

externe Stocknr.	DGRP-ID	interne Stocknr.
BL25174	208	MBD344

---

<b>externe Stocknr.</b>	<b>DGRP-ID</b>	<b>interne Stocknr.</b>
BL25175	301	MBD407
BL25176	303	MBD386
BL25177	304	MBD357
BL25179	307	MBD299
BL25180	313	MBD369
BL25181	315	MBD433
BL25182	324	MBD406
BL25183	335	MBD333
BL25184	357	MBD411
BL25185	358	MBD359
BL25186	360	MBD380
BL25187	362	MBD384
BL25188	375	MBD390
BL25189	379	MBD345
BL25190	380	MBD303
BL25191	391	MBD389
BL25192	399	MBD374
BL25193	427	MBD421
BL25194	437	MBD347
BL25195	486	MBD379
BL25197	517	MBD388
BL25198	555	MBD330
BL25199	639	MBD378
BL25200	707	MBD413
BL25201	712	MBD316
BL25202	730	MBD412
BL25203	732	MBD342
BL25204	765	MBD323
BL25206	786	MBD395
BL25207	799	MBD340
BL25208	820	MBD392
BL25209	852	MBD376
BL25210	859	MBD391
BL25445	365	MBD401
BL25744	705	MBD405
BL25745	714	MBD434

## 5.7. Software

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Entwickler</b>
Anaconda	4.4.0	Anaconda, Inc.
Microsoft Excel 2013	2013	Microsoft Corporation
Python	2.7.13	Python Software Foundation
R	3.4.3	R Core Team
RStudio	1.1.419	RStudio, Inc.
Zen lite (blue edition)	2.3	Zeiss

# Literaturverzeichnis

- [1] Abu-Shumays R. L. and Fristrom J. W. IMP-L3, a 20-hydroxyecdysone-responsive gene encodes *Drosophila* lactate dehydrogenase: structural characterization and developmental studies. *Developmental Genetics*, 20(1):11–22, 1997.
- [2] Aguila J. R., Hoshizaki D. K., and Gibbs A. G. Contribution of larval nutrition to adult reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(3):399–406, 2012.
- [3] Aguila J. R., Suszko J., Gibbs A. G., and Hoshizaki D. K. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 210(6):956–963, 2007.
- [4] Al-Anzi B. *et al.* The leucokinin pathway and its neurons regulate meal size in *Drosophila*. *Current Biology*, 20(11):969–978, 2010.
- [5] Aldaz S. and Escudero L. M. Imaginal discs. *Current Biology*, 20:R429–R431, 2010.
- [6] Alic N. *et al.* Detrimental effects of RNAi: a cautionary note on its use in *Drosophila* ageing studies. *PLoS One*, 7(9):e45367, 2012.
- [7] Alpatov W. W. Growth and variation of the larvae of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 52(3):407–437, 1929.
- [8] Arrese E. L. and Soulages J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55(1):207–225, 2010.
- [9] Baart G. J. E. and Martens D. E. *Genome-scale metabolic models: reconstruction and analysis. In: Neisseria meningitidis. Methods in molecular biology (methods and protocols)*, volume 799. Humana Press, 2011.
- [10] Backhaus B., Sulkowski E., and Schlote F. W. A. A semi-synthetic, general-purpose medium for *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*, 60:210–212, 1984.
- [11] Bäckhed F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44):15718–15723, 2004.
- [12] Baker K. D. and Thummel C. S. Diabetic larvae and obese flies—emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 6(4):257–266, 2007.
- [13] Barraclough C. A. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology*, 68(1):62–67, 1961.
- [14] Barth R. H. and Lester L. J. Neuro-hormonal control of sexual behavior in insects. *Annual Review of Entomology*, 18(1):445–472, 1973.

- [15] Basan M. Resource allocation and metabolism: the search for governing principles. *Current Opinion in Microbiology*, 45:77–83, 2018.
- [16] Bass T. M. *et al.* Optimization of dietary restriction protocols in *Drosophila*. *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(10):1071–1081, 2007.
- [17] Bassett A. R. and Liu J-L. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(1):7–19, 2014.
- [18] Bassett A. R., Tibbit C., Ponting C. P., and Liu J-L. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Reports*, 4(1):220–228, 2013.
- [19] Bilen J. *et al.* Regulation of onset of female mating and sex pheromone production by juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45):18321–18326, 2013.
- [20] BioModels Database. BMID000000141998 – *Drosophila* genome-scale metabolic model. <https://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/BMID000000141998>, 2012.
- [21] Birse R. T. *et al.* High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 12(5):533–544, 2010.
- [22] Blundell J. *et al.* Resistance and susceptibility to weight gain: individual variability in response to a high-fat diet. *Physiology & Behavior*, 86(5):614–622, 2005.
- [23] Boggs C. L. Resource allocation: exploring connections between foraging and life history. *Functional Ecology*, 6(5):508, 1992.
- [24] Boggs C. L. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology*, 23(1):27–37, 2009.
- [25] Boggs C. L. and Freeman K. D. Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia*, 144(3):353–361, 2005.
- [26] Bordbar A. *et al.* A multi-tissue type genome-scale metabolic network for analysis of whole-body systems physiology. *BMC Systems Biology*, 5(1):180, 2011.
- [27] Brand A. H. and Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2):401–415, 1993.
- [28] Brankatschk M., Dunst S., Nemetschke L., and Eaton S. Delivery of circulating lipoproteins to specific neurons in the *Drosophila* brain regulates systemic insulin signaling. *eLife*, 3, 2014.
- [29] Bray G. A. Medical consequences of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6):2583–2589, 2004.
- [30] Britton J. S. and Edgar B. A. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*, 125(11):2149–2158, 1998.

- 
- [31] Brookheart R. T. and Duncan J. G. Modeling dietary influences on offspring metabolic programming in *Drosophila melanogaster*. *Reproduction*, 152(3):R79–R90, 2016.
- [32] Brunk E. *et al.* Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. *Nature Biotechnology*, 36(3):272–281, 2018.
- [33] Bulik C. M. *et al.* Fertility and reproduction in women with anorexia nervosa: a controlled study. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 60(2):130–135, 1999.
- [34] Burmester T., Antoniewski C., and Lepesant J-A. Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Biochemistry*, 262(1):49–55, 1999.
- [35] Busslinger M., Moschonas N., and Flavell R. A.  $\beta^+$  Thalassemia: aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. *Cell*, 27(2):289–298, 1981.
- [36] Buszczak M. *et al.* Mutations in the midway gene disrupt a *Drosophila* acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase. *Genetics*, 160(4):1511–1518, 2002.
- [37] Callier V. *et al.* Developmental changes in hypoxic exposure and responses to anoxia in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 218(18):2927–2934, 2015.
- [38] Cardoso J., Vilaça P., Soares S., and Rocha M. *An algorithm to assemble gene-protein-reaction associations for genome-scale metabolic model reconstruction*. In: *Pattern Recognition in Bioinformatics*, volume 7632. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [39] Carey G. *The five forces behind human evolution*. In: *Human genetics for the social sciences*, volume 1. Sage Publications, 2002.
- [40] Carthew R. W. *RNAi applications in Drosophila melanogaster*. In *RNAi: A guide to gene silencing*. Number 361–400. Cold Spring Harbor Laboratory, 2003.
- [41] Carvalho M. *et al.* Survival strategies of a sterol auxotroph. *Development*, 137(21):3675–3685, 2010.
- [42] Caspi R. *et al.* The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, 42(D1):D459–D471, 2013.
- [43] Caspi R. *et al.* The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1):D471–D480, 2015.
- [44] Celniker S. E. *et al.* Unlocking the secrets of the genome. *Nature*, 459(7249):927–930, 2009.
- [45] Chaplin M. Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11):861–866, 2006.
- [46] Chaston J. M., Newell P. D., and Douglas A. E. Metagenome-wide association of microbial determinants of host phenotype in *Drosophila melanogaster*. *mBio*, 5(5):e01631–14, 2014.

- [47] Cherbas L. *et al.* The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines. *Genome Research*, 21(2):301–314, 2010.
- [48] Chippindale A. K., Leroi A. M., Kim S. B., and Rose M. R. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(2):171–193, 1993.
- [49] Church R. B. and Robertson F. W. Biochemical analysis of genetic differences in the growth of *Drosophila*. *Genetical Research*, 7(03):383, 1966.
- [50] Clark A. J. and Bloch K. The absence of sterol synthesis in insects. *Journal of Biological Chemistry*, 234(10):2578–2582, 1959.
- [51] Colombani J. *et al.* A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell*, 114(6):739–749, 2003.
- [52] Coquin L. *et al.* Metabolomic and flux-balance analysis of age-related decline of hypoxia tolerance in *Drosophila* muscle tissue. *Molecular Systems Biology*, 4, 2008.
- [53] Crowner D., Madden K., Goeke S., and Giniger E. Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila*. *Development*, 129(6):1317–1325, 2002.
- [54] Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry*, 46(15):1339–1352, 2013.
- [55] Delgado F. F. *et al.* Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells. *PLoS ONE*, 8(7):e67590, 2013.
- [56] Deshpande S. A. *et al.* Quantifying *Drosophila* food intake: comparative analysis of current methodology. *Nature Methods*, 11(5):535–540, 2014.
- [57] Diegelmann S. *et al.* The CApillary FEeder assay measures food intake in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*, (121):e55024, 2017.
- [58] Dmitriew C. M. The evolution of growth trajectories: what limits growth rate? *Biological Reviews*, 86(1):97–116, 2011.
- [59] Dougherty E. C. Introduction to axenic culture of invertebrate metazoa: a goal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 77(2):27–54, 1959.
- [60] Duarte N. C. *et al.* Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6):1777–1782, 2007.
- [61] Dutta D. *et al.* Regional cell-specific transcriptome mapping reveals regulatory complexity in the adult *Drosophila* midgut. *Cell Reports*, 12(2):346–358, 2015.
- [62] Dutton H. *et al.* Antibiotic exposure and risk of weight gain and obesity: protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*, 6(1), 2017.

- 
- [63] Ebrahim A. *et al.* Do genome-scale models need exact solvers or clearer standards? *Molecular Systems Biology*, 11(10):831–831, 2015.
- [64] Eckstein S. *Informationsmanagement in der Systembiologie*, volume 1. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [65] Edelaar P. Comment on 'Evolutionary trade-offs, pareto optimality, and the geometry of phenotype space'. *Science*, 339(6121):757–757, 2013.
- [66] Edgecomb R. S., Harth C. E., and Schneiderman A. M. Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *Journal of experimental biology*, 197:215–35, 1994.
- [67] Edwards J. S., Ibarra R. U., and Palsson B. Ø. In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nature Biotechnology*, 19(2):125–130, 2001.
- [68] Feala J. D. *et al.* Flexibility in energy metabolism supports hypoxia tolerance in *Drosophila* flight muscle: metabolomic and computational systems analysis. *Molecular Systems Biology*, 3:99, 2007.
- [69] Feala J. D. *et al.* Metabolism as means for hypoxia adaptation: metabolic profiling and flux balance analysis. *BMC Systems Biology*, 3(1):91, 2009.
- [70] Feist A. M. and Palsson B. Ø. The biomass objective function. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3):344–349, 2010.
- [71] Feist A. M. *et al.* A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular Systems Biology*, 3(121), 2007.
- [72] Fellowes M. D. E., Kraaijeveld A. R., and Godfray H. C. J. Association between feeding rate and parasitoid resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53(4):1302–1305, 1999.
- [73] Fernie A. R., Carrari F., and Sweetlove L. J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3):254–261, 2004.
- [74] Fiehn O. *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18(11):1157–1161, 2000.
- [75] Flatt T. Diet and longevity in the balance. *Nature*, 462(7276):989–990, 2009.
- [76] Förster J. *et al.* Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Research*, 13(2):244–253, 2003.
- [77] Friis-Hansen B. J. Body water compartments in children: changes during growth and related changes in body composition. *Pediatrics*, 28(2):169–181, 1961.

- [78] Friis-Hansen B. J., Holiday M., Stapleton T., and Wallace W. M. Total body water in children. *Pediatrics*, 7(3):321–327, 1951.
- [79] Gaertner B. E. *et al.* Heritable variation in courtship patterns in *Drosophila melanogaster*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 5(4):531–539, 2015.
- [80] Geer B. W., Olander R. M., and Sharp P. L. Quantification of dietary choline utilization in adult *Drosophila melanogaster* by radioisotope methods. *Journal of Insect Physiology*, 16(1):33–43, 1970.
- [81] Géminard C., Rulifson E. J., and Léopold P. Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 10(3):199–207, 2009.
- [82] Giniger E., Tietje K., Jan L. Y., and Jan Y. N. *lola* encodes a putative transcription factor required for axon growth and guidance in *Drosophila*. *Development*, 120(6):1385–1398, 1994.
- [83] Gomes de Oliveira Dal’Molin C. *et al.* A multi-tissue genome-scale metabolic modeling framework for the analysis of whole plant systems. *Frontiers in Plant Science*, 6(4), 2015.
- [84] Gramates L. S. *et al.* FlyBase at 25: looking to the future. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D663–D671, 2016.
- [85] Grangeteau C. *et al.* Yeast quality in juvenile diet affects *Drosophila melanogaster* adult life traits. *Scientific Reports*, 8(1), 2018.
- [86] Gratz S. J. *et al.* Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4):1029–1035, 2013.
- [87] Graveley B. R. *et al.* The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 471(7339):473–479, 2010.
- [88] Grönke S. *et al.* Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 1(5):323–330, 2005.
- [89] Gurobi Optimization Inc. Gurobi Optimizer. Software, <http://www.gurobi.com/?lang=de>, 2012.
- [90] Gutierrez E., Wiggins D., Fielding B., and Gould A. P. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature*, 445(7125):275–280, 2006.
- [91] Handke B. *et al.* The hemolymph proteome of fed and starved *Drosophila* larvae. *PLoS ONE*, 8(6):e67208, 2013.
- [92] Harreiter J. and Kautzky-Willer A. Gender obesity report – Einfluss von Adipositas auf Reproduktion und Schwangerschaft. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 166(3-4):129–138, 2015.
- [93] Hartl D. L. and Jones E. W. *Genetics Principles and Analysis*. Jones and Bartlett Publishers, 4th edition, 1998.

- 
- [94] Hastings J. *et al.* ChEBI in 2016: improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Research*, 44(D1):D1214–D1219, 2015.
- [95] Heigwer F., Port F., and Boutros M. RNA interference (RNAi) screening in *Drosophila*. *Genetics*, 208(3):853–874, 2018.
- [96] Hoffman E. R., Zerwas S. C., and Bulik C. M. Reproductive issues in anorexia nervosa. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 6(4):403–414, 2011.
- [97] Hoffman J. M. *et al.* Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*, 13(4):596–604, 2014.
- [98] Hu Y. *et al.* The *Drosophila* Gene Expression Tool (DGET) for expression analyses. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 2017.
- [99] Huang W. *et al.* Natural variation in genome architecture among 205 *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel lines. *Genome Research*, 24(7):1193–1208, 2014.
- [100] Hull-Thompson J. *et al.* Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS Genetics*, 5(4):e1000460, 2009.
- [101] IBM. IBM ILOG CPLEX Optimization Studio. Software, <https://www.ibm.com/analytics/cplex-optimizer>, 2012.
- [102] Illenseer C. Studien zum Metabolismus von *Drosophila* Larven mit dem Schwerpunkt der Lipidspeicherung. *Bachelor's thesis*, Heinrich-Heine-University, 2016.
- [103] Ingham P. *The development of Drosophila melanogaster*, volume 10. Elsevier BV, 1993.
- [104] Ivanov D. K. *et al.* Longevity GWAS using the *Drosophila* Genetic Reference Panel. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(12):1470–1478, 2015.
- [105] Ja W. W. *et al.* Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20):8253–8256, 2007.
- [106] Jehrke L., Stewart F. A., Droste A., and Beller M. The impact of genome variation and diet on the metabolic phenotype and microbiome composition of *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 8(1), 2018.
- [107] Jennings B. H. *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*, 14(5):190–195, 2011.
- [108] Jumbo-Lucioni P. *et al.* Systems genetics analysis of body weight and energy metabolism traits in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 11(1):297, 2010.
- [109] Kanehisa M. *et al.* KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*, 40(D1):D109–D114, 2011.

- 
- [110] Kanehisa M. *et al.* KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D353–D361, 2016.
- [111] Kaplan H. S. and Gangestad S. W. *Life history theory and evolutionary psychology. In: The handbook of evolutionary psychology.* John Wiley & Sons, Inc., 2015.
- [112] Kauffman K. J., Prakash P., and Edwards J. S. Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5):491–496, 2003.
- [113] Kim S. *et al.* PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1):D1202–D1213, 2015.
- [114] King Z. A. *et al.* BiGG Models: a platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic Acids Research*, 44(D1):D515–D522, 2015.
- [115] King Z. A. *et al.* Escher: a web application for building, sharing, and embedding data-rich visualizations of biological pathways. *PLOS Computational Biology*, 11(8):e1004321, 2015.
- [116] Klepsatel P., Gálíková M., Xu Y., and Kühnlein R. P. Thermal stress depletes energy reserves in *Drosophila*. *Scientific Reports*, 6(1), 2016.
- [117] Knorr A. L., Jain R., and Srivastava R. Bayesian-based selection of metabolic objective functions. *Bioinformatics*, 23(3):351–357, 2006.
- [118] Kumar A. *et al.* Multi-tissue computational modeling analyzes pathophysiology of type 2 diabetes in MKR mice. *PLoS ONE*, 9(7):e102319, 2014.
- [119] Layalle S., Arquier N., and Léopold P. The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 15(4):568–577, 2008.
- [120] Layalle S. *et al.* Smooth, a hnRNP encoding gene, controls axonal navigation in *Drosophila*. *Genes to Cells*, 10(2):119–125, 2005.
- [121] Lee K. S. *et al.* *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49):50781–50789, 2004.
- [122] Lee S., Park C., and Yim J. Characterization of Citrate Synthase purified from *Drosophila melanogaster*. *Molecules and Cells*, 7(5):599–604, 1997.
- [123] Lee W.-C. and Micchelli C. A. Development and characterization of a chemically defined food for *Drosophila*. *PLoS ONE*, 8(7):e67308, 2013.
- [124] Leopold P. and Perrimon N. *Drosophila* and the genetics of the internal milieu. *Nature*, 450(7167):186–188, 2007.
- [125] Li H. and Tennessen J. M. Methods for studying the metabolic basis of *Drosophila* development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(5):e280, 2017.

- 
- [126] Li H. *et al.* Drosophila larvae synthesize the putative oncometabolite L-2-hydroxyglutarate during normal developmental growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(6):1353–1358, 2017.
- [127] Li L., Edgar B. A., and Grewal S. S. Nutritional control of gene expression in Drosophila larvae via TOR, myc and a novel cis-regulatory element. *BMC Cell Biology*, 11(1):7, 2010.
- [128] López-Maury L., Marguerat S., and Bähler J. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 9(8):583–593, 2008.
- [129] Mackay T. F. C. *et al.* The Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel. *Nature*, 482(7384):173–178, 2012.
- [130] Majewski R. A. and Domach M. M. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in E. coli. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7):732–738, 1990.
- [131] Mardinoglu A. *et al.* Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nature Communications*, 5(1), 2014.
- [132] Marianes A. and Spradling A. C. Physiological and stem cell compartmentalization within the Drosophila midgut. *eLife*, 2, 2013.
- [133] Markow T. A., Nazario-Yepiz N., and Loustalot-Laclet M. R. Drosophila species as models for nutritional studies: development, metabolic pools on diets with contrasting relative sugar:protein ratios. *Journal of Nutritional Biology*, 3(1), 2017.
- [134] Martino M. E., Ma D., and Leulier F. Microbial influence on Drosophila biology. *Current Opinion in Microbiology*, 38:165–170, 2017.
- [135] Meindl B. and Templ M. Analysis of commercial and free and open source solvers for linear optimization problems. *Report from Essnet Project on Common Tools and Harmonized Methodologies for SDC in the ESS*, 2012.
- [136] Melcher C., Bader R., and Pankratz M. J. Amino acids, taste circuits, and feeding behavior in Drosophila: towards understanding the psychology of feeding in flies and man. *Journal of Endocrinology*, 192(3):467–472, 2007.
- [137] Merkey A. B., Wong C. K., Hoshizaki D. K., and Gibbs A. G. Energetics of metamorphosis in Drosophila melanogaster. *Journal of Insect Physiology*, 57(10):1437–1445, 2011.
- [138] Mo M. L., Palsson B. Ø., and Herrgård M. J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. *BMC Systems Biology*, 3(1):37, 2009.
- [139] Moessinger C. *et al.* Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24):21330–21339, 2011.

- [140] Montezano D. *et al.* Flux balance analysis with objective function defined by proteomics data – metabolism of Mycobacterium tuberculosis exposed to mefloquine. *PLOS ONE*, 10(7):e0134014, 2015.
- [141] Musselman L. P. *et al.* A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type Drosophila. *Disease Models & Mechanisms*, 4(6):842–849, 2011.
- [142] Musselman L. P. *et al.* Role of fat body lipogenesis in protection against the effects of caloric overload in Drosophila. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12):8028–8042, 2013.
- [143] Na J. *et al.* A Drosophila model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genetics*, 9(1):e1003175, 2013.
- [144] Nagel A. C., Maier D. und Preiss A. Zeit/Raum-kontrollierte RNA-Interferenz in Drosophila melanogaster. *BIOspektrum*, Sonderheft-2005:516, 2005.
- [145] Nakano T. and Suzuki K. Genetic cause of a juvenile form of Sandhoff disease: abnormal splicing of beta-hexosaminidase beta chain gene transcript due to a point mutation within intron 12. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(9):5155–5158, 1989.
- [146] Neel J. V. Diabetes mellitus: a „thrifty“ genotype rendered detrimental by „progress“? *American Journal of Human Genetics*, 14:353–362, 1962.
- [147] Neel J. V. The „Thrifty Genotype“ in 1998. *Nutrition Reviews*, 57(5):2–9, 1999.
- [148] Neidhardt F. C., Ingraham J. L., and Schaechter M. *Physiology of the bacterial cell. A molecular approach*. Sinauer Associates, 1990.
- [149] Nelson D. L. and Cox M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillan Education, sixth edition, international edition, 2013.
- [150] Neumann N. P. and Lampen J. O. Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry*, 6(2):468–475, 1967.
- [151] Nilsson A., Mardinoglu A., and Nielsen J. Predicting growth of the healthy infant using a genome scale metabolic model. *npj Systems Biology and Applications*, 3(1), 2017.
- [152] Novoseltsev V. N., Novoseltseva J. A., and Yashin A. I. What does a fly’s individual fecundity pattern look like? The dynamics of resource allocation in reproduction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(5):605–617, 2003.
- [153] O’Brien E. J. *et al.* Genome-scale models of metabolism and gene expression extend and refine growth phenotype prediction. *Molecular Systems Biology*, 9(1):693–693, 2014.
- [154] Orth J. D. and Palsson B. Ø. Gap-filling analysis of the iJO1366 Escherichia coli metabolic network reconstruction for discovery of metabolic functions. *BMC Systems Biology*, 6(1):30, 2012.
- [155] Orth J. D., Thiele I., and Palsson B. Ø. What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3):245–248, 2010.

- 
- [156] Palsson B. Ø. *Systems Biology*. Cambridge University Press, 2015.
- [157] Parisi M., Li R., and Oliver B. Lipid profiles of female and male *Drosophila*. *BMC Research Notes*, 4(1):198, 2011.
- [158] Pasco M., and Leopold P. High-sugar-induced resistance in *Drosophila* relies on the lipocalin Neural Lazarillo. *PLoS one*, 7(e36583), 2012.
- [159] Perkins L. A. *et al.* The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: resources and validation. *Genetics*, 201(3):843–852, 2015.
- [160] Pierce V. A., Mueller L. D., and Gibbs A. G. Osmoregulation in *Drosophila melanogaster* selected for urea tolerance. *Journal of Experimental Biology*, 202(17):2349–2358, 1999.
- [161] Piper M. D. W. *et al.* A holidic medium for *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods*, 11(1):100–105, 2013.
- [162] Piper M. D. W. *et al.* Matching dietary amino acid balance to the in silico-translated exome optimizes growth and reproduction without cost to lifespan. *Cell Metabolism*, 25(3):610–621, 2017.
- [163] Placzek S. *et al.* BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D380–D388, 2016.
- [164] Poolman M. G., Miguet L., Sweetlove L. J., and Fell D. A. A genome-scale metabolic model of Arabidopsis and some of its properties. *Plant Physiology*, 151(3):1570–1581, 2009.
- [165] Pramanik J. and Keasling J. D. Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(4):398–421, 1997.
- [166] Price N. D., Reed J. L., and Palsson B. Ø. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11):886–897, 2004.
- [167] Raikhel A. S., Brown M. R., and Belles X. *Hormonal control of reproductive processes*. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*, volume 3. Elsevier Pergamon Press, 2005.
- [168] Ramakrishna R., Edwards J. S., McCulloch A., and Palsson B. Ø. Flux–balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280(3):R695–R704, 2001.
- [169] Raman K. and Chandra N. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, 10(4):435–449, 2009.
- [170] Randle P. J., Garland P. B., Hales C. N., and Newsholme E. A. The glucose fatty–acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet*, 281(7285):785–789, 1963.

- [171] Reed J. L., Vo T. D., Schilling C. H., and Palsson B. Ø. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biology*, 4(9):R54, 2003.
- [172] Reed L. K. *et al.* Genotype-by-Diet interactions drive metabolic phenotype variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 185(3):1009–1019, 2010.
- [173] Reiling J. H. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes & Development*, 18(23):2879–2892, 2004.
- [174] Reiter L. T. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6):1114–1125, 2001.
- [175] Ringo J. Sexual receptivity in insects. *Annual Review of Entomology*, 41(1):473–494, 1996.
- [176] Robertson C. W. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. *Journal of Morphology*, 59(2):351–399, 1936.
- [177] Robertson F. W. The ecological genetics of growth in *Drosophila* 6. The genetic correlation between the duration of the larval period and body size in relation to larval diet. *Genetical Research*, 4(01):74, 1963.
- [178] Ruderman N. B. Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. *Annual Review of Medicine*, 26(1):245–258, 1975.
- [179] Sang J. H. and King R. C. Nutritional requirements of axenically cultured *Drosophila melanogaster* adults. *Journal of Experimental Biology*, 38(4):793–809, 1961.
- [180] Sarkar I. N. *et al.* *Methods in biomedical informatics: a pragmatic approach*. Academic Press, 1 edition, 2013.
- [181] Schiweck H., Clarke M., and Pollach G. *Sugar. In: Uhlmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, volume 34. Wiley-VCH, 2007.
- [182] Schönborn J. W. In silico modelling of *Drosophila* metabolism. Master's thesis, Heinrich-Heine-University, 2018.
- [183] Schuetz R. *et al.* Multidimensional optimality of microbial metabolism. *Science*, 336(6081):601–604, 2012.
- [184] Sebo Z. L., Lee H. B., Peng Y., and Guo Y. A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for *Drosophila* genomic engineering. *Fly*, 8(1):52–57, 2013.
- [185] Segre D., Vitkup D., and Church G. M. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23):15112–15117, 2002.
- [186] Shin S. C. *et al.* *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 334(6056):670–674, 2011.

- [187] Shohat-Tal A. *et al.* Genetics of androgen metabolism in women with infertility and hypoandrogenism. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(7):429–441, 2015.
- [188] Shoal O. *et al.* Evolutionary trade-offs, pareto optimality, and the geometry of phenotype space. *Science*, 336(6085):1157–1160, 2012.
- [189] Sigurdsson M. I. *et al.* A detailed genome-wide reconstruction of mouse metabolism based on human Recon 1. *BMC Systems Biology*, 4(1):140, 2010.
- [190] Simmons F. H. and Bradley T. J. An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 43(8):779–788, 1997.
- [191] Singh M. *et al.* SNP–SNP interactions within APOE gene influence plasma lipids in postmenopausal osteoporosis. *Rheumatology International*, 31(3):421–423, 2011.
- [192] Skorupa D. A., Dervisevendic A., Zwiener J., and Pletcher S. D. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*, 7(4):478–490, 2008.
- [193] Sorek R. and Ast G. Intronic sequences flanking alternatively spliced exons are conserved between human and mouse. *Genome Research*, 13(7):1631–1637, 2003.
- [194] Spiegelman B. M. and Flier J. S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4):531–543, 2001.
- [195] Stein W. D. *Transport and diffusion across cell membranes*. Academic Press Inc., 1986.
- [196] Szekely P. *et al.* The mass-longevity triangle: pareto optimality and the geometry of life-history trait space. *PLOS Computational Biology*, 11(10):e1004524, 2015.
- [197] Senk M., Dill K. A., and de Graff A. M. R. Why do fast-growing bacteria enter overflow metabolism? Testing the membrane real estate hypothesis. *Cell Systems*, 5(2):95–104, 2017.
- [198] Takashima Y. *et al.* Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8):3300–3305, 2011.
- [199] Teleman A. A., Chen Y., and Cohen S. M. *Drosophila* melted modulates FOXO and TOR activity. *Developmental Cell*, 9(2):271–281, 2005.
- [200] Tennessen J. M., Barry W. E., Cox J., and Thummel C. S. Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*, 68(1):105–115, 2014.
- [201] Tennessen J. M. *et al.* The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metabolism*, 13(2):139–148, 2011.
- [202] Thiele I. and Palsson B. Ø. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*, 5(1):93–121, 2010.

- [203] Thummel C. S. Flies on steroids – *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends in Genetics*, 12(8):306–310, 1996.
- [204] Torres-Fuentes C., Schellekens H., Dinan T. G., and Cryan J. F. The microbiota–gut–brain axis in obesity. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2(10):747–756, 2017.
- [205] Tretter L. and Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464):2335–2345, 2005.
- [206] Troncoso B., Godoy-Herrera R., and Mora W. The development of larval movement patterns in *Drosophila*. *Heredity*, 58(3):321–329, 1987.
- [207] Tu M-P. and Tatar M. Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*, 2(6):327–333, 2003.
- [208] Turnbaugh P. J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122):1027–1031, 2006.
- [209] Turner S. D. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *The Journal of Open Source Software*, 3(25):731, 2018.
- [210] Ugrankar R. *et al.* *Drosophila* glucone screening identifies Ck1alpha as a regulator of mammalian glucose metabolism. *Nature Communications*, 6(1), 2015.
- [211] Unckless R. L., Rottschaefer S. M., and Lazzaro B. P. A genome-wide association study for nutritional indices in *Drosophila*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 5(3):417–425, 2015.
- [212] Varma A. and Palsson B. Ø. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technology*, 12(10):994–998, 1994.
- [213] Varma A., Boesch B. W., and Palsson B. Ø. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(1):59–73, 1993.
- [214] von Otte S. *et al.* Adipositas und Fertilität. *Gynäkologische Endokrinologie*, 6(1):20–24, 2008.
- [215] Votruba S. B. and Jensen M. D. Regional fat deposition as a factor in FFA metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 27(1):149–163, 2007.
- [216] Vuong H. E., Yano J. M., Fung T. C., and Hsiao E. Y. The microbiome and host behavior. *Annual Review of Neuroscience*, 40(1):21–49, 2017.
- [217] Waldbauer G. P. and Friedman S. Self-selection of optimal diets by insects. *Annual Review of Entomology*, 36(1):43–63, 1991.
- [218] Walters K. A., Allan C. M., and Handelsman D. J. Androgen actions and the ovary. *Biology of Reproduction*, 78(3):380–389, 2008.

- 
- [219] Wang H-F., Feng L., and Niu D-K. Relationship between mRNA stability and intron presence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(1):203–208, 2007.
- [220] Wayne M. L., Soundararajan U., and Harshman L. G. Environmental stress and reproduction in *Drosophila melanogaster*: starvation resistance, ovariole numbers and early age egg production. *BMC Evolutionary Biology*, 6(57), 2006.
- [221] Williams C. M., Barness L. A., and Sawyer W. H. The utilization of glycogen by flies during flight and some aspects of the physiological ageing of *Drosophila*. *The Biological Bulletin*, 84(3):263–272, 1943.
- [222] Wolfe A. J. The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1):12–50, 2005.
- [223] Wong R. *et al.* Quantification of food intake in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 4(6):e6063, 2009.
- [224] Yamanaka N., Rewitz K. F., and O'Connor M. B. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annual Review of Entomology*, 58(1):497–516, 2013.
- [225] Yang H., Basquin D., Pauli D., and Oliver B. *Drosophila melanogaster* positive transcriptional elongation factors regulate metabolic and sex-biased expression in adults. *BMC Genomics*, 18(1), 2017.
- [226] Yasugi T., Yamada T., and Nishimura T. Adaptation to dietary conditions by trehalose metabolism in *Drosophila*. *Scientific Reports*, 7(1), 2017.
- [227] Yu Z. *et al.* Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics*, 195(1):289–291, 2013.
- [228] Zaman S., Lippman S. I. , Zhao X., and Broach J. R. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual Review of Genetics*, 42(1):27–81, 2008.

# Abbildungsverzeichnis

1.1. Paretdiagramm für zwei konkurrierende Parameter. . . . .	2
1.2. Larvales Wachstum von <i>Drosophila</i> in Abhängigkeit der Nahrungsbedingungen. . . . .	5
2.1. Untersuchung der Entwicklungszeit der DGRP Fliegenlinien in Abhängigkeit metabolischer Gruppen der späten L3 Larven. . . . .	12
2.2. Metabolische Messungen von späten L3 Larven unter basalen Bedingungen. . . . .	14
2.3. Metabolische Messungen von sechs Tage alten verpaarten Weibchen und Männchen unter basalen Bedingungen. . . . .	15
2.4. Korrelationsmatrix von wandernden L3 Larven, sechs Tage alten adulten Weibchen und Männchen. . . . .	16
2.5. Multivariate Datenanalyse der metabolischen Daten. . . . .	17
2.6. Auswirkungen des metabolischen Profils und der genetischen Kontribution auf die Fertilität der Virago Linien. . . . .	19
2.7. Experimente zur Etablierung eines Testsystems mit veränderten Nahrungsbedingungen. . . . .	22
2.8. Reaktionen des metabolischen Phänotyps auf Nahrung mit niedrigem Kaloriengehalt. . . . .	23
2.9. Reaktionen des metabolischen Phänotyps auf veränderte Nahrungsbedingungen. . . . .	25
2.10. <i>Manhattan-Plots</i> ausgewählter Beispiele der GWAS. . . . .	27
2.11. Auswirkungen des Gen-Knockdowns durch RNAi auf das Gen <i>slimfast (slif)</i> . . . . .	32
2.12. Metabolische Charakterisierung auf HD. . . . .	34
2.13. Repräsentation des metabolischen Netzwerks <i>FlySilico</i> 1.0. . . . .	37
2.14. Heatmap von Expressionsdaten von Genen in larvalen Geweben. . . . .	39
2.15. Visualisierung der Expressionsdaten von Genen in larvalen Geweben auf das <i>FlySilico</i> 1.0 Modell. . . . .	41
2.16. Visualisierung der Expressionsdaten von Genen gleicher enzymatischer Reaktionsschritte. . . . .	42
2.17. Gewichtsmessungen von Larven auf HD. . . . .	43
2.18. Größenmessungen von Larven auf HD. . . . .	44
2.19. Metabolische Messung freier Metabolite von Larven auf HD via GC-MS. . . . .	48
2.20. Metabolische Messungen von Larven auf HD. . . . .	49
2.21. Darstellung der prozentualen Anteile von Wassergehalt, Trockengewicht und Metabolitmengen am Gesamtgewicht der Larven. . . . .	50
2.22. Robustheitsanalyse unter veränderten Eingangsparametern. . . . .	52
2.23. Larvale Wachstumsparameter unter veränderten Nahrungsbedingungen zur Validierung des Modells. . . . .	54
2.24. Simulationen zur Allokation von Ressourcen. . . . .	56
2.25. Metabolische Messungen der Larven unter veränderten Nahrungsbedingungen. . . . .	59
3.1. Relationen der SNP-assoziierten Gene unterschiedlicher metabolischer Studien. . . . .	67

---

A.1. Identifizierung metabolisch distinkter Gruppen. . . . .	122
A.2. <i>Boxplots</i> der metabolischen Messungen aller DGRP Linien auf unterschiedlichen Futtersorten. . . . .	123
A.3. Zeitreihe zur Darstellung der phänotypischen Plastizität. . . . .	125
A.4. Effekte einer zusätzlichen Wasserquelle im HSD auf die Glykogenmengen. . . . .	126
A.5. Korrelationen zwischen Bakterien des Darmmikrobioms und metabolischen Parametern. . . . .	127
B.1. Robustheitsanalysen - Cholesterol. . . . .	130
B.2. Robustheitsanalysen - Threonin und Asparaginsäure. . . . .	131
B.3. Der Einfluss von Variationen der GAM und NGAM auf die Wachstumsrate. . . . .	132

# Tabellenverzeichnis

2.1. Nährwerttabelle der Futtersorten LSD und HSD. . . . .	21
2.2. Nährwerttabelle des SDs. . . . .	21
2.3. Signifikant-assoziierte SNPs der Larven . . . . .	26
2.4. Signifikant-assoziierte SNPs der adulten Tiere . . . . .	26
2.5. Auswirkungen und Lokalisationen der SNPs ausgewählter Gene . . . . .	29
2.6. Übersicht über die getesteten RNAi Konstrukte . . . . .	30
2.7. Ergebnisse der Gen-Knockdowns durch RNAi. . . . .	31
2.8. Metabolische Module des <i>FlySilico</i> 1.0 Netzwerks. . . . .	35
2.9. Metabolite der GC-MS Messung. . . . .	45
2.10. Reaktionswege und deren Abkürzungen. . . . .	56
4.1. Die Futterrezepte im Vergleich . . . . .	81
4.2. Glycerolstandard zur fluorometrischen Bestimmung von Glycerol. . . . .	83
4.3. Biochemische Analysen: Verdünnungen . . . . .	84
A.1. Alle gemeinsamen SNPs und SNP-assoziierten Gene der Virago Linien (DGRP ID: 324, 380). . . . .	122
A.2. Alle SNP Daten unter basalen und veränderten Nahrungsbedingungen. . . . .	123
A.3. SNP-assoziierte Gene identifiziert in dieser GWAS und von Jumbo-Lucioni <i>et al.</i> <sup>[108]</sup> .123	
A.4. SNP-assoziierte Gene identifiziert in dieser GWAS und von Ugrankar <i>et al.</i> <sup>[210]</sup> . . . . .	124
B.1. Datenquellen für die Rekonstruktion des metabolischen Netzwerkes. . . . .	128
B.2. Übersicht über den Inhalt der Excel-Kalkulationstabelle. . . . .	128
B.3. <i>FlySilico</i> Modell - Reaktionen und Metabolite . . . . .	130
B.4. Genmodule . . . . .	130

# Abkürzungsverzeichnis

**Acetyl-CoA** Acetyl Coenzym A

**ATP** Adenosintriphosphat

**ADP** Adenosindiphosphat

**BDSC** Bloomington Drosophila Stock Center

**BSA** Rinderserumalbumin; engl. *bovine serum albumin*

**bspw.** beispielsweise

**bzw.** beziehungsweise

**CAFE** engl. *Capillary Feeder*

**CS** Citrat-Synthase

**DGRP** Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel

**DGET** Drosophila Gene Expression Tool

**d. h.** das heißt

**DNA** Desoxyribonukleinsäure; engl. *deoxyribonucleic acid*

**DTNB** 5,5'-Diothiobis-2-nitrobenzoesäure

**dw** Trockengewicht, engl. *dry weight*

**EAA** essentielle Aminosäuren, engl. *essential amino acids*

**EC** Numerisches Klassifikationssystem für Enzyme, engl. *enzyme commission number*

**EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

**FBA** Fluss-Balance-Aanalysen, engl. *flux balance analysis*

**GAM** wachstums-abhängige Energieprozesse, engl. *growth associated maintenance requirements*

**GC-MS** Gaschromatographie-Massenspektrometrie

**GO** engl. *gene ontology*

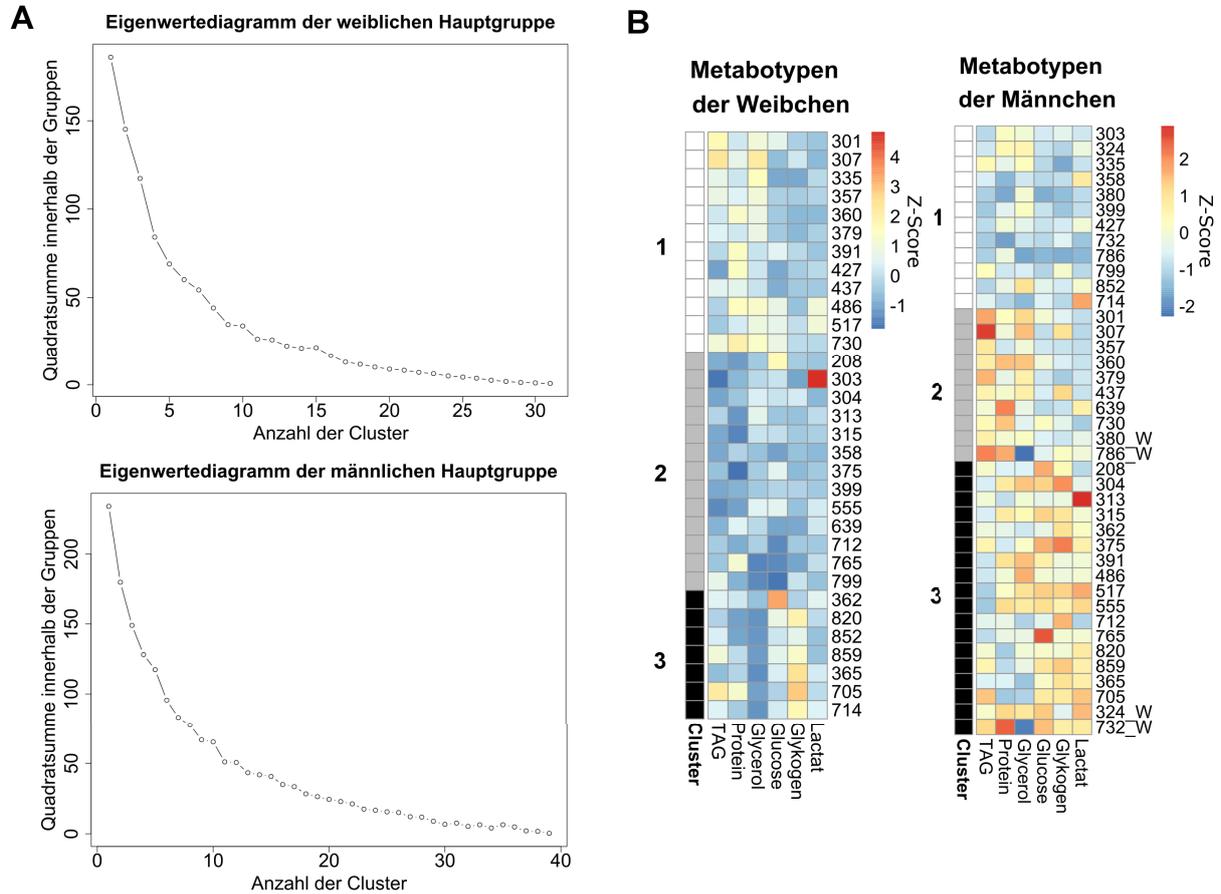
**GPR** Gen-Protein-Reaktions-Regeln, engl. *gene-protein-reaction rules*

**GWAS** Genomweite Assoziationsstudien, engl. *genome-wide association studies*

**HD** chemisch definiertes Futter, engl. *holidic diet*

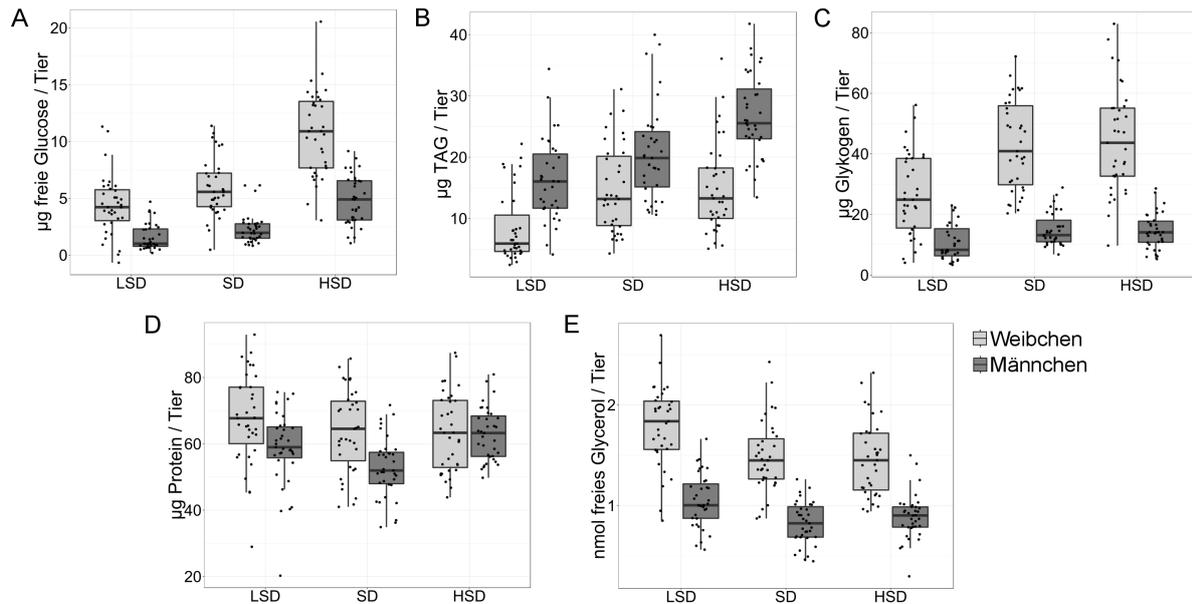
- HSD** Futter mit erhöhter Zuckerkonzentration, engl. *high sugar diet*
- JH** Juvenilhormon
- L3** drittes larvales Stadium
- LDH** Lactatdehydrogenase
- LP** Lineare Programmierung
- LSD** Niedrigzuckerfutter, engl. *low sugar diet*
- NAD<sup>+</sup>** Nicotinamidadeninukleotid, oxidierte Form
- NGAM** wachstums-unabhängige Energieprozesse, engl. *non-growth associated maintenance requirements*
- OAA** Oxallessigsäure, engl. *oxalacetic acid*
- PBS** Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. *phosphate buffered saline*
- PC** Hauptkomponente, engl. *principle component*
- PCA** Hauptkomponentenanalyse, engl. *principle component analysis*
- PE** engl. *proboscis extension*
- qPCR** quantitative Polymerase-Kettenreaktion, engl. *quantitative polymerase chain reaction*
- RNA** Ribonukleinsäure; engl. *ribonucleic acid*
- RNA-Seq** Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung
- SD** Standardfutter, engl. *standard diet*
- SNP** Einzelnukleotid-Polymorphismus, engl. *single-nucleotide polymorphism*
- TAG** Triglycerid oder Triacylglycerid
- TOR** Target of Rapamycin
- TRiP** *Transgenic RNAi Project*
- UAS** engl. *Upstream Activating Sequence*
- usw.** und so weiter
- VE** vollentsalzt
- vs.** im Vergleich zu, engl. *versus*
- ww** Feuchtgewicht, engl. *wet weight*
- Yaa** Hefe-ähnliche Aminosäurezusammensetzung, engl. *Yeast-like amino acid*
- ZNS** Zentrales Nervensystem

# A. Studien zum metabolischen Phänotyp



**Abbildung A.1.:** Identifizierung metabolisch distinkter Gruppen. (A) Eigenwertediagramme (engl. *scree plot*) zur Identifikation der Anzahl metabolisch distinkter Gruppen innerhalb der weiblichen und männlichen Hauptgruppe aus Abbildung 2.5. (B) Die Darstellung der metabolischen Gruppen (Metabotypen 1-3 bei den Weibchen und Männchen) in einer Heatmap. Die metabolischen Daten wurden durch spaltenweise z-Transformation (Farbcodierung) standardisiert. Jede Spalte repräsentiert die Messung eines Metabolits (pro Tier). Jede Reihe repräsentiert eine Fliegenlinie. In der Hauptgruppe der Männchen sind vier Weibchen mit einem männlichen metabolischen Profil lokalisiert (324\_W, 380\_W, 732\_W und 786\_W).

**Tabelle A.1.:** Die Tabelle A.1 befindet sich auf der beigefügten CD und beinhaltet alle SNPs und SNP-assoziierten Gene, die ausschließlich in den beiden Virago Linien (DGRP ID: 324, 380) auftreten.



**Abbildung A.2.:** *Boxplots* der metabolischen Messungen aller DGRP Linien auf den Futterarten mit unterschiedlichen Zuckerkonzentrationen (LSD, SD und HSD). Gezeigt sind die gemittelten Werte der Triplikate der metabolischen Parameter (A) Glucose, (B) TAG, (C) Glykogen, (D) Proteine und (E) freies Glycerol aller 35 DGRP Linien (hellgrau - Weibchen, dunkelgrau: Männchen). Alle Daten sind normalisiert auf die Anzahl an adulten Tieren pro Probe ( $n = 8$ ). Die gezeigten Daten beziehen sich auf die Analysen in Abschnitt 2.2.2.

**Tabelle A.2.:** Die Tabelle A.2 befindet sich auf der beigefügten CD und beinhaltet alle signifikant assoziierten SNPs mit den metabolischen Eigenschaften unter basalen und veränderten Nahrungsbedingungen der Larven und der 6-7 Tage alten adulten Tiere (Weibchen und Männchen) sowie die Gene, die mit den SNPs assoziiert sind.

**Tabelle A.3.:** SNP-assozierte Gene identifiziert in dieser GWAS und von Jumbo-Lucioni *et al.*<sup>[108]</sup>.

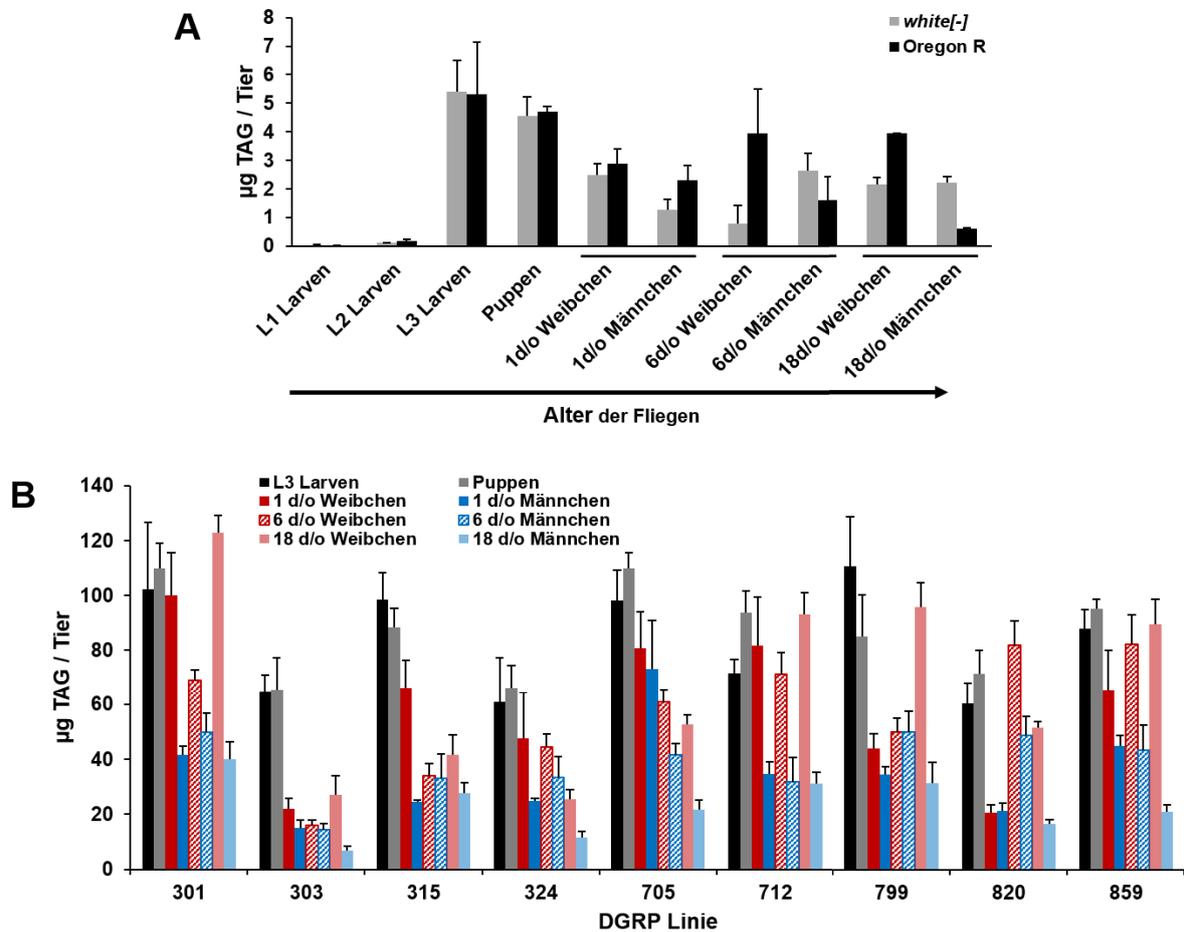
#	Gen ID	CG Nummer	Genname
<i>SNP-assozierte Gene identifiziert unter basale Bedingungen:</i>			
1	FBgn0034118	CG6251	Nucleoporin 62kD
2	FBgn0036302	CG10632	sosondowah
3	FBgn0023197	CG6298	Jonah 74E
4	FBgn0262872	CG43227	milton
5	FBgn0032456	CG6214	Multidrug-Resistance like Protein 1
6	FBgn0267487	CG9181	Protein tyrosine phosphatase 61F
7	FBgn0283521	CG12052	longitudinals lacking

*SNP-assozierte Gene identifiziert unter veränderte Nahrungsbedingungen:*

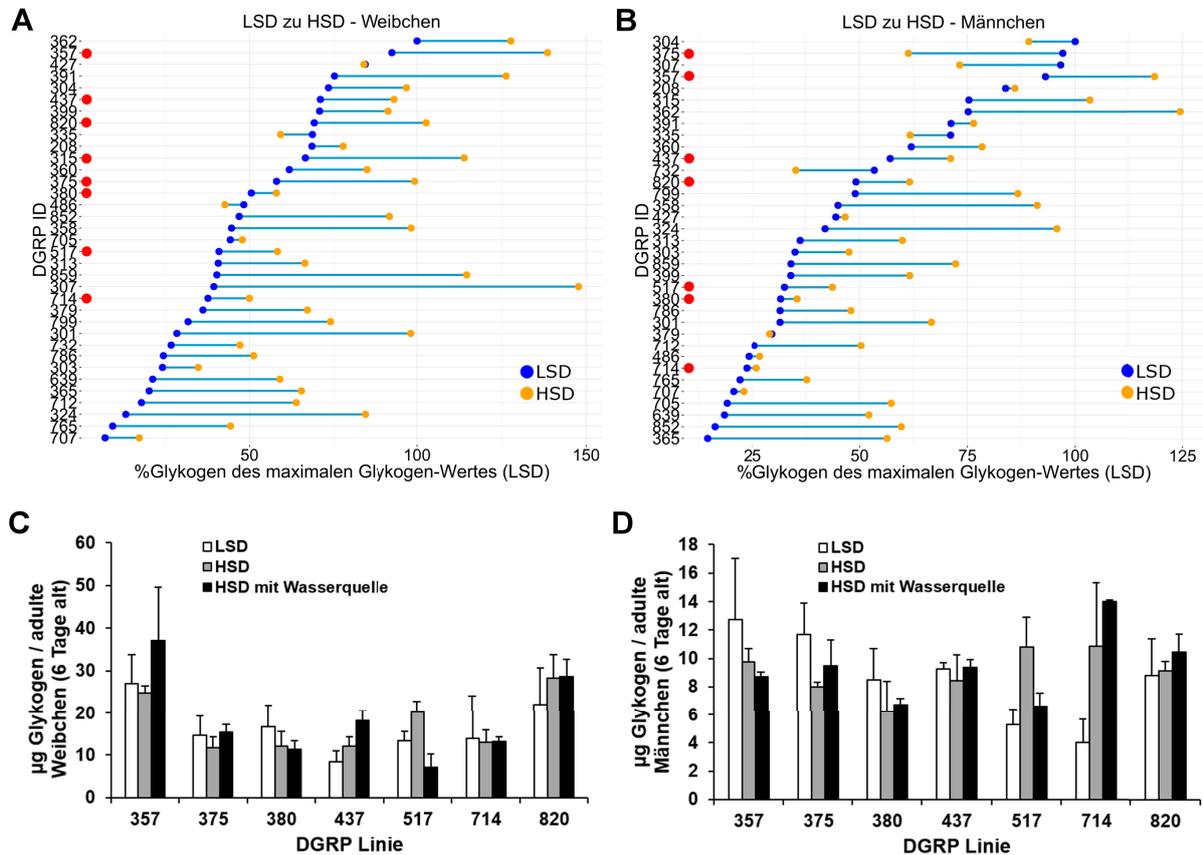
#	Gen ID	CG Nummer	Genname
8	FBgn0041096	CG32096	rolling pebbles
9	FBgn0002524	CG4162	lace
10	FBgn0000639	CG17285	Fat body protein 1
11	FBgn0037534	CG2781	CG2781
12	FBgn0250836	CG8628	Acyl-CoA binding protein 3
13	FBgn0262579	CG43119	Ectoderm-expressed 4
14	FBgn0036157	CG7560	CG7560
15	FBgn0266411	CG45051	similar
16	FBgn0266696	CG45186	Supervillin
17	FBgn0043841	CG31764	virus-induced RNA 1
18	FBgn0261274	CG1333	Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1-like

**Tabelle A.4.:** SNP-assozierte Gene identifiziert in dieser GWAS und von Ugrankar *et al.*<sup>[210]</sup>.

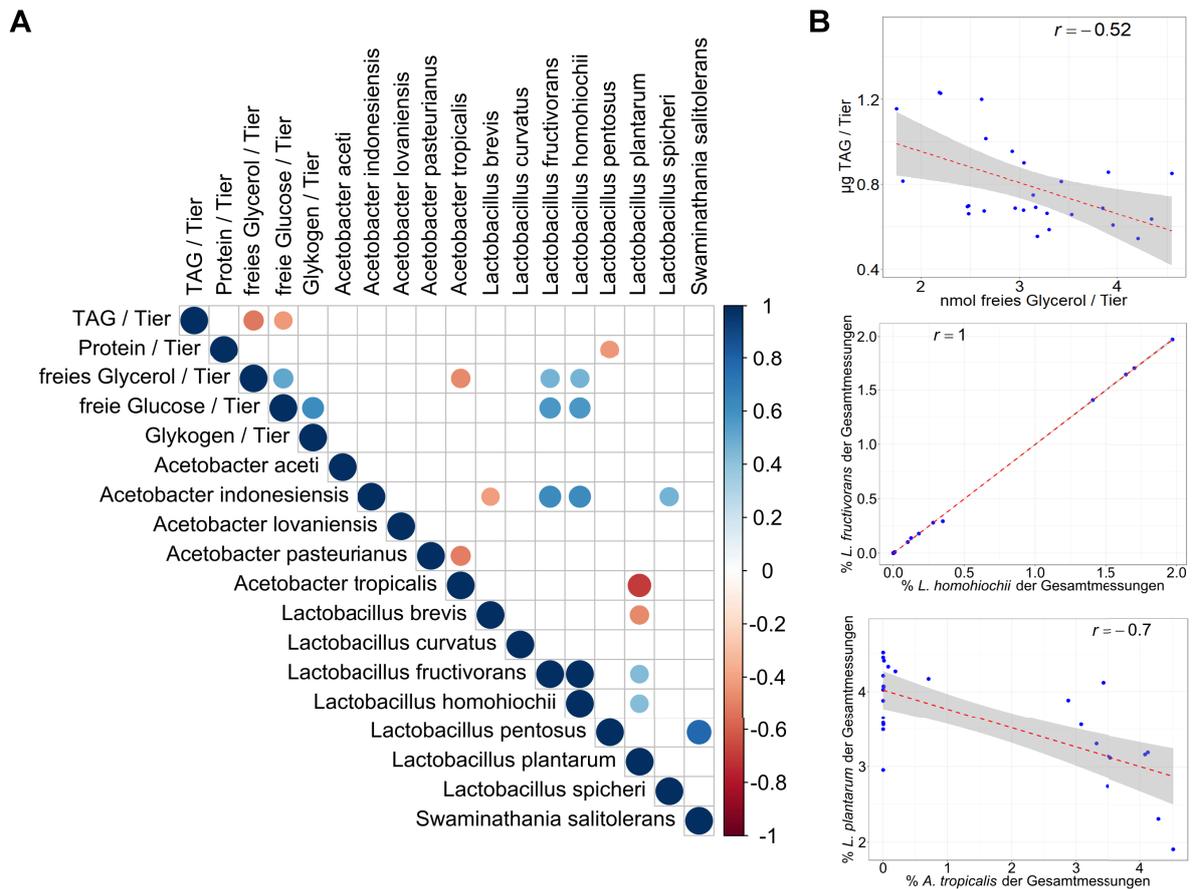
#	Gen ID	CG Nummer	Genname
<i>SNP-assozierte Gene identifiziert unter basale Bedingungen:</i>			
1	FBgn0020617	CG10052	Retinal Homeobox
2	FBgn0265045	CG44162	Stretchin-Mlck
3	FBgn0011589	CG5076	Eag-like K <sup>+</sup> channel
4	FBgn0040309	CG1633	thioredoxin peroxidase 1
5	FBgn0016797	CG9739	frizzled 2
6	FBgn0004369	CG11516	Protein tyrosine phosphatase 99A
7	FBgn0052547	CG32547	CG32547
8	FBgn0267252	CG3694	G protein subunit $\gamma$ at 30A
9	FBgn0259822	CG42403	Ca <sup>2+</sup> -channel-protein- $\beta$ -subunit
10	FBgn0283521	CG12052	longitudinals lacking
<i>SNP-assozierte Gene identifiziert unter veränderte Nahrungsbedingungen:</i>			
11	FBgn0016076	CG14029	vriille
12	FBgn0086655	CG9397	jing
13	FBgn0000546	CG1765	Ecdysone receptor
14	FBgn0000568	CG8127	Ecdysone-induced protein 75B
15	FBgn0010909	CG16973	misshapen
16	FBgn0031855	CG11221	meng-po
17	FBgn0013726	CG8705	peanut
18	FBgn0035957	CG5144	CG5144
19	FBgn0265523	CG4013	Smrter



**Abbildung A.3.:** Zeitreihe zur Darstellung der phänotypischen Plastizität. (A) Metabolische Zeitreihe von Oregon R und *white[-]* Fliegen. Gezeigt sind die Mengen der Triglyceride über verschiedene Zeitpunkte der Entwicklung: (i) L1, L2 und wandernde L3 Larven, (ii) Puppen und (iii) adulte Fliegen im Alter von einem Tag, sechs Tagen und 18 Tagen. Die Triglyceridmengen sind normiert über die Anzahl der Tiere (L1 Larven:  $n = 30$ , L2 Larven:  $n = 15$ , L3 Larven  $n = 5$ , Puppen und adulte Tiere:  $n = 8$ ). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von zwei biologisch unabhängigen Versuchen mit je Quadruplikate. (B) Die Abbildung zeigt ausgewählte DGRP Linien (niedriger, mittlerer und hohe TAG-Mengen unter basalen Bedingungen) über verschiedene Zeitpunkte der Entwicklung: (i) wandernde L3 Larven, (ii) Puppen, (iii) adulte Tiere im Alter von einem Tag, sechs Tagen und 18 Tagen. Gezeigt sind die Messungen der Triglyceride pro Tier (Larven und Puppen:  $n = 5$ , adulte Tiere:  $n = 8$ ). Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Quadruplikate.



**Abbildung A.4.:** Effekte einer zusätzlichen Wasserquelle im HSD auf die Glykogenmengen. Abbildungen (A) und (B) zeigen die *Dumbbell Plots* der Glykogen Messungen von sechs Tage alten DGRP Weibchen und Männchen vom Wechsel von LSD zu HSD. Die ausgewählten DGRP Linien für den Versuch mit der zusätzlichen Wasserquelle sind mit roten Markierungen versehen. Für Abbildungen (C) und (D) wurden die ausgewählten DGRP Linien auf LSD angezogen und die frisch geschlüpften Tiere (Weibchen und Männchen) auf LSD, HSD oder HSD mit einer zusätzlichen Wasserquelle (Pipettenspitze gefüllt mit 1 % Agar) umgesetzt. Gezeigt sind die Messungen von Glykogen pro Tier (n = 8) von sechs Tage alten (C) Weibchen oder (D) Männchen. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate.



**Abbildung A.5.:** Korrelationen zwischen Bakterien des Darmmikrobioms und metabolischen Parametern. Alle Daten sind log-transformiert. (A) Korrelationsmatrix von signifikanten Zusammenhängen ( $p > 0,5$ ) zwischen metabolischen Messungen (basale und veränderte Nahrungsbedingungen) und den identifizierten Bakterienspezies des Darmmikrobioms. Die Farbe und Größe der Kreise repräsentieren den Korrelationskoeffizienten  $r$  ( $-1 < r < 1$ ) und den  $p$ -Wert. (B) Streudiagramm (engl. *scatter plot*) von ausgewählten Korrelationen der Korrelationsmatrix. Grafik entnommen und modifiziert aus<sup>[106]</sup>.

## B. FlySilico: Metabolisches Modell

**Tabelle B.1.:** Datenquellen für die Rekonstruktion des metabolischen Netzwerkes. Tabelle entnommen aus<sup>[182]</sup>.

Datenquelle	Link	Beschreibung
BioCyc <sup>[42,43]</sup>	<a href="https://biocyc.org/">https://biocyc.org/</a>	BioCyc beinhaltet Organismen-spezifische Informationen über Enzyme, Reaktionen, Metabolite, Reaktionswege an.
Brenda <sup>[163]</sup>	<a href="https://www.brenda-enzymes.org/">https://www.brenda-enzymes.org/</a>	Brenda beinhaltet Organismen-spezifische Informationen über Enzyme und Reaktionen und erlaubt den direkten Vergleich von Reaktionen/Enzyme zwischen verschiedenen Organismen.
ChEBI <sup>[94]</sup>	<a href="https://www.ebi.ac.uk/chebi/">https://www.ebi.ac.uk/chebi/</a>	ChEBI ( <i>Chemical Entities of Biological Interest</i> ) beinhaltet Informationen über Moleküle/chemische Entitäten.
KEGG <sup>[109,110]</sup>	<a href="https://www.genome.jp/kegg/">https://www.genome.jp/kegg/</a>	KEGG ( <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> ) beinhaltet Organismen-spezifische Informationen über Reaktionen, Gene, chemische Entitäten und Reaktionswege.
PubChem <sup>[113]</sup>	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	PubChem beinhaltet Informationen über chemische Entitäten.
Lehninger Biochemistry <sup>[149]</sup>	<a href="https://www.springer.com/gb/book/9783540686378">https://www.springer.com/gb/book/9783540686378</a>	Das Buch Lehninger Biochemistry enthält generelle Informationen über Reaktionen, Metabolite und Enzyme.
FlyBase <sup>[84]</sup>	<a href="http://flybase.org/">http://flybase.org/</a>	FlyBase beinhaltet Informationen über <i>Drosophila melanogaster</i> und weitere <i>Drosophila</i> Spezies.
BiGG <sup>[114]</sup>	<a href="http://bigg.ucsd.edu/">http://bigg.ucsd.edu/</a>	BiGG ( <i>Biochemical, Genetic and Genomic</i> ) beinhaltet Informationen von Reaktionen, Metabolite, Gene von diversen metabolischen Modellen. Alle Modelle können bei BiGG heruntergeladen werden.

**Tabelle B.2.:** Übersicht über den Inhalt der Excel-Kalkulationstabelle. Tabelle entnommen aus<sup>[182]</sup>. Die Asterisken (\*) kennzeichnen die minimalen Informationen, die in der Kalkulationstabelle enthalten sein müssen, um ein funktionsfähiges Netzwerk mit COBRAPy zu generieren.

Spaltenname	Beschreibung
<b>Tabellenname: Reactions</b>	
Abbreviation*	Abkürzung des Reaktionsnamens
Name*	Vollständiger Name der Reaktion
Reaction*	Repräsentation der Reaktionen, als reversible (<==>) oder irreversible (- ->) Reaktionen

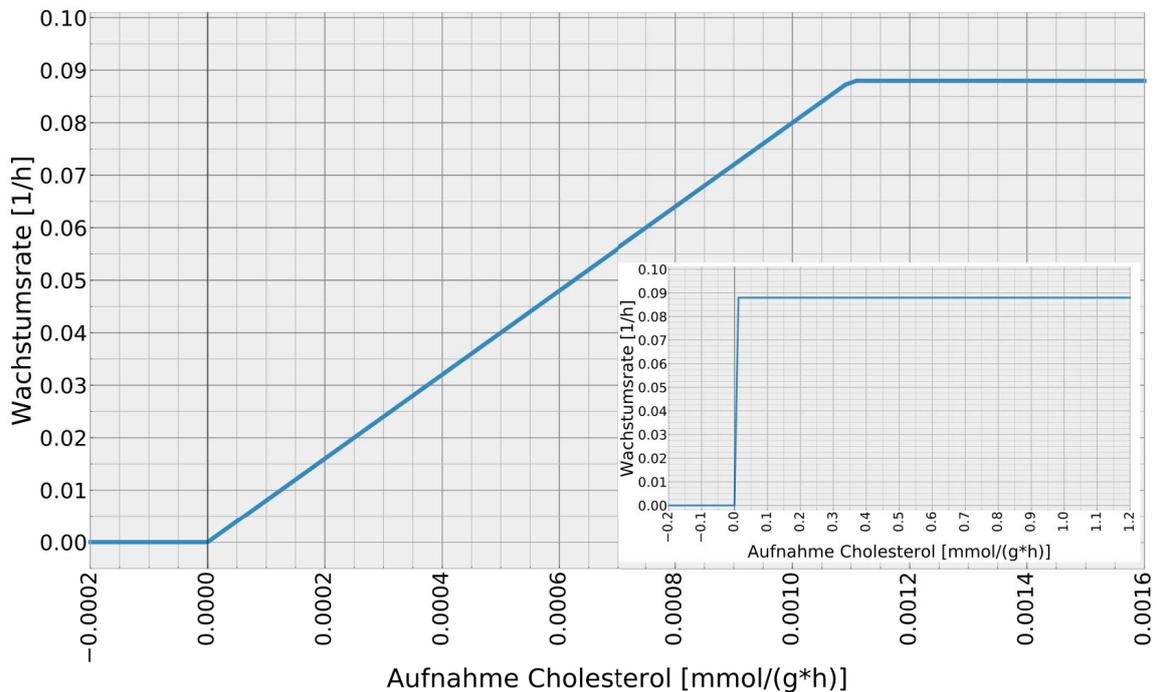
Spaltenname	Beschreibung
GPR (Gene-Protein-Rule)	Enthält die Namen der Gene, die zu der Reaktion assoziiert sind
Genes	Zusätzliche Informationen zu den Genen
Protein	Informationen zu den Proteinen, die zugehörig zu der Reaktion sind
Subsystem	Das zelluläre Kompartiment, in welcher die Reaktion stattfindet
Reversible	Boolescher Ausdruck. Codiert die Reversibilität der Reaktion. 1 = reversibel, 0 = irreversibel
Lower Bound*	Gibt die minimale Flussrate einer Reaktion an. Negative Werte = Richtung von Produkt zu Reaktant (positive Werte andersrum)
Upper Bound*	Gibt die maximale Flussrate einer Reaktion an. Negative Werte = Richtung von Produkt zu Reaktant (positive Werte andersrum)
Objective	Boolescher Ausdruck, ob eine Reaktion die Zielfunktion ist (1) oder nicht (0)
Confidence Score	Ein Wert zwischen 0 und 4. Beschreibung in <sup>[202]</sup>
EC Number	Enzyme Commission (EC) Zahl zu der Reaktion
Notes	Enthält Notizen zu den Reaktionen
References	Literaturangaben zu den Reaktionen
KEGG ID	KEGG Identifikationsnummer der Reaktion

**Tabellenname: Metabolites**

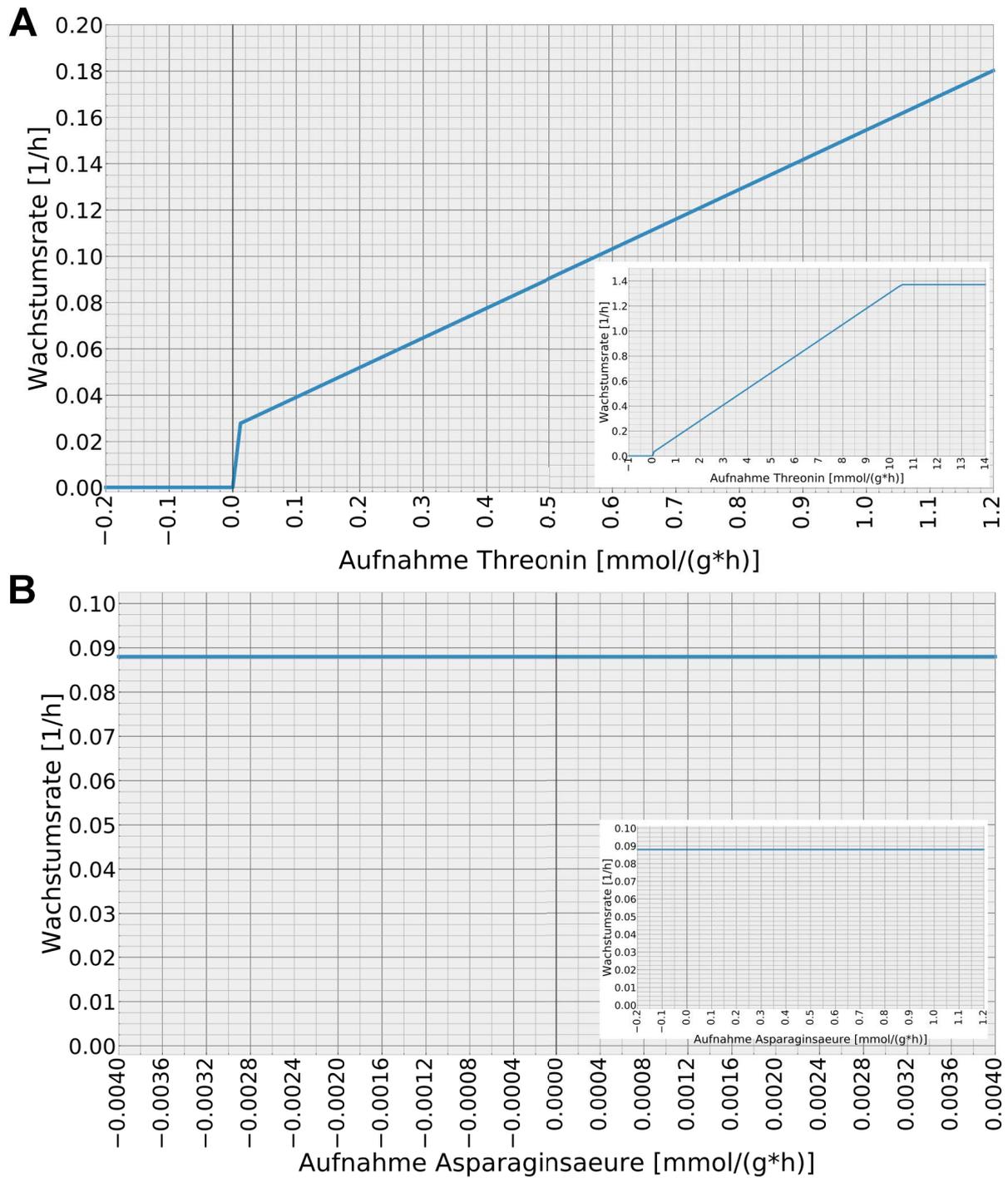
Abbreviation*	Abkürzung des Metabolitnamens
Official name*	Der offizielle Metabolitname
Formula (neutral)	Der chemische Ausdruck des Metabolits im neutralen Zustand
Formula*	Der chemische Ausdruck des Metabolits in geladenem Zustand
Charge*	Wert, der negativ oder positiv sein kann und die Ladung des Metaboliten angibt
Compartment	Abkürzung des zellulären Kompartiments, in welchem das Metabolit lokalisiert ist
KEGG ID	KEGG Identifikationsnummer des Metabolits
PubChem ID	PubChem Identifikationsnummer des Metabolits
ChEBI ID	ChEBI Identifikationsnummer des Metabolits
InChi string	Die IUPAC internationale Kennzeichnung des Metaboliten
Smiles	<i>simplified molecular-input line-entry system string</i> des Metaboliten (vereinfachter Strukturcode)
HMDB	<i>Human Metabolome Database ID</i> des Metaboliten
Notes	Enthält Notizen zu den Reaktionen

**Tabelle B.3.:** Die Tabelle B.3 befindet sich auf der beigefügten CD und beinhaltet alle Reaktionen und Metabolite des *FlySilico* Modells.

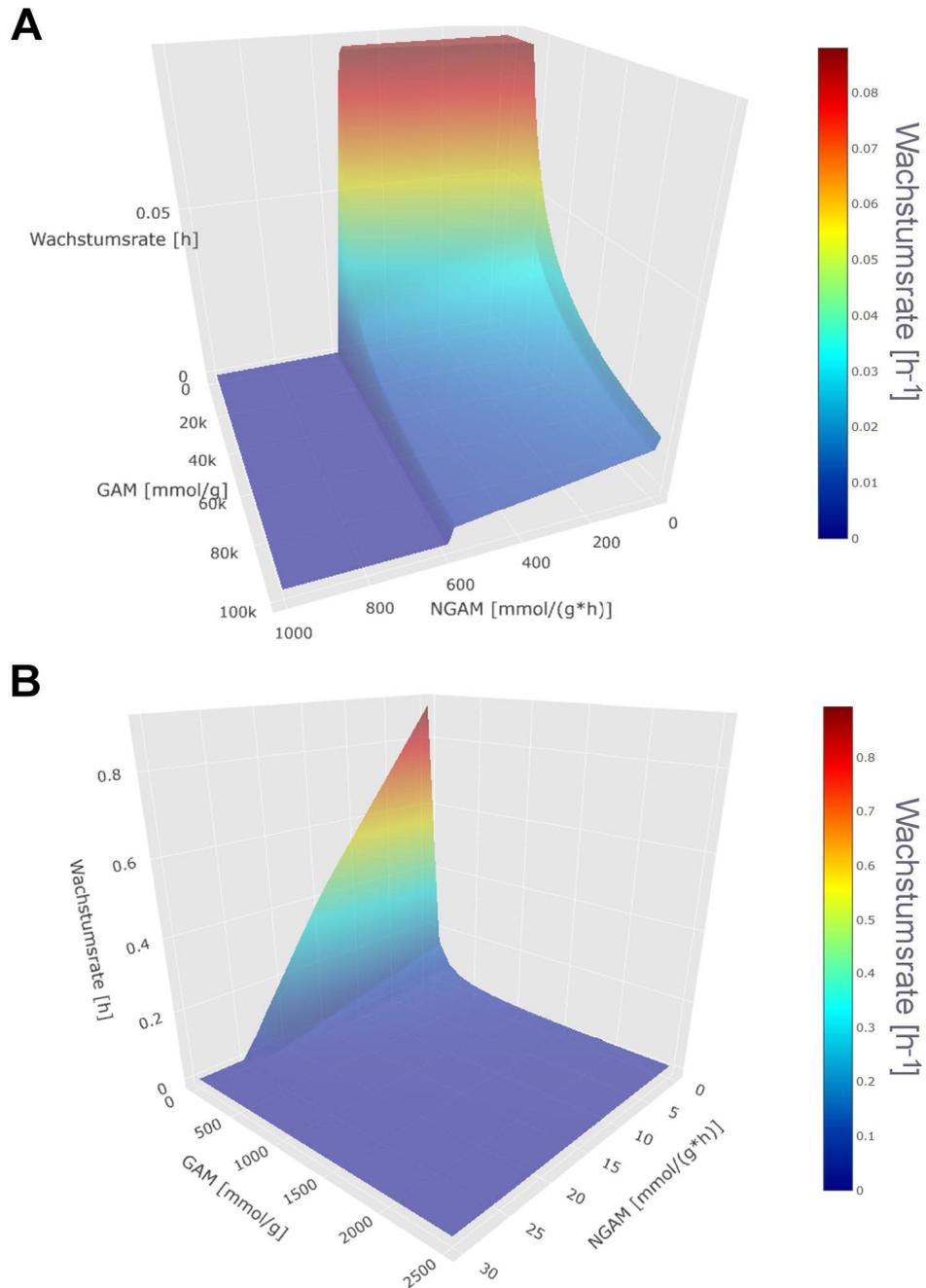
**Tabelle B.4.:** Die Tabelle B.4 befindet sich auf der beigefügten CD und beinhaltet alle Gene aus der Analyse der Genexpressionsdaten in unterschiedlichen Geweben der *Drosophila* Larven (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.5.2). In der Tabelle sind die Gene der einzelnen Module mit den zugehörigen Reaktionswegen aufgeführt.



**Abbildung B.1.:** Robustheitsanalysen. Modellierte Wachstumsrate in Abhängigkeit der Cholesterolaufnahme. *Drosophila* ist ein Cholesterol-auxotropher Organismus<sup>[179]</sup>. Die Simulation zeigt, dass das Modell Cholesterol zur Produktion von Biomasse benötigt. Grafik entnommen und modifiziert aus<sup>[182]</sup>.



**Abbildung B.2.:** Robustheitsanalysen. (A) Modellierter Wachstumsrate in Abhängigkeit der Threoninaufnahme. Threonin ist eine essentielle Aminosäure, die einen Einfluss auf die Wachstumsrate im Modell hat. (B) Modellierter Wachstumsrate in Abhängigkeit der Aufnahme an Asparaginsäure. Die nicht-essentielle Aminosäure hat keinen Einfluss auf die Wachstumsrate. Grafiken entnommen und modifiziert aus<sup>[182]</sup>.



**Abbildung B.3.:** Der Einfluss von Variationen der GAM und NGAM auf die Wachstumsrate. (A) Für einen großen Wertebereich der Koeffizienten von GAM und NGAM wird die maximale Wachstumsrate nicht beeinflusst. Erst mit starkem Anstieg der Werte kommt es zur Reduktion der Wachstumsrate. (B) Die Variationen der GAM und NGAM Koeffizienten auf die Wachstumsrate des IMM904 Hefe Modells<sup>[138]</sup>. Im Gegensatz zum *FlySilico* Modell haben die niedrigere Werte einen Einfluss auf die maximale Wachstumsrate. Grafik entnommen und modifiziert aus<sup>[182]</sup>.