Drosophila als Modellsystem für die Untersuchung der Interaktion(en) zwischen dem metabolischen Status des Wirts, seines Immunsystems und seines Darm-Mikrobioms

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Fiona Anne Stewart

aus Siegen

Düsseldorf, Dezember 2019

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

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

Berichterstatter:

- 1. Junior-Professor Dr. Mathias Beller
- 2. Professor Dr. Markus Kollmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VI
Vorveröffentlichungen der Dissertation	VII
1 Einleitung	1
1.1 Interaktion des Darmmikrobioms mit dem Wirt	1
1.2 Drosophila melanogaster als Modellorganismus der Mikrobiomforschung	3
1.2.1 Der Darm von <i>Drosophila</i>	4
1.2.2 Die Darmflora von Drosophila	6
1.2.3 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung und den Metabolismus von Droso	phila . 9
1.2.4 Das Immunsystem von Drosophila melanogaster und Wechselwirkungen mit dem	
Darmmikrobiom	11
1.3 Ziele der Arbeit	13
2 Ergebnisse	15
2.1 Verschiedene Methoden zur Untersuchung des Darmmikrobioms in Drosophila	15
2.1.1 Herstellung axenischer Fliegen	15
2.1.2 Detektion und Bestimmung von Darmbakterien in Drosophila	16
2.1.3 Aufrechterhaltung axenischer Drosophila Dauerkulturen	18
2.1.4 Das Testen verschiedener Extraktionsmethoden zur Isolation mikrobieller DNA	
2.1.5 Etablierung von qPCR-Analysen des Darmmikrobioms mit speziesspezifischen Primern	19
2.1.6 Methoden zur Quantifizierung von qPCR Analysen	26
2.1.7 Genomanalysen einzelner Darmbakterien aus Drosophila	27
2.1.8 Nachweis von Darmbakterien in Drosophila durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	36
2.2 Der Zusammenhang zwischen Darmmikrobiom und Metabolismus des Wirts	44
2.2.1 Analysen des Darmmikrobioms von wildtypischen Fliegen unter verschiedenen	
Umwelteinflüssen	44
2.2.2 Korrelationen zwischen Metabolitprofilen und Mikrobiomkompositionen	52
2.2.3 Stammspezifische Abhängigkeiten der Fliegen von einem Darmmikrobiom	54
2.3 Untersuchungen von Wirt-Mikrobiom Interaktionen in Referenzfliegenlinien	63
2.3.1 Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung unter Hefemangelbedingungen	64
2.3.2 Metabolische Unterschiede zwischen konventionell gehaltenen und axenischen Fliegen.	66
2.3.3 Lokomotorische Aktivität von axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen	68
2.3.4 Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung	71

2.3.5 Austausch des Darmmikrobioms zwischen den Referenzfliegenlinien	74
2.3.6 Untersuchungen zur Persistenz des Mikrobioms	80
2.3.7 Reassoziationen von Fliegenlinien mit verschiedenen Mikrobiomen	95
3 Diskussion	100
3.1 Methoden der Mikrobiomanalysen in Drosophila	100
3.2 Untersuchungen der Varianz der Wirt-Darmmikrobiom-Interaktion	103
3.2.1 Unterschiede in der Darmmikrobiomkomposition trotz gleicher Umweltbedingungen	103
3.2.2 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung	106
3.2.3 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf den Metabolismus	107
3.3 Die Wirt-Mikrobiom-Interaktion in zwei wildtypischen Fliegenlinien	108
3.3.1 Variationen im Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung und den Metabolismus	109
3.3.2 Unterschiede in der Mikrobiomkomposition und dem Bakteriengehalt	112
3.3.3 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf die lokomotorische Aktivität des Wirts	114
3.3.4 Einfluss des Wirts auf die Mikrobiomkomposition	115
3.3.5 Persistenz des Darmmikrobioms	118
3.3.6 Das perturbierte Mikrobiom behält seinen wachstumsfördernden Effekt bei	119
3.4 Fazit und Ausblick	121
4 Material	123
4.1 Geräte	123
4.2 Verbrauchsmaterialien	124
4.3 Chemikalien und Futterkomponenten	124
4.4 Lösungen und Puffer	126
4.5 Oligonukleotide und FISH Sonden	127
4.6 Antibiotika	128
4.7 Reagenzien, Enzyme, DNA-Farbstoffe	128
4.8 Molekularbiologische und metabolische Kits	129
4.9 Nährmedien und Fliegenfutter	129
4.10 Bakterienstämme	132
4.11 Fliegenstämme	132
5 Methoden	134
5.1 Drosophila melanogaster Methoden	134
5.1.1 Fliegenhaltung	134
5.1.2 Untersuchung des Darmmikrobioms von verschiedenen Wildtypfliegenlinien	134
5.1.3 Herstellung axenischer Fliegen	134

5.1.4 Entwicklung axenischer Fliegen unter Mangelbedingungen	135
5.1.5 Lokomotorische Messungen von axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen	
5.1.6 Messung der Futteraufnahmemenge von adulten Fliegen	135
5.1.7 Quantifizierung der Faeces-Menge	
5.1.8 Mikrobiomaustausch zwischen Fliegenlinien	136
5.1.9 Quantifizierung des Darmmikrobioms	
5.1.10 Reassoziation von Drosophila mit verschiedenen Darmbakterien	
5.2 Molekularbiologische Methoden	
5.2.1 DNA-Extraktion aus Larven, adulten Fliegen und Bakterienkulturen	139
5.2.2 DNA-Extraktion aus einzelnen Fliegen	
5.2.3 Klonierungsstrategie für 16S rRNA Gene	140
5.2.4 Alkalische Lyse	140
5.2.5 Plasmid Präparation und Sanger Sequenzierung	141
5.2.6 RNA Extraktion aus adulten Fliegen	
5.2.7 Synthese komplementärer DNA (cDNA)/ Reverse Transkription	141
5.2.8 Polymerase-Kettenreaktion	
5.2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	142
5.2.10 Mikrobiom-Sequenzierung	
5.3 Biochemische Methoden	
5.3.1 Bestimmung des Triacylglycerolgehalts	
5.3.2 Bestimmung des Glucose- und Glykogengehalts	
5.3.3 Bestimmung des Proteingehalts	
5.4 Histologische Methoden	
5.4.1 Präparation und Fixierung von larvalen und adulten Fliegendärmen	
5.4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Bakterien in Drosophila Därmen	145
5.4.3 Konfokalmikroskopie	
5.5 Statistik	
5.6 Datenanalyse	
5.7 Genomweite Assoziationsstudien	
6 Anhang	147
6.1 Resequenzierung der aus Drosophila isolierten Darmbakterien	
6.2 Sequenzierungen von vier DGRP Fliegenlinien unter verschiedenen Konditionen	
6.3 Metabolitmessungen der konventionell gehaltenen und axenischen DGRP	150
6.4 qPCR Ergebnisse des Mikrobiomaustauschs in Larven und adulten Fliegen	

6.5 Test-Färbungen verschiedener Bakterien mit dem DNA-Farbstoff ToPro1	. 155
6.6 Reassoziation von axenischen Fliegen mit isolierten Mikrobiomen	.156
7 Verzeichnisse	. 158
7.1 Literaturverzeichnis	. 158
7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	. 172
7.3 Abkürzungsverzeichnis	.176
8 Danksagung	.178
9 Eidesstattliche Erklärung	. 179

Zusammenfassung

Alle Metazoen leben in einer Symbiose mit einer großen Zahl an Mikroorganismen. Es wird immer deutlicher, dass dieses "Mikrobiom" verschiedene Einflüsse auf den Wirt hat, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch weitestgehend unbekannt sind. So korreliert eine Dysbiose des Darmmikrobioms mit Fettleibigkeit, Diabetes und Darminfektionen des Wirts, aber auch mit neurologischen Störungen wie Autismus, Parkinson und Depressionen. Da das menschliche Darmmikrobiom hoch divers und komplex ist, sind funktionale Untersuchungen zur Wirt-Mikrobiom-Interaktion im Menschen sehr schwierig. Daher werden Modellorganismen zur Analyse dieser Mechanismen benötigt. Die Einfachheit des Darmmikrobioms auf viele physiologische Aspekte des Wirts. So konnte gezeigt werden, dass sterile (axenische) Fliegen metabolische Unterschiede und Wachstumsdefizite gegenüber Fliegen mit Mikrobiom aufweisen. Dennoch zeigen verschiedene *Drosophila* Stämme unterschiedlich starke Ausprägungen dieser Effekte. Welche Aspekte diese Ausprägungen im Zusammenspiel von Wirt und Mikrobiom bewirken, ist noch nicht klar. Die Unterschiede können vom Genotyp des Wirts, sowie einer unterschiedlichen Abhängigkeit von seinem Mikrobiom ausgehen, aber auch auf Variationen im Darmmikrobiom selbst zurückzuführen sein.

Um dies zu beantworten, wurden in der vorliegenden Studie Mikrobiom-Stabilitätsexperimente, sowie Mikrobiom-Übertragungs- und -Reassoziationsexperimente durchgeführt. Basis der Experimente waren zwei extern unterscheidbare Fliegenstämme, die sich in ihrer Abhängigkeit vom Mikrobiom, ihrer Entwicklung unter Nährstoffmangel und ihrer lokomotorischen Aktivität unterschieden. Es erwies sich außerdem, dass sich diese Linien trotz gleicher Haltungsbedingungen in ihrer Mikrobiomkomposition und im Bakteriengehalt unterschieden. Die Übertragungsexperimente, in denen das Mikrobiom von einer Fliegenlinie auf eine andere transferiert wurde, zeigten, dass die Komposition während der larvalen Entwicklung fast vollständig unabhängig vom Wirt ist und erst im adulten Stadium Varianzen in der Komposition größer werden. In den Stabilitätsexperimenten führte ein regelmäßiges Umsetzen der Fliegen auf neues Futter zu einer drastischen Reduktion der koloniebildenden Einheiten (KBE), wobei die Verlustrate der Bakterien zwischen den Fliegenlinien variierte und die Linie mit dem geringeren Bakteriengehalt ihr Mikrobiom schneller verlor. Dennoch erholten sich die KBE beider Fliegenlinien trotz regelmäßigen Umsetzens und erreichten das Niveau der nicht-transferierten Kontrollfliegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es zwischen verschiedenen Fliegenlinien, trotz identischer Umweltbedingungen, prominente Unterschiede in der Interaktion mit ihrem Mikrobiom gibt. Die Daten untermauern die Hypothese, dass der Wirt in der larvalen Entwicklung nur wenig Einfluss auf die Mikrobiomkomposition hat, die Varianzen in der Komposition im adulten Stadium aber zunehmen. Sie geben außerdem Grund zur Annahme, dass die Bakterien in der Lage sind im Fliegendarm zu persistieren und dort je nach Genotyp eine differentielle Stabilität aufweisen. Die Untersuchungen an Modellsystemen wie Drosophila sind die Grundlage, um die Interaktionen von Wirt und Darmmikrobiom im Detail zu verstehen.

Abstract

All metazoan live in symbiosis with a huge number of microorganisms that often exceed the number of cells of the host. The human body, for example, consists of 3×10^{13} cells, but harbors another 4×10^{13} microorganisms with a large diversity and complexity. In recent years it has been acknowledged that this so called "microbiome" has various impacts on the host of which most mechanisms are so far not understood. A dysbiosis of, for example, the gut microbiome is correlated to obesity, diabetes and bowel inflammation. Further also neurological disorders like autism, Parkinson and depression are linked to an altered gut bacteria composition. Because of the high diversity and complexity of the human gut microbiome it is very difficult to investigate the microbiome-host interaction. Thus, model systems are needed to analyze these mechanisms.

The simplicity of the fruit fly's gut microbiome enables the testing of the functional significance of gut microbiome perturbations for many physiology traits. Flies lacking gut microbes, for example, were demonstrated to show metabolic differences or growth deficits as compared to their conventionally reared siblings. Yet, different fly lines show a varying impact caused by the presence or absence of gut bacteria. Such different impacts are also found in humans which is important for future use of personalized medicine. These differences often complicate the interpretation and generalization of findings. So far, it is still unclear whether the basis of these differences is found on the side of the host and/or the microbiota variations.

To answer this question, microbiome transfer and reassociation experiments, as well as microbiome stability experiments were performed in the present study. This could be done with externally distinguishable fly lines marked by different bacterial loads and distinct microbiome compositions. Microbiome transfer experiments, where the microbiome was switched from one fly line to the other, showed that microbiome compositions are vastly independent of the given host during the larval development but start to vary during the adult stages. The microbial load differences were in agreement with varying rates of bacterial loss. Indeed, a frequent transfer of the flies to fresh food resulted in a dramatic reduction of the colony forming units (CFU) within nine to 13 days of adult life where the rate of losing the bacteria was different among the fly lines and the fly line with lower bacterial load showed the higher loss-rate. However, flies of both genotypes regained bacteria to normal CFU levels despite of the frequent transfer and initial loss.

These results demonstrate that there are prominent differences in the bacterial composition and load of the gut microbiome of different fly lines despite of identical environmental conditions. The data supports the idea that the host has only a low capacity to alter the microbiome composition on a short-term but variations start to increase during the adult ageing. They also give reason to view the gut microbiome not as only transiently passing through the fly but that a certain amount of bacteria are able to persist in the fly gut which display an additional differential stability depending on the genotype of the fly. The analysis using *Drosophila* are base for a better understanding of the interaction between the host and its microbiome.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit und Mitarbeit in anderen Projekten 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.

Werthebach M., **Stewart, F. A.,** Gahlen, A., Mettler-Altmann T., Akhtar I., Maas-Enriquez K., Droste A., Eichmann T. O., Poschmann G., Stühler K., Beller M. Control of *Drosophila* growth and survival by the lipid droplet-associated protein CG9186/sturkopf. Cell Reports, 2019

Tagungsbeiträge

Stewart F. A., Jehrke L., Droste A., Beller M. Analysis of the gut microbiome of *Drosophila melanogaster* and its correlation with the host metabolism. Poster, German *Drosophila* Meeting (GDM) Köln 2016

Stewart F. A., Droste A., Beller M. Dissecting the directionality of the host-gut microbiome interaction. Poster, Gordon Research Conference, Animal and Microbe Symbiosis, Vermont, USA 2017 und 25th European *Drosophila* Research Conference (EDRC), London, UK, 2017.

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.

Eingereichte Beiträge

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

Stewart F. A., Akhtar I., Kuder K., Droste A., Beller, M. Host interoperability and stability of the *Drosophila melanogaster* gut microbiome.

1 Einleitung

1.1 Interaktion des Darmmikrobioms mit dem Wirt

Alle Metazoa leben in einer Symbiose mit einer sehr hohen Anzahl an Mikroorganismen, die die Zellzahl des Wirts häufig um ein Vielfaches übersteigt. So beherbergt der Mensch in seinem Darm ca. 4x 10¹³ Mikroorganismen, besteht aber selbst nur aus ca. 3x 10¹³ Zellen (Sender et al., 2016). Ein Großteil dieser Bakterien konnte bisher nicht unter Laborbedingungen angezogen und analysiert werden. Daher konnte erst durch die Weiterentwicklung der Sequenziertechniken die Komplexität des Darmmikrobioms von Säugern näher analysiert werden (Kostic et al., 2013; Trinder et al., 2017). Zur Identifizierung von Bakterienspezies wird die DNA-Sequenz des nur in Prokaryoten vorkommenden 16S rRNA Gens verwendet. Die Sequenz enthält konservierte Bereiche, aber auch hypervariable Regionen, die eine Unterscheidung bis auf Speziesebene zulassen (Yang et al., 2016). Dabei zeigte sich in verschiedenen Studien des menschlichen Darmmikrobioms eine große mikrobielle Diversität, die sich zusätzlich zwischen Individuen und Alter der Probanden unterscheidet (Lozupone et al., 2012). Man kann auf Grund von Sequenzierdaten davon ausgehen, dass der Mensch in seinem Darm 300-1000 Bakterienspezies trägt (Bäckhed, 2012; Claesson et al., 2009). Besonders stark vertreten sind Bakterien der Bacteroidetes und Firmicutes, aber auch Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria und Verrumicrobiota sind häufig zu finden, wenn auch in deutlich geringerer Zahl (Eckburg et al., 2005). Neben Bakterien sind auch Archeae, Hefen und Viren Teil des Mikrobioms (Lozupone et al., 2012), die jeweils eigene Forschungsfelder darstellen. Über z. B. das Mycobiom war lange Zeit sehr wenig bekannt, gewinnt aber ebenfalls durch Next Generation Sequencing (NGS) Methoden immer stärker an Bedeutung, da Pilze auch einen starken Einfluss auf die Gesundheit bzw. Krankheit des Wirts haben können (Sam et al., 2017).

Obwohl sich die Phyla meistens nicht stark verändern, kann es zwischen Individuen zum Teil starke Unterschiede in der Abundanz und Diversität der Spezies geben. Woraus diese inter-individuellen Unterschiede resultieren, ist noch nicht eindeutig geklärt und liegt derzeit im Fokus zahlreicher Studien. Dabei sind besonders in der Entwicklung vom Kind hin zum Erwachsenen, aber auch in Verbindung mit unterschiedlichen Ernährungstypen, drastische Unterschiede zu erkennen, die dennoch alle ein gesundes Darmmikrobiom darstellen. In Babys besteht das Darmmikrobiom hauptsächlich aus *Bifidobacteria*, wobei es auch hier, je nach Art der Ernährung (Muttermilch oder Muttermilchersatz) und Art der Geburt (natürlich oder Kaiserschnitt), starke Unterschiede geben kann (Bäckhed *et al.*, 2015). Das Mikrobiom ändert sich darauf in den ersten drei Lebensjahren drastisch, da die Diversität aufgrund der veränderten Nahrung und Umwelteinflüsse stark zunimmt. Aber auch diese Änderungen sind stark von den unterschiedlichen Lebensbedingungen der Kinder und später der Erwachsenen beeinflusst (Yatsunenko *et al.*, 2012) und führen zu teilweise großen inter-individuellen Unterschieden. Allgemein ist die Mikrobiomkomposition von mehreren extrinsischen (z. B. Nahrung, physische Aktivität) und intrinsischen (z. B. Aktivität des Immunsystems) Faktoren des Wirts, aber auch intrinsischen Faktoren des Mikrobioms (z. B. altersabhängige Veränderungen) und von anderen Umwelteinflüssen abhängig (Schmidt et al., 2018). Durch diese zahlreichen Variablen, die das Mikrobiom beeinflussen, ist zu erwarten, dass einige Studien zu widersprüchlichen Daten und Ergebnissen gelangen. So wurde z. B. herausgefunden, dass sich auch im erwachsenen Alter das humane Mikrobiom schnell verändern und an die gegebenen Nahrungsbedingungen anpassen kann: Mit einer Nahrungsumstellung von omnivorer zu ausschließlich tierischer Nahrung, soll sich das Mikrobiom innerhalb von 24 Stunden signifikant ändern (David et al., 2014). Diese Änderungen sollen eine Reaktion des Mikrobioms auf das gegebene Nahrungsangebot sein, damit evolutionär betrachtet eine möglichst schnelle Anpassung an die Nahrungsbedingungen möglich ist. Da in dieser Studie allerdings nur 10 Probanden untersucht wurden, müsste in einer größer angelegten Studie analysiert werden, ob es sich bei diesen akuten Änderungen des Darmmikrobioms nicht nur um individuelle Fälle handelt, die jedoch in einer größeren Population anders ausfallen würden. In weiteren Studien wurde erkannt, dass über einen langen Zeitraum 60 % des individuellen Mikrobioms stabil mit dem menschlichen Darm verbunden bleiben (Faith et al., 2013). Die Mikrobiome von Vegetariern, Veganern und Omnivoren unterscheiden sich zwar dahingehend, dass Vegetarier eine signifikant höhere Artenvielfalt als Omnivore besitzen, aber dennoch besitzen sie alle ein sehr ähnliches Kern-Mikrobiom, dass sich nicht so stark wie zunächst angenommen unterscheidet. Eine Erklärung dafür wäre, dass sich die aufgenommenen Nährstoffe (Proteine, Fett, Kohlenhydrate) in ihren Grundbausteinen zwischen den Diäten ähneln (Losasso et al., 2018).

Das Darmmikrobiom ist hauptsächlich am Nährstoffmetabolismus, in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen und an der Erhaltung der intestinalen Barrierefunktion des Darms beteiligt (Jandhyala et al., 2015). Es ist in fast allen Lebewesen darauf ausgelegt durch eine große Anzahl an Enzymen und Stoffwechselwegen komplexe Metabolite für den Wirt zu verdauen und so zur Aufnahme zur Verfügung zu stellen (Flint et al., 2012). Darüber hinaus kann das Darmmikrobiom aber auch Nährstoffe, die vom Wirt nicht selbst synthetisiert werden können, zur Verfügung stellen (Sannino et al., 2018). Kommt es zu einer Dysbiose des Darmmikrobioms, z. B. durch Antibiotikagabe, muss dies nicht nur einen Einfluss auf die Verdauung von Nährstoffen haben. Viele krankhafte Zustände des menschlichen Körpers werden mit einem veränderten Darmmikrobiom korreliert. So konnten in entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa reduzierte Bakterienzahlen und eine veränderte Kompositionen im Vergleich zu Kontrollgruppen gezeigt werden (Frank et al., 2007). Fettleibigkeit und Diabetes ist in Menschen ebenfalls mit einer veränderten, oft verringerten bakteriellen Diversität assoziiert (Larsen et al., 2010; Musso et al., 2011; Turnbaugh et al., 2009) und mit Verschiebungen in der Bakterienkomposition (Firmicutes und Bacteroidetes) verbunden. In fettleibigen Mäusen stellte sich heraus, dass deren verändertes Mikrobiom in der Lage ist mehr Energie aus der Nahrung zu extrahieren (Turnbaugh et al., 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Transplantation dieses "fettleibigen" Mikrobioms in Mäuse ohne funktionelles Mikrobiom ("axenische" Mäuse) die Tiere ebenfalls fettleibig werden (Turnbaugh et al., 2006). Dennoch ist weiterhin nicht eindeutig geklärt was Ursache und was Wirkung ist. Entstehen die veränderten Mikrobiome durch die hochkalorische Nahrung oder ist ein verändertes Mikrobiom Grund dafür, dass so viel Energie aus der Nahrung aufgenommen wird? Abhilfe, von einem krankhaft veränderten

2

Darmmikrobiom und einem daraus resultierenden Krankheitsbild des Wirts, versprechen sogenannte Probiotika, die hauptsächlich aus *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* bestehen und das Darmmikrobiom des Wirts positiv beeinflussen und eine Fettanreicherung reduzieren sollen (Park *et al.*, 2013). Inwiefern diese von außen eingebrachten Änderungen dauerhaft das Darmmikrobiom beeinflussen können, bedarf weiterer Studien. Es hat sich jedoch gezeigt, dass durch Transplantationen von Darmbakterien gesunder Donoren in Menschen mit chronischen Darmentzündungen oder *Clostridium difficile* Infektionen eine langfristige Genesung möglich war (Aas *et al.*, 2003; Tvede and Rask-Madsen, 1989). Dennoch bestehen weiterhin viele Fragen, z. B. inwiefern die Komposition des Darmmikrobioms und vor allem das Zusammenspiel einzelner Bakterienspezies den Wirt beeinflussen und durch einen Austausch des Darmmikrobioms Krankheiten wie Fettleibigkeit revidiert werden können (Sbahi and Di Palma, 2016).

Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass das Darmmikrobiom im Mensch einen Einfluss auf die Verdauung und die Aufnahme von Nährstoffen hat, im negativen Fall Darmerkrankungen auslöst und den Metabolismus beeinflusst, sondern auch neurologische Erkrankungen wie Parkinson und Autismus mit einem veränderten Darmmikrobiom in Verbindung stehen (Cenit *et al.*, 2017). Hier ist jedoch nicht vollends geklärt, ob ein abnormales Darmmikrobiom Grund oder Resultat dieser Erkrankungen ist. Es wurden jedoch bereits durch Fäkaltransplantationen nicht nur Symptome einer Darmerkrankung, sondern gleichzeitig autistische Verhaltensmuster, wenn auch nur für einen gewissen Zeitraum, abgemildert (Kang *et al.*, 2017), so dass ein kausaler Zusammenhang angenommen werden kann. Auch konnte im Gegenzug validiert werden, dass Mäuse, denen das Darmmikrobiom eines autistischen Menschen implantiert wurde, typische autistische Verhaltensmuster zeigen (Sharon *et al.*, 2019).

Ergebnisse von Studien des Darmmikrobioms im Menschen sind häufig schwer zu generalisieren, da die Komposition von zahlreichen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird. Zunächst ist die große Komplexität des Darmmikrobioms nur schwer zu überblicken, wenn Aussagen über den Einfluss einzelner Spezies auf den Menschen getroffen werden sollen. Außerdem sind die inter-individuellen Unterschiede durch zahlreiche, kaum kontrollierbare Aspekte beeinflusst, z. B. unterschiedliche extrinsische Faktoren, wie der Ernährung, dem Lebensstil oder der physikalischen Aktivität des Menschen oder auch das familiäre Umfeld und Umweltbedingungen lassen sich in solchen Studien so gut wie nicht kontrollieren oder beeinflussen (Schmidt *et al.*, 2018). Um jedoch den Einfluss des Mikrobioms auf den Wirt und *vice versa* im Detail zu verstehen und dieses Wissen in Zukunft für medizinische Zwecke zu benutzen, bedarf es einem grundlegenderen Verständnis der Wirt-Bakterien-Interaktion, was mit gutem Erfolg an Modellorganismen wie der Maus oder *Drosophila melanogaster*, mit einer deutlich einfacheren Mikrobiomkomposition untersucht wird.

1.2 Drosophila melanogaster als Modellorganismus der Mikrobiomforschung

Drosophila bietet sich auf Grund ihrer zu höheren Lebewesen homologisierbaren Organen, wie dem Darm oder dem Fettkörper, konservierter Mechanismen und Signalwege mit einer geringeren Redundanz als gut etabliertes Modellsystem für metabolische und physiologische Fragestellungen an. Darüber hinaus haben

Einleitung

Versuche gezeigt, dass das Mikrobiom auch in *Drosophila* - wie beim Säuger - die Physiologie beeinflusst. Verschiedene Eigenschaften, wie eine verringerte Komplexität des Darmmikrobioms, ihre kurze Entwicklungszeit, die hohe Individuenzahl und ihr vollständig sequenziertes Genom machen *Drosophila* zu einem guten Modellsystem für Mikrobiomexperimente. In Fliegen können auf einfache Weise Untersuchungen des Darmmikrobioms durchgeführt und seine Auswirkungen auf den Wirt analysiert werden, die am menschlichen Mikrobiom nicht möglich wären. So können die Tiere vollständig von einem Darmmikrobiom befreit werden, aber auch mit definierten Mengen oder Kompositionen von Bakterien reassoziiert werden (Kietz *et al.*, 2018; Koyle *et al.*, 2016). Trotz der großen evolutiven Distanz zwischen Fliegen und Säugetieren, können Homologien im Verdauungstrakt, im Immunsystem und auch die Effekte eines Darmmikrobioms vergleichend analysiert werden (Apidianakis and Rahme, 2011; Buchon *et al.*, 2014). Außerdem können die Bakterien des *Drosophila* Darmmikrobioms im Labor unter Standardbedingungen kultiviert werden. Dies erlaubt gezielte Analysen der Bakterien und deren Einfluss auf den Wirt. Durch die einfache Zusammensetzung des Fliegenmikrobioms lassen sich gezielte Permutationen durchführen, mit denen untersucht werden kann, inwiefern einzelne Spezies einen bestimmten Phänotyp beeinflussen (Trinder *et al.*, 2017).

1.2.1 Der Darm von Drosophila

Im Vergleich zum Säugetierdarm ist der Darm von Drosophila anatomisch anders aufgebaut, zeigt aber doch in seiner Struktur und Funktion Übereinstimmungen (Trinder et al., 2017) (Abb. 1). In Säugetieren gelangt die Nahrung durch den Oesophagus in den Magen, wo die Verdauung beginnt, bevor sie weiter in den Dünndarm und später in den Dickdarm transportiert wird, wo Nährstoffe, Wasser und Elektrolyte absorbiert werden. In Drosophila läuft dieser Prozess ähnlich ab. Hier wird die Nahrung durch den Vorderdarm zum Kropf transportiert, kurzzeitig gespeichert und dann im Mitteldarm verdaut und die Nährstoffe absorbiert. Im Hinterdarm werden zuletzt Ionen und Wasser resorbiert (Chapman, 2013; Naikkhwah and O'Donnell, 2012). Dabei ist der Fliegendarm ein ähnlich komplexes Organ, wie das Verdauungssystem der Säuger, das in verschiedene Regionen unterteilt wird. Der Vorder- und Hinterdarm sind ektodermalen Ursprungs, während der Mitteldarm, wie der gesamte Säugerdarm, aus endodermalem Gewebe gebildet wird (Apidianakis and Rahme, 2011; Miguel-Aliaga et al., 2018). Im Mitteldarm findet der größte Teil der Verdauung und Absorption von Nährstoffen statt. Der Fliegendarm, wie der der Säuger, besteht aus einer Epitheleinzelschicht. Hier finden sich vier verschiedene Zelltypen, die sowohl in Säugern, als auch in Fliegen vertreten sind: Enteroblasten, absorbierende Enterozyten, sekretorische enteroendokrine Zellen und intestinale Stammzellen (ISCs) (Miguel-Aliaga et al., 2018). Säugerdärme verfügen über weitere Zelltypen, wie die Mucus-produzierenden Becherzellen und antimikrobielle Peptide-produzierenden Paneth-Zellen (Apidianakis and Rahme, 2011). Die intestinalen Stammzellen sind für die kontinuierliche Erneuerung des Epithels zuständig und sichern die physikalische Barrierefunktion des Darms und wichtige Immunfunktionen (Liu et al., 2017). Enterozyten sekretieren Verdauungsenzyme, haben absorbierende und auch immunologische Funktionen (Marianes and Spradling, 2013). Neben dem Aufbau des Darms, sind auch

4

viele Signaltransduktionswege der Darmregeneration, wie z. B. der Notch-Signalweg zur Differenzierung oder Proliferation von intestinalen Stammzellen und Funktionen des Immunsystems, wie die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS, engl. *reactive oxygen species*) und Cytokinen hoch konserviert (Apidianakis and Rahme, 2011), was *Drosophila* zu einem idealen Modellorganismus für Studien des Immunsystems, sowie Analysen der Geweberegeneration im Darm macht (Apidianakis and Rahme, 2011; Liu *et al.*, 2017).

Die Epithelschicht ist äußerlich von viszeralen Muskeln umgeben und im Inneren des Mitteldarms von der peritrophischen Membran geschützt. Der Vorder- und Hinterdarm sind von einer impermeablen Cuticula ausgekleidet (Hegedus *et al.*, 2009). Der Vorderdarm wird in den Oesophagus, den Kropf und den Proventrikulus unterteilt (Abb. 1). Daran schließt sich der Mitteldarm an, welcher in einen anterioren, mittleren und posterioren Mitteldarm unterteilt wird. Je nach Literatur erfolgt eine Gliederung des Mitteldarms in 10-14 morphologische Regionen, die sich durch z. B. pH-Wert, unterschiedliche Genexpressionen oder zelluläre Unterschiede differenzieren lassen (Buchon *et al.*, 2013a; Marianes and Spradling, 2013). Während der Verdauung werden komplexe Makromoleküle, wie Kohlenhydrate, Proteine und Lipide zunächst im vorderen Mitteldarm durch spezifische Verdauungsenzyme in ihre Einzelteile gespalten (Chapman, 2013; Marianes and Spradling, 2013).



Abb. 1: Übersicht über Homologien im Verdauungssystem vom Menschen und *Drosophila melanogaster*. Die Grafik wurde mit Genehmigung von A. Prokorp entnommen und modifiziert. Manchester Fly Facility (2015). droso4schools: Online resources for school lessons using the fruit fly *Drosophila* — https://droso4schools.wordpress.com/

Im Gegensatz zu Wirbeltieren, die Lipide mithilfe von Gallensalzen verdauen, bilden Insekten Fettsäure-Aminosäuren und Glycolipidkomplexe (Chapman, 2013). Im zentralen Mitteldarm werden die Nährstoffe in Einfachzucker, Aminosäuren und Fettsäuren heruntergebrochen (Buchon *et al.*, 2013a; Marianes and Spradling, 2013). Zur besseren Verdauung von Nährstoffen, wie Proteinen oder Mineralien, hat der Darm vieler Tiere einen niedrigen pH-Wert. Der pH-Wert im Darm von *Drosophila* ist dagegen bis auf wenige Regionen eher neutral bis leicht alkalisch (Miguel-Aliaga *et al.*, 2018). Nur in der Kupferzellregion (engl. *copper cell region*) im zentralen Mitteldarm liegt ein mit einem pH-Wert von ungefähr 2 stark saurer Bereich vor (Overend *et al.*, 2016), der an der Prozessierung großer Moleküle beteiligt ist. Im posterioren Mitteldarm werden die gesamten Nährstoffe von den Enterozyten absorbiert, bevor sie über die Hämolymphe zu den anderen Organen transportiert oder in Speichermoleküle umgewandelt werden (Marianes and Spradling, 2013). *Drosophila* verfügt über eine große Anzahl von Verdauungsenzymen (349 bioinformatisch annotierte Proteine), die Proteine, Lipide und Kohlenhydrate aufspalten können (Horne *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2003; Tamaki *et al.*, 2012). Auch die Bakterien im Darm von *Drosophila* sind an der Verdauung beteiligt. Dies erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Zum einen helfen sie, die Nahrung durch bakterielle Enzyme besser aufzuspalten (Huang and Douglas, 2015). Andererseits können die Bakterien der Fliege auch als Nahrung dienen. Da *Drosophila* 15 verschiedene Gene für Lysozyme im Genom trägt, wäre es möglich, dass diese das Peptidoglykan der bakteriellen Zellwände verdauen, um die Bestandteile der Bakterien als Nährstoffe aufzunehmen (Kylsten *et al.*, 1992). Andererseits wäre auch denkbar, dass der nach dem Peptidoglykanverdau freigesetzte Zellinhalt der Bakterien "passiv" auf bestimmte Signalwege der Fliege wirkt und dieser durch das sogenannte "food sensing" einen passiven Wachstumsvorteil erzielen kann.

1.2.2 Die Darmflora von Drosophila

Im Vergleich zum menschlichen Darmmikrobiom, das mehr als 1000 Bakterienarten enthält (Claesson *et al.*, 2009), ist die mikrobielle Diversität im Darm von *Drosophila* sehr viel geringer. Je nach Studie konnten bis zu 30 verschiedene bakterielle Spezies detektiert werden, die zu den *Firmicutes* und α -Proteobacteria gehören (Erkosar *et al.*, 2013). *Acetobacter* und *Lactobacilli* stellen hier die Hauptgenera (Liu *et al.*, 2017). Das Mikrobiom von *Drosophila* enthält aber, wie das Säugermikrobiom, nicht nur Bakterien, sondern auch Hefen und Viren. Unter den Hefen konnten Genera wie *Candida* oder *Saccharomyces* identifiziert werden (Broderick and Lemaitre, 2012). Es wird angenommen, dass Fliegen in der Wildnis aktiv Nahrungsquellen (verrottendes Obst) mit bestimmten Hefen aufsuchen, da diese den Cholesterol auxotrophen Fliegen diesen bedeutenden Nährstoff liefern (Carvalho *et al.*, 2010). Weite Teile dieser Interaktion sind jedoch noch unverstanden.

Ein immer wiederkehrender Kritikpunkt an der Mikrobiomforschung in *Drosophila* sind die Unterschiede in der bakteriellen Abundanz zwischen "wild gefangenen" und im Labor gehaltenen Fliegen (Chandler *et al.*, 2011; Staubach *et al.*, 2013). Diese Unterschiede werden vermutlich hauptsächlich durch die verschiedenen Nahrungsangebote verursacht. Dennoch sind vor allem *Acetobacteraceae* häufige Vertreter sowohl in wilden *Drosophila*, da sie sich hier hauptsächlich von verrottenden Früchten ernähren (Wang and Staubach, 2018), als auch in Laborfliegen (Bost *et al.*, 2017). Zusätzlich ist es fast unmöglich das exakte Alter der "wild gefangenen" Tiere zu bestimmen. Ältere, im Labor gehaltene Fliegen zeigen ebenfalls eine höhere Abundanz von *Acetobacter pomorum* (Wong *et al.*, 2011). Interessanterweise sind Bakterien des Genus *Lactobacillus* eher seltener in wilden *Drosophila* vertreten. Aus der Familie der *Lactobacilli* sind eher die Genera *Weisella, Leuconostoc* und *Enterococcus* vertreten (Bost *et al.*, 2017), die möglicherweise unter

Laborbedingungen nicht so gut wachsen. Die Diversität ist in Laborfliegen ebenfalls geringer als in wilden Fliegen (Broderick and Lemaitre, 2012), was sich dadurch begründen lässt, dass Fliegen in der Wildnis verschiedene Futterquellen zur Verfügung stehen, im Labor jedoch meist ein einzelnes Futter verwendet wird. Im Überblick über mehrere Studien zur Mikrobiomkomposition in *Drosophila* hat sich jedoch gezeigt, dass grundsätzlich *Acetobacteraceae, Lactobacillaceae* und *Enterobacteraceae* detektiert werden und auf Speziesebene *Acetobacter pomorum* und *Lactobacillus plantarum*, aber auch *L. brevis* und *Enterococcus faecalis* in fast allen wilden, wie auch im Labor gehaltenen Fliegen gefunden werden konnten (Adair *et al.*, 2018; Broderick and Lemaitre, 2012; Erkosar *et al.*, 2013).

Im Vergleich zu anderen Lebewesen, sind *Acetobacteraceae* nicht im Darm von Säugetieren zu finden. *Lactobacillus* ist jedoch sowohl in Säugern, als auch in *Drosophila*, ein prominentes Mitglied des Darmmikrobioms (Chandler *et al.*, 2011). Vor allem in Mäusen ist *Lactobacillus*, neben *Bacteroides*, *Clostridium* und *Alistipes* eine der Hauptgenera (Nguyen *et al.*, 2015). Aber auch in Säugetieren stellen sich ähnliche Probleme wie in der Mikrobiomanalyse in *Drosophila* dar. Es werden teilweise stark unterschiedliche Mikrobiomkompositionen publiziert, die möglicherweise durch das Nahrungsangebot, als auch den genetischen Hintergrund des Wirts geformt werden (Nguyen *et al.*, 2015). Die Mechanismen sind aber auch hier weiterhin unklar.

Das Darmmikrobiom wird in allen Lebewesen stark von den gegebenen Umwelteinflüssen beeinflusst, so dass das Mikrobiom zwischen verschiedenen Lebensräumen (in der Natur und auch in verschiedenen Laboren) variiert. Bei *Drosophila* sollen hier vor allem die gegebenen Futterbedingungen den ausschlaggebenden Einfluss haben (Chandler *et al.*, 2011; Staubach *et al.*, 2013; Wang and Staubach, 2018). Ridley und Kollegen konnten zum Beispiel zeigen, dass das Verhältnis von Zucker zu Protein in der Nahrung das Verhältnis von *Acetobacter* zu *Lactobacillus* verändert (Ridley *et al.*, 2012). Auch wurde gezeigt, dass verschiedene Lebensabschnitte in der Entwicklung der Fliege durch bestimmte Bakterienspezies charakterisiert sind (Wong *et al.*, 2011) und die Mikrobiomkomposition davon beeinflusst wird, welche Bakterien die Fliegen mit der Nahrung aufnehmen können. In der Wildnis konnten aus Fliegen von unterschiedlichen Nahrungsquellen verschiedene Bakterien sequenziert werden, die die Fliegen aus der Umwelt aufgenommen hatten (Staubach *et al.*, 2013; Wang and Staubach, 2018). Bisherige Ergebnisse deuteten nicht darauf hin, dass diese über die Nahrung aufgenommenen Bakterien ein stabil assoziiertes Mikrobiom mit immer vorkommenden Vertretern (engl. *core microbiome*) darstellen (Miguel-Aliaga *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2013). An Stelle dessen wird angenommen, dass das Mikrobiom nur transient mit dem Wirt assoziiert ist.

Embryonen werden über die Faeces der Eltern bereits mit den Bakterien kontaminiert bzw. inokuliert und nehmen dann im larvalen Stadium über die Nahrung weitere Bakterien auf, bevor sie diese auch wieder über Faeces in die Umwelt abgeben (Bakula, 1969; Blum *et al.*, 2013). Dabei erscheint es logisch, dass Larven, die konstant Nahrung zu sich nehmen, einen höheren Bakteriengehalt aufweisen, als frisch geschlüpfte adulte Fliegen (Storelli *et al.*, 2011), da die Bakterien im Darm eher mit den Futterbestandteilen im Lumen als mit dem Epithel des Darms assoziiert sind (Broderick *et al.*, 2014). Ein weiteres Indiz für ein

7

transientes Darmmikrobiom ist, dass adulte Fliegen ihr Mikrobiom durch Hungern oder häufiges Umsetzen auf steriles Futter verlieren (Blum *et al.*, 2013; Broderick *et al.*, 2014; Obadia *et al.*, 2017). Es wurde außerdem gezeigt, dass durch den Zyklus der Ausscheidung der Bakterien und die Wiederaufnahme in die nächste Generation, sich die Bakterienkomposition kaum verändert (Téfit *et al.*, 2017). Diese transiente und passive Symbiose von Mikrobiom und Fliege steht jedoch in einem starken Widerspruch zu den bereits publizierten Ergebnissen, dass das Mikrobiom oder einzelne Bakterienarten einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung und auf überlebenswichtige Signalwege, wie den Insulinsignalweg des Wirts haben (Shin *et al.*, 2011; Storelli *et al.*, 2011).

Neuere Erkenntnisse zeigen so auch tatsächlich, dass es Bakterien gibt, die dauerhaft mit dem Wirt assoziiert sind (Pais *et al.*, 2018). In wild gefangenen *D. melanogaster*, die von vom Baum gefallenen Feigen isoliert wurden, wurde das Bakterium *Acetobacter thailandicus* detektiert, welches trotz regelmäßigem Umsetzen der Fliegen im Darm persistieren konnte und die Hauptspezies im Mikrobiom wurde (Pais *et al.*, 2018). Obwohl dies die bisher einzige Art ist, die permanent mit *Drosophila* assoziiert zu sein scheint, schließt es nicht aus, dass auch andere Stämme von *Acetobacter* oder *Lactobacillus* in der Lage sind im Darm zu persistieren.

Nicht nur Umweltbedingungen wie das Futter oder die vorhandenen Bakterien oder Hefen auf der Nahrung bedingen die Mikrobiomkomposition. Es gibt auch Indizien dafür, dass der Genotyp des Wirts das Mikrobiom zusätzlich beeinflusst (Dobson et al., 2015; Early et al., 2017). Dazu wurden verschiedene Fliegenlinien mit jeweils einer Spezies des typischen Darmmikrobioms reassoziiert und die Folgegeneration auf die Abundanz dieser Bakterien getestet (Early et al., 2017). Um die Bedeutung der genetischen Variabilität des Wirts auf die Assoziation mit den Bakterien zu untersuchen, wurden die Experimente mit Fliegen des Drosophila melanogaster Genetic Reference Panels (DGRP) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Sammlung wildtypischer isogener Inzuchtlinien von Drosophila melanogaster, die einer natürlichen Population aus den USA entstammen und vollständig sequenziert sind (Mackay et al., 2012). Die Abundanz der monoassoziierten Bakterien unterschied sich in den verschiedenen Fliegenlinien stark und die Unterschiede konnten signifikant mit einigen Nukleotidpolymorphismen (engl. single nucleotid polymorphisms, SNPs) korreliert werden (Early et al., 2017). Diese Korrelation von Kompositionsveränderungen im Darmmikrobiom mit einem bestimmten Wirtsgenotyp haben auch Ryu und Kollegen dokumentiert. Sie testeten Fliegen, die durch einen Knock-down des Gens caudal eine erhöhte Produktion antimikrobieller Peptide (AMPs) im posterioren Mitteldarm aufwiesen. Dadurch konnten Bakterien, die resistenter gegenüber AMPs waren, sich weiter vermehren, da sie gegenüber anderen Spezies einen Wachstumsvorteil hatten (Ryu et al., 2008).

Ein weiterer Aspekt, der die Mikrobiomkomposition beeinflusst, ist das Alter des Wirts. Wie im Menschen verändert sich das Mikrobiom der Fliegen mit zunehmendem Alter (Claesson *et al.*, 2011). Eine Zunahme der Bakterienzahlen, vor allem der α -Proteobakterien (*Acetobacteraceae*) und eine Verschiebung der Bakterienkomposition hat eine abnorme Proliferation der intestinalen Stammzellen zur Folge. Dies zerstört die Darmhomöostase, führt zu Dysfunktionen der intestinalen Zell-Zellverbindungen (engl. *intestinal barrier*)

8

dysfunction) des Darms und letztendlich zum Tod der Tiere (Buchon *et al.*, 2009a; Clark *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2014).

Um zu solchen Kenntnissen über z. B. die Interaktion des Mikrobioms mit der intestinalen Stammzellproliferation zu gelangen und den Einfluss eines Darmmikrobioms auf den Wirt genauer zu untersuchen, kann es von Vorteil sein, den Wirt vollständig von Bakterien zu befreien, um so vergleichende Analysen durchzuführen. Im Gegensatz zu Menschen oder Säugetieren ist es ohne große Probleme möglich, *Drosophila* völlig frei von Bakterien zu machen ("axenisch") und sie als sterile Dauerkulturen zu halten. Broderick und Kollegen haben so gezeigt, dass die Darmbakterien auch einen direkten Einfluss auf die Genexpression des Wirts haben. So ist im Vergleich von axenischen Fliegen und Fliegen mit einem Darmmikrobiom die Expression zahlreicher Gene im Darm der Fliegen hoch- oder herunterreguliert (Broderick *et al.*, 2014). Vor allem Gene der Immunantwort, des Metabolismus und der Darmregulation waren in Fliegen mit einem Darmmikrobiom hochreguliert. Auf diese Weise und durch Reassoziation mit bestimmten Bakterienarten oder Kombinationen verschiedener Bakterien kann der Einfluss eines Mikrobioms oder der Einfluss bestimmter Bakterien auf den Wirt genauer untersucht werden (Early *et al.*, 2017; Koyle *et al.*, 2016).

1.2.3 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung und den Metabolismus von Drosophila

Das Darmmikrobiom hat verschiedene positive Einflüsse auf die Entwicklung sowie den Metabolismus des Wirts. Im Umkehrschluss wird eine Dysbiose des Darmmikrobioms auch immer häufiger mit metabolischen Krankheiten, wie Übergewicht und Diabetes, sowie anderen Pathologien in Zusammenhang gebracht (Miele *et al.*, 2015). Daher ist es wichtig, die (metabolischen) Interaktionen zwischen dem Wirt und seinem Darmmikrobiom besser zu verstehen und so mögliche Therapieansätze zu entwickeln. Auch hier kann das simplere Darmmikrobiom von *Drosophila* ein hilfreiches Werkzeug zu einem besseren Verständnis sein.

In *Drosophila* sind die symbiotischen Bakterien unter Laborbedingungen nicht überlebenswichtig, können aber vor allem unter limitierenden Nahrungsangeboten einen entscheidenden Wachstumsvorteil bieten. So wurde in mehreren Studien beschrieben, dass axenische Larven eine verlängerte Entwicklungszeit im Vergleich zu Tieren mit einem Mikrobiom haben (Ridley *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2011; Storelli *et al.*, 2011). Um axenische Tiere zu erhalten, werden die Embryonen mit Hypochlorid dechorioniert (vergleiche Ergebnisse 2.1.1), was aber keinen Einfluss auf die Überlebensrate und das Schlüpfen der Embryonen hat (Ridley *et al.*, 2012). Die Entwicklungsverzögerungen können durch Reassoziationen mit Bakterienenthaltenden Faeces wieder rückgängig gemacht werden, was zusätzlich bestätigt, dass die Entfernung des Chorions keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung hat (Ridley *et al.*, 2012).

Neben dem Einfluss auf die Entwicklung des Wirts, dienen die Bakterien dem Wirt auch direkt als Nahrungsquelle, die durch verschiedene Zellwand-lysierende Enzyme im Darm der Fliege verdaut werden können (Kylsten *et al.*, 1992; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018). Aber das Mikrobiom produziert auch wichtige Nährstoffe, wie z. B. Vitamine (Thiamin) (Sannino *et al.*, 2018) und schützt den Wirt vor Hyperglykämie

Einleitung

(Whon et al., 2017), wofür die Bakterien lebendig sein müssen. Einige Publikationen beschreiben nicht nur, dass ein vollständiges Darmmikrobiom nötig ist, sondern dass bereits einzelne Spezies unter Mangelbedingungen und je nach gegebenem Futter, das Wachstum des Wirts unterstützen können, wodurch diese Spezies besonders wichtig erscheinen. Eine Assoziation mit Acetobacter pomorum bietet Drosophila Larven Wachstumsvorteile, indem die von A. pomorum produzierte Essigsäure auf den Insulinsignalweg wirkt (Shin et al., 2011). Die Produktion von Essigsäure durch das Bakterium beeinflusste hier die Entwicklung der Larven, die Körpergröße der adulten Tiere, sowie den Metabolismus. Wie genau die Essigsäure den Insulinsignalweg beeinflusst, ist jedoch noch unbekannt. In einer zweiten Studie wurde dagegen Lactobacillus plantarum als maßgebliches wachstumsförderndes Bakterium identifiziert. Hierbei lief die wachstumsfördernde Wirkung aber über einen noch unbekannten Mechanismus über den TOR-Signalweg (engl. target of rapamycin) und die Ecdysonproduktion ab (Storelli et al., 2011). Zusätzlich kann L. plantarum die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen im Darm von Drosophila aktivieren und so die Proliferation von Epithelzellen des larvalen Darms anregen (Jones et al., 2013; Reedy et al., 2019). Einen ähnlichen Einfluss scheint L. plantarum auch auf die Entwicklung junger Mäuse zu haben, die unter Mangelbedingungen aufwachsen (Schwarzer et al., 2016), was die Bedeutung von Drosophila als Modellsystem weiter untermauert.

Inwieweit das Darmmikrobiom die Produktion von Metaboliten im Wirt beeinflusst, kann ebenfalls gut im Vergleich von konventionell gehaltenen (KH) und axenischen Tieren untersucht werden. Es konnte so gezeigt werden, dass das Darmmikrobiom die Expression zahlreicher Gene im Darm beeinflusst, die mit dem Metabolismus in Verbindung stehen (Erkosar et al., 2014). Daraus resultierend zeigten axenische Canton-S Fliegen in einem Alter von sieben bis zehn Tagen einen unterschiedlichen Gehalt an Trehalose, Glucose und Glykogen im Vergleich zu KH Fliegen (Ridley et al., 2012). Dabei war der Glucosegehalt in axenischen Weibchen und Männchen stark erhöht, der Trehalose- und Glykogengehalt aber nur in Weibchen. In Männchen waren diese beiden Kohlenhydrate deutlich verringert. Interessanterweise waren weder Triglycerid- (TAG) noch Proteingehalt vom Fehlen des Mikrobioms beeinflusst. Allerdings scheint der Einfluss des Mikrobioms stark von der gegebenen Nahrungszusammensetzung abzuhängen. Wong und Kollegen publizierten in axenischen Canton-S höhere TAG-Werte in männlichen wie auch in weiblichen Fliegen (Wong et al., 2014). Eine andere Studie hat ebenfalls erhöhte TAG-Werte für axenische Fliegen dokumentiert. Begründet wird dies, dass durch eine Monoassoziation mit dem Bakterium Acetobacter tropicalis adulte Tiere einen geringen TAG-Gehalt erreichen (als im Vergleich mit L. brevis assoziierten oder axenischen Tieren), da dieses Bakterium den Zucker in der Nahrung konsumiert und dieser nicht mehr in den Metabolismus der Fliegen eingehen kann (Huang and Douglas, 2015). Wodurch diese unterschiedlichen Ergebnisse zustande kommen, ist noch nicht ausreichend geklärt. Zum einen scheinen die unterschiedlichen Futter einen Einfluss auf die Metabolitgehalte des Wirts zu haben, andererseits ist auch eine unterschiedliche Abhängigkeit des Wirts von seinem Darmmikrobiom denkbar, die so zu Genotypspezifischen Reaktionen auf das Fehlen eines Mikrobioms führen.

1.2.4 Das Immunsystem von *Drosophila melanogaster* und Wechselwirkungen mit dem Darmmikrobiom

Das Darmmikrobiom wird von verschiedenen extrinsischen Faktoren, wie der Ernährung und der Umwelt beeinflusst. Genauso haben aber auch intrinsische Faktoren des Wirts, wie der Genotyp mit seinem Immunsystem, Einfluss auf die Mikrobiomkomposition bzw. beeinflusst auch das Mikrobiom das Immunsystem des Wirts. Das angeborene Immunsystem von Drosophila melanogaster schützt die Fliege gegen verschiedene Arten von Pathogenen. Es besteht unter anderem aus zwei konservierten NFκB-Signalwegen, dem IMD- (engl. immune deficiency) und dem Toll-Signalweg. Beide Signalwege sind darauf ausgelegt, auf unterschiedliche Pathogene zu reagieren und die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) zu initiieren (Lemaitre et al., 1997). Der Toll-Signalweg spielt nicht nur in der Immunabwehr der Fliege, sondern auch in der Entwicklung der dorso-ventralen Achse in Embryonen eine zentrale Rolle (Belvin and Anderson, 1996). Er wird hauptsächlich durch grampositive Bakterien und Pilze induziert. Zunächst wird das extrazelluläre Cytokin Spätzle durch verschiedene sekretierte Erkennungsmoleküle (engl. recognition molecules) aktiviert, die entweder grampositive Bakterien anhand ihrer Peptidoglykanzellwand, oder entomopathogene Pilze detektieren. Spätzle wiederum bindet an den Toll-Rezeptor und aktiviert eine intrazelluläre Kaskade, die so die Produktion von z. B. dem AMP Drosomycin im Zellkern einleitet (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Der IMD-Signalweg, dem bisher keine Rolle in der Entwicklung von Drosophila Embryonen zugeschrieben wurde, wird hauptsächlich durch Infektionen mit gramnegativen Bakterien ausgelöst und induziert die Produktion von z. B. Diptericin (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Hier wird durch direkte Detektion und Bindung von Diaminopimelinsäure-enthaltendem Peptidoglykan mit membrangebundenen Rezeptoren (engl. peptidoglycan recognition receptors, PGRPs) das Protein IMD rekrutiert. Dadurch wird die intrazelluläre Signalkaskade in Gang gebracht, die die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Relish zur Folge hat (Kaneko et al., 2004; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Zhai et al., 2017). Relish transloziert dann in den Nucleus, um die Transkription verschiedener AMPs zu aktivieren. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Signalwege in ihrer Art der Immunantwort. IMD-regulierte Gene zeigen eine akute und schnell ansteigende Expressionsänderung, während Gene, die durch den Toll-Signalweg induziert werden, eine eher langsamere und konstantere Expressionsänderung zeigen (Boutros et al., 2002; Lemaitre and Hoffmann, 2007). Die antimikrobiellen Peptide, die Drosophila als Reaktion auf systemische Infektionen bilden kann, werden größtenteils im Fettkörper produziert und in die Hämolymphe abgegeben (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Bisher sind ca. 20 induzierbare AMPs bekannt, die in sieben Klassen unterteilt werden (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Defensin ist gegen grampositive Bakterien wirksam (Dimarcq et al., 1994). Diptericine, Attacine, Drosocin und Cecropine sind hauptsächlich gegen gramnegative Bakterien aktiv (Asling et al., 1995; Bulet et al., 1993; Imler and Bulet, 2005; Wicker et al., 1990), wobei Cecropin A1 sowohl gegen Bakterien als auch Pilze aktiv ist (Ekengren and Hultmark, 1999). Drosomycine und Metchnikowin sind gegen Pilzinfektionen wirksam (Fehlbaum et al., 1994; Imler and Bulet, 2005; Levashina et al., 1995). Die AMPs werden bei einer Infektion aber nicht nur vom Fettkörper

produziert, sondern auch andere Organe wie der Mitteldarm oder die Malpighischen Gefäße sind in der Lage diese zu exprimieren (Buchon et al., 2009b, 2013b; Imler and Bulet, 2005). Dadurch können diese Epithelien nicht nur pathogene Mikroorganismen, sondern auch Bakterien des Darmmikrobioms regulieren. Damit das Immunsystem im Darm jedoch nicht konstitutiv aktiviert ist, wodurch eine Symbiose mit dem Darmmikrobiom erst möglich wird, besitzt der IMD-Signalweg eine Negativregulierung. Diese verhindert eine chronische Inflammation des Gewebes und resultiert in einer Toleranz gegenüber endogenen Darmbakterien (Buchon et al., 2013b; Ryu et al., 2008). Eine solche Regulierung wurde bisher im Toll-Signalweg nicht detektiert (Zhai et al., 2017). Die Produktion weiterer AMPs durch den IMD-Signalweg wird bereits extrazellulär durch die Inhibition der PGRPs verhindert (Aggarwal et al., 2008; Kleino et al., 2008). Darüber hinaus dienen alternative Splice-Varianten einer Regulation des IMD-Signalwegs (Maillet et al., 2008). Zusätzlich gibt es intrazelluläre Proteine, die den Transkriptionsfaktor Relish inhibieren (Morris et al., 2016). Mutanten dieses Proteins (Pickle) zeigen zwar eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen, gleichzeitig wird aber die Lebensdauer der Fliegen drastisch reduziert. Im Darm werden die AMPs regional unterschiedlich exprimiert, wodurch die Kolonisierung durch vorteilhafte Darmbakterien begünstigt werden soll. AMPs werden am stärksten im anterioren Mitteldarm exprimiert, wo sie potentielle Pathogene, die mit der Nahrung aufgenommen wurden, eliminieren sollen (Buchon et al., 2013a). Dagegen werden im posterioren Mitteldarm Negativregulatoren exprimiert, die die Expression der AMPs reduzieren und so die Stabilität eines Darmmikrobioms unterstützen sollen (Capo et al., 2016). Diese Homöostase des Immunsystems erlaubt eine ausgeglichene Reaktion auf pathogene Mikroorganismen, ermöglicht aber auch gleichzeitig eine Interaktion des Wirts mit den symbiotischen Darmbakterien. Damit einher geht daher auch eine ungleichmäßige Verteilung der Darmbakterien über die Länge des Darms. Im Vorderdarm und anterioren Mitteldarm konnten durch Ausplattieren von präparierten Därmen eine große Zahl von Bakterien detektiert werden, wohingegen in der Kupferzell-Region, im posterioren Mitteldarm und Hinterdarm nur sehr wenige Bakterien detektiert wurden (Bosco-Drayon et al., 2012).

Nicht nur das Wirtsimmunsystem ist in der Lage auf das symbiotische Darmmikrobiom zu reagieren und es zu tolerieren, es zeigen sich auch immer mehr Einflüsse des Mikrobioms auf das Immunsystem des Wirts. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eine Assoziation mit einem standardisierten Darmmikrobiom einen deutlichen Einfluss auf die Expression von Genen des Immunsystems hat (Broderick *et al.*, 2014; Erkosar *et al.*, 2014). Im Vergleich zu axenischen Tieren, welche als Embryonen sterilisiert wurden, waren Gene des IMD-Signalwegs hochreguliert (Broderick *et al.*, 2014). Es wurde außerdem geschlussfolgert, dass das Mikrobiom zusätzlich die Genexpression Metabolismus-assoziierter Gene teilweise über den IMD-Signalweg reguliert (Erkosar *et al.*, 2014). So wird zum Beispiel die Entwicklung der Larven durch den Bakterienstamm *Lactobacillus plantarum^{W/L}* begünstigt, da die intestinale Peptidase-Expression aktiviert wird, die über die Signalkaskade des IMD-Signalwegs abläuft (Erkosar *et al.*, 2015). Durch diese erhöhte Peptidase-Aktivität wird die Aufnahme von Proteinen und Aminosäuren aus der Nahrung begünstigt. Diese Wachstumsvorteile werden allerdings im Falle einer akuten Infektion gehemmt, um die Immunantwort zu begünstigen. Dieser *Lactobacillus* Stamm wurde aus Labor-gehaltenen *Drosophila* isoliert und ist einer der

bisher wenigen Stämme der nachweislich einen direkten Einfluss auf die larvale Entwicklung hat (Martino *et al.*, 2015; Storelli *et al.*, 2011).

Neben den zuvor genannten Einflüssen der Darmbakterien auf den IMD-Signalweg wurde publiziert, dass symbiotische Bakterien direkt an der Pathogenabwehr beteiligt sind. So wurde gezeigt, dass die Erkennung von gramnegativen Peptidoglykanzellwänden (insbesondere von Acetobacter pomorum) nötig ist, um eine antivirale Immunantwort des ERK-Signalweges zu initiieren (Sansone et al., 2015). Auch scheint ein gesundes Darmmikrobiom die Larven bzw. adulten Tiere vor Infektionen mit Pathogenen zu schützen. So waren axenische Larven empfindlicher gegenüber Infektionen mit Candida albicans (Glittenberg et al., 2011) und Fliegen mit einem normalen Mikrobiom waren resistenter gegenüber Infektionen mit Serratia marcescens und Pseudomonas aeruginosa (Blum et al., 2013). Der genaue Mechanismus dieser Immunfunktion der Darmbakterien ist bisher nicht bekannt, aber verschiedene Szenarien sind möglich. So ist durch das Mikrobiom das Immunsystem basal leicht aktiviert, was in einer schnelleren Immunantwort auf Pathogene resultiert. Alternativ wirken die Bakterien auf die Proliferation der intestinalen Stammzellen, was eine schnellere Regeneration des Darmgewebes erlaubt (Bonfini et al., 2016; Buchon et al., 2009a). Auch ist eine Verdrängung oder Inhibition der pathogenen Mikroorganismen durch das Darmmikrobiom denkbar, die eine unwirtliche Umgebung für das Wachstum bewirken oder in Konkurrenz um Nährstoffe stehen. Auch hier kann D. melanogaster als Modellorganismus für den Einsatz von Probiotika gegen infektiöse Darmerkrankungen oder Dysbiosen eingesetzt werden (Trinder et al., 2017).

Diese Beispiele zeigen deutlich, wie stark das Immunsystem des Wirts mit dem Darmmikrobiom interkaliert ist und dass das Mikrobiom einen positiven Einfluss auf die Immunantwort des Wirts hat. Diese Wechselwirkungen können aber auch negative Folgen für den Wirt haben. Eine im Alter häufig überaktive Immunfunktion des IMD-Signalwegs resultiert in einer Dysbiose des Darmmikrobioms (Guo *et al.*, 2014). Dies führt weiterhin zu verringerter Fitness des Wirts, Abnahme der Lebenserwartung und zu einer Dysfunktion der intestinalen Zell-Zell-Verbindungen des Darmepithels (Clark *et al.*, 2015; Ryu *et al.*, 2008; Sekihara *et al.*, 2016), welches ein Eindringen der Darmbakterien in die Körperhöhle nicht mehr verhindern kann.

1.3 Ziele der Arbeit

In dieser Studie wurde die Direktionalität der Interaktionen zwischen Darmmikrobiom und Wirt und der Einfluss des Darmmikrobioms auf den Metabolismus des Wirts untersucht. Auch wurde der Effekt eines fremden Mikrobioms auf das Immunsystem des Wirts analysiert. Wie zuvor beschrieben, scheinen zahlreiche Erkenntnisse über die Interaktion von Darmmikrobiom und Wirt nicht nur von einer Seite auszugehen, sondern beruhen auf einem Wechselspiel zwischen mehreren Aspekten. So kann z. B. die Komposition der vom Wirt aufgenommenen Nahrung das Darmmikrobiom beeinflussen, das Darmmikrobiom beeinflusst aber im Gegenzug welche und wie viele Nährstoffe der Wirt aus der Nahrung ziehen kann (Abb. 2).



Abb. 2: Modell für die verschiedenen Parameter im Wirt, die sich gegenseitig, sowie die Entwicklung, den Metabolismus und die Fitness des Wirts beeinflussen.

Daher wurde der Einfluss des Genotyps auf das Darmmikrobiom mit Hilfe der DGRP Fliegenlinien untersucht, die eine große Bandbreite der phänotypischen Plastizität abdecken und bereits in anderen Mikrobiomstudien verwendet wurden (Early et al., 2017; Jehrke et al., 2018; Mackay et al., 2012). Außerdem wurde auch der Einfluss einer Veränderung der Nahrungsbedingungen auf das Darmmikrobiom untersucht. Um gezieltere Analysen der Interaktionen zwischen Wirt und Darmmikrobiom durchzuführen, wurden vergleichende Experimente zwischen konventionell gehaltenen und axenischen Fliegen, sowie mit bestimmten Bakterien reassoziierten Fliegen durchgeführt. Durch diese Experimente konnte der Einfluss der Bakterien auf die Wirtsphysiologie, die Entwicklung und das Immunsystem analysiert werden. Besonders war von Interesse, inwiefern das reassoziierte Mikrobiom stabil ist und ob es einen positiven Einfluss auf den Wirt hat. Neueste Therapieansätze zielen darauf ab ein Ungleichgewicht der Darmflora oder eines "schädlichen" Darmmikrobioms, sowie Pathogene durch den Einsatz von "Mikrobiom-Transplantationen" oder Probiotika positiv zu beeinflussen. Um das Darmmikrobiom allerdings so langfristig zu formen, bedarf es eines tieferen Verständnisses des Zusammenspiels zwischen dem komplexen Metabolismus des Wirts und den Billionen von Mikroben im menschlichen Darm. Drosophila melanogaster bietet sich hier als ideales Modellsystem an, um Hypothesen die diese komplexe Symbiose betreffen in einem einfacheren und besser nachvollziehbareren Weg zu untersuchen.

Ergebnisse

2 Ergebnisse

Es wurde bereits gezeigt, dass symbiotisch lebende Darmbakterien einen Einfluss auf den Metabolismus, die Entwicklung, das Immunsystem und sogar das Verhalten von *Drosophila* haben. Dabei ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht, inwieweit auch der Wirt einen Einfluss auf das Mikrobiom hat und wie diese Wechselwirkungen in der Symbiose z. B. den Bakteriengehalt oder die Mikrobiomkomposition beeinflussen. Auch scheint es, dass verschiedene Fliegenlinien und deren Signalwege durch unterschiedliche Darmbakterien beeinflusst werden und daher unterschiedliche Mechanismen der Interaktion denkbar sind. Aus diesem Grund wurden verschiedene experimentelle Untersuchungen an *Drosophila* und ihrem Darmmikrobiom durchgeführt.

2.1 Verschiedene Methoden zur Untersuchung des Darmmikrobioms in Drosophila

Zur Untersuchung des Darmmikrobioms sind bereits zahlreiche Methoden verwendet und publiziert worden (Heys *et al.*, 2018; Koyle *et al.*, 2016; Micchelli, 2014; Wayland *et al.*, 2014). Da im Labor von Dr. Beller (Mathematische Modellierung biologischer Systeme, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) allerdings bisher keine Arbeiten am Darmmikrobiom von *Drosophila* vorgenommen wurden, mussten zunächst einige Testsysteme etabliert werden. Dabei sollten verschiedene Aspekte der Untersuchungen abgedeckt werden: Es wurden zum einen funktionale Tests an Fliegen und ihrem Darmmikrobiom durchgeführt, aber auch das Darmmikrobiom selbst in seiner Komposition charakterisiert und quantifiziert. Zum anderen war das Ziel, die Lokalisation der Bakterien im Darm von *Drosophila* mit Hilfe von Fluoreszenz*in-situ*-Hybridisierung zu analysieren. Daher wurden verschiedene bereits existierende Methoden überprüft und an die Anforderungen dieses Projekts angepasst.

2.1.1 Herstellung axenischer Fliegen

Zur Untersuchung des Einflusses eines Darmmikrobioms auf die Entwicklung, den Metabolismus und das Immunsystem von *Drosophila*, sollten als Vergleich Fliegen ohne ein Darmmikrobiom hergestellt und analysiert werden. Dazu wurden Embryonen durch Waschen mit Bleiche und Ethanol sterilisiert (siehe Methoden 5.1.3) (Wayland *et al.*, 2014). Zur Kontrolle der Effizienz der einzelnen Schritte wurden nach jedem Waschschritt jeweils ca. 200-300 Embryonen (20 µL) auf Selektionsagarplatten (MRS-Agar, mikroaerophile Anzucht bei 28 °C) ausplattiert. Abbildung 3 zeigt den Bakteriengehalt und die Abnahme der Kolonien von nur von den Platten isolierten Embryonen ("Embryowash"), über die Entfernung des Chorions mit 10 % Bleiche bis zur Sterilisation mit 70 % Ethanol. Nach der Sterilisation sind auf den Agarplatten, auf welchen *white[-]* Embryonen ausplattiert wurden, noch wenige Bakterienkolonien zu erkennen. Die Zahl der Kolonien ist aber zu der Bakterienzahl von Embryonen, die nur mit Embryowash behandelt wurden, deutlich reduziert. Die Oregon-R Embryonen enthielten nach der Sterilisation mit 70 % Ethanol keine Bakterien mehr (Abb. 3 unten rechts).



Embryowash

dechorioniert

sterilisiert

Abb. 3: Bakteriengehalt der Embryonen und Abnahme der Kolonien durch die einzelnen Waschschritte im Protokoll zur Sterilisation von *white[-]* und Oregon-R Embryonen. Die Embryonen wurden mit "Embryowash" von den Apfelsaftagarplatten abgewaschen, anschließend mit 10 % Bleiche dechorioniert und mit 70 % Ethanol sterilisiert.

In ersten Versuchen wurden die Embryonen nach dem Sterilisieren auf nicht autoklaviertes Standardfutter (siehe Material 4.9 Tabelle 16) gegeben und die Sterilität der ersten geschlüpften Fliegen mittels Amplifikation des bakteriellen 16S rRNA Gens überprüft (siehe Methoden 5.2.2 und 5.2.8). Hier war in allen Proben weiterhin bakterielle DNA detektierbar. Daher wurde nach einer weiteren Methode gesucht, um das bakterielle Wachstum in den Larven und Fliegen einzudämmen. Da sich die Bakterien nicht nur im Darm der Fliegen, sondern auch auf dem Futter vermehren (Pais *et al.*, 2018), wurden verschiedene autoklavierbare Futter aus der Literatur getestet und in ebenfalls autoklavierte Polypropylen-Röhrchen gegossen. Hierdurch wurde die Vermehrung der Bakterien *ex vivo* verhindert. Zusätzlich wurden die Futter nach dem Autoklavieren mit mehreren Antibiotika versetzt, um das Wachstum von Bakterien zu inhibieren. Diese Kombination von sterilem Futter und Antibiotika gewährleistete eine gute Grundlage, um die Fliegen konstant bakterienfrei zu halten.

2.1.2 Detektion und Bestimmung von Darmbakterien in Drosophila

Prokaryoten in *Drosophila* oder anderen Wirtsorganismen lassen sich anhand der Sequenz des 16S rRNA Gens detektieren und auch bis auf Speziesebene bestimmen, da 16S rRNA nur in Ribosomen von Prokaryoten zu finden ist. Dies kann mittels PCR, qPCR, Sanger Sequenzierung oder auch *Next Generation Sequencing* geschehen. In dieser Arbeit wurde eine PCR des gesamten 16S rRNA Gens verwendet, um die Sterilität der axenischen Larven oder adulten Fliegen nachzuweisen (Abb. 4). Dafür wurden publizierte,

Ergebnisse

universelle Oligonukleotide ("Primer") für das 16S rRNA Gen verwendet (Klindworth *et al.*, 2013), die ein Amplicon von ca. 500 bp produzieren (siehe Material 4.5 Tabelle 9, Primer Nr. 1 und 2).



Abb. 4: Agarosegel einer Nachweis-PCR des 16S rRNA Gens in axenischen *Drosophila*. Als Template wurde aus axenischen *white[-]* (1-6) und axenischen Oregon-R (7-12) isolierte, gesamt-genomische DNA verwendet. + Positivkontrolle mit DNA isoliert aus konventionell gehaltenen *white[-]* als Template, – Negative Kontrolle ohne Template. Als Referenz wurde die GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) verwendet.

Der Nachweis bestimmter Bakterienarten mittels qPCR des 16S rRNA Gens wird bereits seit längerem angewendet und ist für viele Bakterienarten publiziert (Hermann-Bank *et al.*, 2013; Stevenson *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2011). Da das 16S rRNA Gen in seiner Sequenz zwischen verschiedenen Arten von Bakterien und auch *Archaea* sehr unterschiedlich ist, wird es zu phylogenetischen Analysen verwendet (Weisburg *et al.*, 1991). Dabei werden verschiedene Primer verwendet, die die Sequenz des gesamten 16S rRNA Gens an verschiedenen Positionen abdecken, um sowohl konservierte als auch variable Regionen zu analysieren. Zusätzlich können Analysen der hypervariablen Regionen des 16S rRNA Gens beinhaltet neun hypervariable Regionen (V1-V9) mit einer Länge von 30-100 bp (Gray *et al.*, 1984). Primer, die in diesen Regionen binden, können zum Nachweis bestimmter Spezies genutzt werden.

Next Generation Sequencing Analysen untersuchen unterschiedliche hypervariable Regionen des 16S rRNA Gens, die besonders gut zur Differenzierung einzelner Bakterienarten geeignet sind. Innerhalb dieser hypervariablen Regionen gibt es auch Unterschiede im Grad der Konservierung, wodurch einige Regionen eher zur Identifikation auf höherer Taxonomieebene und andere nicht so konservierte Regionen geeignet sind, Bakterien bis auf Genus oder Speziesebene zu identifizieren (Yang *et al.*, 2016). Dabei kann jedoch keine der Regionen alle Bakterien bis auf Speziesebene klassifizieren.

In der in dieser Arbeit verwendeten *Illumina Miseq* Technologie, werden die Regionen V3 und V4 sequenziert. Die V3 Region gilt als eine der besten Regionen bestimmte Pathogene bis auf Genusebene zu identifizieren (Chakravorty *et al.*, 2007) und V4 hat die höchste Sensitivität und eignet sich sehr gut für phylogenetische Studien (Yang *et al.*, 2016). Die hier verwendeten, publizierten Primer (Klindworth *et al.*, 2013) (siehe Material 4.5 Tabelle 9 Primer Nr. 1 und 2), die ein Amplicon von ca. 500 bp ergeben, werden als die geeignetsten Primer zur Analyse verschiedener bakterieller Spezies angesehen.

2.1.3 Aufrechterhaltung axenischer Drosophila Dauerkulturen

Obwohl die Sterilisation von Drosophila Embryos ohne großen Aufwand durchgeführt werden kann, wurde dennoch versucht, die axenischen Fliegen dauerhaft unter sterilen Bedingungen auf autoklaviertem Futter und dem Einsatz von Antibiotika zu halten. Unter den verschiedenen autoklavierbaren Futtern wurde zunächst ein Maismehl-Hefeextrakt-Futter (Storelli et al., 2011) getestet (siehe Material 4.9 Tabelle 16). Axenische Oregon-R Fliegen konnten sich auf diesem Futter mit einer Entwicklungsverzögerung von zwei bis drei Tagen entwickeln, jedoch starben axenische white[-] nach wenigen Generationen auf diesem Futter aus, weil das Futter möglicherweise nicht reichhaltig genug für die axenischen Tiere war (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde ein autoklavierbares Glucose-Maismehl-Hefe-Futter (Blum et al., 2013) getestet (Tabelle 16). Auf diesem konnten sich auch axenische white[-] ähnlich den axenischen Oregon-R mit zwei bis drei Tagen Verzögerung entwickeln, jedoch wurde das Futter von Oregon-R Larven sehr stark verflüssigt, so dass viele adulte Tiere darin verendeten (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde als drittes Futter ein Glucose-Hefe-Futter (Newell and Douglas, 2014) getestet (Tabelle 16), auf dem sich sowohl axenische Oregon-R als auch white[-] entwickeln konnten. Mit Hilfe dieses Futters war es möglich axenische Dauerkulturen beider Linien zu halten und für weitere Versuche zu verwenden. In Tabelle 1 sind die drei getesteten Futter und ihre Nährstoffgehalte gegenübergestellt. Das Glucose-Hefe-Futter ist mit seinem Verhältnis von Hefe zu Glucose am besten für das Wachstum axenischer Fliegen geeignet.

Tabelle 1: Prozentuale Anteile der Zutaten der verschiedenen axenischen Futter. Das Glucose-Hefe-Futter war mit dem 1:2 Verhältnis von Hefe und Glucose am besten für das Wachstum der axenischen Oregon-R und *white[-]* geeignet.

	Maismehl-Hefeextrakt	Glucose-Maismehl-Hefe	Glucose-Hefe
Trockenhefe	-	5 %	10 %
Hefeextrakt	8 %	-	-
Glucose	-	10 %	10 %
Maismehl	8 %	7 %	

2.1.4 Das Testen verschiedener Extraktionsmethoden zur Isolation mikrobieller DNA

Um das Darmmikrobiom von *Drosophila* in seiner Komposition und Abundanz genauer zu untersuchen, bedarf es zunächst einer geeigneten Methode zur Extraktion von genomischer, bakterieller DNA aus ganzen Tieren. Dafür wurden unterschiedliche genomische DNA-Extraktionsmethoden mit Kits verschiedener Firmen getestet, die eine hohe Reinheit der genomischen DNA erzielen sollen.

Es wurde zunächst das *GeneJET Genomic DNA Purification* Kit von Thermo Scientific getestet, da hier die DNA über eine Silikamembran aufgereinigt wird. Hier wurde das Protokoll zur DNA-Aufreinigung aus Grampositiven Bakterien gewählt, da dieses eine zusätzliche Lyse mit Lysozym beinhaltet. Das Darmmikrobiom von *Drosophila* enthält sowohl Gram-negative, als auch Gram-positive Bakterien und da letztere durch eine dickere Peptidoglykanzellwand geschützt sind, wird Lysozym zum Verdau der β-1,4-glykosidischen Bindungen im Peptidoglykan verwendet. Die Fliegen wurden in diesem Lyse Puffer für Gram-positive

Bakterien (siehe Material 4.4 Tabelle 7) mit einer elektrischen Pistille homogenisiert. Der Rest des Protokolls wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt nicht aufgeschlossene Fliegenbestandteile vom Überstand trennen sollte. Erste Versuche mit diesem Protokoll erbrachten kaum messbare DNA-Konzentrationen. Auch eine Verstärkung des Zellaufschlusses durch Glaskügelchen und längere Inkubationszeiten mit Proteinase K erbrachten nur geringe DNA Mengen (Daten nicht gezeigt).

Da nur unzureichende Mengen genomischer DNA mit dem Kit von Thermo Scientific erzielt wurden, wurde als Alternative ein Kit der Firma QIAGEN getestet. Das *QIAamp DNA Mini* Kit wurde mit verschiedenen Anzahlen von Fliegen als Ausgangsmaterial getestet. Die Fliegen wurden äußerlich sterilisiert und in einem Puffer homogenisiert, welcher unter anderem Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. SDS hat eine stark denaturierende Wirkung auf Proteine und hilft so bei der Aufreinigung der DNA. Anschließend wurden die Fliegen mittels einer weiteren mechanischen und enzymatischen Lyse (Proteinase K) aufgeschlossen. In diesem Kit wird ein weiterer Lyse Puffer verwendet, der die Zellen durch den Inhaltsstoff Guanidinhydrochlorid aufschließen soll. Dieses chaotrope Salz denaturiert Proteine und inhibiert zusätzlich Nukleasen. Die Aufreinigung über die Silikamembran-Säulen wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Allerdings haben auch die Extraktionen mit diesem Kit und verschiedene Elutionsvolumina keine ausreichenden DNA-Mengen ergeben. Für *Next Generation Sequencing* reichte die DNA-Konzentration nicht aus, weshalb eine zusätzliche Natrium-Acetat-Fällung über Nacht durchgeführt wurde. Durch diesen zusätzlichen Schritt konnte eine ausreichende DNA-Konzentration für Sequenzierungen der Mikrobiome erreicht werden (ca. 5-10 ng/µL) (siehe Methoden 5.2.1).

Da diese Form der DNA Extraktion und Aufkonzentration immer auch Verluste von DNA und ein langes Protokoll immer potentiell auch zu einer höheren Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen führt, wurde ein weiteres Kit von QIAGEN getestet, welches speziell für die DNA-Extraktion aus Geweben konzipiert wurde. Das *DNeasy Blood and Tissue Kit* wurde dabei für die DNA-Extraktion aus ganzen Larven und Fliegen modifiziert. Die Tiere wurden wie gewohnt mit 70 % Ethanol und sterilem PBS gewaschen und anschließend in Lyse Puffer für Gram-positive Bakterien (siehe Material 4.4 Tabelle 7) und einem Lyse Puffer des Kits, welcher Guanidinhydrochlorid enthält, mit einer Keramikkugel und Glaskügelchen homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit Lysozym und 20 µL Proteinase K weiter lysiert. Nach einem RNase A Verdau wurde die DNA über eine Silikamembran-Säule des Kits aufgereinigt (siehe Methoden 5.2.1). Diese Methode erbrachte ausreichende DNA-Mengen (ca. 10-25 ng/µL), so dass die bakterielle DNA aus *Drosophila* ohne weitere Fällungen in Folgeversuchen mittels qPCR analysiert werden konnte.

2.1.5 Etablierung von qPCR-Analysen des Darmmikrobioms mit speziesspezifischen Primern

Um verschiedene bakterielle Spezies im Darmmikrobiom von *Drosophila* nachzuweisen, wurde nach spezifischen Primern für das 16S rRNA Gen gesucht, die in einer qPCR bestimmte Arten des Mikrobioms nachweisen. Daher wurden zunächst verschiedene publizierte Primer (Gammon *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2011) für Bakterien, die am häufigsten in im Labor gehaltenen *Drosophila*

vorkommen, getestet. Die Spezifität der einzelnen Primerpaare wurde durch Tests mit DNA aus den jeweiligen Referenzstämmen analysiert, indem der Ct-Wert (engl. *threshold cycle*), welcher das Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz und den Anfang der exponentiellen Kurve beschreibt (grüne Linie), für die jeweiligen Proben verglichen wurde (Abb. 5-8). Hierfür wurde DNA aus *Acetobacter pomorum, Acetobacter tropicalis, Lactobacillus fructivorans, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis* und *Gluconobacter sp.* verwendet. Die Primer für *L. brevis* binden hierbei an das *recombinase A* (*recA*) Gen, da hier keine spezifischen 16S rRNA Gen Primer gefunden werden konnten (Stevenson *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der qPCR verdeutlichen anhand der Fluoreszenzmessungen, dass nur die Primerpaare für *A. pomorum* (16S rRNA Gen) und *L. brevis* (*recA* Gen) speziesspezifisch DNA amplifizierten und keine falschpositiven Ergebnisse lieferten (Abb. 5). Die anderen publizierten Primer waren nicht spezifisch für die jeweilige Bakterienspezies. So amplifizierten die *A. tropicalis* Primer auch DNA von *Gluconobacter sp.* und die Primer für *L. fructivorans* banden ebenfalls an *L. plantarum* DNA was auch an den Schmelzkurven deutlich wurde (Abb. 5 rechte Spalte). Vor allem die Primer für die Amplifikation des 16S rRNA Gens von *L. plantarum* amplifizierte effektiv alle getesteten *Lactobacilli* und auch *Acetobacter* Proben.

Ergebnisse



Abb. 5: Test der Spezifitäten der einzelnen publizierten Primerpaare für einen Bakteriennachweis mittels qPCR. Die linke Spalte zeigt die gemessene Fluoreszenz der qPCR bei der Amplifikation der bakteriellen DNA. Dabei sollte nur eine Kurve entstehen, die die spezifische Amplifikation durch Bindung der Primer an die richtige bakterielle DNA anzeigt. Dies war nur bei den Primern für *A. pomorum* und *L. brevis* der Fall. Die rechte Spalte zeigt die Schmelzkurven der entstandenen PCR Produkte, wo ebenfalls nur eine Kurve zu sehen sein sollte, die eine spezifische Schmelztemperatur hat. Die speziesspezifischen Bindungen und somit entstehende Fluoreszenzkurve sind an der linken Seite farblich kodiert, unspezifische Bindungen sind jeweils farblich auf der rechten Seite markiert. RFU: *Relative fluorescent units*, Relative Fluoreszenzeinheit. Grüne Linie: Start des exponentiellen Wachstums der Fluoreszenzkurve (engl. *Threshold cycle*).

Um spezifische Primer zu designen wurden mit Hilfe von Primer-Blast neue Primer für die qPCR der Bakterien Acetobacter tropicalis, Lactobacillus fructivorans, L. plantarum und Gluconobacter sp. entwickelt (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Diese Primer wurden ebenfalls an der DNA der am meisten vorkommenden Darmbakterien getestet. Die neuen Primer für A. tropicalis und L. fructivorans ergaben spezifische Ergebnisse in den qPCRs (Abb. 6). Für den Nachweis von L. plantarum im Darmmikrobiom wurden zwei neue Primerpaare getestet, wobei die Primer für das recA Gen (L. plantarum 3) spezifisch waren. Die 16S rRNA-Primer für L. plantarum und Gluconobacter sp. waren auch in diesem Testlauf nicht spezifisch und wurden somit nicht weiterverwendet.



Abb. 6: Test der Spezifitäten der einzelnen neu entwickelten Primerpaare für einen Bakteriennachweis mittels qPCR. Alle getesteten Primer, außer die Primer für das 16S rRNA Gen von *L. plantarum (L. plantarum* 2) und *Gluconobacter sp.* waren spezifisch für die jeweilige Spezies. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung und den gleichen Aufbau wie Abbildung 5.

Neben den fünf zuvor genannten Bakterienarten sind auch andere Acetobacter und Lactobacilli häufig im Darmmikrobiom von Drosophila vertreten. Daher wurden zusätzliche Primer für den Nachweis von drei weiteren Bakterienspezies (Acetobacter pasteurianus, Lactobacillus pentosus und L. senmaizukei) entwickelt, die ebenfalls häufig im Darmmikrobiom von Drosophila detektiert werden (Broderick and Lemaitre, 2012; Li et al., 2016; Sekihara et al., 2016) und auf ihre Spezifität getestet. Die Primer für L. pentosus waren spezifisch, die Primer für L. senmaizukei amplifizierten ebenfalls das 16S rRNA Gen von L. brevis (Abb. 7) und da L. brevis in vorherigen Messungen immer deutlich abundanter im Darmmikrobiom vertreten war (Daten nicht gezeigt), wurden diese Primer nicht weiter verwendet. Die Primer für A. pasteurianus banden ebenfalls schwach an die DNA der sehr nah verwandten A. tropicalis Bakterien (Abb. 7). Da der Ct-Wert bei den falsch-positiven Fluoreszenzkurven bei gleicher Template-Menge mehr als 10 log-Stufen nach der richtigen Amplifikation von A. pasteurianus lag, wurden diese Primer trotzdem als ausreichend spezifisch angesehen.



Abb. 7: Test der Spezifitäten weiterer neu entwickelter Primerpaare für einen Bakteriennachweis mittels qPCR. Die Primer für *L. pentosus* waren spezifisch für diese *Lactobacillus* Spezies. Die Primer für *A. pasteurianus* amplifizierten auch DNA von *A. tropicalis*, aber mit einer deutlich verzögerten Amplifikation trotz gleicher eingesetzter DNA-Menge. Die Primer für *L. senmaizukei* amplifizierten zusätzlich *L. brevis* DNA. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung und den gleichen Aufbau wie Abbildung 5.

Neben der Spezifität der Primer ist auch die Amplifikationseffizienz *E* der jeweiligen Primerpaare für die Validität der Ergebnisse wichtig. Diese wurde getestet, indem eine Verdünnungsreihe der jeweiligen DNA mittels qPCR amplifiziert wurde. Die entstehenden Ct-Werte werden gegen die Konzentration der eingesetzten DNA aufgetragen und die Steigung der Geraden in die Formel E =10^[-1/Steigung] eingesetzt. Idealerweise erzielen die Primerpaare eine Effizienz zwischen 80 und 115 %, wobei eine Effizienz von 100 %

eine Verdopplung der PCR-Produkte in jedem Zyklus darstellt (Zhang and Fang, 2006). Insgesamt ist es aber auch wichtig, dass die Primerpaare, die miteinander verglichen werden sollen, eine ähnliche Amplifikationseffizienz haben (Bustin *et al.*, 2009). Hier zeigte sich, dass die publizierten Primer für *A. pomorum* eine sehr schlechte Amplifikationseffizienz erzielten (55,2 %) und daher nicht für weitere Experimente verwendet wurde (Abb. 8). Auch die Primer für *L. senmaizukei* erreichten nur eine Effizienz von 67 % und wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die anderen Primer erzielten Effizienzen zwischen 70 % und 95 % und wurden somit für speziesspezifische qPCR Analysen vom Darmmikrobiom von *Drosophila* verwendet. Die Primer für *L. pentosus* wurden in vorläufigen Experimenten getestet (Daten nicht gezeigt), jedoch konnte in den Proben nie *L. pentosus* nachgewiesen werden, so dass diese Primer in weiterführenden Experimenten nicht mehr verwendet wurden.



Abb. 8: Test der Amplifikationseffizienzen der spezifischen Primerpaare. Die Effizienz wurde an Verdünnungsreihen der jeweiligen Bakterien-DNA getestet. Die Amplifikationseffizienz *E* berechnet sich durch $E = 10^{[-1/Steigung]}$. Auf Grund niedriger Werte wurden die Primer für *A. pomorum* und *L. senmaizukei* nicht für weitere Analysen verwendet. Ct/ Grüne Linie: Start des exponentiellen Wachstums der Fluoreszenzkurve (engl. *Threshold cycle*).

Ergebnisse

2.1.6 Methoden zur Quantifizierung von qPCR Analysen

Neben der Spezifität der Primer zum Nachweis einzelner Darmbakterien in Drosophila musste eine Quantifizierungsmethode der qPCR-Ergebnisse gefunden werden. In einer konventionellen Expressionsanalyse bestimmter Gene mittels qPCR kann die Menge der Transkripte mit Hilfe eines Referenzgens und im Vergleich zu einer Kontrollkondition ins Verhältnis gesetzt werden, was einer relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta$ Ct-Methode) entspricht (Pfaffl *et al.*, 2002). Da es sich hier aber nicht um eine Expressionsanalyse bestimmter Gene handelt, sondern die Quantität der Bakterien im Darm von Drosophila analysiert werden soll, wurde zunächst eine absolute Quantifizierung verwendet. Dazu wurden in den qPCR Analysen Standardreihen mit aus den type strains der einzelnen Bakterien extrahierten DNA angelegt, um über die definierten Mengen der DNA und den zugehörigen Ct-Werten die unbekannten DNA-Mengen des Darmmikrobioms zu quantifizieren. Die Gesamtmenge der bakteriellen DNA in Drosophila wurde dann auf 100 % gesetzt, um so die Anteile der jeweiligen Bakterien prozentual darzustellen. Allerdings erwies sich diese Methode als relativ ungenau, da viele Faktoren die absolute Quantifizierung beeinflussen können. In dieser Methode wurde die DNA aus zwei verschiedenen Ausgangsmaterialien gewonnen, nämlich aus Flüssigkulturen der Bakterien für die Standards und aus ganzen Fliegen für die Darmbakterien. So kann dadurch die Qualität und Quantität der präparierten DNA variieren und die Effizienz der Primerbindung und somit auch die Amplifikationseffizienz beeinflusst werden.

Eine andere Art der Quantifizierung wurde von (Wong *et al.*, 2011) verwendet, in welcher die relative Abundanz von jeweils zwei Darmbakterien verglichen wurde (*"Log₂ relative abundance"*). Diese Methode lässt allerdings keinen Überblick über die gesamte Abundanz der einzelnen Bakterien zu, sondern vergleicht nur jeweils zwei Arten miteinander. Ziel war es jedoch, die Komposition des Darmmikrobioms als Ganzes zu analysieren.

Eine andere Studie (Early *et al.*, 2017) verwendete eine relative Quantifizierung, in der die Ct-Werte der jeweiligen Bakterienspezies auf die Ct-Werte, also die Menge, der in den Proben enthaltenen *Drosophila* DNA bezogen wurde. Dies bietet den Vorteil, dass die gesamte DNA aus dem gleichen Ausgangsmaterial extrahiert wird. Hier wurde die Quantifizierung des *deformed (dfd)* Gens gewählt, da es sich um ein *single copy* Gen handelt (ein Gen, welches nur in einer Kopie im Genom vorkommt) (Coen, 2001; Early *et al.*, 2017). Wie in Abbildung 9 an den Ct-Werten des *dfd* Gens zu erkennen ist, ist in den Proben immer eine sehr ähnliche Menge an *Drosophila*-DNA vorhanden, was die Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Proben sicherstellt. Außerdem kann so auch ein Vergleich zwischen unabhängigen Experimenten erfolgen, weshalb in den folgenden Experimenten diese Methode weiterverwendet wurde. Eine beispielhafte Darstellung der relativen Quantifizierung ist in Abbildung 10 zu sehen.



Abb. 9: Ct-Werte des *Drosophila*-Gens *deformed* (*dfd*), welches zur relativen Quantifizierung von Bakterien-DNA in den Fliegenproben verwendet wurde. In allen Proben war eine vergleichbare Menge *Drosophila*-DNA vorhanden (Ct-Wert von *dfd* zwischen 19 und 20). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus sechs biologisch unabhängigen Replikaten, pro Replikat wurde DNA aus acht Fliegen extrahiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Abb. 10: **Beispielhafte** Quantifizierung der bakteriellen DNA qPCR aus einer mit speziesspezifischen Primern. Die Ct-Werte der einzelnen Detektionen der Bakterien wurden vom Ct-Wert des Drosophila-Gens dfd subtrahiert, um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen. Je negativer der Wert, desto weniger DNA der jeweiligen Spezies konnte in der Präparation der DNA aus ganzen Fliegen detektiert werden.

2.1.7 Genomanalysen einzelner Darmbakterien aus Drosophila

Um die Interaktionen zwischen Wirt und Mikrobiom besser zu verstehen, ist es auch von Nöten, die Darmbakterien näher zu charakterisieren, um so feststellen zu können, was sie als Symbionten von freilebenden Stämmen der selben Art unterscheidet. Dazu wurden vergleichende Genomanalysen zwischen aus *Drosophila* isolierten Darmbakterien und bereits sequenzierten Referenzstämmen durchgeführt.

2.1.7.1 Isolierung und Resequenzierung einzelner Darmbakterien aus Drosophila

In der Forschung mit *Drosophila* werden unter anderem die Linien Oregon-R und *white[-]* als Referenzfliegenlinien gehalten und als Kontrollen für vergleichende Experimente und Experimente an nicht genetisch veränderten Fliegenlinien verwendet (Jehrke, 2019; Werthebach *et al.*, 2019). Petkau und Kollegen haben gezeigt, dass Bakterien die mit *Drosophila* assoziiert sind, Gene besitzen, die ihnen im Gegensatz zu Bakterien aus der Umwelt, helfen auf Fliegenfutter zu überleben und so eine Reassoziation mit der Fliege eingehen können (Petkau *et al.*, 2016). Im Gegenzug dazu können jedoch Bakterien, die in einer Symbiose mit *Drosophila* leben auch Gene verloren haben, die für das symbiotische Leben innerhalb
des Wirts nicht mehr notwendig sind oder die Symbiose sogar erleichtern. Um mehr über die Genome der hier isolierten Bakterien zu erfahren, wurden einzelne Darmbakterien dieser häufig verwendeten Fliegenlinien auf fehlende Gene im Vergleich zu in der Umwelt lebenden Bakterien analysiert.

Um die Darmbakterien von *white[-]* und Oregon-R besser zu untersuchen, wurden einzelne Fliegen homogenisiert und auf MRS- und ACE-Agarplatten (siehe Material 4.9 Tabelle 15) ausplattiert. Von den dort gewachsenen Kolonien wurden je Nährmedium und Fliegenlinie vier morphologisch unterscheidbare Kolonien weiter vereinzelt und über mehrere Schritte in Reinkultur gebracht. Für die Speziesbestimmung der einzelnen Kulturen wurden PCRs des 16S rRNA Gens durchgeführt (siehe Material 4.5 Tabelle 9, Primer Nr. 3 und 4), die Amplifikate subkloniert und anschließend sequenziert (siehe Methoden 5.2.3).

Insgesamt konnten so zehn *Lactobacillus*- und sechs *Acetobacter*-Arten bzw. Stämme ermittelt werden (Tabelle 2). Aus diesen wurden zehn verschiedene Isolate von den beiden Medien zur Resequenzierung der genomischen DNA weiter verwendet (Tabelle 2). Dabei wurden MRS Isolat 4 aus Oregon-R und ACE Isolat 2 aus *white[-]* zwar jeweils auf MRS- oder ACE-Agarplatten isoliert, zur DNA-Extraktion dann aber sowohl auf ACE- als auch MRS-Agarplatten angezogen und separat sequenziert. Sie werden daher im folgenden Text "MRS Isolat 4 Oregon-R (angezogen auf MRS)" oder "MRS Isolat 4 Oregon-R (angezogen auf MRS)" oder "MRS Isolat 4 Oregon-R (angezogen auf ACE)" benannt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und anschließender BLAST Analyse der subklonierten 16S rRNA Gene aus den aus Oregon-R und *white[-]* isolierten Darmbakterien.

Bezeichnung	16S rRNA Gen BLAST Ergebnis	Kultivierung	Resequenzierung
Bakterienisolat			
MRS Isolat 1 Oregon-R	Lactobacillus pantheris	28 °C mikroaerophil	
MRS Isolat 2 Oregon-R	Lactobacillus plantarum	28 °C mikroaerophil	✓
MRS Isolat 3 Oregon-R	Lactobacillus plantarum	28 °C mikroaerophil	
MRS Isolat 4 Oregon-R	Acetobacter indonesiensis	28 °C mikroaerophil	ACE ✓, MRS ✓
ACE Isolat 1 Oregon-R	Acetobacter indonesiensis	28 °C aerophil	✓
ACE Isolat 2 Oregon-R	Lactobacillus plantarum	28 °C aerophil	✓
ACE Isolat 3 Oregon-R	Acetobacter indonesiensis	28 °C aerophil	
ACE Isolat 4 Oregon-R	Lactobacillus brevis	28 °C aerophil	
MRS Isolat 1 white[-]	Lactobacillus brevis	28 °C mikroaerophil	
MRS Isolat 2 white[-]	Lactobacillus plantarum	28 °C mikroaerophil	✓
MRS Isolat 3 white[-]	L. pentosus/L. plantarum	28 °C mikroaerophil	
MRS Isolat 4 white[-]	Acetobacter indonesiensis	28 °C mikroaerophil	✓
ACE Isolat 1 white[-]	A. pasteurianus/ A. pomorum	28 °C aerophil	✓
ACE Isolat 2 white[-]	Lactobacillus brevis	28 °C aerophil	ACE ✓, MRS ✓
ACE Isolat 3 white[-]	A. pasteurianus/ A. pomorum	28 °C aerophil	
ACE Isolat 4 white[-]	Lactobacillus brevis	28 °C aerophil	

2.1.7.2 Resequenzierung einzelner Darmbakterien und vergleichende in silico Analysen

Es wurde eine Resequenzierung der Genome der einzelnen Darmbakterien durchgeführt, um genetische Unterschiede zwischen den *type strains* und den isolierten Bakterien aus *Drosophila* zu ermitteln. Hier wurden zehn Bakterienisolate von MRS- und ACE-Agarplatten im *Genomics & Transcriptomics* Labor von Prof. Köhrer mittels *Illumina Miseq* Technologie sequenziert (Tabelle 2). Die Sequenzierergebnisse wurden mit der Software *Geneious Prime* (*Geneious Prime* 2019.2.1) analysiert. Hier wurden zunächst die einzelnen DNA-Stücke (engl. *reads*) der Sequenzierungen an dem Referenzgenom ausgerichtet (engl. *Alignment*), um Unterschiede in der Genomsequenz zu erkennen. Vor allem Gene, die in den sequenzierten Stämmen fehlen, können so leicht detektiert werden. In den Sequenzierungen wurden in jeder Probe jeweils ungefähr 3 bis 4 Millionen *reads* erzielt, die jeweils eine durchschnittliche Länge zwischen 138 und 147 bp hatten (Abb. 11 und Anhang 6.1 Tabelle 21). Von diesen *reads* wurden nicht alle in den Alinierungen mit den Referenzgenomen verwendet ("ungenutzte *reads"*). Vor allem in den Sequenzierungen von ACE Isolat 1 und 2 aus Oregon-R und ACE Isolat 2 (angezogen auf ACE) aus *white[-]* konnten über 90 % der *reads* nicht verwendet werden (Abb. 11). Da hier möglicherweise das falsche Referenzgenom verwendet wurde, wurden mit *Geneious Prime BLAST* Analysen der 16S rRNA Gensequenzen durchgeführt, die aber keine eindeutigen Ergebnisse zur Spezies dieser Isolate erbrachten. Mit aller Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei diesen Proben um Mischkulturen verschiedener Mikrobiom-Spezies, so dass eine Resequenzierung des Genoms so nicht möglich war. In den anderen Proben wurden zwischen 65 % bis 75 % der gesamten *reads* in Alinierungen an die jeweiligen Referenzgenome genutzt (Abb. 11).





Abb. 11: Absolute *read*-Zahlen der Resequenzierungen der einzelnen aus Oregon-R und *white[-]* Fliegen isolierten Darmbakterien. Aus der Gesamtzahl der *reads* wurde immer nur ein Teil an die Referenzgenome aliniert (genutzte *reads*). Die restlichen *reads* konnten in *Geneious Prime* dem jeweiligen Referenzgenom nicht zugeordnet werden (ungenutzte *reads*). Vor allem in den Sequenzierungen von ACE Isolat 1 und 2 aus Oregon-R und ACE Isolat 2 (angezogen auf ACE) aus *white[-]* wird deutlich, dass die Alinierung nicht erfolgreich. Es handelt sich hier wahrscheinlich um Mischkulturen.

Bei den Alinierungen der Genome mit den Referenzgenomen zeigte sich, dass es sich bei den Bakterienisolaten MRS Isolat 4 aus Oregon R (angezogen auf MRS) und MRS Isolat 4 aus *white[-]* nicht um *Acetobacter indonesiensis*, sondern auch um einen *L. plantarum* Stamm handelt (siehe Anhang 6.1 Tabelle

21). In der Alinierung der *reads* an ein Referenzgenom von *A. indonesiensis*, konnten deutlich weniger Sequenzabschnitte zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden diese Sequenzierergebnisse ebenfalls mit *L. plantarum* WCFS1 verglichen, wo über 65 % der *reads* aliniert wurden.

Die Sequenzierung von MRS Isolat 4 von Oregon-R (angezogen auf ACE) konnte erfolgreich an dem Referenzgenom von A. indonesiensis ausgerichtet werden. Da es sich bei diesem Referenzgenom jedoch nur um einzelne große DNA-Sequenzen (engl. Scaffold sequence) handelt, kann so nicht festgestellt werden, welche Genomabschnitte im hier aus Drosophila isolierten Stamm im Vergleich zum Referenzgenom fehlen. Schlussendlich handelt es sich bei den Proben MRS Isolat 2 und 4 (angezogen auf MRS) aus Oregon-R und MRS Isolat 2 und 4 aus white[-] um L. plantarum Stämme (siehe Anhang 6.1 Tabelle 21). Im Vergleich zum Referenzstamm L. plantarum WCFS1, welcher vollständig sequenziert und annotiert ist und ursprünglich aus menschlichem Speichel isoliert wurde (Kleerebezem et al., 2003; Siezen et al., 2012), fehlen in den Isolaten aus Drosophila 190 Gene und dabei teils ganze Gencluster, wie in der Darstellung der Geneious Prime Software klar zu erkennen ist (Abb. 12). So konnten in den Analysen z. B. keine reads zu den Genen des Molypdopterin-Biosynthese-Clusters (z. B. mobA, mobB, moeA und moeB) und den Untereinheiten der Nitratreduktase (narG, narH, narI, narJ) zugeordnet werden (Abb. 12). Molypdopterin ist der Co-Faktor der Nitratreduktase (Teusink et al., 2005). Diese respiratorische Nitratreduktase ist Membran-gebunden und generiert durch die Reduktion von Nitrat zu Nitrit eine "Protonen bewegende Kraft" (engl. Proton motive force), welche zur ATP-Synthese verwendet wird (Moreno-Vivián et al., 1999). Weshalb dieses Enzym in den aus Drosophila isolierten Stämmen fehlt ist noch nicht bekannt. Möglicherweise ist durch die Symbiose mit Drosophila eine solche ATP-Gewinnung nicht mehr notwendig. Des Weiteren fehlen in allen vier Isolaten große Teile der cps Gencluster (cps1B bis cps1I, cps2G bis cps2K und cps3B), welche einige Glycosyltransferasen und Polysaccharid-Biosynthese-Gene enthalten, die für die Produktion von extrazellulären Kapselpolysacchariden zuständig sind (Lee et al., 2016; Remus et al., 2012). Solche extrazellulären Polysaccharide sind häufig an der Interaktion der Bakterien mit der Umwelt beteiligt und spielen in der Virulenz von pathogenen Bakterien und ihrer Interaktion mit dem Wirt eine wichtige Rolle (García et al., 2000; Remus et al., 2012). Die Bedeutung dieser Kapselpolysaccharide ist in Lactobacilli noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Funktionen dieser Polysaccharide Stammspezifisch sind und sie unter anderem an der Adhäsion an Wirtszellen oder anderen Bakterien beteiligt sind, aber auch das Immunsystem beeinflussen und probiotisch wirken. So verbesserte die Deletion der cps Gencluster in einem, aber nicht allen getesteten mutanten L. plantarum Stämmen die Adhäsion an humane intestinale Zellen (Lee et al., 2016). Die Deletion der cps Gencluster hatte im Stamm L. plantarum WCFS1 globale Effekte auf die Expression von extrazellulären Proteinen und Teichonsäuren (Remus et al., 2012). So wäre es auch in den hier aus Drosophila isolierten L. plantarum Stämmen denkbar, dass das Fehlen großer Teile der cps Gene eine Reaktion auf die Symbiose mit dem Wirt ist und so eine bessere Interaktion zwischen den Bakterien und den intestinalen Zellen des Wirts stattfinden kann. Diese Hypothese muss allerdings durch vergleichende Tests zwischen Bakterien mit oder ohne diesem Gencluster und ihrer Wirkung auf Drosophila untersucht werden.

30

11,216,6			77,162			¢		Pop in	215,5		0		e o o			^
	-	1	13	gene 8		0					1,085,000	1,083,635	rfbA GL		0	
-		1,3/8,000	1,376,162			1		000 000 0	s'unium		٥		Le Contra de la Co		\cap	
	- -					×			3	-	0084,000	,082,635	cps11 Ge		0	
00010027	8	000'/5'1	1,375,162	nypoureu gen		0		0000	0,000,2	-	0 -	-			\mathbf{x}	
~	-	8	162 Che	gene		0			contron -	-	083,000	081,635	cps1H CDS		0	
2	•	0/2°1	1,374	gene nar		~				Å,	-	1			\prec	
0001008/7	-	000,4/5,1	1,373,162	narj		~			7,400,00	•-	382,000	80,635	ps1G CDS ps1G gene		0	
	• •			rHgene		0			000/07	5.		1,1	S		X	
3		13/4,000	1,372,162						7		81,000	79,635	cps1Fge		•	
-	-	8	,162						nnn'nnn'	2	01	1,0	gene			
•	0	5/5°L	1,371						000100	•	000'08	78,635	cps1E		2	
0/1	-	1,312,000	1,370,162	gene					-	-		11	1D CDS 1D gene		0	
000 ¹ 001				narG		0			000'000'1	- •	000'6/	77,635	CDS CDS		\mathbf{x}	
	-	000'1/5'1	1,369,162						00010	-		1,0	CDS gene			
	-	800-	8,162						~	:	018,000	376,635	cps10			
	-	12.1	1,36	ere C		٦			000/007/1	-	01	1,0				
-	-	000'695'1	1,367,162	moeBg		0			0000	-	000	75,635	ps1B CDS		0	
	-			moa		Ì			0'1	÷	1,0	1,0				
	-	1.368,000	1,366,162	eA CDS	eA gene	0		000	000,000	-	16,000	74,635	ps1A CDS			
		0007/8	55,162	Ĕ	m				00	 :	1,0	1,0				
-	•	<u>.</u>	13	C mobB		0		ricted)	8	•	- 12,000	73,637	f1 CDS f1 gene			
000,000		1,366,000	1,364,162	A g mor		2		port table (resi	400,000	:	1,0	1,0				
	o			B mot		10	v	k: Any 🚅 Ex	3.	_	21 2	7			2	
S.	:	3,102	53	100	s: A2	çe: A2		Bui Tra	200	1	3,10		14567	nts: A2	rage: A	
	adav sepa adav adav tajav t				Answer Waytow Waytow<	Market Market<	Market Market<									

Abb. 12: (vorherige Seite) Exemplarische Darstellung der Genomanalysen in *Geneious Prime*. Die *reads* der Sequenzierung wurden an das Referenzgenom von *L. plantarum* WCFS1 aligniert und freie Flächen in der Anordnung zeigen, dass für diese Sequenzen im Referenzgenom keine passenden DNA-Fragmente in der Sequenzierung gefunden werden konnten. Die gelben Pfeile beschreiben die codierenden Sequenzen (engl. *coding sequence,* cds) und grüne Pfeile das Gen.

Im zirkulären Vergleich des Referenzgenoms von *L. plantarum* WCFS1 und den vier resequenzierten Isolaten wird deutlich, an welchen Stellen Unterschiede zwischen den Genomen der Stämme bestehen. Dabei zeigt die Darstellung auch, dass die vier isolierten *L. plantarum* höchstwahrscheinlich dem selben Stamm entsprechen, da in der zirkulären Darstellung die gleichen Genomabschnitte im Vergleich zum Referenzstamm fehlen (Abb. 13). Die Vergleiche wurden mit der Software BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) durchgeführt und dargestellt (Alikhan *et al.*, 2011). Die Darstellung zeigt außerdem den GC *Skew* an, welcher die Über- oder Unterrepräsentation der Nukleotide Guanin und Cytosin im Genom der Bakterien beschreibt. Er ist ein Indikator für den Leitstrang und den Folgestrang der DNA und markiert damit den Replikationsursprung und -terminus im Genom. Er ist im Leitstrang positiv, sowie negativ im Folgestrang. An den Wechselstellen des GC *Skew* im Genom ist somit der Replikationsursprung-bzw. -terminus lokalisiert (Necşulea and Lobry, 2007).



Abb. 13: Vergleich der Genome des Referenzstamms *L. plantarum* WCFS1 mit den resequenzierten *L. plantarum* Stämmen MRS Isolat 2 und 4 aus Oregon-R und MRS Isolat 2 und 4 aus *white[-]* Fliegen, die auf MRS-Agarplatten isoliert wurden. Es wurde die Software BRIG verwendet (Alikhan *et al.*, 2011). Der GC *Skew* beschreibt die Über- (GC *Skew* (+)) oder Unterrepräsentation (GC-*Skew* (-)) der Nukleotide Guanin und Cytosin im Genom der Bakterien. Das Genom besteht aus ca. 3,3 Mio. bp. Die Unterbrechungen in den Ringen zeigen an, dass in den Isolaten im Vergleich zum Referenzgenom Genomabschnitte fehlen. Die Farbskalierung der jeweiligen Ringe gibt an, wie hoch die Genome in den jeweiligen Abschnitten in BLAST Analysen miteinander übereinstimmen ("Identity").

Bei dem Stamm ACE Isolat 1 aus *white[-]* handelt es sich um einen *Acetobacter pasteurianus* Stamm, was durch den Vergleich mit dem vollständig sequenzierten Stamm *A. pasteurianus* IFO 3283-01 (NCBI Reference Sequence: NC_013209.1) ersichtlich wurde (Abb. 14). Dieser Stamm wurde aus einem Biofilm während der Essigfermentation gewonnen (Azuma *et al.*, 2009). Das Genom ist zwar durch *in silico* Analysen annotiert, es wurden aber bisher keine Gencluster annotiert oder funktionelle Analysen der Gene durchgeführt wie z. B. in *Lactobacillus plantarum*. Dennoch konnte der Vergleich zwischen Referenzgenom und dem Genom des aus *Drosophila* isolierten Stamms zeigen, dass einige Gene im *Drosophila*-Stamm nicht vorhanden sind. So konnte z. B. ein Genabschnitt von ca. 38 kb nicht im isolierten *A. pasteurianus* Stamm ausgemacht werden. Dieser Bereich enthält hauptsächlich hypothetische Proteine, denen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte. Von insgesamt 255 Genen, die im Vergleich der beiden Stämme nicht

im hier isolierten Stamm zu finden waren, sind 94 hypothetische Proteine, aber auch einige Gene für verschiedene Transporter fehlen. Da es keine annotierten Gencluster gibt, ist jedoch unklar zu welchen Signalwegen diese Gene gehören.



Abb. 14: Vergleich der Genome des Referenzstamms *A. pasteurianus* IFO-3283-01 mit dem des resequenzierten *A. pasteurianus* Stamms ACE Isolat 1 aus *white[-]* Fliegen, welcher auf ACE-Agarplatten isoliert wurde. Das Genom besteht aus ca. 2,9 Mio. bp. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung und den gleichen Aufbau wie Abbildung 13.

Die Sequenzierungen des Stamms ACE Isolat 2 aus *white[-]* (angezogen auf MRS) zeigte, dass es sich um einen *Lactobacillus brevis* Stamm handelt, der mit dem Referenzgenom von *L. brevis* ATCC367 verglichen wurde, welcher aus dem Mund eines Menschen isoliert wurde (Davis, 1955; Makarova *et al.*, 2006).

Das Referenzgenom von *L. brevis* ist ebenso wie das von *A. pasteurianus* nur durch *in silico* Analysen annotiert und daher keine direkte Erkennung von Genclustern möglich. Im Vergleich fehlten nur 53 Gene im isolierten *L. brevis* Stamm, wovon 23 für hypothetische Proteine codieren (Abb. 15). Auch in diesem aus *Drosophila* isolierten Stamm fehlten einige Gene für z. B. Transporter oder Enzyme. Welche genaue Funktion diese Proteine besitzen und ob das Fehlen dieser Gene eine Anpassung an die Symbiose mit *Drosophila* ist, müsste durch weitere molekularbiologische und funktionelle Tests untersucht werden.



Abb. 15: Vergleich der Genome des Referenzstamms *L. brevis* ATCC367 mit dem des resequenzierten *L. brevis* Stamms ACE Isolat 2 aus *white[-]* Fliegen, der auf MRS-Agarplatten isoliert wurde. Das Genom besteht aus ca. 2,3 Mio. bp. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung und den gleichen Aufbau wie Abbildung 13.

Die Resequenzierungen der aus *Drosophila* isolierten Darmbakterien haben gezeigt, dass Unterschiede zu den Referenzgenomen bestehen. Diese Verluste von Genen und Genclustern können eine Anpassung an eine Symbiose mit *Drosophila* darstellen und möglicherweise die Interaktion zwischen Wirt und Bakterien erleichtern, wie z. B. durch den Verlust von extrazellulären Kapselproteinen. Ein Verlust von für Transporter codierenden Genen kann auch ein Hinweis darauf sein, dass diese in der Symbiose mit *Drosophila* nicht länger gebraucht werden und diese im Referenzstamm als Anpassung an eine andere spezialisierte Lebensweise nötig waren. Wie diese Verluste von Genen im Detail die Interaktion zwischen Wirt und Bakterien beeinflussen, kann in weiterführenden, vergleichenden funktionellen Experimenten analysiert werden.

2.1.8 Nachweis von Darmbakterien in Drosophila durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Neben den verschiedenen Methoden zur Sterilisation von Drosophila Embryonen, zur molekularbiologischen Quantifizierung und Detektion des Darmmikrobioms in Drosophila, sollte außerdem eine Methode zur visuellen Darstellung und Lokalisation der Bakterien in vivo etabliert werden. Bisher wurden durch PCR, qPCR und NGS die Anwesenheit der Bakterien nur auf mikrobiologischer und DNA-Ebene nachgewiesen. Die Frage, wo die Bakterien lokalisiert sind, ist bisher ungeklärt, könnte aber von großem Interesse für die Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiom sein. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische Methode mit welcher DNA oder RNA über eine Nukleinsäure-Sonde detektiert werden kann (Amann and Fuchs, 2008; Langer-Safer et al., 1982). Diese verwendete Sonde ist spezifisch für einen Teil der nachzuweisenden DNA oder RNA und hybridisiert über Basenpaarung an diese Bereiche. Dabei gibt es verschiedene Optionen wie die Sonde zur Visualisierung markiert ist. So werden Digoxigenin-markierte RNA-Sonden zur mRNA Detektion verwendet, die dann über Antikörper-gekoppelte Enzyme erkannt werden, oder auch radioaktive Sonden eingesetzt (Gall and Pardue, 1969; Komminoth, 1992). Bei der hier verwendeten Option sind an die Sonden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, die die Detektion der gesuchten DNA durch z. B. Fluoreszenzmikroskopie möglich macht. FISH wird auch zur spezifischen Detektion von Bakterien verwendet, indem Sonden eingesetzt werden, die an die 16S rRNA der Ribosomen binden (Amann and Fuchs, 2008). In dieser Arbeit wurden sowohl bekannte Sonden wie auch neu synthetisierte getestet, die spezifisch Bakterien im Darmmikrobiom von Drosophila nachweisen und so die Lokalisation der Bakterien im Darm analysierbar machen.

2.1.8.1 Erstellung und Verifizierung von speziesspezifischen Sonden für das Darmmikrobiom

Als universelle Bakterien-FISH Sonde wurde die Sonde Eub338 getestet, die an fast alle 16S rRNA-Moleküle von Prokaryoten binden soll (Amann *et al.*, 1990). Für den Nachweis von *Lactobacilli* wurde ebenfalls eine bereits beschriebene Sonde Lacto722 verwendet, die in der *probebase* Datenbank zu finden war (http://probebase.csb.univie.ac.at/node/8) (Sghir *et al.*, 1998). Außerdem wurden mit Hilfe des Webtools *decipher* (http://www2.decipher.codes/DesignProbes.html) eine Sonde synthetisiert, die die spezifische Detektion von *Acetobacter* ermöglichen sollte. Die Sonden wurden mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, damit die Sonden gleichzeitig an Därmen von *Drosophila* verwendet werden können (siehe Material 4.5 Tabelle 11). Die drei Sonden wurden zunächst in Zusammenarbeit mit Anna Härle im Rahmen ihrer Bachelorarbeit an Bakteriensuspensionen getestet (Härle, 2018). Dabei wurde das Protokoll zur Hybridisierung optimiert, indem verschiedene Schlüsselparameter des FISH-Protokolls variiert wurden: (a) Fixierung der Bakterien/des Gewebes, (b) Formamidkonzentration, (c) Sondenkonzentration, (d) Hybridisierungstemperatur und (e) Hybridisierungsdauer. Die Fluoreszenz der Bakterien wurde anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie und Messungen der Fluoreszenzintensität im Plattenlesegerät untersucht. Das endgültige Protokoll ist in Methoden 5.4.2 zu finden.

Die Spezifität der Sonden wurde getestet, indem versucht wurde *E. coli, Acetobacter* und *Lactobacillus* Kulturen mit den jeweils konträren Sonden zu hybridisieren. Dabei konnte bestätigt werden, dass die universelle Sonde Eub338 mit *E. coli, Acetobacter* und *Lactobacilli* hybridisierte, die spezifischen Sonden aber nur jeweils an die 16S rRNA von *Acetobacter* oder *Lactobacilli* binden (Abb. 16 und 17). Die beiden spezifischen Sonden zeigten eine geringe Hybridisierung mit *E. coli*, das Signal war aber deutlich schwächer als in den gewünschten Proben (Abb. 17). Da *E. coli* auch keinen Vertreter des *Drosophila* Darmmikrobioms darstellt, wurde die Detektion von *Lactobacilli* und *Acetobacter* in Faeces und Larven weiter etabliert.



Abb. 16: Übersicht über die Spezifität der drei FISH-Sonden Eub338-Atto425, Aceto-Atto488 und Lacto722-Atto594 in verschiedenen Bakteriensuspensionen. Die Sonden wurden an *Lactobacillus plantarum, L. brevis* und *L. fructivorans* getestet. Die Bakterien wurden jeweils mit jeder der drei Sonden hybridisiert und die Fluoreszenz an einem Konfokalmikroskop LSM710 mit einem 63x Öl-Objektiv analysiert. Nur die universelle Eub338-Sonde und die spezifische *Lactobacillus*-Sonde hybridisierten mit der 16S rRNA der Bakterien.



Abb. 17: Übersicht über die Spezifität der drei FISH-Sonden an verschiedenen Bakteriensuspensionen. Die Sonden wurden an *E. coli, Acetobacter pasteurianus* und *A. tropicalis* getestet. Die Bakterien wurden jeweils mit jeder der drei Sonden hybridisiert und die Fluoreszenz an einem Konfokalmikroskop LSM710 mit einem 63x Öl-Objektiv analysiert. Nur die universelle Eub338-Sonde und die spezifische *Acetobacter*-Sonde hybridisierten mit der 16S rRNA der Bakterien. An *E. coli* gab es eine geringe Hybridisierung der spezifischen Sonden.

2.1.8.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Drosophila Faeces

Da *Drosophila* Darmbakterien über die Faeces ausscheiden und diese so zur Reassoziation von Larven und zum Erhalt des Darmmikrobioms in der Population beitragen (Blum *et al.*, 2013; Fink *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2015), wurde zunächst eine nicht-invasive Methode zur Analyse des Darmmikrobioms getestet. Die Methode wurde in Zusammenarbeit mit Anna Härle im Rahmen ihrer Bachelorarbeit etabliert (Härle, 2018). Hierbei wurden die Faeces direkt auf Objektträgern mit 5 % Paraformaldehyd (PFA) (siehe Material 4.4 Tabelle 7, Fixierpuffer) fixiert. Auch die Hybridisierung mit den Sonden konnte direkt auf den Objektträgern der Folgen und so gleichzeitig, neben der Zusammensetzung des Darmmikrobioms, auch die Lokalisation der

Bakterien in den Faeces untersucht werden. (Methode siehe 5.4.2). Abbildung 18 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der FISH an Faeces, die hier mit den Sonden Aceto-Atto488 und Eub338-Atto425 durchgeführt wurde (Härle, 2018). Zusätzlich wurde eine DNA-Färbung mit ToPro3 angewendet. Durch die FISH konnten zahlreiche Bakterien in den Faeces nachgewiesen werden. In dieser dreifachen Färbung sollten alle Bakterien mit ToPro3 (rot) und Eub338-Atto425 (blau) angefärbt werden (Abb. 18 A und B), aber nur die *Acetobacter* mit der *Aceto*-Sonde (grün), was gut zu erkennen ist (Abb. 18 C). Neben den Bakterien konnten jedoch noch weitere Bestandteile der Faeces, wie z. B. Hefen in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen detektiert werden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Autofluoreszenz von Hefe (Maslanka *et al.*, 2018). Es wäre aber auch denkbar, dass die Sonden in den Futterresten verbleiben und nicht ausgewaschen wurden. Aus diesem Grund sind weitere Analysen der Faeces von Fliegen, die auf anderen Futtern gehalten wurden nötig, um die Färbung der Bakterien so spezifisch wie möglich zu gestalten.



Abb. 18: FISH-Analysen an Faeces von adulten white[-] Fliegen mit den Sonden Eub338-Atto425 (blau) und Aceto-Atto488 (grün). Die Faeces wurden zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff ToPro3 (rot) gefärbt. Die fluoreszent gefärbten Bakterien wurden an Konfokalmikroskop einem LSM710 mit einem 63x Öl-Objektiv analysiert. Mikroskopie durchgeführt von Anna Härle, 2018.

2.1.8.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an larvalen Därmen

Für FISH in wandernden L3 Larven wurde zur Fixierung der Gewebe nicht PFA, sondern *Carnoy's Solution* (Ethanol, Chloroform, Essigsäure 6:3:1) verwendet, welches bereits mehrfach zum Fixieren von Geweben verwendet wurde (Lebeer *et al.*, 2011; Matsuo *et al.*, 1997; Swidsinski *et al.*, 2005). Durch diese Fixiermethode konnten die Bakterien durch FISH oder einfache DNA-Färbungen mit ToPro1 oder 3 im Darm der Larven sichtbar gemacht werden, was zuvor mit einer Fixierung in PFA nicht möglich war und in Zusammenarbeit mit Anna Härle während ihrer Bachelorarbeit bestätigt wurde (Härle, 2018). Abbildung 19 zeigt zunächst den Vergleich der beiden Fixiermethoden an Därmen von L3 Larven mit einer einfachen DNA-Färbung. Die Därme wurden jeweils mit ToPro3 für 30 min gefärbt.



Abb. 19: Vergleich von Paraformaldehyd und *Carnoy's Solution* Fixierung an Iarvalen Därmen. A: fixiert mit PFA; B, C, D fixiert mit *Carnoy's Solution*. Zum Vergleich der Färbeintensität durch ToPro3 wurden A und B unter identischen Einstellungen am Konfokalmikroskop aufgenommen. D zeigt eine Vergrößerung aus C, * markiert die angefärbten Darmbakterien. Entnommen und modifiziert aus (Härle, 2018).

In Abbildung 19 A ist die Färbung des mit PFA-fixierten Darms zu sehen. Hier sind nur die Zellkerne des Darmepithels angefärbt. Die Bakterien sind nicht detektierbar. Abbildung 19 B zeigt dagegen einen Darm, der zuvor mit *Carnoy's Solution* fixiert und anschließend unter den gleichen Einstellungen des Konfokalmikroskops aufgenommen wurde, die für die Aufnahme *des* PFA-fixierten Darms verwendet wurden. Hier wird deutlich, wieviel stärker die Färbung im *Carnoy's Solution* fixierten Darm ist. Abbildung 19 C hingegen zeigt den gleichen Darm mit angepassten Einstellungen und deutlich sichtbaren Bakterien im Lumen des Darms (Abb. 19 D). Für die FISH an Därmen wurde außerdem die Hybridisierungszeit der Sonden von vier auf 16 Stunden verlängert, da dies eine bessere Fluoreszenzfärbung der Bakterien mittels Sonde und weniger Hintergrundfluoreszenz im Darmgewebe der Fliege zur Folge hatte (Härle, 2018) (Abb. 20).



Abb. 20: FISH an larvalen Därmen von *Drosophila* mit Eub338-Atto425 und verschiedenen Hybridisierungszeiten (vier (A) und 16 Stunden (B)). Die Därme wurden mit ToPro3 gegengefärbt. Entnommen aus (Härle, 2018). Zur besseren Ansicht wurden die Helligkeit und der Kontrast der Abbildungen bearbeitet.

Abbildung 21 zeigt eine Hybridisierung mit den drei verschiedenen fluoreszent-markierten Sonden an einem Darm einer *white[-]* L3 Larve, die sich auf Hefeextrakt-Maismehl-Futter entwickelt hatte. Die beiden spezifischen Sonden für *Lactobacilli* und *Acetobacter* haben mit distinkten Bakterien hybridisiert, was in den einzelnen Fluoreszenzkanälen (Atto594 und Atto488) zu erkennen ist. Auch das zusammengefügte Bild (merge) zeigt die unterschiedlich fluoreszierenden Bakterien in den verschiedenen Regionen des Darms. Im hinteren Teil des Darms konnten mehr Bakterien detektiert werden. Die universelle Eub338-Sonde sollte mit allen Bakterien hybridisieren, jedoch ist sehr viel Hintergrundfluoreszenz des Darms vorhanden, so dass die Fluoreszenz der Bakterien schwer zu erkennen ist. Hier wäre eine weitere Anpassung der Hybridisierungs- oder Mikroskopieprotokolle nötig, um diese ungezielte Färbung zu minimieren.



Abb. 21: FISH am Darm einer *white[-]* L3 Larve. Der Darm wurde mit Carnoy's Solution fixiert und mit den drei fluoreszenten Sonden Eub338 (blau), Lacto722 (rot) und Aceto (grün) hybridisiert. Die Detailaufnahmen wurden an einem Konfokalmikroskop LSM710 mit einem 63x Öl-Objektiv und der gesamte Darm an einem Operetta CLS High-Content Analysis System mit einem 5x Luft-Objektiv von Irfan Akhtar (Doktorand bei Prof. Beller) aufgenommen. In den Detailaufnahmen ist der Maßstab 10 µm, in der Übersicht des Darms liegt er bei 1 mm.

Trotz der Hintergrundfluoreszenz ist es möglich mit dieser Methode die *Lactobacilli* und *Acetobacter in vivo* sichtbar zu machen und in weiteren Experimenten die Lokalisation der Bakterien genauer zu analysieren. So kann untersucht werden, ob es Unterschiede in der Lokalisation der *Lactobacilli* und *Acetobacter* gibt und wie sich diese Lokalisationen unter bestimmten äußerlichen Einflüssen, wie z. B. einer Nahrungsumstellung oder einer Pertubation durch regelmäßiges Umsetzen der Fliegen verändert.

2.2 Der Zusammenhang zwischen Darmmikrobiom und Metabolismus des Wirts

Es wurde bereits in zahlreichen Studien belegt, dass das Darmmikrobiom in starken Wechselwirkungen mit seinem Wirt steht und diesen in verschiedenen Bereichen beeinflussen kann. So sind bereits Zusammenhänge zwischen der Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven und bestimmten Darmbakterien untersucht worden (Keebaugh et al., 2018; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011; Strigini and Leulier, 2016) und auch die Interaktion des Wirtsimmunsystems mit den symbiotischen Darmbakterien steht im Fokus der Forschung (Broderick, 2016; Capo et al., 2016; Mistry et al., 2017; Yiu et al., 2017). In dieser Studie wurde unter anderem der Einfluss eines Darmmikrobioms auf den Metabolismus des Wirts untersucht. Diese Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiom kann durch verschiedene Aspekte beeinflusst werden, z. B. durch die Komposition des Mikrobioms, den Genotyp des Wirts oder verschiedene äußerliche Einflüsse (siehe Einleitung 1.3, Abb. 2). Um den Einfluss der genetischen Komponente auf den Metabolismus der Fliegen, aber auch auf die Mikrobiomkomposition zu untersuchen, wurden ein Teil der Fliegenlinien des Drosophila Genetic Reference Panels (DGRP) verwendet, die eine große Bandbreite von Genvariationen darstellen (Mackay et al., 2012). Innerhalb des DGRP wurde die Mikrobiomkomposition von vier metabolisch differenzierbaren Linien und die Korrelationen zum Wirtsmetabolismus unter möglichst konstanten Umweltbedingungen untersucht. Außerdem wurde die Abhängigkeit der Fliegenentwicklung und des Metabolismus von der Präsenz eines Darmmikrobioms analysiert.

2.2.1 Analysen des Darmmikrobioms von wildtypischen Fliegen unter verschiedenen Umwelteinflüssen

Zunächst wurde die Zusammensetzung des Mikrobioms von vier metabolisch differenzierbaren DGRP Linien unter verschiedenen Futterbedingungen getestet, da die Futterquelle die Bakterienkomposition in *Drosophila* am stärksten beeinflussen soll (Broderick and Lemaitre, 2012; Erkosar *et al.*, 2018; Obadia *et al.*, 2018; Téfit *et al.*, 2017; Vacchini *et al.*, 2017).

2.2.1.1 Analysen unter basalen Futterbedingungen

In Zusammenarbeit mit Lisa Jehrke (Doktorandin im Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme, AG Beller, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurden die DGRP Linien unter basalen Bedingungen auf Standardfutter (siehe Material 4.9 Tabelle 16) für zwei Generationen mit gleicher parentaler Dichte aufgezogen und als sechs Tage alte Fliegen gesammelt und eingefroren. Anhand der

44

Ergebnisse aus den metabolischen Messungen der Triacylglycerolmengen (TAG) der männlichen Fliegen wurden vier Linien ausgewählt, bei welchen zusätzlich das Darmmikrobiom mittels *Next Generation Sequencing* des 16S rRNA Gens analysiert werden sollte (siehe Methoden 5.2.10). Ziel war es, die metabolischen Messungen mit der Abundanz bestimmter Darmbakterien zu korrelieren und eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Metabolismus des Wirts und seinem Darmmikrobiom zu erkennen. Es wurden zwei Linien (303 und 315) ausgewählt, bei denen die Männchen und Weibchen einen niedrigen und zwei (301 und 859), bei denen ein hoher TAG-Gehalt gemessen wurde, um eine große Bandbreite des Metabolismus abzudecken (Abb. 22).

Zusätzlich wurden zwei Proben von axenischen Wildtypfliegen (Oregon-R) als Negativkontrolle ebenfalls sequenziert. Für die Sequenzierung des Darmmikrobioms wurde DNA aus jeweils fünf Larven bzw. acht adulten Fliegen in Duplikaten extrahiert (siehe Methoden 5.2.1). Die Sequenzierung und Qualitätskontrollen wurden im *Genomics & Transcriptomics* Labor von Prof. Karl Köhrer an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt (siehe Methoden 5.2.10).



Abb. 22: Bestimmung der TAG-Mengen der DGRP Linien unter basalen Bedingungen. Die Pfeile markieren die Linien, welche für *Next Generation Sequencing* Experimente des Darmmikrobioms ausgewählt wurden. Pro Probe wurden acht sechs Tage alte männliche oder weibliche Fliegen verwendet. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus biologischen Triplikaten, sowie die Standardabweichungen. Der TAG-Gehalt wurde auf die Anzahl der Tiere pro Probe normiert. Modifiziert aus (Jehrke *et al.*, 2018).

Die Sequenzierung der Larven und adulten Fliegen ergab eine hohe Anzahl an *reads*, die pro Probe analysiert wurden (siehe Anhang 6.2 Tabelle 22), welche zu einem hohen Prozentsatz bis auf Genusebene klassifiziert werden konnten. Dabei werden sogenannte *Rarefaction* Kurven gebildet, die die Anzahl der identifizierten Arten in Abhängigkeit der Anzahl der *reads* stellt. Je mehr *reads* in einer Sequenzierung pro Probe erreicht werden können, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit alle Bakterien in der Probe zu detektieren. Sobald ein Plateau erreicht ist, ist die *read* Anzahl ausreichend (Abb. 23). Pro Probe konnten laut dem *Genomics & Transcriptomics* Labor zwischen 190.000 und 955.000 *reads* erzielt werden (siehe Anhang 6.2 Tabelle 22).

Von diesen wurden nach der Qualitätskontrolle des *"Metagenomic Analysis Server MG-RAST"* (Version 4.0.3, https://www.mg-rast.org/index.html?stay=1) (Meyer *et al.*, 2008) zwischen 34.600 und 286.000 *reads* pro Probe zur Analyse der Spezies verwendet (siehe Abb. 23 und Anhang 6.2 Tabelle 22).



Abb. 23: *Rarefaction* Analyse der basalen DGRP-Sequenzierungen. Für jede sequenzierte DGRP-Probe sind die *read* Zahlen gegen die Anzahl der Spezies aufgetragen. Es wurde das Mikrobiom von wandernden L3 Larven, sechs Tage alten Männchen und Weibchen der Linien 301, 303, 315 und 859 in Duplikaten sequenziert. Als Negativkontrollen wurde DNA aus axenischen Oregon-R Männchen und Weibchen extrahiert und sequenziert. Die *read* Zahl lag deutlich unter denen der anderen Proben.

Die Sequenzierung der axenischen Oregon-R Männchen und Weibchen zeigte deutlich weniger *reads* (ca. 150.000 bzw. ca. 20.000 nach MG-RAST Qualitätskontrolle) (siehe Anhang 6.2 Tabelle 22) und keine Bakterien, die normalerweise in *Drosophila* vorkommen. Vielmehr wurden Bakterien detektiert, die Teil der menschlichen Haut- bzw. Mundflora sind (Abb. 24). Sehr wahrscheinlich waren diese Bakterien daher nicht mit den Fliegen assoziiert, sondern die DNA ist während der Probenverarbeitung in die Probe gelangt. Wie bereits unter 2.1.3 beschrieben konnten also durch die Behandlung der Embryonen mit Bleiche und Ethanol und die Haltung der sich aus den Embryonen entwickelten Fliegen auf autoklaviertem Futter mit Antibiotika so alle natürlicherweise vorkommenden Darmbakterien eliminiert werden.

46



Abb. 24: Sequenzierergebnisse der axenischen Oregon-R Fliegen auf Speziesebene. Es wurde pro Probe aus jeweils acht sechs Tage alten männlichen und weiblichen Fliegen DNA extrahiert und das 16S rRNA Gen der Bakterien sequenziert. Die Messungen zeigen keine typischen in *Drosophila* vorkommenden Bakterien, sondern Bakterien der Mund und Hautflora des Menschen. Die geringen *read* Zahlen sprechen zusätzlich für von außen in die Probe gelangte DNA (siehe Anhang 6.2, Tabelle 22). Das *Drosophila* Darmmikrobiom konnte jedoch durch die Sterilisation und Haltung auf autoklaviertem Futter mit Antibiotika eliminiert werden.

Die Sequenzierergebnisse auf Speziesebene zeigen die eigentlichen Unterschiede zwischen den Darmmikrobiomen der Fliegenlinien. Die Duplikate der Proben zeigen jeweils eine sehr ähnliche bakterielle Komposition (wurden zur Übersicht in Abbildungen 25 gemittelt). Ebenfalls ähneln sich die Ergebnisse der männlichen und weiblichen Fliegen einer Linie stark. Zum Teil sind stärkere Unterschiede zwischen den L3 Larven und den adulten Tieren zu erkennen. So enthalten die Larven der Linie 301 ca. 30 % DNA von *A. indonesiensis*, während die adulten Tiere stattdessen ähnliche Mengen *A. pasteurianus*-DNA enthalten. Die einzelnen DGRP-Linien unterschieden sich dagegen deutlicher. *Lactobacillus japonicus* und *L. pentosus* konnten zwar in allen vier Linien nachgewiesen werden. Jedoch konnte *L. plantarum* nur in Linie 301 und *L. brevis* nur in den Linien 303 und 315 detektiert werden (Abb. 25). Auch *A. pasteurianus* kann nur in drei Linien (301, 303 und 859) und *A. tropicalis* nur in zwei von vier Linien (303 und 315) nachgewiesen werden. In der Linie 859 wurde neben den typischen Vertretern des Darmmikrobioms auch eine hoher Anteil an *Wolbachia sp.* detektiert. *Wolbachia* ist ein parasitär und intrazellulär in Insekten lebendes Bakterium, dass einen großen Einfluss auf die Physiologie und die Fortpflanzung des Wirts hat (Fry *et al.*, 2004), aber nicht zum Darmmikrobiom gehört.

Obwohl die vier Linien seit mehreren Generationen auf dem gleichen Standardfutter (siehe Material 4.9 Tabelle 16) gehalten wurden, konnten doch deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des jeweiligen Darmmikrobioms ausgemacht werden. Es scheint also, dass nicht nur die Futterbedingungen das Mikrobiom beeinflussen, sondern auch interne Faktoren des Wirts, wie z. B. das Immunsystem oder die Anwesenheit von *Wolbachia pipientis* einen Einfluss haben können (Simhadri *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2016). *Wolbachia* ist ein in Insekten häufig vorkommender intrazellulärer Symbiont/Parasit, welcher signifikanten Einfluss auf die Physiologie (Bi *et al.*, 2018; Gruntenko *et al.*, 2017; Toomey *et al.*, 2013) und das Darmmikrobiom von *Drosophila* haben kann (Simhadri *et al.*, 2017). Es gibt jedoch eine Ähnlichkeit zwischen den Mikrobiomen der Fliegenlinien mit einem niedrigen TAG-Gehalt. In Linie 315 und 303 ist jeweils ein Anteil zwischen 10 und 30 % von *Lactobacillus brevis* DNA gemessen worden, der in den anderen beiden Linien nicht vertreten ist. Ein Vergleich der beiden Linien mit einem hohen TAG-Gehalt ist, aufgrund des hohen *Wolbachia*-Gehalts in Linie 859, schwierig.



Abb. 25: Mikrobiomkomposition auf Speziesebene der vier sequenzierten DGRP Linien unter basalen Futterbedingungen. Es wurde DNA von L3 Larven, sowie sechs Tage alte Männchen und Weibchen in Duplikaten sequenziert und die Ergebnisse anschließend gemittelt. Die L3 Larven Probe von Linie 301 und die Weibchen Probe von Linie 315 konnten nur in Unikaten gemessen werden. Die Linien 315 und 303 zeigten in vorherigen Messungen einen niedrigen TAG-Gehalt, Linien 301 und 859 einen hohen Gehalt.

2.2.1.2 Einfluss eines Futterwechsels auf das Darmmikrobiom von Wildtypfliegen

Neben der Analyse der Mikrobiomkomposition unter basalen Bedingungen in den vier DGRP Linien, sollte auch der Einfluss des Futters auf die Mikrobiomkomposition untersucht werden. Das Mikrobiom ist ein sehr dynamisches und von äußeren Einflüssen abhängiges System, dass vor allem durch die Nahrung stark beeinflusst wird (Chandler et al., 2011). Es wurde bereits gezeigt, dass unterschiedliche Futterbedingungen einen großen Einfluss auf den Wirtsmetabolismus haben. So entwickelten Fliegen, die auf einem hochkalorischen Futter (hoher Zuckergehalt) gehalten wurden eine Insulinresistenz und zeigten einen erhöhten Triacylglycerolgehalt (Musselman et al., 2011). Dagegen hat eine Limitierung des Nahrungsangebots (engl. "dietary restriction") einen positiven Einfluss auf die Lebensdauer, beeinflusst aber auch gleichzeitig die Fruchtbarkeit weiblicher Drosophila (Metaxakis and Partridge, 2013). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass nicht nur die Nahrung allein den Metabolismus beeinflusst, sondern auch das Darmmikrobiom einen entscheidenden Faktor spielt. In Mäusen ist das Darmmikrobiom essentiell für den Verdau von Polysacchariden und die Absorption von Monosacchariden im Darm wird begünstigt (Bäckhed et al., 2004). Daher wurde angenommen, dass nicht nur die Darmbakterien einen Einfluss auf den Metabolismus haben, sondern auch die vorhandenen Nährstoffe das Darmmikrobiom formen können. So könnten unterschiedliche Kohlenstoffquellen wie Saccharose oder Glucose oder verschiedene Mengen an Protein das Wachstum bestimmter Bakterien fördern oder inhibieren. Auch der pH-Wert oder die Osmolarität des Futters könnten sowohl auf dem Futter als auch im Darm ein unterschiedliches Bakterienwachstum begünstigen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Fliegen des DGRP für eine Generation auf einem Zuckerreduzierten Futter (engl. *low sugar diet*, LSD) gehalten. Nach dem Schlüpfen wurden die Tiere auf LSD, Standardfutter (engl. *standard diet*, SD) oder ein Futter mit erhöhtem Zuckergehalt (engl. *high sugar diet*, HSD) überführt (siehe Material 4.9 Tabelle 16), um den Einfluss der Nahrung auf den Metabolismus und das Darmmikrobiom zu untersuchen. Nach weiteren fünf Tagen wurden die Tiere für die verschiedenen metabolischen Messungen und für die Sequenzierung eingefroren und eine DNA-Extraktion von Männchen und Weibchen durchgeführt (siehe 2.1.4 und Methoden 5.2.1). Die Sequenzanalyse erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben. Die *read* Anzahl und die *Rarefaction* Analysen der Sequenzierung der männlichen und weiblichen Fliegen zeigen eine hohe *read* Zahl (siehe Anhang 6.2 Tabelle 23, 24) und eine ausreichende Abdeckung der einzelnen Arten in den Proben (Abb. 26 und 27).

Innerhalb einer Fliegenlinie waren zwischen den Fliegen, die auf verschiedenen Futtern gehalten wurden, nach einem Zeitraum von sechs Tagen keine starken Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung zu erkennen (einzelne Daten nicht gezeigt). Die einzelnen Linien waren in sich sehr ähnlich, so dass zumindest in dem hier gewählten Zeitfenster, das Futter offensichtlich keinen starken Einfluss auf das Mikrobiom zu haben scheint.



Abb. 26: *Rarefaction* Analyse der Sequenzierung von männlichen Fliegen der vier DGRP Linien 301, 303, 315 und 859. Die Fliegen wurden nach dem Schlüpfen für sechs Tage auf HSD, LSD oder SD gehalten. Die Sequenzierungen aller Proben zeigen eine ausreichende Anzahl von *reads*.



Abb. 27: *Rarefaction* Analyse der Sequenzierung von weiblichen Fliegen der vier DGRP Linien 301, 303, 315 und 859. Die Fliegen wurden nach dem Schlüpfen für sechs Tage auf HSD, LSD oder SD gehalten. Die Sequenzierungen aller Proben zeigen eine ausreichende Anzahl von *reads*.

2.2.1.3 Gesamtübersicht über Darmmikrobiom Unterschiede

Die Gesamtheit der Sequenzierergebnisse der vier DGRP Linien wurde weiterhin in einer Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal component analysis, PCA) untersucht, die um Übereinstimmungen oder Unterschiede der jeweiligen Mikrobiome in den Fliegenlinien besser zu veranschaulichen (Abb. 28). Die Datenpunkte aggregieren in Gruppen (engl. cluster), wenn sie sich stark ähneln. Es ist zu erkennen, dass die Datenpunkte hauptsächlich nach den einzelnen DGRP Linien in Cluster aufgeteilt sind. Vor allem Linie 859 und 301 bilden weit voneinander entfernte Cluster, was auf die starken Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung hindeutet. Linien 303 und 315 bilden keine so prominenten Cluster und sind untereinander verteilt.



Abb. 28: Hauptkomponentenanalyse der Sequenzierergebnisse der vier DGRP Linien unter basalen Futterbedingungen, sowie nach einem Futterwechsel von LSD auf LSD, LSD auf SD und LSD auf HSD. Die einzelnen Proben werden hauptsächlich nach den einzelnen Fliegenlinien aufgespalten. Entnommen und modifiziert aus (Jehrke *et al.*, 2018).

Neben der PCA wurde auch eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt, die die Ähnlichkeit der DGRP Linien in Bezug auf die Mikrobiomzusammensetzung darstellt (Abb. 29). Wie auch schon in der PCA, zeigt sich hier eine starke Abspaltung der Linie 859, was vor allem durch den hohen Prozentsatz an *Wolbachia pipientis* hervorgerufen wird. Die Proben der Linie 301 zeigen ebenfalls eine starke Ähnlichkeit zueinander. Linien 303 und 315 zeigen dagegen keine klare Abgrenzung, was auf Grund der ähnlichen Bakterienkomposition zu erwarten war. Da die Mikrobiome der Männchen und Weibchen sich nicht stark voneinander unterscheiden, ist hier auch keine deutliche Aufspaltung der beiden Geschlechter innerhalb der Fliegenlinien zu erkennen.



Prozent der Bakterien

Abb. 29: Hierarchisches Clustering der Sequenzierergebnisse der vier DGRP Linien unter basalen Futterbedingungen (Liniennummer und a oder b als Duplikate in der Sequenzierung), sowie nach einem Futterwechsel von LSD auf LSD, LSD auf SD und LSD auf HSD. Die einzelnen Proben werden hauptsächlich nach den einzelnen Fliegenlinien aufgespalten. Entnommen und modifiziert aus (Jehrke *et al.*, 2018).

2.2.2 Korrelationen zwischen Metabolitprofilen und Mikrobiomkompositionen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Abundanz einzelner Metabolite und der Mikrobiomzusammensetzung zu untersuchen, wurden die metabolischen Messungen (durchgeführt von Lisa Jehrke, Institut für Mathematische Modellierung biologischer Systeme, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mit den Sequenzierergebnissen der vier DGRP Linien in Zusammenhang gebracht (Jehrke *et al.*, 2018). Die Korrelationen wurden zwischen den 13 abundantesten Bakterienarten, sowie den Metaboliten TAG, Protein, Glycerol, Glucose und Glykogen analysiert, sowie unter den Bakterien und den Metaboliten selbst. Damit konnten mögliche Korrelationen z. B. zwischen TAG oder Glykogen mit der Abundanz bestimmter Bakterien festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in einer Korrelationsmatrix dargestellt (Abb. 30). Die roten Punkte stellen dabei eine negative, die blauen eine tendenziell positive Korrelation dar. So zeigte sich eine leicht negative Korrelation zwischen der Menge an freiem Glycerol und der Abundanz von *Acetobacter*-Spezies und ebenfalls zwischen *L. plantarum* und *A. tropicalis.* Es zeigte sich zudem eine perfekte, positive Korrelation (r=1) zwischen den beiden Stämmen *L. fructivorans* und *L. homohiochii*. Obwohl nur vier Linien des DGRP sequenziert wurden, konnten doch Korrelationen zwischen einzelnen Metaboliten und Bakterienspezies ausgemacht werden. Weitere Untersuchungen könnten daher noch genauere Informationen liefern.



Abb. 30: Korrelationsmatrix der gemessenen Metabolite der Fliegen sowie ihrem Darmmikrobiom (links) und *scatter plots* einzelner korrelierter Parameter (rechts). In blau ist eine positive, in rot eine negative Korrelation der jeweiligen Ergebnisse gezeigt. Die Größe der Punkte beschreibt die Signifikanz der jeweiligen Korrelationen. Die Daten wurden zur Darstellung log-transformiert. Eine leichte negative Korrelation besteht zwischen den Glycerol-Messungen und dem %-Anteil an *Acetobacter*. Der %-Anteil von *L. plantarum* und *A. tropicalis* korreliert ebenfalls negativ. Der Korrelationskoeffizient *r* in den *scatter plots* beschreibt den linearen Zusammenhang der jeweiligen Werte. Entnommen und modifiziert aus (Jehrke *et al.*, 2018).

2.2.3 Stammspezifische Abhängigkeiten der Fliegen von einem Darmmikrobiom

Die Entwicklung von *Drosophila* ist stark abhängig von den gegebenen Umweltbedingungen, wie der Temperatur (Schou *et al.*, 2017) oder den Futterverhältnissen (Pascacio-Villafán *et al.*, 2016; Piper *et al.*, 2014). Insbesondere unter Hefe-limitierenden Nahrungsbedingungen hat darüber hinaus das Darmmikrobiom einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der Entwicklung (Chaston *et al.*, 2014; Pais *et al.*, 2018). Es wurde auch gezeigt, dass die Entwicklung von *Drosophila* Larven unter Hefemangelbedingungen von bestimmten Darmbakterien abhängt (Shin *et al.*, 2011; Storelli *et al.*, 2011). In diesen Studien wurde nur je eine wildtypische Referenzfliegenlinie verwendet. In einer der Fliegenlinien (*w*¹¹¹⁸) konnte *A. pomorum* eine normale Entwicklung wiederherstellen (Shin *et al.*, 2011). In der mit *yw* durchgeführten anderen Studie wurde dagegen *L. plantarum* als essentieller Faktor einer normalen Entwicklung detektiert (Storelli *et al.*, 2011). Da eine unterschiedlich starke Abhängigkeit von bestimmten Darmbakterien oder dem Mikrobiom als Gesamtheit auch wirtsspezifisch sein könnte, wurden die 37 Fliegenlinien des *Drosophila Genetic Reference Panel* (DGRP) in Bezug auf die Abhängigkeit von einem intakten Mikrobiom für verschiedene Parameter getestet. Zunächst wurde für jede Linie eine axenische Variante generiert (siehe 2.1.1) und die Sterilität der Fliegen regelmäßig mittels PCR überprüft (siehe 2.1.2).

2.2.3.1 Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung von *Drosophila* unter verschiedenen Nahrungsbedingungen

Um das Zusammenspiel zwischen Darmmikrobiom und Genotyp zu untersuchen, wurden vergleichende Entwicklungsexperimente mit den axenischen und konventionell gehaltenen (KH) Fliegen durchgeführt. Hierfür wurden die Fliegen auf Futtern mit verschiedenen Hefemengen bzw. Proteinquellen (Frischhefe oder Hefeextrakt) gehalten. Durch die voneinander abweichende Nährstoffzusammensetzung bieten die verschiedenen Futter eine unterschiedlich gute Voraussetzungen zur Entwicklung (siehe Material 4.9 Tabelle 16). Das Glucose-Maismehl-Hefe-Futter (GMH) war hierbei das reichhaltigste Futter, gefolgt vom Glucose-Hefe-Futter (GH) und Hefeextrakt-Maismehl-Futter (HeM) (siehe 2.1.1 Tabelle 1). In diesem Versuch wurde nicht die Entwicklungsgeschwindigkeit, sondern nur die Fähigkeit der Fliegen sich auf den verschiedenen Futtern zu entwickeln, untersucht. Parentale KH und axenische Tiere der verschiedenen DGRP Linien wurden für 24 h auf den verschiedenen Futtern belassen und die Entwicklung dieser ersten Generation von abgelegten Embryonen wurde beobachtet. Bereits in dieser ersten Generation nach Eiablage auf den Futtern, konnten Unterschiede in der Entwicklungsfähigkeit der Fliegen festgestellt werden (Abb. 31). Auf dem GMH-Futter entwickelten sich alle konventionell gehaltenen und bei den axenischen Fliegen, bis auf Linie 486, alle zu adulten Tieren. Auf dem Glucose-Hefe-Futter konnten auch bereits in der ersten Generation Unterschiede in der Wachstumsfähigkeit festgestellt werden. Hier zeigten sich bei zwei Linien im normalen und axenischen Zustand keine Entwicklung zu adulten Tieren (Linie 486 und 639), was auf einen allgemein zu niedrigen Nährstoffgehalt dieses Futters für diese Fliegen schließen lässt. Es konnten sich jedoch zwei andere KH Linien (730 und 799) nicht auf dem GH-Futter entwickeln, die

54

entsprechenden axenischen Linien hatten dagegen keine Probleme in der Entwicklung (Abb. 31). Auf dem Futter mit dem geringsten Nährstoffgehalt (HeM) zeigten fünf konventionell gehaltene Linien Wachstumsprobleme, wohingegen die axenischen korrespondierenden Linien keine Einschränkungen zeigten. Das erwartete Ergebnis, dass die axenischen Linien größere Wachstumsprobleme zeigen würden, lag nur bei zwei Linien vor (324 und 486). Diese erste Generation der DGRP, die auf den drei Futtern gehalten wurden, stammte noch von parentalen Tieren ab, die auf dem reichhaltigen Standardfutter gehalten wurden und somit den Embryonen einen Wachstumsvorteil geben konnten. Daher wurde eine zweite Generation der KH und axenischen DGRP untersucht, deren Elterntiere aus der ersten Generation auf den drei getesteten Futtern stammten und somit keine zusätzlichen Wachstumsvorteile an die Embryonen weitergeben konnten.

1	Glukose-N	laismehl-Hefe	Glukos	e-Hefe	Hefeextrakt-Maismehl		
Generation	КН	axenisch	КН	axenisch	KH axenisch		
208							
301							
303							
304							
307							
313							
315							
324							
335							
357							
358							
360							
362							
375							
379							
380							
391							
399							
427							
437							
486							
517							
555							
639							
707							
712							
730							
732							
765							
786							
799							
820							
852							
859							
365							
705							
714							

Abb. 31: Wachstum der konventionell gehaltenen (KH) (je links) und axenischen (je rechts) DGRP Fliegen in der ersten Generation, die sich auf den drei getesteten Futtern entwickelten. In grün sind die Linien markiert, die sich bis ins adulte Stadium entwickeln konnten, in rot, die Linien, die durch Wachstumsdefizite ausstarben. Pro Linie und Kondition wurden zwei Futterröhrchen analysiert.

In dieser zweiten Generation der DGRP Fliegen zeigten sich noch stärkere Wachstumsprobleme. Von den 37 DGRP Linien waren sechs Linien im KH und axenischen Zustand, sowie zwei zusätzliche der axenischen und zudem vier weitere Linien der KH Fliegen nicht mehr in der Lage sich auf dem Hefeextrakt-Maismehl-Futter zu entwickeln (Abb. 32). Hier scheint wieder keine direkte Abhängigkeit vom Darmmikrobiom zu bestehen, aber eine allgemeine Einschränkung unter schlechten Umweltbedingungen zu überleben. Besonders ins Auge fielen drei Linien (303, 304 und 307), die sich zusätzlich auch auf dem Glucose-Hefe-Futter und auch auf dem reichhaltigen Glucose-Maismehl-Hefe-Futter (307) im axenischen Zustand nicht entwickeln konnten. Es konnte beobachtet werden, dass vier Linien (313, 427, 639 und 730) sich im axenischen Zustand auf dem Hefeextrakt-Maismehl-Futter zu adulten Tieren entwickelten, mit einem Darmmikrobiom jedoch vorzeitig verstarben.

2	Glukose-Ma	aismehl-Hefe	Gluko	se-Hefe	Hefeextrakt-Maismehl		
Generation	кн	axenisch	КН	axenisch	КН	axenisch	
208							
301							
303							
304							
307							
313							
315							
324							
335							
357							
358							
360							
362							
375							
379							
380							
391							
399							
427							
437							
486							
517							
555							
639							
707							
712							
730							
732							
765							
786							
799							
820							
852							
859							
365							
705							
714							

Abb. 32: Wachstum der konventionell gehaltenen (KH) (je links) und axenischen (je rechts) DGRP Fliegen in der zweiten Generation, deren Elterntiere sich bereits auf den gleichen drei Futtern entwickelt hatten. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abb. 31.

Die Entwicklung der Fliegen auf den verschiedenen Futtern zeigte, dass es unterschiedliche Abhängigkeiten der Fliegen von einem Darmmikrobiom gibt, aber auch genotypische Unterschiede des Wirts in der Fähigkeit sich unter Mangelbedingungen zu entwickeln bestehen, die unabhängig vom Darmmikrobiom sind. Da die Genome der Fliegen des DGRP vollständig sequenziert sind (Mackay *et al.*, 2012), konnten mit diesen Daten Genomweite Assoziationsstudien (engl. *Genome wide association studies*, GWAS) durchgeführt werden, die eine mögliche Korrelation der Entwicklungsfähigkeit (im konventionell gehaltenen oder axenischen Zustand der Fliege) mit bestimmten Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *Single nucleotide polymorphisms*, SNPs) korrelieren (siehe Methoden 5.7). Es wurden alle Konditionen der Fliegenhaltung, bis auf die KH Fliegen auf GMH, da hier keine Wachstumseinschränkungen vorlagen, in den

GWAS getestet. Die *Manhattan-Plots* (Abb. 33) stellen eine Visualisierung der detektierten SNPs dar. Diese Darstellung wird häufig verwendet, um Resultate der GWAS darzustellen, indem die Position der jeweiligen SNPs auf den einzelnen Chromosomen gegen den negativen Logarithmus der p-Werte der Assoziationen aufgetragen wird (Neil Sarkar, 2013). Der p-Wert von 10⁻⁵ wurde als Standardwert bei GWAS mit DGRP Fliegen bereits verwendet (Mackay *et al.*, 2012). Die Plots zeigen, dass zahlreiche SNPs mit der Entwicklungsfähigkeit auf den verschiedenen Futtern im axenischen Zustand oder mit einem Darmmikrobiom assoziiert sind (Abb. 33).



Abb. 33: Manhattan-Plots der GWAS, welche die mit den Differenzen der Entwicklungsfähigkeit der KH und axenischen DGRP Fliegen assoziierten SNPs darstellt. Die Diagramme stellen die SNPs (graue und schwarze Punkte) auf den einzelnen Chromosomen von *Drosophila* (y-Achse) dar (X, 2L, 2R, 3L, 3R). Zur besseren Übersicht werden nur Assoziationen ab einem p-Wert von 10⁻³ gezeigt.

SNPs liegen nicht nur in Genen, sondern können auch in intergenischen Regionen vorhanden sein. Da jedoch die Interpretation intergenischer SNPs schwierig ist, wurde der Fokus auf SNPs gelegt, die in codierenden Bereichen liegen. Tabelle 3 stellt die Gesamtzahl der signifikanten SNPs (p<10⁻⁵) dar und zeigt, wie viele davon Gen-assoziiert sind. Dabei wird hier jedoch nicht berücksichtigt, welche SNPs in Introns bzw. Exons liegen und ob in den Gen-assoziierten SNPs mehrere pro Gen vorhanden sind.

Tabelle 3: Signifikant assoziierte SNPs in KH und axenischen Fliegen, die auf verschiedenen Futtern gehalten wurden. Von den gesamten signifikanten SNPs sind immer nur ein Teil tatsächlich Gen-assoziiert, die SNPs in intergenischen Regionen, werden in weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Anzahl SNPs	Axenisch GMH-	Axenisch	Axenisch HeM-	Konventionell	Konventionell
	Futter	GH-Futter	Futter	GH-Futter	HeM-Futter
Gesamt	1000	686	253	155	46
Gen-assoziiert	387	226	117	76	30

Von diesen Genen, in denen SNPs gefunden wurden, die mit dem Wachstum der axenischen DGRP Fliegen auf GMH-Futter und GH-Futter assoziiert sind, konnte ein Großteil in Gen-Ontologie Analysen (*flymine.org*) Prozessen der Systementwicklung, Entwicklung multizellulärer Organismen und anderen Entwicklungsprozessen zugeordnet werden. In den anderen Futterkonditionen und in konventionell gehaltenen Fliegen waren nur sehr wenige oder gar keine Gene diesen Gen-Ontologien zugeordnet.

Unter den Genen mit signifikant assoziierten SNPs waren bei den axenischen Tieren Gene wie *steppke* (CG11628) (alle Futter), welches an verschiedenen Signalwegen, wie dem Insulinsignalweg beteiligt ist (Fuss *et al.*, 2006) oder *short neuropeptide F receptor* (CG7395) (GMH- und GH-Futter), welches am ERK-Signalweg und so an der Regulation von Wachstum beteiligt ist und Futteraufnahme und Futtersuchverhalten reguliert (Lee *et al.*, 2008). Unter den Genen mit signifikant assoziierten SNPs der konventionell gehaltenen Tiere auf GH- und HeM-Futter waren verschiedene Geschmacksrezeptoren (*gustatory receptor 93a* und *66a* (CG13417 und CG7189)), die maßgeblich an der Futteraufnahme beteiligt sind (Apostolopoulou *et al.*, 2016; Ryuda *et al.*, 2018). Aber auch Gene die von Ecdyson, dem Häutungshormon, induziert werden, wie *ecdysone-induced protein 93 F* (CG18389) und *ecdysone-inducible gene E1* (CG32356) waren unter den Genen mit signifikant assoziierten SNPs. Diese sind an der Zelltot-Regulation während der Metamorphose (Ureña *et al.*, 2014) und der Neuordnung von Zellen in der Morphogenese beteiligt (Andres *et al.*, 1993).

Um letztendlich herauszufinden, welche Gene mit SNPs mit der Entwicklungsfähigkeit auf einem bestimmten Futter und der Präsens eines Darmmikrobioms zusammenhängen, wurden die signifikant assoziierten Gene miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass nur ein sehr kleiner Teil der Gene, sowohl in KH als auch in axenischen Fliegen, signifikant assoziiert war. Die Mehrheit war spezifisch für KH oder axenische Fliegen (Abb. 34). Unter diesen fünf Genen waren bei den KH und axenischen Fliegen, die sich auf Glucose-Hefe-Futter entwickeln konnten oder Wachstumsprobleme haben, *knot* (CG10197), ein Transkriptionsfaktor, der für die Muskelspezifikation und Kopfsegmentierung in Embryonen benötigt wird

58

und eine wichtige Rolle in den Lymphdrüsen spielt (Crozatier *et al.*, 1999). Außerdem Gene wie *nemo* (CG7892), das verschiedene Rollen in Entwicklungsprozessen spielt (Zeng and Verheyen, 2004), *capricious* (CG11282), das für einen Transmembranrezeptor codiert, der in der Morphogenese verschiedener Gewebe beteiligt ist (Krause *et al.*, 2006) und das Gen für die Phosphodiesterase 1c, die mit dem Paarungsverhalten von *Drosophila* assoziiert ist (Morton *et al.*, 2010).

Unter den fünf Genen mit SNPs, die mit einer Entwicklung auf HeM-Futter, unabhängig vom Mikrobiom, assoziiert sind, sind *seven up* (CG11502), welches im Fettkörper am Insulinsignalweg beteiligt ist (Musselman *et al.*, 2018), *fear-of-intimacy* (CG6817), dass für die Bildung von Muskeln in *Drosophila* benötigt wird (Carrasco-Rando *et al.*, 2016) und *sickie* (CG43720), dass axonales Wachstum reguliert, aber auch auf den IMD-Signalweg Einfluss nimmt (Abe *et al.*, 2014; Foley and O'Farrell, 2004).



Abb. 34: Gemeinsame und individuelle Gene, in denen SNPs liegen, die mit der Wachstumsfähigkeit der DGRP Linien auf den jeweiligen Futtern assoziiert sind. Da ein Großteil der SNPs jeweils nur mit konventionell gehaltenen (KH) oder axenischen Fliegen assoziiert ist, kann die Präsenz oder das Fehlen eines Mikrobioms als auschlaggebender Grund für die Wachstumsunterschiede angesehen werden.

Die Unterschiede in der Entwicklungsfähigkeit der einzelnen DGRP Linien und die GWAS haben gezeigt, dass sowohl der Genotyp der Fliegen, aber vor allem das Mikrobiom entscheidend dafür sind, ob die Fliegen unter bestimmten Umweltbedingungen überleben können. Um den Einfluss der Darmbakterien auf die Fliege im adulten Stadium zu analysieren, wurden vergleichende Tests verschiedener Wirtsmetabolite durchgeführt, die bereits in verschiedenen Studien zwischen KH und axenischen Fliegen unterschiedlich ausgeprägt waren (vergleiche Einleitung 1.2.3).

2.2.3.2 Einfluss des Darmmikrobioms auf den Metabolismus des Wirts

Neben den detektierten Entwicklungsunterschieden zwischen KH und axenischen Fliegen, wurde auch der Einfluss eines Darmmikrobioms auf den Metabolismus der Fliege analysiert. Eine genetische Kontribution des Wirts zu Unterschieden im Metabolismus der Fliege konnte bereits gezeigt werden (Jehrke *et al.*, 2018). Es ist aber auch denkbar, dass zusätzlich die Präsenz eines Darmmikrobiom einen direkten Einfluss auf den Metabolismus des Wirts hat, da z. B. andere oder mehr Nährstoffe aus der Nahrung der Fliege vom Mikrobiom zur Verfügung gestellt werden. Für die Untersuchung einer möglichst großen Bandbreite von Wildtypfliegen, wurden hier wieder die Linien des DGRPs verwendet. Um den Zusammenhang zwischen den Wachstumsproblemen der KH und axenischen Fliegen auf den verschiedenen Futtern zu analysieren, wurden die Fliegen auf Glucose-Maismehl-Hefe-Futter (GMH) angezogen und männliche Fliegen in einem Alter von sechs Tagen für verschiedene metabolische Messungen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die metabolischen Messungen (siehe Methoden 5.3) zeigten im Gehalt von Protein, Triacylglycerol (TAG), Glucose und Glykogen zwischen den einzelnen Fliegenlinien große Unterschiede (siehe Anhang 6.3). Es konnte bereits gezeigt werden, dass axenische sechs Tage alte Fliegen der Linie Canton-S einen höheren TAG- und Glucosegehalt aufwiesen, als Fliegen, die mit *Acetobacter tropicalis* reassoziiert wurden (Huang and Douglas, 2015). Jedoch Fliegen, die mit *Lactobacillus brevis* reassoziiert wurden, einen ähnlichen TAG-Gehalt aufwiesen. Auch Wong und Kollegen publizierten signifikant erhöhte TAG-Gehalte in Canton-S Fliegen (Wong *et al.*, 2014).

Zur besseren Übersicht wurden die Differenz der Metabolitwerte zwischen KH und axenischen Fliegen aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten ermittelt und die Mittelwerte in Abbildung 35 und 36 aufgetragen. Bei einem positiven Wert, zeigten die KH Fliegen einen höheren Metabolitgehalt, bei einem negativen Wert, waren die Metabolite in den KH Fliegen niedriger als in den axenischen. Auf der einen Seite sind bei den TAG-Messungen in einigen Linien so gut wie keine Unterschiede zwischen KH und axenischen Fliegen zu erkennen (z. B. Linie 375, 427). Es sind aber auch einige Linien vorhanden, die große Differenzen im TAG-Gehalt zeigen (z. B. 786, 859), wobei mehr axenische Fliegenlinien einen höheren TAG-Gehalt aufweisen als die KH Fliegen (Abb. 35 oben). Daher lassen sich hier nur schwer generelle Tendenzen zwischen den axenischen und KH Fliegen erkennen, in vielen Linien speichern die axenischen Fliegen jedoch mehr TAG, wie auch bereits zuvor publiziert. Der Unterschied des Proteingehalts ist zwischen den Linien sehr variabel, wodurch keine Tendenzen erkannt werden können (Abb. 35 unten).



Abb. 35: Unterschiede im TAG- (oben) und Proteingehalt (unten) von konventionell gehaltenen und axenischen DGRP Männchen (sechs Tage alt). Gezeigt werden die Differenzen im Metabolitgehalt zwischen KH und axenischen Fliegen. Bei einem positiven Wert ist der Metabolitgehalt in den KH Fliegen höher, bei einem negativen Wert ist der Gehalt niedriger als in den axenischen Linien. Die Werte sind Mittelwerte aus zwei biologisch unabhängigen Replikaten, in welchen jeweils Quadruplikate von je 8 Fliegen pro Linie und Kondition gemessen wurden.

Im Glucose- und Glykogengehalt konnten sowohl konventionell gehaltene Fliegenlinien mit höherem, als auch mit niedrigerem Glucose- und Glykogengehalt detektiert werden (Abb. 36). Es sind aber auch einige Linien zu erkennen, bei denen durchschnittlich kein Unterschied zwischen KH und axenischen Fliegen herrscht. Tendenziell haben mehr Fliegenlinien im konventionell gehaltenen Zustand höhere Glucose- und Glykogenwerte. Im Gesamtüberblick über die Metabolitunterschiede zwischen axenischen und KH Fliegen lässt sich in den Unterschieden im TAG-Gehalt eine Tendenz erkennen. Hier haben die meisten Linien im axenischen Zustand einen teils deutlich höheren TAG-Gehalt. Die anderen Metabolite scheinen durch das Fehlen eines Darmmikrobioms in unterschiedlichen Richtungen beeinflusst zu werden. Das Vorhandensein eines Mikrobioms scheint je nach Genotyp einen anderen Einfluss auf den Wirt zu haben.

61



Abb. 36: Unterschiede im Glucose- (oben) und Glykogengehalt (unten) zwischen konventionell gehaltenen und axenischen DGRP Männchen (sechs Tage alt). Gezeigt werden die Differenzen im Metabolitgehalt zwischen KH und axenischen Fliegen. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abb. 35.

Die Ergebnisse der metabolischen Messungen der DGRP Fliegen wurden außerdem in weiteren GWAS verwendet (siehe Methoden 5.7). In den GWAS konnten nur wenige mit den Metabolitunterschieden assoziierte SNPs identifiziert werden, die über der Signifikanzgrenze von 10⁻⁵ liegen (Abb. 37). Da sich bei den Messungen keine klaren Tendenzen in Bezug auf den Einfluss des Darmmikrobioms auf den Metabolismus herauskristallisiert hatten, waren auch nicht viele GWAS Assoziationen erwartet worden. In der GWAS mit den TAG-Differenzen konnten fünf signifikante SNPs identifiziert werden (Abb. 37 A), von denen zwei in intergenischen Bereichen lagen. Zwei weitere lagen in dem nicht weiter charakterisierten Gen CG1299, dem eine Endopeptidase-Aktivität zugeschrieben wird und ein SNP im Gen für das Protein Kinesin heavy chain 73, welches am endosomalen Transport während der Zellteilung von Neuroblasten beteiligt ist. Mit den Unterschieden im Proteingehalt wurden zehn SNPs identifiziert (Abb. 37 B), von denen zwei in intergenischen Bereichen lagen. Die anderen SNPs lagen in codierenden Bereichen von *off-track, cadherin 87A, homeobrain* und den uncharakterisierten Genen CG14834 und CG32547.

In der GWAS mit den Glucosemessungen wurden lediglich drei SNPs detektiert (Abb. 37 C), die in den codierenden DNA-Regionen von *Alan shepard, scribble* und *sex peptide* liegen. Bei der GWAS der Glykogenmessungen konnten keine signifikanten SNPs gefunden werden (Abb. 37 D) Insgesamt lag keiner der SNPs in einem codierenden DNA-Bereich, welcher mit z. B. direkten Funktionen im Metabolismus oder des Immunsystems in Zusammenhang steht.



Abb. 37: Manhattan-Plots der GWAS, welche die mit den Differenzen der Metabolitmessungen der KH und axenischen DGRP Fliegen assoziierten SNPs darstellt. Die Diagramme stellen die SNPs (graue und schwarze Punkte) auf den einzelnen Chromosomen von *Drosophila* (y-Achse) dar (X, 2L, 2R, 3L, 3R). Zur besseren Übersicht werden nur Assoziationen ab einem p-Wert von 10⁻³ gezeigt. (A) SNPs assoziiert mit Messungen der TAG-Menge pro adultem Männchen, (B) SNPs assoziiert mit Messungen der Proteinmenge pro adultem Männchen, (C) SNPs assoziiert mit Messungen der Glucosemenge pro adultem Männchen, (D) SNPs assoziiert mit Messungen der Glykogenmenge pro adultem Männchen. Der Grenzwert der signifikant assoziierten SNPs liegt bei 10⁻⁵ (blaue Linie).

Obwohl in den Metabolitmessungen unterschiedliche Einflüsse der Präsenz eines Darmmikrobioms erkannt werden konnten, wurden in den GWAS dennoch keine interessanten, signifikanten SNPs in den untersuchten DGRP Linien identifiziert. Da sich keine starken Tendenzen des Einfluss der Bakterien auf den Metabolismus herauskristallisierten, waren die Effekte kleiner als erwartet.

2.3 Untersuchungen von Wirt-Mikrobiom Interaktionen in Referenzfliegenlinien

Die Untersuchungen an den verschiedenen DGRP Linien haben gezeigt, dass ein Darmmikrobiom von unterschiedlich großer Bedeutung für den Wirt sein kann und dass ein Fehlen des Mikrobioms sich unterschiedlich auf die larvale Entwicklung und den Metabolismus auswirken kann. Außerdem haben die Sequenzierungen gezeigt, dass obwohl Tiere den selben Umweltbedingungen ausgesetzt sind, doch Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms bestehen. Um diese Unterschiede im
Darmmikrobiom von verschiedenen *Drosophila* Linien genauer zu untersuchen und gezielte Einflüsse auf das Darmmikrobiom nehmen zu können wie z. B. Co-Kultivierung zweier Linien unter den exakt gleichen Bedingungen, wurden weitere Experimente mit den häufig verwendeten Laborfliegenlinien Oregon-R und *white[-]* durchgeführt. Der Vorteil dieser Fliegen liegt unter anderem in den unterschiedlichen Augenfarben, wodurch die Tiere während einer Co-Kultivierung unterscheidbar sind (siehe Methoden 5.1.8 Abb. 65).

2.3.1 Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung unter Hefemangelbedingungen

Der Einfluss des Darmmikrobioms auf den Wirt spiegelt sich in vielen Aspekten wider. Dazu zählen Einflüsse auf das Immunsystem (Erkosar *et al.*, 2014; Ryu *et al.*, 2008; Yiu *et al.*, 2017), indem z. B. Gene des IMD-Signalwegs durch eine Assoziation mit Darmbakterien reguliert werden (Erkosar *et al.*, 2014), oder die Interaktion zwischen den Toll-like Rezeptoren (TLR) im Darm und dem Mikrobiom, welche die Immunhomöstase aufrecht erhält (Yiu *et al.*, 2017). Außerdem bewirkt ein gesundes Darmmikrobiom die Verdrängung von pathogenen Mikroorganismen (Sansone *et al.*, 2015), oder fördert auch die Entwicklung des Wirts unter mangelhaften Nahrungsbedingungen (Shin *et al.*, 2011; Storelli *et al.*, 2011) (siehe 2.2.3.1). Zunächst war die Entwicklungsfähigkeit von KH und axenischen DGRP Linien auf drei verschiedenen autoklavierbaren Futtern getestet worden, die zuvor in der Etablierung von axenischen Dauerkulturen verwendet wurden (siehe 2.2.3.1). Hier zeigte sich, dass sowohl KH als auch axenische Fliegen Entwicklungsschwierigkeiten mit mangelnden Nährstoffen haben.

Um daher den Einfluss eines natürlichen Darmmikrobioms auf die Entwicklung von Drosophila genauer zu untersuchen, wurden zwei typische Labor-Referenzstämme, Oregon-R und white[-] verwendet und nur die Menge an Hefe im Futter variiert. Embryonen beider Linien wurden zunächst dechorioniert und sterilisiert (siehe 2.1.1 und Methoden 5.1.3) und auf Glucose-Hefe-Futter mit Antibiotika gehalten. Adulte Fliegen wurden mittels PCR des 16S rRNA Gens auf ihre Sterilität überprüft (siehe 2.1.2 und Methoden 5.2.8) und in Dauerkulturen gehalten. Um anschließend konventionell gehaltene Fliegen (mit Darmmikrobiom) und die jeweiligen axenischen Fliegen in ihrer Entwicklung zu untersuchen, wurden diese auf axenisches Hefe-Futter mit Hefekonzentrationen von 2 % bis 0,1 % (siehe Material 4.9 Tabelle 16) gesetzt und nach 24stündiger Eiablage verworfen. Anschließend wurde die Anzahl der Puppen dokumentiert, die sich über die Zeit aus den axenischen und konventionell gehaltenen Embryonen entwickelten und anschließend zum Vergleich prozentual dargestellt (Abb. 38). Die Entwicklung konventionell gehaltener (KH) white[-] war durch die verschiedenen Hefekonzentrationen nur wenig beeinträchtigt. Die KH white[-] Tiere verpuppen sich auf allen Hefekonzentrationen innerhalb von fünf bis 13 Tagen, wobei die Entwicklung der Larven auf den niedrigen Konzentrationen etwas verzögert ist (Abb. 38 A). Im Vergleich zum 2 % Hefe-Futter waren auf 0,25 % und 0,1 % Hefe-Futter die ersten Puppen nach ca. acht bzw. neun Tagen zu sehen (Abb. 38 A). Im Vergleich dazu konnten bei den axenischen white[-] auf dem reichhaltigsten Futter (2 % Hefe) nach sieben und auf 0,25 % Hefe nach elf Tagen die ersten Puppen detektiert werden. Auf der niedrigsten Hefekonzentration von 0,1 % erreichten die axenischen Larven nicht das Puppenstadium und verstarben im Larvenstadium (Abb. 38 B).

Auf die Fliegen der Linie Oregon-R hatten die Futter mit geringeren Hefekonzentrationen einen deutlich stärkeren Einfluss, sowohl auf die KH, als auch auf die axenischen Tiere (Abb. 38 C und D). Bei KH Oregon-R bewirkte bereits eine mittlere Hefekonzentration von 1 % und 0,5 % eine Entwicklungsverzögerung (erste Puppen nach sieben bzw. neun Tagen), die auf 0,25 % deutlich stärker ausfiel (erste Puppen nach ca. 16 Tagen). Bei einer Konzentration von 0,1 % konnten sich die KH Oregon-R Larven, im Gegensatz zu *white[-]* Larven, nicht mehr verpuppen. Die drastischste Verzögerung war bei axenischen Oregon-R Larven zu sehen (Abb. 38 D). Bei einer Hefekonzentration von 0,5 % benötigten die Larven über 14 Tage um die ersten Puppen zu bilden, bei den niedrigeren Hefemengen haben sich über den Verlauf des Experiments keine Puppen entwickelt. Die Wachstumsunterschiede zwischen den axenischen *white[-]* und Oregon-R sind durch die prozentuale Auftragung deutlich zu erkennen (Abb. 38 B, D). Die Entwicklung von axenischen Oregon-R ist deutlich eingeschränkt im Vergleich zu axenischen *white[-]*.



Abb. 38: Entwicklung der Puppen von konventionell gehaltenen und axenischen *white[-]* und Oregon-R Fliegen unter Hefemangelbedingungen. Embryonen wurden auf Futter mit 2 % bis 0,1 % Hefe abgelegt und die Anzahl der Puppen über die Zeit dokumentiert. (A) Konventionell gehaltene *white[-]*, (B) axenische *white[-]*, (C) konventionell gehaltene Oregon-R und (D) axenische Oregon-R auf Futter mit verschiedenen Hefekonzentrationen. Repräsentatives Ergebnis aus drei biologisch unabhängigen Experimenten. Pro Kondition wurden fünf Futterröhrchen analysiert und die Zahl der Puppen gemittelt. Zur Normierung der Ergebnisse wurde die Gesamtzahl der Puppen am Ende des Experiments auf 100 % gesetzt. Bei axenischen *white[-]* auf 0,25 % Hefe konnten sich nur in einem Futterröhrchen Tiere entwickeln. Bei axenischen *white[-]* auf 0,1 % Hefefutter, KH Oregon-R auf 0,1 % Hefefutter und axenischen Oregon-R auf 0,25 % und 0,1 % Hefefutter entwickelten sich keine Puppen. Die Buchstaben repräsentieren die statistisch signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Hefekonzentrationen basierend auf einem Permutationstest (p≤0,05).

Zwischen den beiden Fliegenlinien sind deutliche Unterschiede in der Entwicklungszeit und der Abhängigkeit von einem Darmmikrobiom zu erkennen. Diese könnten durch eine mangelhafte Nährstoffversorgung der axenischen Larven hervorgerufen werden, da konventionell gehaltene Fliegen auf Mangelmedien zusätzliche Nährstoffe durch ihr Darmmikrobiom erhalten können. Daher wurden verschiedene Metabolite in KH und axenischen Larven und adulten Tieren untersucht.

2.3.2 Metabolische Unterschiede zwischen konventionell gehaltenen und axenischen Fliegen

Um einen Unterschied im Metabolismus von konventionell gehaltenen und axenischen Tieren zu untersuchen, wurden Larven und adulte Tiere auf autoklaviertem Glucose-Hefe-Futter (GH) (siehe Material 4.9 Tabelle 16) gehalten. Parentaltiere können Nährstoffe an ihre Nachkommen weitergeben und somit den Gehalt von z. B. Speichermetaboliten beeinflussen. Daher wurden alle Fliegen vor dem Experiment bereits für zwei Generationen auf dem gleichen Futter gehalten, um Auswirkungen von anderen Futtern auf den Metabolismus auszuschließen. Zusätzlich wurden axenische Fliegen aus den Dauerkulturen auf GH-Futter mit und ohne Antibiotika getestet, um den möglichen Einfluss von Antibiotika auf den Metabolismus des Wirts auszuschließen. Außerdem wurden Fliegen aus frisch sterilisierten Embryonen verwendet, damit eine mögliche Adaptation der axenischen Dauerkulturen untersucht werden kann.

2.3.2.1 Metabolische Messungen in konventionell gehaltenen und axenischen Larven

In drei unabhängigen Experimenten wurden Quadruplikate der L3 Larven gesammelt und anschließend anhand biochemischer Assays (siehe Methoden 5.3) der TAG-, Protein-, Glucose- und Glykogengehalt der Tiere bestimmt. Die metabolischen Messungen der Larven lassen sowohl im TAG- als auch im Proteingehalt (nicht gezeigt) keine Unterschiede zwischen KH und axenischen Tieren erkennen, auch gibt es keine großen Unterschiede im Vergleich von *white[-]* und Oregon-R Larven (Abb. 39 A). Auch im Glucosegehalt konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 39 B). In frisch sterilisierten *white[-]* Larven ist der Glykogengehalt signifikant erniedrigt. Bei Oregon-R Larven konnte nur eine Reduktion des Glykogengehalts gemessen werden, die in den frisch sterilisierten Tieren am stärksten ausfiel (Abb. 39 C).



Abb. 39: Quantifizierung verschiedener Metabolite aus white[-] oder Oregon-R L3 Larvenextrakten. Die Tiere wurden entweder konventionell, in axenischen Dauerkulturen mit und ohne Antibiotika oder frisch axenisch auf Glucose-Hefe-Futter gehalten. Gemessen wurden der TAG-, Glucose- und Glykogengehalt pro Tier. In jedem der drei biologisch unabhängigen Experimente wurden jeweils Quadruplikate aus acht Tieren gesammelt und die Mittelwerte der Experimente gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Es wurde für jeder Metabolit eine einseitige ANOVA durchgeführt. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes wurde ein multipler, korrigierter paarweise t-Test durchgeführt. $p \ge 0,05$ nicht signifikant (ns), p <0,05. Es wurden jeweils die axenischen Kondition mit den KH Fliegen verglichen.

2.3.2.2 Metabolische Messungen in konventionell gehaltenen und axenischen adulten Fliegen

In sechs Tage alten adulten *white[-]* und Oregon-R Fliegen sind mehr Unterschiede zwischen KH und axenischen Tieren zu erkennen. So ist in adulten *white[-]* Weibchen, die sich aus frisch axenischen Embryonen entwickelt hatten, eine leichte Erhöhung des TAG-Gehalts zu sehen (Abb. 40 D). Auch in Oregon-R Männchen aus frisch sterilisierten Embryonen ist der TAG-Gehalt erhöht (Abb. 40 E). Im Proteingehalt waren keine Unterschiede zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Der Glucosegehalt ist hingegen nur in *white[-]* Weibchen und Männchen signifikant reduziert, die auf Futter mit Antibiotikazusatz gehalten wurden, was einen Einfluss der Antibiotika nahelegt (Abb. 40 F, G). Oregon-R Fliegen sind hiervon jedoch ausgenommen. Der Glykogengehalt ist in allen axenischen *white[-]* Weibchen signifikant reduziert, was eine geschlechtsspezifische Reaktion auf das Fehlen des Mikrobioms darstellt (Abb. 40 H). Im Vergleich der beiden untersuchten Fliegenlinien, ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Oregon-R Weibchen, als auch Männchen einen deutlich höheren TAG-Gehalt haben als die jeweiligen *white[-]* Fliegen. Diese Unterschiede waren im Larvenstadium noch nicht vorhanden. Interessanterweise ist in weiblichen Oregon-R Tieren aber kein

Unterschied zu den männlichen *white[-]* zu erkennen. Die Messungen der verschiedenen Metabolite haben leichte Unterschiede zwischen axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen aufgezeigt. Diese waren aber nur in jeweils einer Fliegenlinie zu erkennen, was eine Verallgemeinerung der Ergebnisse schwierig macht. In axenischen Oregon-R könnte eine verlängerte Entwicklung durch das Fehlen eines Darmmikrobioms dazu führen, dass die Larven mehr Zeit haben größere Mengen an Speichermetaboliten anzulegen. Dies war allerdings nur in den frisch sterilisierten Tieren zu erkennen.



Abb. 40: Metabolische Messungen aus konventionell gehaltenen sechs Tage alten Fliegen, axenischen sechs Tage alten Fliegen aus Dauerkulturen mit und ohne Antibiotika und frisch axenischen sechs Tag alten Fliegen von *white[-]* und Oregon-R, die sich auf Glucose-Hefe-Futter entwickelten. Gemessen wurden der TAG-, Glucose- und Glykogengehalt pro Tier. Es wurden jeweils acht Tiere in Quadruplikaten gesammelt und in jedem der drei biologisch unabhängigen Experimente gemessen und die Mittelwerte gebildet.Weitere Durchführung und Statistik siehe Abb. 39. p \geq 0,05 nicht signifikant (ns), p < 0,05 *, p < 0,01 ***, p < 0,001 *** und p < 0,0001 ****.

2.3.3 Lokomotorische Aktivität von axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen

Neben metabolischen Unterschieden zwischen axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen, wurde auch die motorische Aktivität der Fliegen untersucht. Schretter und Kollegen haben gezeigt, dass die lokomotorische Aktivität (Gehgeschwindigkeit und tägliche Aktivität) axenischer Oregon-R Weibchen im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren erhöht ist (Schretter *et al.*, 2018). Hier wurden jedoch weibliche Jungfrauen ab einem Alter von sieben Tagen getestet und die Messungen außerdem nur für zwei Tage durchgeführt. In der vorliegenden Studie wurden die Unterschiede zwischen axenischen und KH Oregon-R und *white[-]* (Weibchen und Männchen) ab einem Alter von einem Tag (frisch geschlüpft) über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht. Außerdem wurden während der Messungen ein normaler Tag-/Nachtrhythmus durch 12-stündige Hell- und Dunkelphasen simuliert. Hier ist zu erkennen, dass sich die Fliegen bei Licht deutlich mehr bewegen als während der Dunkelphase. Es gibt aber auch Schwankungen innerhalb der Hellphase, sowohl in KH als auch axenischen Tieren (Abb. 41).



Abb. 41: Aktivitätsmonitor-Messungen von KH und axenischen Oregon-R und *white[-]* Weibchen (oben) und Männchen (unten) über die Zeit. Die Abbildung stellt die durchschnittliche Aktivität von KH und axenischen Oregon-R Weibchen und Männchen, sowie KH und axenischen *white[-]* Weibchen und Männchen ab einem Alter von einem Tag über einen Zeitraum von sieben Tagen dar. Pro Kondition wurden jeweils 32 einzeln in Röhrchen gehaltene Fliegen untersucht. Die Dunkelphase (12 h) ist in schwarz, die Hellphase (12 h) in grau dargestellt. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis aus drei biologisch unabhängigen Replikaten dar.

In der Boxplot-Darstellung der Gesamtunterbrechungen der Lichtschranke über sieben Tage, ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität der axenischen Oregon-R Weibchen und auch Männchen im Vergleich zu den konventionell gehaltenen Oregon-R Tieren signifikant erhöht ist (Abb. 42), was mit den publizierten Daten übereinstimmt. Dabei unterbrachen die axenischen Oregon-R Tiere die Lichtschranke fast doppelt so häufig, wie die Fliegen mit einem Mikrobiom (Ø=10.112 Mal gegenüber Ø=5.461 Mal bei den Weibchen und Ø=7.356 gegenüber Ø=3.898 Mal bei den Männchen).



Abb. 42: Einfluss eines Darmmikrobioms auf die Gesamtaktivität von konventionell gehaltenen und axenischen Oregon-R und *white[-]* Weibchen (oben) und Männchen (unten) über einen Zeitraum von sieben Tagen. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis aus drei biologisch unabhängigen Replikaten dar. Die Signifikanz wurde durch einen zweiseitigen, unabhängigen t-Test bestimmt (p < 0.05 *, p < 0.01 ** und <math>p < 0.001 ***).

Im Vergleich dazu, sind zwischen KH und axenischen *white[-]* Weibchen und Männchen keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität zu erkennen (Abb. 42). Bei den *white[-]* Weibchen lag die durchschnittliche Unterbrechung der Lichtschranke bei 6.040 (KH) und 6.043 (axenisch) und bei den Männchen bei 6.345 (KH) und 5.620 (axenisch). Auch diese Ergebnisse zeigen wieder, dass Oregon-R Fliegen deutlich stärker, wie in der Entwicklung (siehe 2.3.1 Abb. 38) von einem Fehlen des Mikrobioms beeinflusst werden und hier wieder Unterschiede im Genotyp der Fliege ausschlaggebend für die unterschiedliche Reaktion der Fliegen sein könnten.

2.3.4 Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung

Da die beiden Fliegenlinien *white[-]* und Oregon-R in Bezug auf die Entwicklungsfähigkeit und -dauer, sowie den Metabolismus unterschiedlich auf das Fehlen ihres Mikrobioms reagieren (siehe 2.3.1 und 2.3.2), wurden die Darmmikrobiome der beiden Linien hinsichtlich ihrer Komposition und Abundanz bestimmter Bakterienarten genauer untersucht. Dafür wurde aus Larven und adulten Fliegen genomische Gesamt-DNA gewonnen (siehe Methoden 5.2.1 und 2.1.4) und mittels qPCR und speziesspezifischen Primern (siehe 2.1.5 und Material 4.5 Tabelle 8) analysiert. Dabei wurden fünf der am häufigsten bei *Drosophila* Fliegen (Laborhaltung) detektierten Bakterienarten nachgewiesen. Für eine relative Quantifizierung der Bakterienmessungen wurde zusätzlich die in den Proben enthaltene *Drosophila* DNA-Menge gemessen, indem das *deformed* (*dfd*) Gen von *Drosophila* amplifiziert wurde. Die Amplifikation dieses Gens ergibt in allen qPCR Analysen des *Drosophila* Mikrobioms einen reproduzierbaren Ct-Wert zwischen 19 und 20 und ist somit gut geeignet, um die Bakterienmenge zu quantifizieren (siehe 2.1.6 Abb. 9). Die Ct-Werte der einzelnen Bakterienmessungen wurden dann von dem *dfd* Ct-Wert subtrahiert (Early *et al.*, 2017) (siehe 2.1.6 Abb. 10).

Zunächst wurde das Darmmikrobiom von wandernden L3 Larven analysiert. Die Messungen ergaben aus sechs unabhängigen Wiederholungen, dass Oregon-R Larven signifikant mehr *A. tropicalis*-DNA enthielten als *white[-]* Larven, aber deutlich weniger *L. fructivorans*-DNA (Abb. 43). *Acetobacter pasteurianus*-DNA war in beiden Linien am stärksten vertreten und auch die anderen Bakterienspezies waren in ähnlichem Maße vorhanden.



Abb. 43: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von wandernden Oregon-R und *white[-]* L3 Larven. Es wurden speziesspezifische Primer für den Nachweis von *Acetobacter pasteurianus, A. tropicalis, Lactobacillus brevis, L. fructivorans* und *L. plantarum* verwendet. Die Ct-Werte der einzelnen Spezies wurden auf das *Drosophila* Gen *deformed* (*dfd*) normiert (siehe 2.1.6). Gezeigt sind die Mittelwerte aus sechs biologisch unabhängigen Replikaten. Signifikanzniveaus des zweiseitigen, unabhängigen t-Tests: $p \ge 0,05$ nicht signifikant, p < 0,05 *, p < 0,01 ** und p < 0,001 ***. Verglichen wurden die Werte von Oregon-R gegen *white[-]* Larven.

Die Mikrobiomzusammensetzung wurde des Weiteren auch in sechs Tage alten Männchen und Weibchen gemessen. Dafür wurde DNA aus acht Tieren pro Probe extrahiert (siehe Methoden 5.2.1). In Oregon-R und *white[-]* Proben konnte nicht in jedem Experiment DNA von *A. tropicalis* und *L. plantarum* nachgewiesen werden, da sich die DNA Mengen am unteren Detektionslimit der qPCR befanden (Abb. 44). Die anderen drei gemessenen Bakterienspezies konnten sowohl in Oregon-R und *white[-]* Weibchen und Männchen detektiert werden.

Dabei wurde in den *white[-]* Fliegen eine signifikant höhere Abundanz von *L. brevis* und *L. fructivorans* festgestellt. Außerdem war in allen Experimenten ein niedrigerer Bakteriengehalt in den Oregon-R Fliegen nachweisbar.



Abb. 44: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von weiblichen und männlichen sechs Tage alten adulten Oregon-R und *white[-]* Fliegen. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abb. 43. Verglichen wurden jeweils die Werte von Oregon-R Weibchen gegen *white[-]* Weibchen und Oregon-R Männchen gegen *white[-]* Männchen. *A. tropicalis* und *L. plantarum* konnten nicht in allen Wiederholungen detektiert werden.

Um Gründe für die Unterschiede im Bakteriengehalt der beiden Fliegenlinien zu finden, wurden Futteraufnahme-Experimente durchgeführt (siehe Methoden 5.1.6). Dafür wurden männliche *white[-]* und Oregon-R Fliegen für 30 min auf Standardfutter gehalten, das mit 200 µg/mL Fluorescein versetzt war. Als Positivkontrolle wurden Fliegen verwendet, die über Nacht auf Agarose gehungert wurden. Die Fliegen wurden anschließend homogenisiert und das von den Fliegen aufgenommene Fluorescein im

Plattenlesegerät gemessen. Über eine Standardreihe wurde die Fluoresceinmenge pro Fliege quantifiziert. Gehungerte *white[-]* Fliegen nahmen über den Versuchszeitraum von 30 min signifikant mehr Futter auf, jedoch bestand zwischen den ungehungerten Fliegen kein Unterschied (Abb. 45). Die Annahme, dass *white[-]* auf Grund höherer Futteraufnahmen auch gleichzeitig mehr Bakterien aufnimmt, konnte somit hier nicht bestätigt werden.



Abb. 45: Gemessene Fluoresceinmenge, die von white[-] und Oregon-R Männchen über das Futter aufgenommen wurde. Die Positivkontrolle wurde vor dem Experiment über Nacht auf Agarose gehungert. Oregon-R Männchen und white{-] Männchen nahmen in der gemessenen Zeit ungefähr gleich viel Futter auf. Signifikanzniveaus des zweiseitig, ungepaarten t-Tests: $p \ge 0,05$ nicht signifikant (n.s.), p<0,01 **.

In der Bachelorarbeit von Sarah Annemarie Görigk (Institut für mathematische Modellierung biologischer Systeme, HHU Düsseldorf, 2016) wurde im Gegenzug die Faeces-Anzahl der Fliegen, pro Zeit ermittelt (siehe Methoden 5.1.7), da Fliegen so ihr Darmmikrobiom in die Umwelt abgeben und dies ebenfalls einen unterschiedlichen Bakteriengehalt zwischen den Linien erklären könnte (Görigk, 2016). Abbildung 46 zeigt jedoch, dass die Anzahl der gezählten Faeces fast identisch zwischen den beiden Linien ist. Somit kann auch hier nicht der Unterschied im Bakteriengehalt zwischen *white[-]* und Oregon-R über die vermehrte Ausscheidung von Bakterien erklärt werden.



Abb. 46: Faeces-Anzahl pro männlicher Fliege von white[-] und Oregon-R über 24 Stunden. Die Messungen ergaben keine Unterschiede in der Faeces-Anzahl. Entnommen und modifiziert aus Bachelorarbeit Sarah Annemarie Görigk (Görigk, 2016). Signifikanzniveaus des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests: $p \ge 0,05$ nicht signifikant (n.s.).

2.3.5 Austausch des Darmmikrobioms zwischen den Referenzfliegenlinien

Da in vorherigen Versuchen Unterschiede im Darmmikrobiom von *white[-]* und Oregon-R festgestellt wurden, aber keine direkten Indizien, die erklären könnten wodurch diese Unterschiede zustande kommen, wurde versucht das Darmmikrobiom zwischen den zwei Linien auszutauschen (siehe Methode 5.1.8 Abb. 65). So sollte überprüft werden, ob nicht nur äußerliche Einflüsse das Darmmikrobiom formen, sondern auch der Wirt selbst eventuell die Komposition verändern kann. Zunächst wurden 30 männliche Oregon-R oder *white[-]* Fliegen für eine Woche auf autoklaviertem Glucose-Hefe-Futter gehalten, um das Futter mit den Bakterien aus ihren Faeces zu inokulieren. Anschließend wurden eine Mischung aus axenischen Oregon-R und *white[-]* Embryonen in diese, mit entweder Oregon-R oder *white[-]* Mikrobiom inokulierten Futterröhrchen gegeben, damit sie sich unter dem Einfluss der jeweiligen Mikrobiome entwickeln können. Durch das Mischen der Fliegenlinien und die simultane Entwicklung der Larven mit dem selben Mikrobiom konnten die Mikrobiomkompositionen der Linien direkt miteinander verglichen werden. Die Abundanz der einzelnen Darmbakterien wurde anschließend im Larvenstadium und in adulten Tieren mittels qPCR analysiert.

2.3.5.1 Mikrobiomaustausch in Larven

Um den Mikrobiomaustausch in L3 Larven zu untersuchen, mussten die Larven zunächst äußerlich differenzierbar gemacht werden. Dies wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Anna Härle (Institut für mathematische Modellierung biologischer Systeme, HHU Düsseldorf) durchgeführt (Härle, 2018). Hierzu wurden jeweils *white[-]* und Oregon-R Fliegen mit zwei Fliegenlinien mit fluoreszent-markierten Balanzierchromosomen gekreuzt, deren Fluoreszenz im Larvenstadium sichtbar war (siehe Methoden 5.1.8). Axenische Embryonen dieser Kreuzungen wurden auf zuvor von männlichen *white[-]* oder Oregon-R Fliegen inokuliertem Futter ausgebracht und im L3 Larvenstadium nach RFP- oder GFP-Fluoreszenz sortiert. Aus diesen Larven wurde anschließend DNA präpariert und die verschiedenen Bakterienspezies im Mikrobiom der Larven mittels qPCR analysiert. In Abbildung 47 werden die gemessenen relativen Abundanzen der Darmbakterien dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Larven, die aus dem gleichen Futterröhrchen kamen, also dieselben Bakterien aus den Faeces aufnehmen konnten, eine sehr ähnliche Bakterienkomposition aufweisen (links mit *white[-]* Mikrobiom und rechts mit Oregon-R Mikrobiom).



Abb. 47: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von wandernden L3 Larven von fluoreszent-gekreuzten Oregon-R und *white[-]* nach einem Austausch der Darmbakterien. Es wurden speziesspezifische Primer für den Nachweis von *Acetobacter tropicalis, A. pasteurianus, Lactobacillus brevis, L. fructivorans* und *L. plantarum* verwendet. Die Ct-Werte der einzelnen Spezies wurden auf das *Drosophila* Gen *deformed* (*dfd*) normiert. Die Embryonen von Oregon-R und *white[-]* wurden zusammen auf Futter gegeben, welches mit Faeces von *white[-]* (weiße Ovale) oder von Oregon-R (rote Ovale) inokuliert wurde. Die daraus resultierenden Larven wurden anhand ihrer Fluoreszenz unterschieden. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei biologisch unabhängigen Experimenten.

Um die Ergebnisse aller biologischen Wiederholungen des Mikrobiomaustauschs in Larven zu vereinen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit allen Ergebnissen der qPCRs der Bakterien, die in Larven detektiert wurden, durchgeführt. Die PCA zeigte eine klare Trennung der Larven, die auf einem Oregon-R oder *white[-]* Mikrobiom aufgewachsen sind (Abb. 48), was die Ergebnisse aus Abb. 47 bestätigt. Die qPCR Ergebnisse der einzelnen Wiederholungen (Ct *dfd* – Ct Bakterium) sind im Anhang 6.4 Abb. 70 dargestellt und unterstreichen ebenfalls den Transfer eines Darmmikrobioms von einer Fliegenlinie zur anderen. Da die Tiere während der Verpuppung und Entwicklung zum adulten Tier jedoch keine weitere Nahrung

aufnehmen, in welcher Zeit das Darmmikrobiom doch vom Wirt beeinflusst werden könnte, wurde der gleiche Versuch mit *white[-]* und Oregon-R Fliegen wiederholt.



Abb. 48: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Bakterien-spezifischen qPCR-Ergebnisse des Mikrobiomaustauschs in Larven aus drei biologisch unabhängigen Wiederholungen. Die Ellipsen zeigen das 95 % Konfidenzintervall um den Schwerpunkt, der durch den Kreis oder das Dreieck repräsentiert wird. Hauptkomponenten PC1 und PC2. Die Larven, die auf dem *white[-]* Mikrobiom aufwuchsen, sind klar von den Larven, die auf dem Oregon-R Mikrobiom aufwuchsen, getrennt.

2.3.5.2 Mikrobiomaustausch in adulten Tieren

Eine Kreuzung von Fliegen mit fluoreszent-markierten Balanzierchromosomen zur Unterscheidung der *white[-]* und Oregon-R Tiere war hier nicht nötig, da die adulten Tiere anhand ihrer Augenfarbe unterschieden werden konnten (*white[-]* weiß, Oregon-R rot). Nach dem Schlüpfen konnten die Tiere so nach Genotyp getrennt werden und auf neue Futter verteilt werden. So sollte überprüft werden, ob die Fliegen, wenn sie nicht mehr die Möglichkeit besitzen, das "Fremd-Mikrobiom" (paralog) über das Futter zu erneuern, die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen und möglicherweise in den Originalzustand versetzen können.

Hierzu wurden zum einen die frisch geschlüpften Tiere für qPCR Analysen des Darmmikrobioms eingefroren und zum anderen die nach Linien getrennten Fliegen auf neues, autoklaviertes Futter gegeben und weitere zehn Tage separat gealtert (siehe Methode 5.1.8 Abb. 65). Auch das Darmmikrobiom dieser Fliegen wurden anschließend mittels qPCR analysiert. Die Ergebnisse dieser qPCR der verschiedenen Darmbakterien zeigten zunächst ein ähnliches Bild, wie bei den wandernden L3 Larven (Abb. 49). Die frisch geschlüpften Fliegen, die sich in einem Futterröhrchen entwickelt hatten, haben ein sehr ähnliches Darmmikrobiom. Dabei unterscheiden sich weiterhin die Darmmikrobiome von *white[-]* und Oregon-R, mit welchen die axenischen Embryonen inokuliert wurden (Abb. 49). In den zehn Tage alten Fliegen hat sich das Darmmikrobiom leicht verändert. So ist in den Fliegen (Oregon-R und *white[-]*), die sich auf dem *white[-]*-Mikrobiom entwickelt haben, eine deutlich niedrigere Zahl an *L. fructivorans* und eine höhere Abundanz von *A. tropicalis* zu erkennen. Insgesamt ist die Mikrobiomzusammensetzung in den beiden Fliegenlinien, die das gleiche Mikrobiom aufgenommen hatten, aber sehr ähnlich geblieben. Das Darmmikrobiom der Fliegen, die sich auf dem Oregon-R-Mikrobiom entwickelt haben, hat sich mit dem Altern der Fliegen nicht viel verändert. Auch hier haben die beiden Fliegenlinien, obwohl sie bereits zehn Tage in getrennten Röhrchen gehalten wurden und somit kein Mikrobiomaustausch stattfinden kann, eine sehr ähnliche Mikrobiomkomposition beibehalten.



Abb. 49: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von weiblichen und männlichen adulten Fliegen von Oregon-R und *white[-]* nach einem Austausch der Darmbakterien in einem Alter von einem und zehn Tagen. Die Embryonen von Oregon-R und *white[-]* wurden zusammen auf mit Faeces-inokuliertes Futter gegeben und die daraus resultierenden Fliegen anhand ihrer Augenfarbe sortiert (*white[-]* weiß, Oregon-R rot). Weitere Durchführung siehe Abb. 49. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus vier biologisch unabhängigen Experimenten.

Um ebenfalls die Ergebnisse aller unabhängigen qPCRs der adulten Tiere miteinander zu vergleichen, wurde erneut eine PCA durchgeführt. Diese zeigte, dass im Vergleich der vier Wiederholungen, keine so klare Trennung in Bezug auf die Übertragbarkeit des Mikrobioms zu erkennen ist. Zum Teil ließ sich bei den einen Tag alten Fliegen erkennen, dass sich die Mikrobiom-Zusammensetzungen der Fliegen, die sich auf dem gleichen Futter entwickelt hatten, ähnelten (Abb. 50 links). Jedoch zeigten die zehn Tage alten Fliegen, die nach dem Schlüpfen nach Genotyp getrennt worden waren, keine so eindeutige Trennung der implantierten Mikrobiome wie in den Larven (Abb. 50 rechts). Die qPCR Ergebnisse der einzelnen Wiederholungen (Ct dfd – Ct Bakterium) sind im Anhang 6.4 Abb. 70 dargestellt und zeigen durch die Farbkodierung, dass die Mikrobiom-Zusammensetzung in adulten Tieren nicht mehr im vollen Maße dem ursprünglich implantierten Mikrobiom entspricht.

Die qPCR-Messungen und PCA-Analysen zeigen, dass während der larvalen Entwicklung, die Mikrobiomkomposition hauptsächlich der der Umwelt entspricht, welche über die Nahrung aufgenommen wird. Im adulten Stadium und während des Alterns, ist diese Komposition der konsumierten Bakterien zwischen den Genotypen der Fliegenlinien nicht mehr einheitlich und scheint zusätzlichen anderen Faktoren ausgesetzt zu sein.



Abb. 50: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Bakterien-spezifischen qPCR-Ergebnisse des Mikrobiomaustauschs in einen Tag (links) und zehn Tage (rechts) alten männlichen Fliegen aus vier Wiederholungen. Die Ellipsen zeigen das 95 % Konfidenzintervall um den Schwerpunkt, der durch den Kreis oder das Dreieck repräsentiert wird. Hauptkomponenten PC1 und PC2. Die Proben sind in den adulten Tieren nicht mehr deutlich anhand des inokulierenden Mikrobioms zu unterscheiden.

2.3.5.3 Einfluss eines Mikrobiomaustauschs auf das Immunsystem der Fliege

Da in vorherigen Experimenten ein unterschiedlicher Bakteriengehalt in *white[-]* und Oregon-R Fliegen detektiert wurde (siehe 2.3.4 Abb. 44) wäre eine unterschiedliche Aktivität des Immunsystems denkbar, die den Gehalt der Bakterien im Darm unterschiedlich reguliert. Dazu wurde die Expression von drei verschiedenen antimikrobiellen Peptiden (AMPs) zwischen *white[-]* und Oregon-R verglichen, die im Immunsystem von *Drosophila* als Reaktion auf eine Infektion mit gram-negativen, wie auch gram-positiven Bakterien und Pilzen produziert werden (Buchon *et al.*, 2014; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Lemaitre *et al.*, 1997; Valanne *et al.*, 2011), aber auch regulierend auf das symbiotische Darmmikrobiom wirken (Erkosar *et al.*, 2013). Da im Mikrobiomaustausch die Komposition des "fremden" Darmmikrobioms von den Fliegen nicht vollständig zurück zur ursprünglichen Komposition verändert wurde (siehe Abb. 47-50), ist dennoch eine Reaktion des Immunsystems denkbar und dass der Organismus so auf das fremde Darmmikrobiom (autolog) mit denen, die ein fremdes Darmmikrobiom (paralog) aufgenommen haben, verglichen.

Für die Messungen wurden ganze, männliche, unverpaarte Fliegen des Mikrobiomaustauschs verwendet und RNA aus diesen einen und zehn Tage alten Tieren extrahiert (siehe Methoden 5.2.6). Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert (siehe Methoden 5.2.7 und 5.2.9). Zunächst wurde die Expression der AMPs zwischen *white[-]* und Oregon-R Männchen verglichen, die jeweils das autologe Mikrobiom über die Faeces aufgenommen haben, d. h. Fliegen, die in getrennten Röhrchen das jeweilige, eigene Mikrobiom aufgenommen haben. So konnten die basalen Unterschiede in der Expression der einzelnen AMPs zwischen *white[-]* und Oregon-R Männchen verglichen werden. Dabei war im Mittel der vier unabhängigen Experimente kein Expressionsunterschied von *attacin B* und *diptericin* in einen Tag alten männlichen Fliegen zu erkennen (Abb. 51). Die Expression von *cecropin A2* war dagegen in männlichen Oregon-R im Vergleich zu *white[-]* Männchen signifikant erhöht. In zehn Tage alten männlichen Oregon-R war die *attacin B* Expression der *white[-]* Expression sehr ähnlich. Die *diptericin* Expression war dagegen in Oregon-R niedriger und die *cecropin A2* Expression doppelt so hoch wie in zehn Tage alten *white[-]* Fliegen.





Anschließend wurde die AMP-Expression von Fliegen, die das paraloge Mikrobiom in der Entwicklung aufgenommen hatten, mit den Fliegen aus dem gleichen Röhrchen verglichen, die ihr autologes Mikrobiom aufgenommen hatten. Die einen Tag alten Oregon-R Fliegen mit *white[-]* Mikrobiom zeigten keine andere Expression der drei AMPs als die Oregon-R, die das Oregon-R Mikrobiom aufgenommen hatten (Abb. 52). *Cecropin A2* war in einen Tag alten Oregon-R ebenfalls leicht höher exprimiert. In zehn Tage alten Oregon-R, die sich zuvor auf dem *white[-]*-Mikrobiom entwickelt hatten, war die Expression der AMPs in ihrer Tendenz ähnlich zu den basalen Unterschieden zwischen Oregon-R und *white[-]* Fliegen. Allerdings war die Expression der drei AMPs, in den Oregon-R, die das fremde *white[-]* Mikrobiom aufgenommen hatten, insgesamt höher. Die *attacin B* Expression war im Vergleich zu den basalen Expression erhöht und die *diptericin* Expression war nicht wie in den Oregon-R Fliegen mit ihrem eigenen Mikrobiom niedriger als in *white[-]*, sondern hatte die ungefähr gleiche Expression. Die *cecropin A2* Expression war im Vergleich zu den basalen Messungen ebenfalls erhöht. Somit scheint das Immunsystem von Oregon-R über die Zeit doch auf die Reassoziation mit einem "fremden" Mikrobiom zu reagieren, auch wenn die Produktion der AMPs keinen augenscheinlichen Effekt auf die Mikrobiomkomposition in den Fliegen hat (vergleiche Abb. 50).



Abb. 52: Auswirkungen eines Darmmikrobiom-Austauschs mit einem *white[-]* Mikrobiom auf das Immunsystem von einen und zehn Tage alten Oregon-R männlichen, verpaarten Fliegen im Vergleich zu *white[-]* männlichen, verpaarten Fliegen, die im selben Fliegenröhrchen mit ihrem autologen Darmmikrobiom reassoziiert wurden. Das Diagramm zeigt die gemittelten Ergebnisse aus vier biologisch unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveaus des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests im Vergleich von Oregon-R mit *white[-]*: p> 0,05 n.s., p < 0,05 *, p < 0,01 ** und p < 0,001 ***.

2.3.6 Untersuchungen zur Persistenz des Mikrobioms

2.3.6.1 Veränderungen des Bakteriengehalts

Die Unterschiede im Darmmikrobiom zwischen Oregon-R und *white[-]* konnten nicht durch eine unterschiedliche Futteraufnahmemenge oder die Anzahl der abgelegten Faeces erklärt werden. Eine erhöhte Futteraufnahmemenge von *white[-]* hätte den höheren Bakteriengehalt erklären können, sowie eine höhere Faeces-Anzahl bei Oregon-R Fliegen einen geringeren Bakteriengehalt begründen könnte (siehe 2.3.4 Abb. 45, 46). Auch anhand eines erzwungenen Mikrobiomaustauschs (siehe 2.3.5) konnte nicht gezeigt werden, dass der Wirt die Komposition oder Menge der Darmbakterien aktiv beeinflussen kann, obwohl eine leichte Aktivierung des Immunsystems in Oregon-R Fliegen zu erkennen war.

Daher muss ein anderer Mechanismus den Bakteriengehalt in den Fliegen unterschiedlich beeinflussen. Möglicherweise ist die Menge der abgelegten Faeces gleich, aber der Gehalt der ausgeschiedenen Bakterien unterscheidet sich zwischen den beiden Fliegenlinien. Der höhere Bakteriengehalt in *white[-]* Fliegen könnte daraus resultieren, dass das Darmmikrobiom von *white[-]* eher in der Lage ist im Darm des Wirts zu persistieren. Die vorherrschende Meinung ist zurzeit, dass *Drosophila* kein stabil assoziiertes und persistierendes Mikrobiom besitzt, sondern die Darmbakterien transient über die Nahrung aufgenommen und über die Faeces abgegeben werden (Blum *et al.*, 2013). Sobald diese Erneuerung des Darmmikrobioms nicht mehr möglich ist, sinkt die Zahl der Bakterien (Blum *et al.*, 2013). Um eine mögliche Persistenz näher zu charakterisieren, wurde die Stabilität des Darmmikrobioms anhand des Bakteriengehalt der Fliegen über mehrere Wochen dokumentiert. Blum und Kollegen publizierten, dass Fliegen, die nach dem Schlüpfen täglich auf neues Futter gesetzt wurden, kein richtiges Darmmikrobiom aufbauen können (Blum *et al.*,

2013). Um dagegen zu testen, ob ein sich zuvor normal etabliertes Darmmikrobiom im Wirt persistieren kann und es hier auch linienspezifische Unterschiede gibt, die den Unterschied im Bakteriengehalt erklären können, wurden männliche *white[-]* und Oregon-R Fliegen verwendet. Die Tiere wurden bis zu einem Alter von sechs Tagen unter konventionellen Bedingungen gehalten, um ein normales Darmmikrobiom zu etablieren. Anschließend wurden die Fliegen zwei Mal pro Tag auf neues Futter transferiert, um eine erneute Aufnahme von Bakterien aus dem Futter und den Faeces zu unterbinden.

Zum Vergleich der Entwicklung der Bakterienzahlen wurden zusätzlich männliche Fliegen gehalten, die über die Zeit des Experiments auf dem selben Futter blieben und somit ihr Darmmikrobiom konstant auffrischen konnten. Um den Bakteriengehalt der Fliegen zu quantifizieren und auch die Mikrobiomkomposition zu analysieren, wurden alle drei bis vier Tage Fliegen homogenisiert und auf zwei verschiedenen Selektivmedien ausplattiert (MRS- und ACE-Agarplatten) (siehe Methoden 5.1.9). Die zu Beginn des Experiments gemessenen koloniebildenden Einheiten (KBE) in sechs Tage alten Fliegen wurden zu Darstellungszwecken auf 100 % gesetzt und alle weiteren gemessenen KBE darauf normiert. Die gewachsenen Kolonien auf den verschiedenen Agarplatten zeigten, dass die Kontrollfliegen, welche im selben Futterröhrchen verblieben, über den Zeitraum von 23 Tagen eine relativ konstante Anzahl von Bakterien im Darm besitzen (Abb. 53). Wie erwartet reduzierte sich die Anzahl der Bakterien in den regelmäßig transferierten white[-] Männchen innerhalb von ungefähr sieben Tagen auf MRS- und ACE-Agarplatten. Überraschenderweise nahmen die KBE aber ab einem Alter von 13 Tagen wieder zu und erreichten bis zum Ende des Experiments ähnliche Zahlen wie in den Kontrollfliegen (Abb. 53). In Oregon-R Fliegen hat der regelmäßige Transfer einen deutlich stärkeren Einfluss, was aufgrund des in den qPCR Analysen ermittelten, niedrigeren Bakteriengehalts erwartet wurde (siehe 2.3.4 Abb. 44). Die Fliegen verloren innerhalb von drei Tagen einen signifikanten Teil ihres Mikrobioms, wohingegen die Bakterienzahl in den Kontrollfliegen relativ konstant blieb. Aber auch hier war bis zum Ende des Experiments zu sehen, dass die Bakterienzahl sich der der Kontrollfliegen wieder annäherte.

Insgesamt zeigten die Wiederholungen dieses Experiments, wie auch zuvor die qPCR-Analysen des Darmmikrobioms, dass Oregon-R Fliegen einen deutlich niedrigeren Bakteriengehalt aufwiesen als *white[-]* Fliegen (Abb. 54). Die MRS- und ACE-Agarplatten, auf welchen die Fliegen in einem Alter von sechs Tagen ausplattiert wurden, zeigten niedrigere KBE in Oregon-R Fliegen, was zusätzlich die Hypothese unterstreicht, dass verschiedene Fliegenlinien trotz gleicher Umweltbedingungen einen unterschiedlichen Bakteriengehalt besitzen.

81



----white[-] Kontrolle ----white[-] transferiert

----Oregon-R Kontrolle ----Oregon-R transferiert

Abb. 53: Veränderungen des Bakteriengehalts im Darmmikrobiom von *white[-]* (links) und Oregon-R Männchen (rechts). Ab einem Alter von sechs Tagen wurden ein Teil der Fliegen zwei Mal pro Tag auf neues Futter transferiert, der andere Teil verblieb als Kontrolle auf dem selben Futter. Alle drei bis vier Tage wurden Fliegen homogenisiert und in Duplikaten auf MRS- und ACE-Agarplatten ausplattiert. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden pro Fliege ermittelt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte aus vier (MRS) und drei (ACE) biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Asterisken markieren signifikante Unterschiede in KBE zwischen Kontrolle und transferierten Fliegen im zweiseitigen, ungepaarten t-Test (p < 0,05 *).



Abb. 54: Übersicht über die koloniebildenden Einheiten (KBE) in den einzelnen Wiederholungen des Ausplattierens von sechs Tage alten white[-] und Oregon-R Männchen auf MRS- und ACE-Agarplatten. In den drei Wiederholungen des Experiments, zeigten die männlichen Oregon-R Fliegen einen geringeren Bakteriengehalt als die white[-] Fliegen.

Um auch einen möglichen morphologischen und einen damit einhergehenden bakteriellen Unterschied im Darmmikrobiom zwischen nicht transferierten und transferierten Fliegen zu dokumentieren, wurden Bilder der Agarplatten von den verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen (Abb. 55 und 56) und zusätzliche 16S rRNA-Sequenzierungen der gewachsenen Kolonien durchgeführt. Es lassen sich auf den Agarplatten der ausplattierten *white[-]* und Oregon-R Fliegen Unterschiede in der Morphologie der gewachsenen Kolonien erkennen. Vor allem auf den Agarplatten, auf welchen die transferierten Oregon-R Fliegen ausplattiert wurden, ist die Zellzahl im Vergleich zu den Agarplatten der nicht transferierten Fliegen, deutlich reduziert. Aber auch der Anstieg der Zellzahlen im höheren Alter der transferierten Fliegen ist auf den Agarplatten zu erkennen. Die Quantifizierung der Bakterienzahlen in den Fliegen weist darauf hin, dass das Mikrobiom von *Drosophila* zumindest in Teilen im Darm verbleiben kann, auch wenn es nicht durch Aufnahme von außen erneuert werden kann.



Abb. 55: Übersicht über die Morphologie und Anzahl der Bakterienkolonien der ausplattierten männlichen *white[-]* und Oregon-R Fliegen auf MRS-Agarplatten. Es wurden sechs Tage alte Männchen und anschließend zwei Mal pro Tag transferierte und nicht transferierte männliche Fliegen (Kontrolle) mit ansteigendem Alter homogenisiert und ausplattiert. Das Alter der ausplattierten Fliegen ist rechts gezeigt. Erkennbar sind sowohl Unterschiede des Darmmikrobioms in der Koloniezahl als auch in der Morphologie zwischen den nicht transferierten und transferierten Fliegen.



Abb. 56: Übersicht über die Morphologie und Anzahl der Bakterienkolonien der ausplattierten männlichen *white[-]* und Oregon-R Fliegen auf ACE-Agarplatten. Die Abbildung hat den gleichen Aufbau und die gleiche Durchführung wie Abb. 55. Erkennbar sind sowohl Unterschiede des Darmmikrobioms in der Koloniezahl als auch in der Morphologie zwischen den nicht transferierten und transferierten Fliegen.

2.3.6.2 Veränderungen der Mikrobiomzusammensetzung

Der regelmäßige Transfer der Fliegen auf neues Futter hatte im Vergleich zu den nicht transferierten Fliegen einen deutlichen Einfluss auf die Zahl der Bakterien im Darm (siehe Abb. 53). Außerdem lässt die veränderte Koloniemorphologie (siehe Abb. 55 56) auf zusätzliche und eine Veränderung der Mikrobiomzusammensetzung schließen. Es ist denkbar, dass ein solches, von äußeren Einflüssen geformtes Mikrobiom seine entwicklungsfördernden Eigenschaften für den Wirt verloren hat oder aber nur die tatsächlich vorteilhaften Bakterien im Darm der Fliege persistieren konnten, um so die Entwicklung der nächsten Generation zu sichern. Aus diesem Grund, wurden die auf den Agarplatten gewachsenen Bakterien isoliert und als Glycerinkulturen für Reassoziationsversuche eingefroren. Um die genaue

84

Zusammensetzung dieses im Labor kultivierbaren Mikrobioms zu analysieren, wurde die Komposition der Bakterien mittels 16S rRNA-Sequenzierung untersucht.

Es wurden die isolierten Mikrobiome von Zeitpunkten gewählt, an denen die größten Unterschiede in der Komposition erwartet wurden, da sich das Mikrobiom sowohl über den zeitlichen Verlauf durch das Altern der Fliegen, aber auch durch das regelmäßige Umsetzen der Tiere auf frisches Futter verändern kann. Dies waren als Startpunkt Bakterien aus sechs Tage alte Fliegen, aus neun (Oregon-R) bzw. 13 Tage (*white[-]*) alten nicht transferierten Fliegen und als Endpunkt Bakterien aus 23 Tage alten nicht transferierten Tieren, um die Veränderungen des Mikrobioms durch das Altern der Tiere zu analysieren. Außerdem wurde das Mikrobiom aus neun bzw. 13 Tage alten transferierten Fliegen analysiert, da hier die Bakterienzahl zwischen den transferierten und nicht transferierten Tieren am stärksten differierte. Für Oregon-R wurden statt den Bakterien aus 13 Tage alten Fliegen, die isolierten Bakterien von neun Tage alten Fliegen verwendet, da hier der Unterschied am größten war. Zuletzt wurden die Bakterien aus 23 Tage transferierten Fliegen sequenziert, um zu untersuchen, ob durch den Wiederanstieg der Bakterienzahl (siehe Abb. 53) sich auch die Mikrobiomkomposition wieder angleicht. Pro Kondition wurden jeweils die Kolonien von zwei Agarplatten abgewaschen und die DNA daraus isoliert, um Duplikate zu sequenzieren. Aus diesen Proben wurde das 16S rRNA Gen mittels *Next Generation Sequencing* im *Genomics & Transcriptomics Labor* (Prof. Karl Köhrer) an der HHU analysiert.

Der Shannon-Index (*engl. Shannon alpha diversity index*) untersucht, welche Diversität oder Komplexität eine Probe besitzt. Dabei wird die Anzahl der Arten, als auch deren Abundanz mit einbezogen (Spellerberg and Fedor, 2003). Die Analysen zeigten, dass die Duplikate in der Sequenzierung eine ähnliche Komplexität der Bakterienkomposition aufwiesen, es jedoch Unterschiede zwischen den Proben gab (Abb. 57 A). So zeigten die verschiedenen Proben aus Oregon-R und *white[-]* eine ähnliche Komplexität (Abb.57 B), die bakterielle Komposition war auf den ACE-Agarplatten jedoch weniger komplex als die Bakterienkomposition, die auf den MRS-Platten zu finden waren (Abb. 57 C, D).





Um genauer auf die Unterschiede zwischen den Mikrobiomen der nicht transferierten und transferierten Fliegen einzugehen, wurden die Sequenzierergebnisse bis zum Genus- und Spezieslevel analysiert. Auf den MRS-Platten, befanden sich wie erwartet hauptsächlich *Lactobacillus*-Spezies, aber auch einige *Acetobacter* waren in der Lage auf diesen Platten zu wachsen (Abb. 58). In den *white[-]* Proben ist *L. brevis* das am häufigsten vertretene Bakterium und macht in der Probe von sechs Tage alten Fliegen ca. 90 % aus (Abb. 58 oben). In sechs Tage alten Oregon-R sind es nur ca. 30 % (Abb. 58 unten).



Abb. 58: Bakterielle Komposition der isolierten Mikrobiome aus männlichen *white[-]* und Oregon-R Fliegen verschiedenen Alters, die anhand *Next Generation Sequencing* des 16S rRNA Gens detektiert wurde. Es wurden Bakterien, die auf MRS-Agarplatten gewachsen waren, sequenziert. Dabei wurden die Mikrobiome von sechs, 13 und 23 Tage alten *white[-]* und sechs, neun und 23 Tagen alten Oregon-R Fliegen analysiert. Es wurde vor allem der Unterschied zwischen nicht transferierten und häufig transferierten Fliegen und ihrem Mikrobiom untersucht. Pro Zeitpunkt wurden Duplikate der MRS-Platten abgewaschen und daraus DNA extrahiert und als Duplikate sequenziert. Gezeigt ist die gemittelte prozentuale Abundanz der 96,5 % häufigsten Bakterien.

Die Sequenzierung zeigte, dass sich die Mikrobiome der nicht transferierten und der transferierten Fliegen über den Verlauf der Zeit unterschiedlich verändern. In den nicht transferierten *white[-]* Fliegen verringert sich der Anteil an *L. brevis*, dagegen konnten *L. plantarum* bzw. *L. pantheris* detektiert werden. In den 23 Tage alten nicht transferierten *white[-]* Fliegen erhöhte sich der Anteil an *Acetobacter*-Spezies (*A. indonesiensis* und *A. tropicalis*) deutlich auf fast 50 %. In den regelmäßig transferierten *white[-]* Fliegen wurden ebenfalls *A. indonesiensis* detektiert, die größte Zunahme lag allerdings bei *L. plantarum* und die Hauptspezies war weiterhin *L. brevis*.

In den Proben, die aus den verschiedenen Oregon-R Konditionen extrahiert wurden, ist die Vielfalt der gewachsenen Bakterien größer als in *white[-]*. Auf den MRS-Platten, auf denen sechs Tage alten Oregon-R ausplattiert wurden, waren *L. brevis*, *L. plantarum* und *L. pantheris* fast gleich stark vertreten (Abb. 58). In den nicht transferierten Oregon-R Fliegen wurden über die Zeit *Acetobacter*-Spezies prominenter (über 50 % nach neun Tagen und 25 % nach 23 Tagen) und *L. fructivorans* und *L. homohiochii* waren neben *L. brevis* vertreten. Dagegen blieb die Prozentzahl der *Acetobacter* in den transferierten Oregon-R Fliegen niedriger und *L. plantarum* und *L. brevis* waren die am stärksten vertretenen Arten. Die Sequenzierungen der Bakterien, von den MRS-Platten zeigen, dass sich die Mikrobiomkomposition der isolierten Bakterien bis auf die Abundanz von *L. brevis* deutlich zwischen den nicht transferierten und transferierten Fliegen unterscheidet.

Die Komposition, der auf den ACE-Agarplatten gewachsenen Bakterien, ist weniger komplex. In den sechs Tage alten Fliegen konnten die meisten Bakterienspezies detektiert werden, wobei *Acetobacter*-Spezies deutlich überwiegen (Abb. 59). Aus nicht transferierten *white[-]* und Oregon-R Männchen konnte nach 13 bzw. neun Tagen hauptsächlich *Acetobacter pasteurianus* isoliert werden. In den transferierten Fliegen konnte dagegen nur *A. indonesiensis* detektiert werden. Nach 23 Tagen ist jedoch zwischen den nicht transferierten und transferierten Fliegen im Hinblick auf die Bakterien, die auf ACE-Agar wachsen konnten, kein Unterschied mehr zu erkennen. Alle Proben enthielten 90 % oder mehr *A. indonesiensis*, was aufgrund der großen Abundanz von *A. pasteurianus* in den 13 und neun Tage alten nicht transferierten *white[-]* und Oregon-R überraschend war.

Der Vergleich der Komposition der Bakterien von den MRS- und ACE-Agarplatten deutet darauf hin, dass der regelmäßige Transfer der Fliegen einen unterschiedlichen Einfluss auf Acetobacteraceae und Lactobacilli hat, wobei sich die Abundanz der Acetobacteraceae früher ändert als die der Lactobacilli und dementsprechend auch wieder früher von der Perturbation erholen kann (vergleiche Abb. 58 und 59). Die Sequenzierungen der isolierten Darmbakterien zeigten ähnliche Kompositionen zu den Mikrobiomsequenzierungen aus ganzen Fliegen der DGRP Linien (siehe 2.2.1 Abb. 25). Auch hier waren A. indonesiensis, A. pasteurianus, L. brevis und L. plantarum die Hauptspezies, die detektiert wurden. Dies zeigt, dass auf den MRS- und ACE-Selektivmedien ein Großteil des natürlichen Darmmikrobioms von Drosophila kultivierbar ist und für Reassoziationen axenischer Tiere verwendet werden kann. Im Vergleich zu den Ergebnissen der qPCR Analysen des Darmmikrobioms von white[-] und Oregon-R Fliegen (siehe 2.3.4 Abb. 43 und 44) sind ebenfalls die gleichen bakteriellen Spezies vorhanden, wobei in der qPCR Analyse die Abundanz von beispielsweise A. indonesiensis oder L. pantheris nicht getestet wurde und dadurch die verhältnismäßigen Abundanzen verschoben sind. Auch ist denkbar, dass durch die Kultivierung der Darmbakterien auf den Selektivmedien bestimmte Spezies angereicht wurden und sich die Abundanzen so ebenfalls beispielsweise in den verschiedenen Lactobacillus-Arten verschieben.



Abb. 59: Bakterielle Komposition der isolierten Mikrobiome aus männlichen *white[-]* und Oregon-R Fliegen verschiedenen Alters, die anhand *Next Generation Sequencing* des 16S rRNA Gens detektiert wurden. Es wurden Bakterien, die sich auf ACE-Agarplatten entwickelt hatten, sequenziert. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abbildung 58.

2.3.6.3 Einfluss auf das Immunsystem der Fliege

Die Ergebnisse des *Next Generation Sequencing* der isolierten Bakterien aus den unterschiedlich alten und verschieden behandelten männlichen Fliegen hat gezeigt, dass das regelmäßige Umsetzen der Fliegen einen Einfluss auf das Darmmikrobiom, sowohl in der Zahl als auch in der Komposition hatte. Jedoch konnte sich die Zahl der Darmbakterien über die Zeit wieder stabilisieren und erhöhen. Auch die Bakterienkomposition änderte sich zumindest im Hinblick auf die Bakterien, die auf ACE-Platten gewachsen waren, bis zu einem Alter von 23 Tagen nicht mehr. Die Sequenzierungen der Mikrobiome, die von den MRS-Platten isoliert

wurden, zeigten, dass in den nicht transferierten Fliegen im Alter die Menge an Acetobacter zunahm, wohingegen in den transferierten Fliegen hauptsächlich Lactobacilli detektiert wurden. Daher wurde im Anschluss getestet, ob die deutliche Abnahme und anschließende Zunahme der Bakterienzahl, als auch die Änderungen im Darmmikrobiom einen Einfluss auf das Immunsystem des Wirts haben oder das Immunsystem möglicherweise unterschiedlich reagiert.

Aus diesem Grund wurde aus nicht transferierten und transferierten Fliegen zu den wichtigsten Zeitpunkten, an welchen die größten Unterschiede im Bakteriengehalt vorlagen (siehe Abb. 53), RNA extrahiert (siehe Methoden 5.2.6) und die Genexpression von vier antimikrobiellen Peptiden (AMPs) (Primer siehe Material 4.5 Tabelle 10) mittels qPCR analysiert (siehe Methoden 5.2.9). Die AMP-Expression wurde von männlichen Fliegen aus drei biologisch unabhängigen Experimenten analysiert und anschließend gemittelt. Zunächst wurde die Genexpression über den zeitlichen Verlauf des Experiments analysiert und die AMPs in 13 und 23 Tage alten white[-] Fliegen mit der Expression in sechs Tage alten Fliegen verglichen (Abb. 60 A, C). In nicht transferierten white[-] ist die Expression von drei der vier getesteten AMPs im Alter von 13 Tagen hoch reguliert. Die Expression von attacin B und cecropin A2 ist nach 13 Tagen erhöht, ist aber durch die Bildung des Mittelwerts insgesamt nicht signifikant (Abb. 60 A). Diptericin und drosomycin wurden in den drei biologischen Replikaten nur sehr wenig bis nicht reguliert. In den 23 Tage alten nicht transferierten Fliegen, sind dagegen alle AMPs herunterreguliert. Hier konnte jedoch nur ein Ansatz von Fliegen getestet werden, da in den Wiederholungen der Analyse des Bakteriengehalts, die nicht transferierten white[-] Männchen starben, bevor sie ein Alter von 23 Tagen erreichten. In den transferierten Fliegen ist dagegen keine starke Expressionsveränderung im Alter von 13 Tagen oder 23 Tagen zu erkennen (Abb. 60 C).

In Oregon-R wurde in den nicht transferierten neun Tage alten Fliegen ein massiver Anstieg der *attacin B* und *diptericin* Expression detektiert, auch die *cecropin A2* Expression war deutlich erhöht, wobei diese aufgrund der Schwankungen in den biologischen Replikaten nicht signifikant waren. Nach 23 Tagen ist diese Erhöhung wieder abgeschwächt, wobei bei *attacin B* und *diptericin* weiterhin eine Expressionserhöhung zu erkennen ist (Abb. 60 B). Dagegen ist in den transferierten Oregon-R so gut wie keine Expressionsänderung der AMPs zu erkennen (Abb. 60 D).

Diese Daten weisen darauf hin, dass das Immunsystem im Laufe des Alterns der Fliegen je Genotyp unterschiedlich reagiert und die Expression einiger AMPs hochreguliert werden kann, im Alter dann jedoch wieder abschwächt. Interessanterweise gibt es in den regelmäßig transferierten Fliegen keinerlei Expressionsänderung. Möglicherweise ist durch den von außen induzierten Verlust der Bakterienzahl in transferierten neun Tage alten Oregon-R und 13 Tage alten *white[-]* Männchen eine Induktion des Immunsystems nicht nötig, da ein übermäßiges Wachstum des Darmmikrobioms nicht weiter eingedämmt werden muss.



Abb. 60: Expressionsanalysen der antimikrobiellen Peptide, *attacin B, diptericin, cecropin A2* und *drosomycin*. Es wurden die Expressionsänderungen in nicht transferierten und transferierten *white[-]* (13 und 23 Tage) und Oregon-R (neun und 23 Tage) im Vergleich zu sechs Tage alten Fliegen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus drei biologisch unabhängigen Replikaten. Nur die Ergebnisse der 23 Tage alten nicht transferierten *white[-]* sind Unikate, da in den Wiederholungen, die Fliegen nicht bis zu einem Alter von 23 Tagen auf dem selben Futter überlebt haben. Die Signifikanzen der einzelnen AMPs wurden jeweils zu der Expression in sechs Tage alten Fliegen verglichen. Signifikanzniveaus des zweiseitig, ungepaarten t-Tests: p> 0,05 n.s., p < 0,05 *, p < 0,01 ** und p < 0,001 ***.

Neben der zeitlichen Veränderung der AMP-Expressionen von sechs bis 23 Tage alten Fliegen, wurden auch die Expressionen der AMPs zwischen den transferierten Fliegen mit den jeweiligen nicht transferierten Fliegen des gleichen Alters verglichen (Abb. 61). In den transferierten 13 Tage alten *white[-]* ist keine große Expressionsänderung im Vergleich zu den nicht transferierten Kontrollen des gleichen Alters zu erkennen. Lediglich *attacin B* ist leicht herunterreguliert. Dagegen ist in 23 Tage alten *white[-]* Tieren die *cecropin A2* und *drosomycin* Expression leicht erhöht, was bisher aber auch nur in einem Experiment detektiert werden konnte, da in weiteren Wiederholungen, die nicht transferierten *white[-]* bevor sie 23 Tage alt waren, verstarben. In transferierten neun Tage alten und 23 Tage alten Oregon-R ist die Expression aller AMPs in dieser Betrachtungsweise nur leicht reduziert oder nicht anders reguliert als die Kontrollen (Abb. 61). Dieser Vergleich der Expressionen der AMPs zwischen den transferierten und nicht transferierten Fliegen zeigt, dass der häufige Transfer und der damit einhergehende Verlust der Darmbakterien bei Tag 13 bzw. Tag 9, keinen starken Einfluss auf das Immunsystem hat. Eine leichte Reduktion ist zu erkennen. Auch nach 23 Tagen, wo in beiden Fliegenlinien die Bakterienzahl wieder angestiegen war (siehe Abb. 53), konnte keine starke Expressionsveränderung detektiert werden.



2.3.6.4 Detektion von Darmbakterien in Drosophila

Abb. 61: Expressionsanalysen der antimikrobiellen Peptide, attacin B, diptericin, cecropin A2 und drosomycin. Es wurden die Expressionsänderungen in transferierten white[-] (13 und 23 Tage) und Oregon-R (neun und 23 Tage) im Vergleich zu den jeweils gleich alten, nicht transferierten Fliegen analysiert. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abb. 60. Die Expressionsänderungen gegenüber den nicht transferierten, gleich alten white[-] bzw. Oregon-R waren bis auf die Expression von drosomycin in neun Tage alten transferierten Oregon-R und von attacin B in 23 Tage alten transferierten Oregon-R, nicht signifikant.

Durch das Ausplattieren der nicht transferierten und transferierten Fliegen und die 16S rRNA Sequenzierung der isolierten Bakterien, konnten bereits Erkenntnisse über die Veränderung der Bakterienzahl sowie die bakterielle Zusammensetzung der isolierten Darmmikrobiome gemacht werden. Interessant ist jedoch auch die Lokalisation der Bakterien im Darm der Fliegen zu untersuchen, um mögliche Nischen der persistierenden Bakterien zu detektieren, die während des regelmäßigen Umsetzens auf neues Futter im Darm verbleiben. Dazu wurden Oregon-R Männchen wie zuvor (siehe 2.3.6.1) ab einem Alter von sechs Tagen entweder als Kontrollen auf dem selben Futter belassen oder zwei Mal am Tag in neue Futterröhrchen transferiert. Hier wurden ausschließlich Oregon-R Männchen getestet, da der Unterschied im Bakteriengehalt von transferierten und nicht transferierten white[-] Männchen weniger markant war (siehe Abb. 53). Zunächst wurde ein Teil der sechs Tage alten Oregon-R Männchen zwei Mal pro Tag auf neues Futter gesetzt und ein Teil auf dem gleichen Futter belassen. Da der Unterschied im Bakteriengehalt bei Oregon-R nach drei Tagen (neun Tage alte Fliegen) am stärksten war, wurden hier Därme aus Fliegen beider Konditionen präpariert, mit Carnoy's Solution fixiert und mit dem DNA-Farbstoff ToPro1 gefärbt und auf Objektträgern in Prolong Gold antifade reagent eingebettet (siehe Methoden 5.4.1). Die Därme wurden mit einem LSM780 Konfokalmikroskop untersucht. Zuvor wurde die Effizienz des DNA-Farbstoffes ToPro1 an Bakteriensuspensionen verschiedener Drosophila Darmbakterien und E. coli getestet (siehe Anhang 6.5 Abb. 71).



Abb. 62 (vorherige Seite): Vergleich von Därmen von nicht transferierten und transferierten neun Tage alten männlichen Oregon-R Fliegen. Die Abbildung zeigt repräsentative Beispiele der untersuchten Därme pro Kondition. Es wurden neun Därme der transferierten und acht Därme der nicht transferierten Därme mikroskopiert und analysiert. Es wurde eine Färbung mit dem DNA-Farbstoff ToPro1 durchgeführt. Im Lumen des Darms von den nicht transferierten Fliegen sind zahlreiche Bakterien des Darmmikrobioms anhand der DNA-Färbung mit ToPro1 zu erkennen (i). In den Därmen der transferierten Fliegen sind nur vereinzelte Bakterien zu erkennen (ii). Die Übersichtsaufnahme wurde an einem LSM780 Konfokalmikroskop mit einem 10x Luftobjektiv aufgenommen. Die Nahaufnahmen der verschiedenen Darmabschnitte wurden mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv aufgenommen. Die orangen Linien zu den Nahaufnahmen zeigen die Präsenz von Bakterien an.

Die Därme von nicht transferierten neun Tage alten Oregon-R beinhalteten große Mengen an Bakterien entlang der anterioren-posterioren Achse (Abb. 62 rechts) mit einer starken Anreicherung im mittleren Mitteldarm (Abb. 62 und 63). Die Därme der transferierten Fliegen enthielten deutlich weniger Bakterien (Abb. 62 links), was den Befund der stark unterschiedlichen koloniebildenden Einheiten auf den Agarplatten entspricht (Abb. 53, 55 und 56). Es wurden einzelne Bakterien über die gesamte Länge des Darms der transferierten Fliegen detektiert (Detailaufnahmen Abb. 62 links und 63) und nicht in einem bestimmten Abschnitt des Darms, was gegen eine bestimmte Nische spricht, in welcher die Bakterien in den Därmen der transferierten Fliegen persistieren.

Die Menge der Bakterien in den einzelnen Abschnitten des Darms wurden zusätzlich mit Hilfe des CellProfiler Software Pakets quantifiziert (McQuin *et al.*, 2018). So konnten die Fluoreszenzsignale der gefärbten Bakterien in den Einzelaufnahmen der Därme quantifiziert werden und einem der vier Darmabschnitte (Kropf und Proventrikulus, anteriorer Mitteldarm, mittlerer Mitteldarm, posteriorer Mitteldarm und Enddarm) zugeordnet werden. Besonders viele Bakterien konnten so im mittleren Mitteldarm der nicht transferierten Fliegen detektiert werden (Abb. 63), was mit den visuellen Analysen der Därme am Konfokalmikroskop übereinstimmte (Abb. 62). Dagegen konnten im mittleren Mitteldarm der transferierten neun Tage alten Oregon-R Fliegen signifikant weniger Bakterien detektiert werden. Aber auch in dieser *in silico* Analyse der Lokalisation der Bakterien konnte keine spezielle Nische ausgemacht werden, in welcher die Bakterien im Darm der transferierten Fliegen persistieren.



Abb. 63: Anzahl der Bakterien pro Darmabschnitt in nicht transferierten und transferierten neun Tage alten Oregon-R Männchen. Die Bakterienzahl wurde durch Bildsegmentierung bestimmt und die Graphen geben die Zahlen von acht Därmen der nicht transferierten und neun Därmen der transferierten Fliegen wieder. Statistische Unterschiede zwischen den Bakterienzahlen in nicht transferierten und transferierten Fliegen wurden durch einen nichtparametrischen Wilcoxon-Test untersucht und die p-Werte in der Abbildung angegeben. Im mittleren Mitteldarm war ein signifikanter Unterschied in der Bakterienzahl detektierbar.

2.3.7 Reassoziationen von Fliegenlinien mit verschiedenen Mikrobiomen

Zahlreiche Studien verwenden die Methode der Reassoziation von axenischen Fliegen mit einem definierten Darmmikrobiom, um die Auswirkungen dieser Bakterien auf die Wirtsphysiologie, die Entwicklung oder das Immunsystem zu analysieren (vergleiche Einleitung 1.2.3 und 1.2.4). Dieser funktionale Test des Darmmikrobioms wurde hier ebenfalls verwendet, um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Mikrobiome, die durch die Perturbation der Fliegen durch regelmäßiges Umsetzen entstanden sind (siehe 2.3.6.2 Abb. 58 und 59), einen unterschiedlichen Wachstumsvorteil für axenische Tiere erbringen können. Dafür wurden die isolierten Bakterien verwendet, die im Rahmen der Untersuchungen des Bakteriengehalts auf den MRS- und ACE-Agarplatten gewachsen waren, von den Platten abgewaschen und in Glycerinkulturen konserviert wurden (siehe 2.3.6). Die Sequenzierungen der auf den Selektivmedien isolierten Bakterien legen nahe, dass sich die *Lactobacilli* und *Acetobacter* im Darmmikrobiom in ihrer Abundanz mit dem Altern der Fliegen unterschiedlich verändern, aber auch

unterschiedlich auf eine von außen wirkende Perturbation reagieren (siehe 2.3.6.2). Diese Veränderungen in der Mikrobiomkomposition könnten auch einen Einfluss auf den wachstumsfördernden Effekt der Darmbakterien haben. Zwei Szenarien sind denkbar: Zum einen könnte das Darmmikrobiom durch das regelmäßige Umsetzen so gestört sein, dass die wichtigen Spezies des Mikrobioms verringert sind oder wachstumsfördernde Stoffe nicht mehr vorhanden sind. Zum anderen, könnten aber genau diese wichtigen Spezies während der Pertubation im Darm persistieren und so in einer "Stresssituation" die Entwicklungsvorteile für den Wirt aufrechterhalten. Um dies zu untersuchen wurden jeweils axenische white[-] und Oregon-R Embryonen mit den Mikrobiomen von sechs Tage alten white[-] oder Oregon-R Männchen, die auf MRS- und ACE-Agarplatten gewachsen waren, reassoziiert. Außerdem wurden axenische Embryonen auch mit Mikrobiomen von 23 Tage alten Fliegen, die nicht transferiert und mit Mikrobiomen aus 23 Tage alten Fliegen, die transferiert wurden, reassoziiert (siehe Methoden 5.1.10). Die reassoziierten Embryonen wurden unter Hefemangel (0,25 % Hefe-Futter) (siehe Material 4.9 Tabelle 16) gehalten und die Entwicklung von Puppen über die Zeit dokumentiert. Es wurde ein 0,25 % Hefe-Futter gewählt, damit der positive Einfluss eines Mikrobioms unter limitierten Nährstoffbedingungen untersucht werden konnte. Da nicht bekannt ist, welche Menge von Bakterien einen wachstumsfördernden Effekt auf die axenischen Tiere hat, wurden zwei verschiedene Mengen zu den axenischen Embryonen gegeben, um die Auswirkungen unterschiedlicher bakterieller Zellzahlen auf die Entwicklung der Fliegen zu analysieren (100 µL OD₆₀₀=1 und 100 µL OD₆₀₀=25). Möglicherweise besteht zwischen der Anzahl der Bakterien und dem entwicklungsfördernden Effekt eines Darmmikrobioms für den Wirt eine Dosisabhängigkeit. Zusätzlich wurden als Negativkontrollen auch das Wachstum von Embryonen, die nicht mit Bakterien reassoziiert wurden, analysiert. Hier wurden Embryonen verwendet, die nur von den Apfelsaftagarplatten gewaschen wurden und axenische Embryonen, die vollständig sterilisiert wurden (vergleiche 2.1.1). Als Positivkontrolle wurden axenische Embryonen untersucht, die auf Futter ausgebracht wurden, welches zuvor von 30 männlichen Fliegen unterschiedlichen Alters mit ihren Faeces inokuliert wurde ("Prä-Inokulation"). Diese Kondition diente der Kontrolle, dass eine Reassoziation der axenischen Larven mit einem Mikrobiom über das Futter bzw. die Futteraufnahme möglich ist und ein so aufgenommenes Mikrobiom den Tieren einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu den axenischen Larven bietet.

In den einzelnen Experimenten (MRS-Reassoziation und ACE-Reassoziation) zeigte sich, dass Embryonen die nur von den Apfelsaftagarplatten gewaschen wurden ("Embryowash") und Embryonen, die vollständig axenisch sind, unterschiedlich stark in ihrer Entwicklung verlangsamt sind (Abb. 64). Jedoch ist klar zu erkennen, dass diese beiden Kontrollen signifikant langsamer wachsen, als die Larven, die mit einem Mikrobiom reassoziiert wurden. Die Embryonen beider Fliegenlinien, die auf den "prä-inokulierten" Futtern aufgewachsen waren, zeigten eine Entwicklungsgeschwindigkeit, die dem Wachstum der reassoziierten Larven ähnlich war. Dieses Wachstumsverhalten entsprach den Erwartungen, da nicht genau bestimmt werden kann, wie viele Faeces und damit Bakterien die Fliegen über einen Zeitraum von vier Tagen auf dem Futter ablegen. Es konnte somit aber bestätigt werden, dass die Larven die Bakterien über die Nahrung bzw. aus den Faeces aufnehmen.

96

Bei den Reassoziationen entwickelten sich die ersten Puppen nach 11 bis 12 Tagen nachdem die Embryonen auf dem Hefemangelfutter mit den Mikrobiomen reassoziiert wurden. In den Reassoziationen mit den Bakterien, die von den MRS- oder ACE-Agarplatten isoliert wurden, wird ersichtlich, dass eine Reassoziation mit einer großen Menge von Bakterien (100 µL OD₆₀₀=25) im Vergleich zu einer geringeren Menge (100 µL OD₆₀₀=1) einen größeren Wachstumsvorteil bietet (siehe Anhang 6.6 Abb. 72 und 73). Die *white[-]* Embryonen zeigten in der Reassoziation mit dem MRS-Mikrobiom von 23 Tage alten transferierten *white[-]* Fliegen und mit dem ACE-Mikrobiom von sechs Tage alten *white[-]* Kontrollfliegen die schnellste Entwicklung bis zum Puppenstadium (Abb. 64 A, B). Bei Oregon-R Embryonen zeigte das MRS-Mikrobiom von sechs Tage alten Oregon-R Fliegen und das ACE-Mikrobiom von 23 Tage alten transferierten Fliegen die besten Wachstumsvorteile (Abb. 64 C, D). Aber auch in den beiden Konditionen, in denen das sechs Tage alte Mikrobiom den besten wachstumsfördernden Effekt hat, zeigt eine Reassoziation mit den Mikrobiom aus transferierten Fliegen eine deutliche Verbesserung im Gegensatz zu den axenischen Larven.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Mikrobiome durch eine Perturbation ihren wachstumsfördernden Effekt nicht verloren haben, was für die Entwicklung von den Fliegen in der Natur von enorm wichtiger Bedeutung ist. Es scheint, dass das Darmmikrobiom von *Drosophila* sich zwar durch äußerliche Einflüsse verändern lässt, der letztlich wichtige Aspekt, der wachstumsfördernde Effekt für den Wirt aber nicht verloren geht.



Abb. 64: Reassoziation von axenischen *white[-]* und Oregon-R Embryonen auf 0,25 % Hefefutter mit aus verschiedenen Fliegenkonditionen isolierten Bakterien. Es wurde die Zeit bis zur Verpuppung der Larven und die Anzahl der Puppen dokumentiert, um den wachstumsfördernden Effekt der Mikrobiome zu analysieren. Die Bakterien wurden zuvor auf MRS- und ACE-Agarplatten jeweils aus sechs Tage alten und 23 Tage alten nicht transferierten und aus 23 Tage alten transferierten männlichen *white[-]* und Oregon-R Fliegen isoliert. Die Embryonen wurden mit 100 µL Bakterien einer OD₆₀₀= 25 reassoziiert. Als Kontrollen wurden die Entwicklung von Embryonen auf vorinokulierten Futterröhrchen, sowie von Embryonen, die von den Apfelsaftagarplatten gewaschen (Embryowash) und von solchen, die vollständig sterilisiert wurden (axenisch), analysiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen mit je mindestens drei Fliegenröhrchen pro Kondition. Die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Wachstumskurven wurde durch einen Permutationstest analysiert. Die Buchstaben a-e repräsentieren folgende Ergebnisse: (a) signifikant unterschiedlich zu einer anderen Probe, (b) zu zwei Proben, (c) zu drei Proben, (d) zu vier Proben und (e) zu fünf Proben. Die exakten p-Werte sind in Abb. 72 und 73 im Anhang 6.6 zu finden.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass sich das Mikrobiom von *Drosophila* zwischen verschiedenen Fliegenlinien unterscheidet und in dem hier untersuchten Zeitrahmen nicht sehr stark durch einen Futterwechsel verändert wird. Vielmehr zeigten sich linienspezifische Unterschiede in der Komposition, als auch im Bakteriengehalt, die auch unter identischen Futterbedingungen zwischen den Linien zu unterscheiden waren. Der Einfluss eines Darmmikrobioms auf den Metabolismus war im Vergleich zu axenischen Tieren nicht stark verändert, jedoch zeigten sich unterschiedliche Abhängigkeiten vom

Mikrobiom während der Entwicklung unter Hefemangelbedingungen und in der lokomotorischen Aktivität. Es stellte sich daher die Frage, ob der Wirt selbst einen Einfluss auf die Bakterienkomposition und den -gehalt hat, was sich aber in einem Mikrobiom-Austauschexperiment nicht direkt bestätigen ließ. Vielmehr zeigte sich, dass das Mikrobiom eine unterschiedlich gute Fähigkeit besitzt, unter perturbierenden Bedingungen im Wirt zu persistieren oder im Gegensatz der Wirt auch hier linienspezifisch in der Lage ist, sein Darmmikrobiom zu halten. Auch konnte gezeigt werden, dass die Perturbation von außen keinen negativen Einfluss auf den wachstumsfördernden Effekt einer Reassoziation von axenischen Tieren mit einem Darmmikrobiom hat. Diese Erkenntnis zeigt, dass die Interaktion zwischen Mikrobiom und *Drosophila* weniger transient ist als bisher angenommen und sich eine stabile Assoziation auch in im Laborgehaltenen Fliegen herauskristallisiert.
3 Diskussion

Die Interaktion zwischen multizellulären Organismen und ihrem Darmmikrobiom hat in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit erhalten und ist im Fokus zahlreicher Studien, die den Einfluss des Darmmikrobioms auf den Wirt untersuchen. Es hat sich herausgestellt, dass eine enge Verbindung zwischen einer Dysbiose des Darms und Erkrankungen des Wirts besteht (Cenit et al., 2017; Harper et al., 2018; Kang et al., 2017; Swidsinski et al., 2005; Wu et al., 2017). Einige dieser Dysbiosen und die mit ihr verbundenen Erkrankungen des Wirts können bereits teilweise durch eine Änderung oder Umstellung des Darmmikrobioms zu einer "gesunden" Mikrobiomkomposition durch z. B. Probiotika oder Fäkaltransplantationen geheilt werden (Chanyi et al., 2017; Walsh et al., 2014). Die Direktionalität zwischen Dysbiosen und bestimmten Erkrankungen ist jedoch noch nicht genauer verstanden. Daher ist es von Nöten, die Interaktionen zwischen Wirt und Bakterien und die Stabilität des Mikrobioms genauer zu verstehen. Diese Interaktionen im Menschen zu untersuchen ist äußerst schwierig, da das menschliche Mikrobiom aus 500-1000 Spezies bestehen kann, die alle in ihrer Abundanz und gemeinsamen Komposition einen Einfluss auf den Wirt haben können. Zusätzlich ist die Komposition des Mikrobioms von multiplen Faktoren (z. B. Ernährung, Umwelt, genetische Prädisposition) abhängig, was Studien am Menschen zusätzlich erschwert. Aus diesem Grund werden Modellorganismen wie Drosophila melanogaster verwendet, die mit einer einfacheren mikrobiellen Komposition, großer Probenanzahl und unter kontrollierbaren Laborbedingungen die Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiom leichter untersuchen lassen. Zwischen dem Mensch und Drosophila bestehen, trotz der großen evolutionären Distanz, weitreichende Analogien. So sind das Verdauungssystem, die Funktion des Darmepithels und die Darmhomöostase größtenteils konserviert und der Drosophila Mittel- und Hinterdarm sind funktionell analog zum Dünndarm und Dickdarm des Menschen (Capo et al., 2019). Auch die Komposition des Darmmikrobioms in Drosophila, besteht trotz ihrer Einfachheit hauptsächlich aus den gleichen bakteriellen Phyla (Firmicutes und Proteobacteria), die auch im Menschen einen Großteil des Mikrobioms ausmachen (Trinder et al., 2017). Neben diesen funktionellen und kompositorischen Übereinstimmungen wird geschätzt, dass ca. 60 % der 13.000 codierenden Fliegengene im Menschen evolutionär konserviert sind (Bellen and Yamamoto, 2015). Da das Genom zusätzlich weniger komplex als ein humanes Genom ist, kann mithilfe von mutanten Fliegen nach direkten Interaktionen zwischen Genen des Wirts und einzelnen bakteriellen Spezies gesucht werden. Diese Kombination aus einem genetisch wenig komplexen Wirt und einem einfacheren Mikrobiom macht die Fruchtfliege zu einem idealen Modellorganismus für die Analyse von Wirt-Mikrobiom-Interaktionen.

3.1 Methoden der Mikrobiomanalysen in Drosophila

Zur Analyse des Darmmikrobioms in *Drosophila* werden verschiedene Methoden verwendet, die z. B. den Vergleich zwischen axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen sowie eine Kompositionsanalyse des Darmmikrobioms erlauben. Die Etablierung von verschiedenen Methoden zum Nachweis, der

Quantifizierung und Lokalisation von Bakterien in *Drosophila* ist sehr wichtig, um aus den Ergebnissen Schlussfolgerungen über den Einfluss eines Darmmikrobioms auf *Drosophila* als Wirt zu ziehen. Einige dieser Methoden wurden bereits in anderen Publikationen verwendet (Ryu *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011), waren jedoch bisher nicht Schwerpunkt der Arbeitsgruppe von Dr. Beller und wurden daher im Rahmen dieser Arbeit zunächst etabliert und verifiziert. Weiterhin wurden zusätzliche Methoden und Experimente neu etabliert, um die Übertragbarkeit und Persistenz des Darmmikrobioms in *Drosophila* untersuchen zu können.

Um den Einfluss des Darmmikrobioms auf verschiedene Aspekte des Wirts, wie seine Entwicklung oder den Metabolismus zu untersuchen, werden häufig konventionell gehaltene Fliegen mit Fliegen denen das Darmmikrobiom fehlt – so genannte axenische Tiere- verglichen. Hierfür wird das Chorion der Embryonen mit Bleiche abgelöst und die Embryonen anschließend mit 70 % Ethanol sterilisiert. Es wurde gezeigt, dass die Embryonen selber steril sind und Darmbakterien der Mutter über das Chorion übertragen werden, wenn die Larven dieses nach dem Schlüpfen fressen (Bakula, 1969). Wenn das Chorion jedoch durch Bleiche vom Embryo abgelöst wird, sollte keine Übertragung der Bakterien mehr möglich sein. Zur Kontrolle der Sterilität wurden ein Teil der Embryonen in den hier beschriebenen Experimenten nach jedem Schritt homogenisiert und auf Nährmedien für Lactobacilli bzw. Acetobacter ausplattiert (siehe 2.1.1 Abb. 3). Nach der Entfernung des Chorions waren immer noch zwischen 50 und 200 Bakterienkolonien auf den Agarplatten gewachsen. Die anschließende Behandlung mit 70 % Ethanol reduzierte die Zahl der Kolonien zwar deutlich, bei einigen Proben sogar vollständig, es konnte aber nicht für alle behandelten Embryonen eine vollständige Sterilität beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden die Embryonen in dieser Arbeit zusätzlich auf autoklavierten Futtern mit verschiedenen Antibiotika gehalten, die ein bakterielles Wachstum unterdrückten und so die Fliegen in axenischen Dauerkulturen gehalten werden konnten. Die sich hier entwickelten Fliegen wurden regelmäßig mittels PCR des 16S rRNA Gens auf ihre Sterilität überprüft (siehe 2.1.2 Abb. 4). Zahlreiche veröffentlichte Protokolle verwenden keine zusätzliche Sterilisation mit Ethanol, sondern berufen sich darauf, dass durch die Behandlung mit Bleiche alle Bakterien eliminiert werden können (Early et al., 2017; Koyle et al., 2016; Newell and Douglas, 2014; Ridley et al., 2012). Dies konnte hier in zahlreichen Experimenten nicht verifiziert werden, weshalb die zusätzliche Sterilisation mit Ethanol in das Protokoll aufgenommen wurde. Auch wird in diesen Publikationen nicht erwähnt, ob und wie kontrolliert wird, dass die Sterilisierung erfolgreich war. Auch Publikationen, die zusätzlich eine Sterilisation mit 70 % Ethanol durchführen, beschreiben nicht, ob die axenischen Embryonen anschließend durch 16S PCR oder Ausplattieren auf Wachstumsmedien überprüft wurden (Elya et al., 2016; Pais et al., 2018). Broderick und Kollegen beschrieben, dass die axenischen Tiere über Ausplattieren oder 16S PCR auf Sterilität überprüft werden (Broderick et al., 2014), jedoch nicht, ob die Tiere dauerhaft steril waren.

Heys und Kollegen testeten dagegen in ihrer Publikation die verschiedenen Methoden zur Sterilisierung von *Drosophila* Embryonen bzw. verglichen die koloniebildenden Einheiten (KBE) in adulten Fliegen mit oder ohne Behandlungen. Dabei zeigte sich, dass nach einer Behandlung mit sterilem, destillierten Wasser fast die gleiche Anzahl Bakterienkolonien detektiert wurde, als wenn die Embryonen mit Bleiche dechorioniert

wurden (Heys et al., 2018). Auch eine nachträgliche Behandlung der sich entwickelten Tiere mit Streptomycin im nicht autoklavierten Futter oder die Verwendung von sterilisiertem Futter ohne Antibiotika erbrachte in ganzen Fliegen keine großen Unterschiede in der Bakterienzahl. Auf Streptomycin-Futter lagen die KBE in dechorionierten Fliegen zwischen 0 und 4,5 x 10¹ und bei normalen Fliegen zwischen 2,1 x 10¹ und 1 x 10². Bei einer Entwicklung auf lediglich autoklaviertem Futter lagen die KBE noch näher beieinander (zwischen 4,3 x 10² und 6,2 x 10²) (Heys et al., 2018). Besonders auffällig war in dieser Studie, dass keine der Konditionen in allen Proben zu vollständig axenischen adulten Tieren führte (Heys et al., 2018). Es zeigte sich also, dass die Methode der Sterilisation durch Entfernung des Chorions nicht immer zum gewünschten Ergebnis führt, sondern eine zusätzliche Behandlung mit 70 % Ethanol und eine anschließende Haltung auf autoklaviertem Futter mit Antibiotika erst zu vollständig sterilen Tieren führt (siehe 2.1.3). Dennoch stellt sich die Frage, wie valide die Analyse gnotobiotischer (mit bestimmten Bakterien reassoziierter) Tiere ist, wenn die Embryonen oder auch Larven oder adulte Tiere möglicherweise nicht vollständig von ihrem eigenen Mikrobiom befreit wurden. In den meisten Studien werden jedoch Reassoziationen mit einem hohen Bakteriengehalt durchgeführt. Hierdurch sollten die wenigen Bakterien, die die Sterilisation überlebt haben, wenn überhaupt nur einen geringen Einfluss zeigen (Newell and Douglas, 2014).

Zur Analyse der Komposition des Darmmikrobioms in Drosophila wurde neben Next Generation Sequencing Analysen auch die Analyse mittels qPCR verwendet. Dafür wurden Primer für die spezifische Amplifikation des jeweiligen 16S rRNA Gens von fünf Bakterienarten gesucht, die wichtige Vertreter des Darmmikrobioms von im Labor gehaltenen Fliegen darstellen (Broderick et al., 2014; Wong et al., 2011). Zunächst wurden bereits publizierte Primer verwendet (siehe 2.1.5). Es stellte sich allerdings heraus, dass fast alle nicht speziesspezifisch waren. Da diese Messungen keine genaue Analyse der Komposition des Mikrobioms und der Bakterienabundanz zuließen, wurden neue Primer entworfen, die spezifisch für jeweils eine Bakterienart waren. Die Sequenz des 16S rRNA Gens in Bakterien wird seit längerer Zeit zur Unterscheidung verschiedener Arten verwendet, da dieses Gen mehrere hypervariable Regionen besitzt, die sich auch zwischen nahverwandten Bakterien unterscheiden (Klindworth et al., 2013). Es wird aber auch das gesamte 16S rRNA Gen (ca. 1500 bp) sequenziert, um phylogenetische Analysen durchzuführen. Die Generierung von so speziesspezifischen Primern kann dennoch schwierig sein, weil z. B. zwischen verschiedenen Lactobacillus Arten eine sehr hohe Homologie zwischen den 16S rRNA Genen herrscht (Stevenson et al., 2006). Daher wurden für die nah verwandten Arten Lactobacillus plantarum und L. brevis Primer für das recombinase A Gen verwendet. Eine Analyse mittels Alignment der jeweiligen DNA-Sequenzen hat ergeben, dass das 16S rRNA Gen der beiden Lactobacillus Arten zu 93,9 % übereinstimmt, die Sequenz des recombinase A Gens jedoch nur zu 73,6 % (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/). Des Weiteren ist es wichtig, dass in der Analyse mittels qPCR die Primer eine vergleichbare Effizienz zeigen, damit die Ergebnisse der einzelnen Messungen kompatibel sind. Aus diesem Grund wurde der ebenfalls publizierte Primer für die Detektion von A. pomorum nicht weiter verwendet, da die Effizienz unter 70 % lag (siehe 2.1.5 Abb. 8). Die anderen Primer erreichten eine ausreichende Effizienz über 70 %, so dass sie gut untereinander verglichen werden konnten.

3.2 Untersuchungen der Varianz der Wirt-Darmmikrobiom-Interaktion

Die Korrelationen zwischen einer bestimmten Mikrobiomkomposition und einem krankhaften Zustand des Wirts liegen im Fokus der aktuellen Forschung. So wurden bereits das Reizdarmsyndrom mit dem Verlust bestimmter Bakterienarten im menschlichen Darm assoziiert (Cao *et al.*, 2014). Eine logische Schlussfolgerung ist daher auch, dass das Darmmikrobiom einen Einfluss auf den Wirtsmetabolismus hat. Dabei konnte gezeigt werden, dass bestimmte Bakterienkompositionen mit z. B. einem erhöhten BMI oder Fettleibigkeit assoziiert sind (Ley *et al.*, 2006). So ist eine bestimmte Bakterienkomposition in Mäusen in der Lage durch z. B. Fermentation mehr Nahrungsbestandteile zu verdauen und so Monosaccharide und kurzkettige Fettsäuren dem Wirt zur Verfügung zu stellen (Turnbaugh *et al.*, 2006). Auch in Menschen konnten Studien zeigen, dass eine im Verhältnis signifikant erhöhte Anzahl von *Firmicutes* und reduzierte Anzahl von *Bacteroidetes* mit Fettleibigkeit assoziiert ist (Bervoets *et al.*, 2013; Kasai *et al.*, 2015; Koliada *et al.*, 2017; Ley *et al.*, 2006). Dagegen konnten Hu und Kollegen jedoch keine Veränderungen im Verhältnis von *Firmicutes* und Bacteroidetes zwischen über- und normalgewichtigen Testpersonen feststellen (Hu *et al.*, 2015) und Schwiertz und Kollegen fanden sogar eine Erhöhung der *Bacteroidetes* und Reduzierung der *Firmicutes* in Menschen mit einem BMI über 30 (Hu et al., 2015; Schwiertz et al., 2010), was aufweist, wie schwierig eine Generalisierung von Ergebnissen im Menschen ist.

3.2.1 Unterschiede in der Darmmikrobiomkomposition trotz gleicher Umweltbedingungen

Drosophila ist ein gutes Modellsystem, um die Zusammenhänge zwischen dem Wirtsmetabolismus und dem Darmmikrobiom zu analysieren. Aufgrund der relativ einfachen Mikrobiomkomposition und der großen Fülle an genetischen Informationen über den Wirt, können so Korrelationen zwischen einem bestimmten (metabolischen) Phänotyp und der Mikrobiomkomposition des Wirts identifiziert werden. Im Zuge der Dissertation von Lisa Jehrke (Institut für mathematische Modellierung biologischer Systeme, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) wurde das Kernset (engl. *core set*) der DGRP Fliegen metabolisch charakterisiert. Bei diesen Fliegen handelt es sich um eine Sammlung wildtypischer isogener Inzuchtlinien von *Drosophila melanogaster*, die vollständig sequenziert sind und eine große Bandbreite an phänotypischen Merkmalen abdecken (Mackay *et al.*, 2012).

In den untersuchten DGRP Linien zeigten sich große Unterschiede im Gehalt von z. B. Trigylcerid, Glykogen oder Glycerol (Jehrke, 2019; Jehrke *et al.*, 2018). Um den möglichen Zusammenhang zwischen diesen metabolischen Phänotypen und dem Darmmikrobiom zu untersuchen, wurden aus vier ausgewählten DGRP Linien, die unter basalen Futterbedingungen und unter veränderten Nahrungsangeboten sehr unterschiedliche TAG-Werte aufwiesen, 16S rRNA Gen Sequenzierungen durchgeführt (siehe 2.2.1. Abb. 22). Die Fliegenlinien, die unter basalen Bedingungen gehalten wurden (Standardfutter, 25 °C) wiesen die typischen *Acetobacter* und *Lactobacillus* Vertreter eines *Drosophila* Darmmikrobioms auf. Dabei 103 unterschieden sich die Anteile und auch die Arten zwischen den Fliegenlinien teilweise deutlich, obwohl sie unter den gleichen Umweltbedingungen gehalten wurden (siehe 2.2.1 1 Abb. 25). Auch die Fliegen, die von einem *low sugar diet* (LSD) für sechs Tage auf Futter mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen transferiert wurden, zeigten sehr ähnliche Mikrobiomkompositionen zu den unter basalen Bedingungen gehaltenen Fliegen. Innerhalb der Fliegenlinien blieben die Kompositionen weitestgehend stabil (siehe 2.2.1.3 Abb. 28, 29), was zu der vorherrschenden Meinung gegenläufig ist, dass das Futter die Mikrobiomkomposition formt und beeinflusst (Chandler *et al.*, 2011; Erkosar and Leulier, 2014; Staubach *et al.*, 2013). Möglicherweise war ein Transfer der adulten Tiere für nur sechs Tage nicht ausreichend lang genug, um das Mikrobiom zu verändern, jedoch wurden die Tiere zuvor für eine Generation auf *low sugar diet* gehalten, was augenscheinlich auch keinen Einfluss auf die Komposition hatte.

Wie bereits erwähnt wurde in Studien an Drosophila, aber auch an Säugetieren und am Mensch festgestellt, dass sich die Mikrobiomkomposition durch ein anderes Nahrungsangebot verändert. In Drosophila und auch im Mensch wurden Veränderungen innerhalb weniger Tage, in Mäusen nach zwei Wochen beobachtet (Chandler et al., 2011; David et al., 2014; Lozupone et al., 2012; Magnusson et al., 2015; Ooi et al., 2014). Es müssen daher weitere Faktoren auf das Mikrobiom wirken, wie z. B. der Genotyp des Wirts durch den u. a. das Immunsystem unterschiedlich auf die Symbionten reagiert. In einer der vier sequenzierten DGRP Linien wurde neben Bakterien des Darmmikrobioms auch Wolbachia detektiert. Wolbachia ist kein Bakterium des Darmmikrobioms, sondern ein obligat intrazellulär lebendes Bakterium, dass je nach Quelle ca. 40 % bis 50 % aller Insekten tragen (Gruntenko et al., 2017; Zug and Hammerstein, 2012). Es ist bereits bekannt, dass Wolbachia Endosymbionten sind, die einen starken Einfluss auf den Wirt haben. Sie sind unter anderem in der Lage Parthenogenese, Feminisierung von männlichen Embryonen und cytoplasmatische Inkompatibilität zu induzieren, um über die weibliche Keimbahn verbreitet zu werden (Werren et al., 2008). Simhadri und Kollegen haben nun herausgefunden, dass Wolbachia auch einen Einfluss auf die Darmmikrobiomkomposition hat. So konnten in mit Wolbachia-infizierten Drosophila deutlich weniger bis gar keine Acetobacteraceae detektiert werden. Der Gehalt an Lactobacilli war dagegen unbeeinträchtigt (Simhadri et al., 2017). Auch in der DGRP-Linie 859, in der Wolbachia detektiert wurde, war der Acetobacter-Gehalt in Larven sehr niedrig und in adulten Tieren nicht nachweisbar (siehe 2.2.1.1 Abb. 25). Insgesamt war der Wolbachia-Gehalt in den hier durchgeführten Sequenzierungen jedoch so hoch, dass weitere Tests nötig wären, um einen direkten Einfluss von Wolbachia auf das Darmmikrobiom zu verifizieren. So könnten z. B. Sequenzierungen des Mikrobioms ausschließlich aus präparierten Därmen der Fliegen durchgeführt werden, um den Wolbachia-Anteil in der Sequenzierung zu verringern, da Wolbachia hauptsächlich in der maternalen Keimbahn gefunden wird (Serbus et al., 2015; Simhadri et al., 2017). Simhadri und Kollegen berichteten, dass der Effekt von Wolbachia vom Genotyp der Fliege abhängig sei. Daher wäre es von Vorteil eine größere DGRP Kohorte zu testen (ca. 50 % der DGRP sind mit Wolbachia infiziert (mittels PCR getestet, Daten nicht gezeigt und (Huang et al., 2014)). So könnten weitere Schlüsse über die Interaktion von Wolbachia mit dem Darmmikrobiom gezogen werden. Auch Einflüsse des Immunsystems oder des Metabolismus auf die Mikrobiomkomposition könnten durch Sequenzierungen

weiterer DGRP Fliegenlinien untersucht werden. Da die Fliegen des DGRP vollständig sequenziert sind, könnten so in Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) SNPs detektiert werden, die eventuell mit einer bestimmten Bakterienkomposition korrelieren.

Die Ergebnisse der gesamten 16S rRNA Sequenzierung (basal und Futterwechsel) wurden anschließend verwendet, um Korrelationen zwischen dem Wirtsmetabolismus und der Mikrobiomkomposition zu detektieren. Obwohl nur vier Linien seguenziert wurden, konnten Korrelationen zwischen verschiedenen Metaboliten und Bakterienarten identifiziert werden, wie z. B. eine schwach positive Korrelation zwischen freier Glucose und L. fructivorans oder L. homohiochii (siehe 2.2.2 Abb. 30). Zwischen Acetobacter tropicalis und freier Glucose bestand dagegen eine schwach negative Korrelation (Jehrke et al., 2018). Huang und Douglas publizierten, dass eine Monoassoziation von Canton-S Fliegen mit Acetobacter tropicalis zu einem reduzierten TAG-Gehalt und reduzierten Glucosegehalt in den Fliegen führte (Huang and Douglas, 2015). Die Schlussfolgerung war, dass die Bakterien die Glucose im Futter verstoffwechseln und diese daher den Fliegen nicht mehr zur Verfügung steht. Obwohl die Fliegen dort nur mit 5 x 10⁶ Bakterien pro Futterröhrchen reassoziiert wurden, ist eine Monoassoziation eine sehr artifizielle Situation, die unter natürlichen Bedingungen so nicht auftreten wird und wahrscheinlich auch nicht die normale Interaktion zwischen Fliege und Darmbakterium widerspiegelt. Dennoch besteht diese Möglichkeit der Interaktion auch bei den DGRP Fliegen, die auf Futtern mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen gehalten wurden und so eine negative Korrelation zwischen freier Glucose und einer anderen Acetobacter-Art zustande kommen kann. Eine negative Korrelation mit dem TAG-Gehalt der Fliegen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist auch hier der Einfluss des Mikrobioms abhängig vom Genotyp des Wirts. Diese unterschiedliche Abhängigkeit vom Darmmikrobiom konnte ebenfalls in Versuchen mit axenischen und konventionell gehaltenen DGRP Fliegen im Zuge ihrer Entwicklung beobachtet werden (siehe 2.2.3.1).

Neben den Korrelationen zwischen Metaboliten und Bakterien, konnten auch solche zwischen verschiedenen Spezies des Darmmikrobioms detektiert werden. So bestand eine negative Korrelation zwischen *L. plantarum* und *A. tropicalis.* Hier ist anzunehmen, dass diese beiden Arten im Darm um die gleichen Ressourcen konkurrieren. Die "perfekte" Korrelation zwischen *L. fructivorans* und *L. homohiochii* (r=1) scheint dagegen nicht sehr natürlich. Der Vergleich der 16S rRNA Gen Sequenzen dieser beiden Spezies zeigt, dass es nur 18 Basenunterschiede in ca. 1500 bp Gesamtlänge (Deletionen oder Austausche) zwischen diesen Arten gibt (Alignment Tool "EMBOSS Matcher" https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss _matcher/). Diese geringen Unterschiede können die Zuordnung der einzelnen Spezies mittels *in silico* Analysen erschweren, wodurch es zu einer stochastischen Zuordnung der Sequenzierungen zu *L. fructivorans* bzw. *L. homohiochii* kommt. Möglicherweise sind Probleme auf dieser Ebene der Identifizierung häufiger, obwohl die Methode der 16S Sequenzierung oft Proben bis auf Speziesebene analysiert und Schlussfolgerungen daraus gezogen werden.

Neben groß angelegten Korrelationsstudien, die weitere Zusammenhänge zwischen bestimmten Bakterien und z.B. dem Zucker- oder Fettstoffwechsel aufzeigen können, müssen jedoch gezieltere Funktionsuntersuchungen durchgeführt werden. In Mäusen bewirkte die Gabe eines Mikrobioms einer

übergewichtigen Maus, dass die empfangenden Tiere ebenfalls während der Entwicklung dicker wurden, als die Mäuse die mit einem Mikrobiom aus schlanken Mäusen gefüttert wurden (Ellekilde *et al.*, 2014). Auch in *Drosophila* wäre es möglich durch Selektion Fliegen mit höherem Fettgehalt und einem "übergewichtigen" Mikrobiom zu erhalten und dieses Mikrobiom im Vergleich zu normal gehaltenen Fliegen zu vergleichen. So kann gezielt untersucht werden, welche bakteriellen Spezies mit erhöhten TAGoder Glucosewerten einher gehen. Außerdem kann so gezeigt werden, ob ein Transfer dieses Mikrobioms auch normal gehaltene Fliegen in ihrem Metabolismus beeinflusst und möglicherweise die direkte Interaktion zwischen diesen Bakterien und dem Wirt ermittelt werden. Solche direkten Zusammenhänge zwischen Metabolismus und Mikrobiomkomposition oder einer bestimmten Spezies sind noch nicht ausreichend untersucht.

3.2.2 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung

Die Fliegen des DGRP Kernsets wurden verwendet, um den Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung zu untersuchen. Dabei wurde neben der Axenität der Fliegen auch der Genotyp der Linie und der Einfluss der Nahrung auf die Entwicklung getestet. Es wurden drei verschiedene Futter getestet, die sich in ihrem Zucker-, Hefe- und Maismehlgehalt unterschieden (siehe 2.1.3 Tabelle 1). Zunächst wurden alle Linien sterilisiert (siehe 2.1.1) und auf Abwesenheit von Bakterien mittels 16S PCR getestet (siehe 2.1.2). Anschließend wurden sowohl die axenischen Linien, als auch die gleichen Linien mit ihrem natürlichen Darmmikrobiom auf die drei Futter transferiert und für 24 Stunden Embryonen abgelegt. Die axenischen Linien wurden während des Versuchs auf Futter mit Antibiotika gehalten, um eine Kontamination mit Bakterien und eine dadurch mögliche Beeinflussung der Entwicklung auszuschließen. Anschließend wurde überprüft, welche Linien sich als konventionell gehaltene (KH) oder axenische Tiere auf welchem Futter bis zum adulten Stadium entwickeln konnten (siehe 2.2.3.1). In dieser ersten Generation hatten unerwarteter Weise mehr KH Fliegen als axenische Fliegen Probleme sich auf den zwei Futtern mit dem geringeren Nährstoffgehalt (Glucose-Hefe und Hefeextrakt-Maismehl) zu entwickeln (siehe Abb. 31). Darunter waren fünf Linien die sich im KH Zustand nicht, dafür aber im axenischen Zustand zu adulten Tieren entwickeln konnten. Möglicherweise lag in diesen KH Linien eine Dysbiose oder Infektion mit Pathogenen vor, die durch eine Behandlung mit Bleiche, Ethanol und anschließender Antibiotikabehandlung eliminiert wurden. Eine weitere Erklärung, dass nur wenige axenische Linien Wachstumsdefizite zeigten, könnte die Weitergabe von Nährstoffen der Parentaltiere an die Embryonen sein, die dadurch einen Wachstumsvorteil besaßen. Es wurde bereits gezeigt, dass der Einfluss der Ernährung auf den Metabolismus und die Entwicklung in die Folgegeneration weiterreicht (Matzkin et al., 2013) und so die axenischen Embryonen einen Wachstumsvorteil erfahren.

Daher wurden die adulten Fliegen aus dieser ersten Generation verwendet, um in einer Wiederholung nochmals Embryonen auf den Futtern abzulegen, so dass die Elterntiere und Embryonen den gleichen Nahrungsbedingungen ausgesetzt waren. Hier zeigte sich dann, dass sich deutlich weniger Fliegenlinien auf den verschiedenen Futtern bis zu adulten Tieren entwickeln konnten (siehe Abb. 32). Vor allem auf dem

Hefeextrakt-Maismehl-Futter (HeM) hatten sowohl KH als auch axenische DGRP Linien Wachstumsdefizite. Erstaunlicherweise konnten in dieser zweiten Generation jedoch auf HeM-Futter mehr KH Fliegenlinien als axenische Linien sich nicht bis zu adulten Tieren entwickeln. Die Annahme, dass ein Mikrobiom unter Nährstoffmangel den Fliegen einen Entwicklungsvorteil bietet, konnte also nicht für alle Linien des DGRP bestätigt werden. Letztendlich waren es auf HeM-Futter nur zwei Linien, auf Glucose-Hefe-Futter (GH) drei Linien und auf Glucose-Maismehl-Hefe-Futter (GMH) eine Linie, die im axenischen Zustand nicht gewachsen war, ein Mikrobiom hier aber zur normalen Entwicklung beigetragen hat.

Die unterschiedlichen Fähigkeiten sich auf den drei Futtern zu entwickeln, scheinen vor allem bei den KH Fliegen und den Linien, in welchen sowohl KH als auch axenische Tiere sich nicht entwickeln konnten, auf die genetische Kontribution der Fliege zurückzuführen sein. Daher wurden genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt, die die Identifikation genetischer Varianten, die mit der Entwicklungsfähigkeit oder -unfähigkeit assoziiert sind, ermöglichen. Dabei werden SNPs in intergenischen Regionen, wie auch innerhalb von Genen (Introns und Exons) identifiziert. Da eine Interpretation von SNPs in intergenischen Regionen schwierig ist, wurde sich in dieser Studie nur auf Gen-assoziierte SNPs konzentriert. Hier können aber auch interessanterweise SNPs in Exons, als auch Introns einen Einfluss auf den Phänotyp haben (Busslinger et al., 1981; Nakano and Suzuki, 1989). Mit der Entwicklung der Fliegen im KH oder axenischen Zustand auf den verschiedenen Futtern waren zahlreiche SNPs assoziiert, die in der Entwicklung der Tiere eine Rolle zu spielen scheinen (siehe Abb. 33). Ob diese assoziierten SNPs tatsächlich mit einer veränderten Entwicklungsfähigkeit auf bestimmten Futtern mit oder ohne Darmmikrobiom zusammenhängen, muss in experimentellen Untersuchungen festgestellt werden. Häufig werden Gene, die korrelierte SNPs tragen, mittels GAL4/UAS-System überexprimiert, oder anhand von RNAi herunterreguliert. Hierdurch kann eine mögliche Bedeutung für den korrelierten Phänotyp getestet werden. Diese Methode muss jedoch nicht zwingend aussagekräftige Ergebnisse erzielen, da ein Gen-assoziierter SNP nicht immer eine Veränderung der Genexpression bzw. einen Funktionsverlust nach sich ziehen muss. Besser geeignet ist das CRISPR-Cas-System, in welchem SNPs mittels einer Endonuklease und anschließender DNA-Reparatur in wildtypische Fliegenlinien eingebracht werden. Dadurch kann isoliert untersucht werden, ob diese Genvariation einen Einfluss auf den Phänotyp der Fliege hat (Ochiai, 2015).

3.2.3 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf den Metabolismus

Neben der Abhängigkeit vom Mikrobiom während der Entwicklung, wurden die axenischen und KH DGRP verwendet, um den Einfluss des Darmmikrobioms auf den Metabolismus zu untersuchen. Dazu wurden die Metabolite TAG, Glucose und Glykogen, sowie der Proteingehalt der Tiere bestimmt (siehe 2.2.3.2). Anschließend wurden die Unterschiede der Metabolitgehalte in den jeweiligen Linien zwischen KH und axenischen Tieren verglichen. Dabei zeigte sich, dass mehr Linien im axenischen Zustand einen höheren TAG-Gehalt aufwiesen als die jeweiligen KH Linien (siehe Abb. 35). Höhere TAG-Werte in axenischen Fliegen wurden bereits in vorausgegangenen Studien bestätigt (Huang and Douglas, 2015; Wong *et al.*, 2014). Im Vergleich des Proteingehalts enthielten im axenischen Zustand ungefähr die Hälfte der Linien weniger

Protein als die konventionell gehaltenen Tiere (siehe Abb. 35). Hier scheint das Fehlen eines Mikrobioms keinen einheitlichen Einfluss auf die Linien zu haben. Bei den Glucose- und Glykogenmessungen waren bei etwas mehr als der Hälfte der Linien die Werte in KH Fliegen höher (siehe Abb. 36). Wong und Kollegen zeigten erhöhte Glucose- und Glykogenwerte in axenischen Fliegen, was jedoch abhängig vom Hefe-Zucker-Verhältnis im Futter war und auch nur in der Fliegenlinie Canton-S getestet wurde (Wong et al., 2014). Die hier durchgeführten Messungen an den axenischen und KH DGRP konnten jedoch zeigen, dass eine durchaus größere Plastizität der Bedeutung des Mikrobioms für den Wirt vorliegt oder aber auch die Abhängigkeit des Wirts von seinem Mikrobiom unterschiedlich stark ist. Es bestehen somit klare Unterschiede in der Abhängigkeit vom Mikrobiom zwischen den verschiedenen Genotypen von Drosophila. Das hier verwendete Glucose-Maismehl-Hefe-Futter hat im Vergleich zu den anderen Futtern drei wichtige Futterkomponenten und ist daher reichhaltiger als das GH und HeM-Futter (siehe Tabelle 1), auf dem sich zuvor alle KH und bis auf zwei Linien alle axenischen Linien entwickeln konnten. Die Unterschiede zwischen KH und axenischen Tieren könnten auf einem Futter mit weniger Nährstoffen oder einem Mangelfutter noch deutlicher gemacht werden, was den positiven Effekt eines Darmmikrobioms auf den Metabolismus unterstreichen würde. Hier ist es jedoch schwierig den Grad zwischen dem Vorteil eines Darmmikrobioms zu testen, ohne dass die axenischen Fliegen dabei aus Nährstoffmangel aussterben. Es wäre außerdem möglich alle DGRP Linien mit einem identischen Mikrobiom zu inokulieren und anschließend die Metabolite mit axenischen Tieren zu vergleichen. So könnten direkte Veränderungen im Metabolismus des jeweiligen Genotyps in Abhängigkeit von einem bestimmten Darmmikrobiom untersucht werden.

Die Ergebnisse der Metabolitmessungen wurden in GWAS verwendet, wie bereits in vorherigen Studien, der Zusammenhang zwischen bestimmten Parametern wie Speichermetaboliten, dem Gewicht der Fliegen und bestimmten SNPs untersucht wurde (Jumbo-Lucioni *et al.*, 2010; Unckless *et al.*, 2015). Aber auch die Assoziation von SNPs, dem Fehlen eines Mikrobioms, sowie verschiedenen Metaboliten wurde untersucht (Dobson *et al.*, 2015). Es wurde beschrieben, dass die Linien durchschnittlich im axenischen Zustand einen höheren TAG- und Glucosegehalt, aber reduzierte Protein und Glykogenwerte zeigten, was sich mit den in dieser Studie ermittelten Daten deckt. Dobson und Kollegen konnten jedoch deutlich mehr Gen-assoziierte SNPs detektieren, was sehr wahrscheinlich an der unterschiedlichen Analysemethode liegt. In den hier durchgeführten GWAS konnten nur sehr wenige mit den jeweiligen Metaboliten signifikant assoziierte SNPs detektiert werden (siehe Abb. 37). Dabei lag kein SNP in Genen, die bekannterweise dem Metabolismus zugeordnet sind. Unter den Genen waren einige uncharakterisierte Gene, die möglicherweise eine Rolle im Metabolismus oder auch in der Interaktion mit dem Darmmikrobiom spielen. Hier besteht die Möglichkeit in weiterführenden Studien, diese in der GWAS detektierten Gene weiter zu charakterisieren und möglicherweise eine Verbindung in der Interaktion zwischen Wirt und Darmmikrobiom zu finden.

3.3 Die Wirt-Mikrobiom-Interaktion in zwei wildtypischen Fliegenlinien

Die Analysen an den DGRP Fliegen haben gezeigt, dass der Wirt, je nach Futter bzw. Nährstoffbedingungen aber auch Genotyp unterschiedlich abhängig von seinem Darmmikrobiom ist. Die Entfernung dieses

Mikrobioms beeinflusst den Wirt je nach Genotyp unterschiedlich in seiner Entwicklung (siehe 2.2.3.1), aber auch in seinem Metabolismus (siehe 2.2.3.2). Zusätzlich tragen die unterschiedlichen Fliegenlinien trotz gleicher Umweltbedingungen auch verschiedene Mikrobiomkompositionen (siehe 2.2.1), so dass die Fliege möglicherweise doch einen Einfluss auf ihre Symbionten haben. Um diese Unterschiede zwischen wildtypischen Genotypen näher zu charakterisieren wurden Experimente mit zwei Fliegenlinien durchgeführt, die anhand ihrer Augenfarbe gut zu unterscheiden sind und so auch unter identischen Bedingungen (Co-Kultivierung) aufgezogen werden können.

3.3.1 Variationen im Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung und den Metabolismus

Im Vergleich der zwei im Labor häufig verwendeten Fliegenlinien *white[-]* und Oregon-R konnten wie bei den DGRP Fliegen Unterschiede in der Fähigkeit sich ohne Darmmikrobiom unter Mangelbedingungen zu entwickeln beobachtet werden. Hier wurde getestet, wie sich ein Hefemangel auf die Entwicklung von KH und axenischen Tiere auswirkt.

Die KH white[-] zeigten eine nur wenig verzögerte Entwicklung auf Futter mit niedrigen Hefekonzentrationen, wohingegen axenische white[-] unter Hefemangel deutlich langsamer wuchsen und bei 0,1 % Hefe sich keine Puppen mehr bildeten (siehe 2.3.1 Abb. 38), was die Ergebnisse einer vorausgegangenen Studie bestätigte (Shin et al., 2011). Hier wird deutlich, dass unter so drastischem Hefemangel das Darmmikrobiom die Larven in der Entwicklung unterstützt. Wie genau ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Den Larven fehlen während der Entwicklung auf Futter mit wenig Hefe Proteine aber auch Sterole. Da Drosophila Sterol auxotroph ist, muss dieses aus der Nahrung durch z. B. Hefen aufgenommen werden (Anagnostou et al., 2010; Broderick and Lemaitre, 2012; Carvalho et al., 2010; Cooke and Sang, 1970; Sang and King, 1961). Carvalho und Kollegen wiesen nach, dass sich Embryonen, die zuvor mit Natriumhypochlorit behandelt wurden (axenisch), auf delipidiertem Hefefutter nicht weiter als bis zum zweiten Larvenstadium entwickeln konnten. Die Entwicklung konnte aber durch die Zugabe von Cholesterol bis zum adulten Tier gerettet werden (Carvalho et al., 2010), was beweist, dass Sterol und nicht das Darmmikrobiom hier der limitierende Wachstumsfaktor ist. Dennoch entwickelten sich die white[-] Larven mit einem Darmmikrobiom unter Hefemangel relativ normal. Die Bakterien des Drosophila Darmmikrobioms selbst sind allerdings nicht in der Lage Sterole zu produzieren (Douglas, 2015). Das Bakterium Methylococcus capsulatus besitzt ein Gen für eine Oxidosqualen Cyclase, welche die Ringbildung von Oxidosqualen zu Lanosterol oder Cycloartenol durchführt (Wei et al., 2016). Die typischen Drosophila Darmbakterien wurden hier jedoch nicht als Träger dieses Gens genannt und auch in BLAST-Analysen wurde dieses Gen oder ein Homolog nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt), so dass sie wahrscheinlich keine Sterol-ähnlichen Verbindungen produzieren.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass *Acetobacter pomorum* auf Futter mit Casaminosäuren anstatt Hefe, die Entwicklungsfähigkeit von axenischen Embryonen bzw. Larven wiederherstellen kann (Shin *et al.*, 2011). Dies wird unter anderem auf die Aktivität der Pyrroloquinolin-Quinon-abhängigen Alkoholdehydrogenase I (PQQ-ADH) zurückgeführt, die in der Essigsäuresäure-Produktion eine Rolle spielt (Yakushi and Matsushita,

2010) und auf den Insulinstoffwechsel wirken soll (Shin *et al.*, 2011). Die Essigsäure oder möglicherweise andere bakterielle Metabolite geben den Larven das Signal zur weiteren Entwicklung, was sie sonst unter den gegebenen Mangelbedingungen nicht tun würden. Dennoch ist weiterhin ungeklärt, woher die Larven das für die Entwicklung essentielle Sterol nehmen. Denkbar wäre, dass die dechorionierten Embryonen nur von Bakterien befreit wurden, jedoch weiterhin Hefen vorhanden sind. Diese Hefen würden dann den axenischen Larven als Sterolquelle zur Verfügung stehen, es fehlt aber weiterhin das bakterielle "Signal" zur weiteren Entwicklung. Larven mit einem Mikrobiom wären dann in der Lage sich auf dem Casaminosäuren-Futter zu entwickeln (Shin *et al.*, 2011). Möglicherweise besitzen die in Shin *et al.* verwendeten axenischen Embryonen aber auch noch genügend Sterol aus der Parentalgeneration, wenn die richtigen Wachstumssignale vom Darmmikrobiom oder einer bestimmten bakteriellen Spezies gesendet werden. Diese Hypothesen der Übertragung von Sterolen aus der Parentalgeneration und dass axenische Embryonen noch Hefen enthalten können, müssen zur Klärung dieser Zusammenhänge experimentell bewiesen werden.

Im Gegensatz zu *white[-]* konnten die axenischen Oregon-R sich auf den zwei niedrigsten Hefefuttern (0,1 % und 0,25 % Hefe) nicht zu Puppen entwickeln, zeigten aber auch bei der höchsten Hefekonzentration (2 %) eine verlangsamte Entwicklung (siehe Abb. 38 D). Hier ist zu erkennen, dass Oregon-R Larven offensichtlich stärker in ihrer Entwicklung von ihrem Darmmikrobiom abhängig sind, als *white[-]* Larven. Überraschenderweise zeigten die KH Oregon-R, im Gegensatz zu den KH *white[-]*, auf allen getesteten Hefefuttern (2 % bis 0,1 % Hefe) ein signifikant verlangsamtes Wachstum. Bei der niedrigsten Hefekonzentrationen scheint das eigene Mikrobiom keinen ausreichenden wachstumsfördernden Effekt zu haben, da sich keine Puppen ausbildeten (siehe Abb. 38 C). Einerseits wäre es denkbar, dass die Mikrobiomkomposition im Darm von Oregon-R Fliegen anders als in *white[-]* Fliegen ist, welche möglicherweise aus Bakterien besteht, die einen besseren wachstumsfördernden Effekt haben. Andererseits wäre es möglich, dass *white[-]* Fliegen insgesamt eine höhere Anzahl an Bakterien besitzen. Diese könnte den Larven und Puppen nicht nur bestimmte Wachstumssignale in der Entwicklung geben, sondern die Tiere zusätzlich mit mehr fehlenden Nährstoffen versorgen als in Oregon-R. Es wurde gezeigt, dass die Bakterien des Darmmikrobioms als Proteinersatz dienen (Keebaugh *et al.*, 2018), daher könnte ein höherer Bakteriengehalt *white[-]* Fliegen in der Entwicklung unter Hefemangel unterstützen.

Zahlreiche Studien befassen sich ausschließlich mit der Interaktion des bakteriellen Mikrobioms mit dem Wirt, dennoch besteht ein großer Teil des Darmmikrobioms in *Drosophila* aus Hefen. Chandler und Kollegen haben die Hefe-Spezies in *Drosophila* analysiert und festgestellt, dass wie im bakteriellen Mikrobiom, eine kleine Zahl von Hefe-Spezies den Großteil der Komposition ausmachen. Außerdem wird die Komposition der Hefen ebenfalls von der Nahrung des Wirts beeinflusst (Chandler *et al.*, 2012). Daher ist anzunehmen, dass *Drosophila* nicht nur mit den Bakterien im Darmmikrobiom interagiert, sondern auch die Hefen eine essentielle Rolle spielen. Es sollte daher in zukünftigen Studien untersucht werden, ob KH *white[-]* mehr Hefen in ihrem Mikrobiom besitzen als Oregon-R Fliegen, die unter den hier getesteten Hefemangelbedingungen den Fliegen einen Wachstumsvorteil durch die Bereitstellung von Sterolen bieten.

Dies wäre, neben den unterschiedlichen Genotypen der Fliegen eine Erklärung für die differentielle Entwicklungsfähigkeit der KH *white[-]* und Oregon-R Larven.

Der Vergleich vom TAG-, Glucose- und Glykogengehalt zeigte in konventionell gehaltenen und axenischen *white[-]* und Oregon-R Larven, die sich auf Glucose-Hefe-Futter entwickelt hatten, keine großen Unterschiede (siehe 2.3.2.1 Abb. 39). Hier könnten die axenischen Tiere möglicherweise ein durch das fehlende Mikrobiom verursachtes Nährstoffdefizit, durch vermehrte Nahrungsaufnahme ausgleichen. Zwischen KH und axenischen adulten Tieren von Glucose-Hefe-Futter lagen keine Unterschiede in den TAG-Mengen vor (siehe 2.3.2.2 Abb. 40). In axenischen *white[-]* Weibchen konnte eine signifikante Reduktion in den Glykogenmengen, sowie leicht geringere Glucosemengen in weiblichen und männlichen axenischen *white[-]* Tieren detektiert werden. Axenische Oregon-R Fliegen schienen dagegen metabolisch nicht vom Fehlen ihres Darmmikrobioms beeinflusst zu sein. Das hier verwendete Glucose-Hefe-Futter stellt zwar keine besonders reiche Diät für die Tiere dar, da die Metabolitwerte ähnlich zu anderen gemessenen Werten in *Drosophila* sind (Jehrke *et al.*, 2018), dennoch könnte dieses Futter mit 10 % Hefe die eventuellen Unterschiede im Metabolismus zwischen KH und axenischen Tieren überdecken, die erst unter Hefemangel sichtbar werden. Interessant wäre es daher den Metabolismus von KH und axenischen Tieren auf weniger reichhaltigem Futter zu vergleichen.

Im Gegensatz zu white[-] und Oregon-R Fliegen wiesen axenische Canton-S Weibchen erhöhte TAG-Mengen auf, wenn sie auf dem auch in dieser Studie verwendeten Glucose-Hefe-Futter gehalten wurden (Wong et al., 2014). Diese metabolischen Unterschiede werden von Wong und Kollegen nicht auf Hyperphagie, sondern auf die fehlende metabolische Aktivität der Bakterien in KH Fliegen zurückgeführt. Da hier jedoch Fliegen der Linie Canton-S diesen Phänotyp zeigten, ist nicht auszuschließen, dass auch der Metabolismus der Fliegen nicht immer gleich auf das Fehlen eines Darmmikrobioms reagiert. Da das gleiche Futter verwendet wurde, kann der Effekt eines anderen Futters auf den Metabolismus ausgeschlossen werden, auch wenn Unterschiede im Nährstoffgehalt der verwendeten Hefen nicht ausgeschlossen werden können. Unterschiede in der Mikrobiomkomposition der vergleichend analysierten KH Fliegen könnten aber auch einen Einfluss auf einen höheren oder niedrigeren Speichermetabolitgehalt haben. Staubach und Kollegen haben bereits publiziert, dass die Mikrobiomkomposition von in Labor-gehaltenen Drosophila vom jeweiligen getesteten Labor abhängig ist (Staubach et al., 2013), so dass auch angenommen werden kann, dass diese konventionell gehaltenen Fliegen unterschiedliche Speichermetabolitmengen besitzen. Ein direkter Vergleich der Metabolitwerte in KH Fliegen zwischen (Wong et al., 2014) und der vorliegenden Studie ist, aufgrund der unterschiedlichen Normalisierung nicht direkt möglich. Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass nicht nur das Futter und die Mikrobiomkomposition einen Einfluss auf den Metabolismus des Wirts haben, sondern auch der Wirt und sein Genotyp als Faktor mit in Betracht gezogen werden muss, was die Generalisierbarkeit von Ergebnissen erschwert. Um den Einfluss des Genotyps zu untersuchen, müsste das Mikrobiom weiterer Fliegenlinien, wie die Fliegen des DGRP, die genetisch vollständig charakterisiert sind untersucht werden, um Schlüsse über Wechselwirkungen zwischen bestimmten Genen des Wirts und den Darmbakterien zu ziehen. Auch Transkriptom-Analysen geben weitere Einblicke, welche Genexpression im Wirt mit einer bestimmten Mikrobiomkomposition einher geht. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass zahlreiche Gene hoch- oder runterreguliert werden, wenn KH Fliegen mit axenischen Fliegen verglichen werden (Bost et al., 2018; Broderick et al., 2014). Vor allem Gene, die an der Immunantwort, dem Metabolismus, der Darmepithel-Homöostase und der Darmphysiologie beteiligt sind, werden durch die Abwesenheit eines Darmmikrobioms anders reguliert. Neben den Untersuchungen an der Interaktion des Mikrobioms mit Drosophila, wird auch in Mäusen der Einfluss des Darmmikrobioms auf die Entwicklung und den Metabolismus untersucht. Axenische Mäuse, die mit einem konventionellen Darmmikrobiom reassoziiert wurden, wiesen einen um 60 % erhöhten Körperfettgehalt auf (Bäckhed et al., 2004). Dennoch gibt es auf Grund verschiedener Methoden und Experimentdesigns auch hier unterschiedliche Resultate und Meinungen, welche Faktoren die Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiom beeinflussen (Bäckhed, 2012). Um den Einfluss des Darmmikrobioms im Menschen zu untersuchen, bedarf es natürlich anderer Methoden als den Vergleich von axenischen und kolonisierten Individuen. Hier werden Metagenom-Analysen des Mikrobioms durchgeführt, die die Komposition des Darmmikrobioms abbilden und diese in Korrelationen mit bestimmten Krankheiten, wie Fettleibigkeit stellen können (Schmidt et al., 2018). Dabei ist es jedoch schwierig Ergebnisse über verschiedene Studien oder auch zwischen Individuen hinweg zu vergleichen, da noch mehr intrinsische und extrinsische Faktoren als bei einfachen Modellorganismen wie Drosophila das Darmmikrobiom beeinflussen. Auch handelt es sich bei solchen Analysen aus Stuhlproben um qualitative Ergebnisse, die noch keine funktionelle Bedeutung der Darmbakterien und auch ihre räumliche Anordnung im Darm zulassen (Vandeputte et al., 2017). Dennoch konnten bereits zahlreiche Aussagen über die Mikrobiomkomposition im Darm des Menschen getroffen werden, in dem durch Perturbationen wie z. B. eine Nahrungsumstellung oder Medikamentengabe das Mikrobiom beeinflusst wurde (David et al., 2014).

3.3.2 Unterschiede in der Mikrobiomkomposition und dem Bakteriengehalt

Da Unterschiede in der Entwicklungsfähigkeit der konventionell gehaltenen *white[-]* und Oregon-R Larven sogar auf den Hefefuttern mit höherer Hefekonzentration (2 %) zu erkennen waren, wurde näher untersucht, wie sich diese Linien voneinander unterscheiden. Dazu wurde zunächst das Darmmikrobiom in seiner Abundanz und Komposition anhand von fünf häufig in *Drosophila* detektierten Bakterienspezies mittels qPCR untersucht und verglichen (siehe 2.3.4). So konnte ein Überblick über die bakterielle Komposition im Darm von *Drosophila* Larven und Fliegen geschaffen werden, auch wenn nicht alle Spezies detektiert wurden. In den qPCR Analysen zeigte sich, dass es bereits in wandernden L3 Larven Unterschiede in der Komposition gab (siehe Abb. 43). In *white[-]* Larven fanden sich höhere Mengen von *L. fructivorans* und deutlich niedrigere *A. tropicalis* Mengen im Vergleich zu Oregon-R Larven. Diese Kombination könnte unter Mangelbedingungen vorteilhafter für die Entwicklung sein. Ob diese den *white[-]* Larven mehr Nährstoffe bietet oder die wichtigen Signale für eine schnelle Entwicklung verstärkt sind, müsste in spezifischen Experimenten untersucht werden, in denen z. B. das Mikrobiom zwischen den Linien ausgetauscht wird. Der Bakteriengehalt war in den Larven der beiden Linien jedoch ähnlich.

In sechs Tage alten adulten Tieren wurde deutlich, dass der Bakteriengehalt in männlichen und weiblichen Oregon-R Fliegen insgesamt geringer war als in *white[-]* Fliegen (siehe Abb. 44). Auch in Monoassoziationsstudien mit den Fliegen des DGRP hatte der Genotyp der Fliegen einen Einfluss auf den Bakteriengehalt (Early *et al.*, 2017). Die Unterschiede im Bakteriengehalt erklären allerdings nicht die Entwicklungsdifferenzen zwischen *white[-]* und Oregon-R Larven, da hier der Bakteriengehalt relativ ähnlich war. Daher könnte die unterschiedliche relative Abundanz der Bakterienspezies in den Larven die Entwicklung unterschiedlich stark fördern und die Mikrobiomkomposition insgesamt wichtiger als die Menge der Mikroorganismen sein.

Zwischen adulten white[-] und Oregon-R Fliegen zeigten sich ebenfalls einige signifikante Unterschieden in der relativen Abundanz einzelner Spezies (siehe Abb. 44). In verschiedenen Publikationen wurde bisher als Begründungen für Unterschiede in der Mikrobiomkomposition verschiedene Futter oder verschiedene Haltungsbedingungen in Laboren oder Umweltbedingungen in der Natur angegeben (Staubach et al., 2013; Wang and Staubach, 2018). Jedoch wurden die verschiedenen Fliegenlinien in dieser Studie unter identischen Haltungsbedingungen und auf dem gleichen Futter gehalten. Es muss daher ein anderer, weiterer Grund für Unterschiede in der Mikrobiomkomposition bestehen. In männlichen und weiblichen Oregon-R Fliegen war die Abundanz von L. brevis und L. fructivorans signifikant kleiner als in white[-] Fliegen. Broderick und Kollegen hatten auch in zwei wildtypischen Laborfliegenlinien (Oregon-R und Canton-S) eine deutlich unterschiedliche Mikrobiomkomposition festgestellt (Broderick et al., 2014). Auch Han und Kollegen beschrieben unterschiedliche Mikrobiomkompositionen in Canton-S und white[-], die sowohl vom Alter, dem Geschlecht und dem Genotyp der Fliege abhängig sind (Han et al., 2017). Dennoch unterschieden sich die Komposition zwischen diesen beiden Studien und den von den hier detektierten Bakterienspezies zum Teil deutlich. Auch Early und Kollegen konnten in verschiedenen DGRP Linien unterschiedliche Mengen an L. brevis nachweisen, nachdem axenische Embryonen mit einzelnen Bakterienkulturen reassoziiert wurden (Early et al., 2017). Dies unterstreicht ebenfalls, dass die Mikrobiomkomposition zumindest im adulten Stadium vom Genotyp der Fliege abhängig ist. Jedoch wird L. brevis auch als Pathobiont angesehen, obwohl es ein typischer Vertreter des Mikrobioms in Drosophila ist (Kim et al., 2013; Lee et al., 2013). Der Stamm L. brevis EW produziert Uracil, welches eine chronische Aktivierung des Enzyms Dualoxidase im Darm des Wirts induziert, wodurch reaktive Sauerstoffspezies produziert werden (Lee et al., 2013). Dies kann zu Entzündungen im Darmepithel und erhöhter Sterblichkeitsrate der Fliege führen. Ein weiterer typischer Vertreter des Drosophila Darmmikrobioms ist Lactobacillus plantarum, welches bereits in zahlreichen Publikationen als eine der Schlüsselspezies des wachstumsfördernden Effekts in Drosophila angesehen wird. Diese Spezies wirkt upstream des TORabhängigen Nährstoffdetektionssystems (Storelli et al., 2011), ist jedoch in dieser Studie häufig nah oder unter dem Detektionslimit der qPCR-Analysen. Lactobacillus Spezies sind in jungen adulten (ungefähr sieben Tage alt) weniger abundant, als in älteren Fliegen (30 Tage und mehr) (Han et al., 2017), was mit den hier gezeigten Ergebnissen übereinstimmt. Andere Studien beschrieben L. plantarum nicht als Schlüsselspezies, sondern zeigten, dass eine Monoassoziation mit dieser Spezies schwere intestinale

Schäden, wie Stammzellverlust, eingeschränkte Epithelerneuerung und Verschleiß der Epithelschichten des Darms, verursacht (Fast *et al.*, 2018). Daher könnte ein Fehlen oder eine nur sehr geringe Abundanz von *L. plantarum* vorteilhaft für den Wirt sein und eine ausgewogene Komposition der Bakterienspezies den größten wachstumsfördernden Effekt auf die Larven haben.

3.3.3 Der Einfluss des Darmmikrobioms auf die lokomotorische Aktivität des Wirts

Neben dem Einfluss des Mikrobioms auf die Entwicklung und den Metabolismus der Fliegen (Shin *et al.*, 2011; Storelli *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2016), hat das Entfernen des Mikrobioms und eine axenische Haltung auch einen Einfluss auf die motorische Aktivität der Fliegen (Schretter *et al.*, 2018). Um Mikrobiomabhängige lokomotorische Unterschiede zwischen den beiden Fliegenlinien *white[-]* und Oregon-R zu untersuchen, wurde die Aktivität von einen Tag alten KH und axenischen Männchen und Weibchen über eine Woche mit Hilfe eines Activity Monitors dokumentiert (siehe Methoden 5.1.5). Die Messungen zeigten, dass axenische Oregon-R Weibchen und Männchen signifikant aktiver waren, als die Tiere mit Mikrobiom (siehe 2.3.3 Abb. 41, 42). In axenischen Oregon-R Weibchen konnte eine erhöhte lokomotorische Aktivität bereits nachgewiesen werden (Schretter *et al.*, 2018). Diese Hyperaktivität konnte durch eine Monoassoziation mit *L. brevis* revidiert werden, da dieses Bakterium mithilfe des Enzyms Xylose Isomerase auf den Zuckermetabolismus der Fliege einwirkt (Schretter *et al.*, 2018). KH oder mit *L. brevis*-reassoziierte Tiere, als auch axenische Fliegen, denen dieses Enzym über die Nahrung zugeführt wurde, wiesen im Gegensatz zu axenischen Kontrolltieren eine geringere Aktivität, sowie einen verringerten Trehalosegehalt auf (Schretter *et al.*, 2018).

Im Vergleich dazu, waren in drei biologisch unabhängigen Experimenten zwischen den KH und axenischen white[-] Fliegen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Hier scheint das Fehlen des Darmmikrobioms keinen Einfluss auf die motorische Aktivität zu haben. Ähnliche Ergebnisse erzielten Selkrig und Kollegen, welche beschrieben, dass axenische männliche Canton-S Fliegen in der ersten axenischen Generation kaum lokomotorische Unterschiede zu den Kontrollen zeigten und erst in der zweiten Generation eine leicht erhöhte Aktivität der axenischen Tiere zu erkennen war (Selkrig et al., 2018). Diese Unterschiede wurden jedoch als so gering angesehen, dass hier der Schluss gezogen wurde, dass das Mikrobiom keinen starken und konsistenten Einfluss auf die Aktivität der Fliegen hat. Auch wenn zwischen den hier getesteten KH Fliegenstämmen keine signifikanten Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität bestanden, ist es dennoch interessant, dass sich die L. brevis Mengen signifikant in den hier durchgeführten qPCR Analysen zwischen adulten Oregon-R und white[-] Fliegen unterschieden (siehe 2.3.4 Abb. 44). Wie diese Unterschiede in der Mikrobiomkomposition die lokomotorische Aktivität in axenischen Tieren beeinflussen muss weiter untersucht werden. Möglicherweise besteht eine stärkere Abhängigkeit zwischen Oregon-R Fliegen, ihrem Mikrobiom und der Xylose Isomerase-Expression dieser Bakterien, so dass der axenische Status die Tiere stärker beeinflusst, sie einen höheren Trehalosegehalt besitzen und die Hyperaktivität sichtbar wird. Schlussendlich scheinen auch hier die verwendeten Fliegenlinien einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang des Experiments zu haben, was eine Generalisierung der Ergebnisse erschwert, was auch die unterschiedlichen publizierten Ergebnisse erklärt (Schretter *et al.*, 2018; Selkrig *et al.*, 2018). Möglicherweise besteht ein Unterschied im Kohlenhydratmetabolismus zwischen den zwei hier getesteten Fliegenlinien, so dass sich der Trehalosegehalt in KH und axenischen *white[-]* nicht so stark unterscheidet wie in Oregon-R und dadurch kein Unterschied in der lokomotorischen Aktivität gemessen werden konnte. Dies muss jedoch noch näher untersucht werden. Auch eine Messung der lokomotorischen Aktivität auf Futtern mit anderen Zuckerquellen, die eine Änderung im Trehalosegehalt bewirken, könnte Aufschluss darüber geben, wie das Darmmikrobiom mit dem Kohlenhydratmetabolismus von *Drosophila* interagiert.

In Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Verpflanzung eines Mikrobioms von Autismus-Patienten auch in Mäusen typische Symptome von Autismus hervorruft (Sharon *et al.*, 2019). Dazu gehörten unter anderem eine reduzierte lokomotorische Aktivität im Vergleich zu Tieren mit einem normalen Mikrobiom, was eine Verbindung des Darms/Darmmikrobioms mit dem Gehirn des Wirts darstellen könnte. Solch eine Interaktion zwischen dem Darmmikrobiom und dem Verhalten konnte hier in der Oregon-R Fliegenlinie ebenfalls nachgewiesen werden, indem die Tiere ohne Mikrobiom mit konventionell gehaltenen Tieren verglichen wurden. Die Verbindung von Darm und Gehirn wird in *Drosophila* zur Zeit näher analysiert und könnte in Zukunft Aufschluss über diese Interaktion von Darmmikrobiom und Gehirn bzw. Verhalten geben (Fischer *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2017).

3.3.4 Einfluss des Wirts auf die Mikrobiomkomposition

Eine große Frage in der Mikrobiomforschung ist, wie die Komposition des Mikrobioms geformt wird. Ist sie z. B. nur von Umwelteinflüssen und der Diät abhängig oder hat der Wirt auch die Möglichkeit die Komposition mitzugestalten. Bisher ist die geläufige Meinung zur Interaktion des Mikrobioms mit Drosophila, dass die Bakterien nur transient mit dem Wirt verbunden sind und so nur eine passive Interaktion stattfindet, die stark von den gegebenen Umweltbedingungen abhängig ist (Blum et al., 2013; Martino et al., 2018; Staubach et al., 2013). Dennoch wurde in zahlreichen Experimenten gezeigt, dass das Darmmikrobiom oder einzelne bakterielle Vertreter einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung, den Metabolismus und bestimmte Signaltransduktionswege haben (Keebaugh et al., 2018; Ma et al., 2019; Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011). Es ist nur schwer vorstellbar, dass eine solch starke Interaktion zwischen Wirt und Mikrobiom nur transient sein soll. Sinnvoller wäre, dass Drosophila in der Lage wäre diese wichtige Symbiose auch in Situationen aufrechtzuerhalten, die keine erneute Aufnahme des Mikrobioms zulassen, wie z. B. unter Nahrungsmangel, um den positiven Effekt dieser Symbiose für ihre Entwicklung oder Fortpflanzung zu gewährleisten. Early und Kollegen konnten bereits zeigen, dass Drosophila, je nach Genotyp, einen unterschiedlichen Einfluss auf den Gehalt reassoziierter Bakterien hat (Early et al., 2017). Am wahrscheinlichsten scheint eine Kombination aus extrinsischen (z. B. der Diät) und intrinsischen Faktoren (z. B. des Genotyps) zu sein, die gemeinsam einen Einfluss auf die Mikrobiomkomposition haben. In dieser Studie wurden zwischen white[-] und Oregon-R Fliegen trotz identischer Haltungsbedingungen Unterschiede in der Mikrobiomkomposition, wie auch im Bakteriengehalt festgestellt. Um nun zu testen,

ob der Wirt oder die Umweltbedingungen die Mikrobiomkomposition beeinflussen, wurde ein Mikrobiom-Austauschexperiment durchgeführt (siehe 2.3.5). Dazu konnten sich axenische *white[-]* und Oregon-R Fliegen im selben Futterröhrchen und auf dem selben Mikrobiom in paralleler Haltung in einem Container entwickeln (siehe Methoden 5.1.8). Die Futterröhrchen wurden dafür durch männliche *white[-]* oder Oregon-R Fliegen durch ihre Faeces mit Bakterien inokuliert, bevor eine Mischung von axenischen Embryonen beider Stämme auf dieses Futter gegeben wurde.

Die larvalen Tiere dieses Experiments zeigten in qPCR Analysen sehr ähnliche Mikrobiomzusammensetzungen, wenn sie sich in einem Futterröhrchen entwickelt hatten (siehe 2.3.5.1 Abb. 47, 48). Da das Hauptaugenmerk bei Larven auf der schnellen Gewichts- und Größenzunahme liegt (Aguila et al., 2007; Church and Robertson, 1966), nehmen sie in kurzer Zeit sehr viel Futter (und hiermit auch sehr viele Bakterien) auf, was erklären könnte, warum die Darmmikrobiome sich zwischen den Fliegenlinien, die sich auf denselben vorinokulierten Futtern entwickelten, nicht sehr stark unterscheiden. Dies zeigt, dass die Mikrobiomkomposition in der larvalen Phase durch Aufnahme während des Fressens geformt wird. Es ist bereits bekannt, dass die Mikrobiomkomposition durch die Aufnahme der Bakterien über die Nahrung beeinflusst wird (Chandler et al., 2011; Staubach et al., 2013). Jedoch nehmen die Tiere während der Verpuppung und Entwicklung zum adulten Tier keine weitere Nahrung auf, welche das Darmmikrobiom von außen beeinflussen könnte. Während des Eintritts in die Metamorphose reduziert sich die Bakterienzahl in den Puppen, welche mit einer erhöhten Expression verschiedener antimikrobieller Peptide korreliert (Broderick and Lemaitre, 2012; Samakovlis et al., 1990; Tryselius et al., 1992). Dies könnte ein Mechanismus der Fliege sein, die Bakterienzahl zu reduzieren, bevor der adulte Darm in der Metamorphose gebildet wird (Broderick and Lemaitre, 2012). Der larvale Darm wird während der Metamorphose fast vollständig aufgelöst und durch adulte Darm-Vorläuferzellen neu gebildet (Aghajanian et al., 2016; Broderick and Lemaitre, 2012; Takashima et al., 2011). Hierbei wird der larvale Mitteldarm aber nicht vollständig histolysiert, sondern wird in der Puppe erhalten, um welchen sich später der adulte Mitteldarm entwickelt (Takashima et al., 2011). Hier wird ebenfalls das Meconium gebildet, was als Reservoir für das Mikrobiom dienen kann, um die Bakterien so in die adulten Tiere zu übertragen (Broderick and Lemaitre, 2012). Es ist durchaus vorstellbar, dass diese Neubildung des Darms und die Aktivität des Immunsystems vor der Metamorphose einen Einfluss auf die Mikrobiomkomposition haben.

Zur Analyse dieses adulten Mikrobioms wurde der gleiche Mikrobiomaustausch mit adulten *white[-]* und Oregon-R Fliegen wiederholt. In den einzelnen Wiederholungen dieses Experiments zeigten sich teilweise große Unterschiede in der Abundanz der einzelnen Bakterienspezies. Einerseits zeigten die Fliegen, die sich auf dem selben Mikrobiom entwickelt hatten nach ein und zehn Tagen nach dem Schlüpfen ein sehr ähnliches Mikrobiom, andererseits konnten Unterschiede zwischen *white[-]* und Oregon-R Fliegen aus dem gleichen Futterröhrchen detektiert werden. Hier veränderte sich die Komposition mit zunehmendem Alter der Tiere unterschiedlich zwischen den Fliegenlinien, obwohl während der Entwicklung das selbe Darmmikrobiom aufgenommen wurde (siehe 2.3.5.2 Abb. 49, 50 und Anhang 6.4 Abb. 70).

Diese Diskrepanzen in den Ergebnissen könnten dadurch zustande kommen, dass für die Inokulation des vorher Bakterien-freien Fliegenfutters männliche Fliegen unterschiedlichen Alters verwendet wurden. Es wurde bereits beschrieben, dass sich das Mikrobiom in *Drosophila* Fliegen mit dem Altern der Tiere in seiner Komposition verändert (Clark *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2011). Dadurch wurden über die Faeces möglicherweise auch unterschiedliche Mikrobiomkompositionen an die jeweiligen axenischen Embryonen von *white[-]* und Oregon-R übertragen. So könnte eine bestimmte Mikrobiomkomposition in der Entwicklung der Larven vorteilhaft sein, wird aber dann für die Fortpflanzung von den adulten Tieren angepasst, welche sich zwischen *white[-]* und Oregon-R Fliegen unterscheiden kann. Je nachdem welches Alter die Fliegen zur Inokulation hatten, musste das Mikrobiom dann noch dementsprechend von den adulten Fliegen mehr oder weniger verändert werden, was sich in der PCA widerspiegelte (siehe 2.3.5.2 Abb. 50). Dies zeigt, dass das Mikrobiom nicht ausschließlich durch familiäre Transmission unverändert übertragen wird, sondern die Fliege in bestimmter Weise einen Einfluss auf die Mikrobiomkomposition haben muss.

Die in dieser Studie durchgeführten Versuche zum Einfluss des Immunsystems auf die Komposition zeigten jedoch keine signifikante Induktion der drei getesteten antimikrobiellen Peptide durch das fremde Mikrobiom (siehe 2.3.5.3 Abb. 52). Unterschiede konnten jedoch in der basalen Aktivität des Immunsystems der beiden Fliegenlinien festgestellt werden (Abb. 51). Die cecropin A2 Expression war in Oregon-R Fliegen nach einem und 10 Tagen jeweils ca. dreifach bzw. doppelt so hoch, wie in white[-] Fliegen des gleichen Alters. Möglicherweise wird so das Mikrobiom in Oregon-R stärker reguliert. Eine erneute Untersuchung der AMP-Expression mit Darm-spezifischer RNA im Gegensatz zu der RNA kompletter Tiere könnte in der Zukunft noch genauere Informationen liefern. Die Tatsache, dass das Mikrobiom von den Larven aus der Umwelt aufgenommen wird und sie sich anschließend zu adulten Tieren entwickeln zeigt, dass eine externe Perturbation der Mikrobiom-komposition die Entwicklung der Tiere nicht einschränkt. Im Hinblick auf einen medizinischen Mikrobiomtransfer in Menschen (über z. B. Fäkaltransplantation) ist dies ein wichtiger Anhaltspunkt, um sicherzustellen, dass ein transferiertes Mikrobiom die Möglichkeit hat im Wirt zu verbleiben und nicht (direkt) vom Wirt in die ursprüngliche und unerwünschte, "kranke" Komposition verändert zu werden. Obwohl es den Anschein macht, das Fliegen ihr Mikrobiom nur passiv aufnehmen und dieses nur transient mit dem Wirt verbunden ist (Blum et al., 2013), konnte in dieser Arbeit in mehreren unabhängigen Experimenten festgestellt werden, dass Fliegen der Linie Oregon-R einen geringeren Bakteriengehalt aufwiesen (siehe 2.3.4 Abb. 44 und 2.3.6.1 Abb. 54). Wenn die Fliegen jedoch ihr Mikrobiom ausschließlich passiv aus der Umwelt und von anderen Fliegen aufnehmen, sollten die Schwankungen im Bakteriengehalt in allen Fliegenlinien je nach Umweltbedingung ähnlich sein. Daher wurde nach weiteren Gründen gesucht, die diese Unterschiede erklären könnten. Wie die Anzahl der abgelegten Faeces, mit welchen Bakterien ausgeschieden werden (Fink et al., 2013), oder die Menge der Futteraufnahme, mit welcher Bakterien wieder aufgenommen werden (siehe 2.3.4 Abb. 45, 46). Hier bestand jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Fliegenlinien. Eine unterschiedliche Anzahl von Bakterien in den Faeces von white[-] und Oregon-R wäre allerdings denkbar. Hier wäre eine vergleichende

Analyse der Bakterien in den Faeces mittels qPCR möglich. Diese Methode wurde bereits etabliert und lieferte vergleichbare Ergebnisse über die Mikrobiomkomposition, wie Proben aus ganzen Tieren oder Därmen (Fink *et al.*, 2013). Auch kann eine visuelle Quantifizierung der Bakterien in den Faeces mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt werden (siehe 2.1.8). Eine Futterquantifikation über nichtabsorbierende Farbstoffe, wie sie in dieser Studie verwendet wurden, ist oft nicht exakt genug, da die Farbstoffe in Langzeitmessungen (mehr als 30 min) wieder ausgeschieden werden oder die Fliegen einen sehr unregelmäßigen Fressrhythmus haben, was Kurzzeitmessungen erschwert (Deshpande *et al.*, 2014). Eine Quantifizierung mit radioaktiv-markiertem Futter kann auch über längere Messzeiten durchgeführt werden, wodurch die Messungen präziser sind (Deshpande *et al.*, 2014).

3.3.5 Persistenz des Darmmikrobioms

Da die hier durchgeführten Messungen keine Unterschiede in der Futteraufnahmemenge oder der Faeces-Anzahl ergaben, wurde nach einem anderen Grund für die unterschiedlichen Bakterienzahlen gesucht. Dazu wurde getestet, wie schnell die Fliegen ihr Darmmikrobiom verlieren, wenn sie es nicht von außen erneuern können. Bisher veröffentlichte Daten geben an, dass im Labor-gehaltene *Drosophila* ihr Darmmikrobiom durch regelmäßige orale Aufnahme erneuern müssen und nur so eine normale Darmflora aufbauen bzw. erhalten können (Blum *et al.*, 2013). Daher wurde die Hypothese untersucht, ob die Fliegen, nachdem sie durch eine normale Entwicklung ein Mikrobiom aufgebaut hatten, es im Umkehrschluss auch wieder verlieren würden, wenn sie es nicht über die Nahrung erneuern können und ob Fliegen mit weniger fest assoziiertem Mikrobiom die Bakterien schneller verlieren.

Wie in 2.3.6.1 Abb. 53 zu erkennen, verloren die *white[-]* bzw. Oregon-R Männchen, die ab einem Alter von sechs Tagen zweimal täglich auf neues Futter transferiert wurden, innerhalb weniger Tage 20 bis 40 % bzw. 60 bis 80 % ihres Mikrobioms. Kontrolltiere, die dauerhaft auf dem selben Futter verblieben, zeigten konstante bzw. steigende Bakterienzahlen. Unerwarteterweise stiegen die koloniebildenden Einheiten im weiteren Verlauf des Experiments wieder, obwohl die Fliegen weiterhin auf neues Futter transferiert wurden und keine neuen Bakterien aus dem Futter aufgenommen werden konnten. Broderick und Kollegen haben gezeigt, dass in alternden Fliegen, der Bakteriengehalt im Darm deutlich ansteigt (Broderick *et al.*, 2014), was durch eine Dysfunktion der Barrierefunktion der Darmschleimhaut zustande kommt (Clark *et al.*, 2015). Auch der Zusammenbruch der Immunregulation im gealterten Epithelium des Darms führt zu einer weiteren Expansion der bakteriellen Zahlen (Clark *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2014). Jedoch sind diese Phänotypen in deutlich älteren Tieren sichtbar geworden (30 bis 40 Tage alt). In dieser Studie stiegen die bakteriellen Zahlen, allerdings schon ab einem Alter von 13-16 Tagen wieder deutlich an (siehe Abb. 53). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein Teil der Bakterien in der Lage ist im Darm der Fliege zu verbleiben, zu proliferieren und so unter Stressbedingungen die Bakterienzahl wieder zu erhöhen.

Auch Pais und Kollegen fanden, im Gegensatz zur vorherrschenden Meinung, in wilden *Drosophila*, ein Bakterium, das stabil mit dem Darm der Fliegen assoziiert ist (Pais *et al.*, 2018). Diese *Acetobacter*-Art (*A. thailandicus*), konnte in keiner der hier durchgeführten Mikrobiom-Sequenzierungen, sowohl in DGRP

Linien, als auch *white[-]* und Oregon-R detektiert werden. Da aus *white[-]* und Oregon-R jedoch nur die Bakterien sequenziert wurden, die auf ACE- bzw. MRS-Agarplatten gewachsen waren, wäre es jedoch möglich, dass *A. thailandicus* andere Wachstumsbedingungen bevorzugt und daher hier nicht nachgewiesen werden konnte. Der Vorteil der hier durchgeführten Sequenzierung der auf den Agarplatten gewachsenen Bakterien ist, dass die exakte Mikrobiomkomposition für weiterführende Experimente bekannt ist. Dafür wurde aus den gewachsenen Kolonien nicht nur DNA extrahiert, sondern diese auch als Glycerinkulturen für eine spätere Anzucht und Reassoziation mit axenischen Embryonen verwendet, um den Einfluss dieser Bakterien auf die Entwicklung der Fliegen zu untersuchen (siehe 2.3.7).

Neben A. thailandicus könnten auch andere Acetobacter- oder Lactobacilli-Spezies in der Lage sein im Darm der Fliege zu persistieren. In den hier durchgeführten Sequenzierungen der auf den MRS- und ACE-Agarplatten gewachsenen Bakterien (siehe 2.3.6.2 Abb. 57-59), konnten sowohl zwei Lactobacillus-Arten (L. brevis und L. plantarum), als auch eine Acetobacter-Art (A. indonesiensis) in den sechs Tage alten Fliegen und in den transferierten Fliegen in einem Alter von neun bzw. 13 und 23 Tagen nachgewiesen werden. Möglicherweise sind daher diese Arten nicht nur transient mit dem Darm der Fliege assoziiert, sondern haben Strategien entwickelt den Darm dauerhaft zu besiedeln. Inamine und Kollegen haben gezeigt, dass Fliegen, die als Embryonen mit jeweils einer Bakterienspezies reassoziiert wurden und anschließend regelmäßig auf neues Futter gesetzt wurden, die Bakterien ebenfalls unterschiedlich schnell verlieren bzw. diese in der Fliege persistieren können (Inamine et al., 2018). Die Zahlen von A. tropicalis, L. brevis und L. plantarum blieben über einen Zeitraum von sechs Tagen stabil, wohingegen die Zahl von A. pomorum und L. fructivorans durch das Umsetzen zurückging (Inamine et al., 2018). Wo und mit welchen Mechanismen die Bakterien in der Lage sind im Darm zu persistieren und zu proliferieren ist noch nicht erforscht. Die Mikroskopieaufnahmen der neun Tage alten transferierten Fliegen zeigten keine spezifische Region im Darm, in der Bakterien gehäuft auftraten, sondern eine geringe Bakterienzahl über den gesamten Darm (siehe 2.3.6.4 Abb. 62, 63). Da hier nur das gesamte Darmmikrobiom mit dem DNA-Farbstoff ToPro1 visualisiert wurde, wäre es von Interesse in zukünftigen Experimenten, die Distribution einzelner Spezies im Darm zu untersuchen. Dafür wäre die Analyse mittels FISH geeignet, da durch spezifische Sonden verschiedene bakterielle Genera oder Spezies unterschieden werden können (siehe 2.1.8).

3.3.6 Das perturbierte Mikrobiom behält seinen wachstumsfördernden Effekt bei

Die Veränderungen im Bakteriengehalt und vor allem der Anstieg der Bakterienzahlen in den transferierten Fliegen können als eine Art *in vivo* Selektion oder als evolutionärer Prozess beschrieben werden. Dies kann Veränderungen in der Mikrobiomkomposition, aber auch funktionale Unterschiede der Bakterien nach sich ziehen. Die Sequenzierungen der auf den MRS- und ACE-Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien aus nicht transferierten und transferierten Fliegen zeigten Unterschiede in der bakteriellen Mikrobiomkomposition (siehe 2.3.6.2 Abb. 57-59). Bei den Sequenzierungen der Bakterien von den MRS-Agarplatten waren Unterschiede bei *white[-]* und Oregon-R im Alter von 23 Tagen zu erkennen. Bei den ACE-Agarplatten waren die Unterschiede in der Komposition dagegen bei neun und 13 Tagen am stärksten.

An diesem Zeitpunkt war die Bakterienzahl in den beiden Fliegenlinien in den transferierten Fliegen am niedrigsten. Die Sequenzierung der Bakterien aus 23 Tage alten Fliegen zeigte dagegen kaum noch Unterschiede im Mikrobiom zwischen nicht transferierten und transferierten Tieren. Möglicherweise sind die hier gewachsenen *Acetobacteraceae* (hauptsächlich auf ACE-Agarplatten) bereits früher von der von außen einwirkenden Perturbation beeinflusst als die hauptsächlich auf MRS-Agarplatten gewachsenen *Lactobacilli*.

Um neben den Unterschieden in der Komposition auch den Einfluss der Perturbation auf die wachstumsfördernden Eigenschaften der Bakterien zu untersuchen, wurden axenische Embryonen mit den von den Agarplatten isolierten Bakterien reassoziiert. Es wurde angenommen, dass durch den Transfer auf neues Futter eine Selektion stattfindet, durch welche die Bakterien ihren wachstumsfördernden Effekt entweder verlieren oder noch verstärken würden. Da wahrscheinlich nicht nur die Komposition der Mikrobiome, sondern auch die Zahl der Bakterien einen Einfluss auf die Entwicklung der Fliegen hat, wurden axenische Embryonen mit verschiedenen Mengen Bakterien (100 μ L OD₆₀₀ = 1 oder OD₆₀₀ = 25) reassoziiert. Da die Reassoziationen nicht nur mit einer Bakterienart, sondern mit einem komplexen Gemisch verschiedener isolierter Bakterien durchgeführt wurde, war die Quantifizierung mittels optischer Dichte (OD₆₀₀) am effizientesten. Auch wenn die Quantifizierung mittels OD₆₀₀ je nach Bakteriengröße und Lichtdurchlässigkeit variieren kann, sind die absoluten Zellzahlen bei gleicher OD₆₀₀ ungefähr gleich (Newell and Douglas, 2014). Dabei zeigten die Ergebnisse, dass eine größere Menge an Bakterien einen deutlich besseren wachstumsfördernden Effekt besitzt als eine geringe Bakterienzahl (siehe Anhang 6.6 Abb. 72, 73). Dieser positive Zusammenhang von Bakterienzahl und Entwicklung der Larven wurde bereits von Keebaugh und Kollegen beschrieben. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass Bakterien unter Mangelbedingungen als Proteinquelle für die Fliegen dienen und so die Entwicklung unterstützen (Keebaugh et al., 2018). In diesem Fall sollte ausschließlich die Menge an Bakterien und nicht die Komposition des Mikrobioms ausschlaggebend sein.

Um einen Vergleich des wachstumsfördernden Effekts der verschiedenen Bakterien zu haben, wurde als Negativkontrolle das Wachstum von Embryonen untersucht, die mit Embryowash (nicht vollständig steril) bzw. mit Bleiche und Ethanol axenisch gemacht wurden (siehe 2.3.7 Abb. 64). Hier zeigte sich, dass die Reassoziation mit den Bakterien die Zeit bis zur Verpuppung im Vergleich zu axenischen Embryonen deutlich verkürzt. Im Gegensatz dazu entwickelte sich die Positivkontrolle, in welcher die Larven sich von mit Faeces vorinokuliertem Futter ernährten, in einer ähnlichen Geschwindigkeit wie die reassoziierten Larven. Die Larven auf dem vorinokulierten Futter gaben so einen Bezugspunkt zur Entwicklungszeit von "konventionell reassoziierten" Larven, da unbekannt war, wie viele Bakterien zu einer "normalen" Entwicklung nötig sind.

Es konnte nicht bestätigt werden, dass die Bakterien durch die Selektion ihren wachstumsfördernden Effekt verlieren. Im Gegenteil zeigten die Ergebnisse, dass die Bakterien der transferierten Fliegen mitunter den stärksten wachstumsfördernden Effekt besaßen (siehe Abb. 64). Auch eine Perturbation des Mikrobioms durch niedrige Dosen eines Oxidationsmittels (Tert-butyl-hydroperoxid) oder eines Antibiotikums im

larvalen Stadium hatten einen positiven Effekt auf das Darmmikrobiom (Obata *et al.*, 2018). Die Zahl verschiedener *Acetobacter*-Arten wurde dezimiert und die Mikrobiomkomposition im Darm der Fliege dadurch so verändert, dass die Lebensspanne der Fliegen um bis zu 30 % verlängert wurde und keine negativen Effekte für den Wirt auftraten. Gleichzeitig erhöhte sich der Gehalt an *L. plantarum* im Darm der Fliegen und diese stabil veränderte Mikrobiomkomposition konnte sogar an die folgende Generation weitergegeben werden (Obata *et al.*, 2018).

Die hier erzielten Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass eine Selektion des Mikrobioms durch den Verlust großer Teile der Darmbakterien durch regelmäßigen Transfer weiterhin einen Vorteil für den Wirt darstellen und der positive Effekt des Darmmikrobioms potentiell sogar noch verstärkt wird. Dieser Mechanismus, könnte auch in der Natur dem Wirt in Stresssituationen einen essentiellen Vorteil bieten, um das Überleben der nächsten Generation zu sichern.

3.4 Fazit und Ausblick

Die Analysen zur Interaktion von Drosophila melanogaster mit ihrem Darmmikrobiom und der Vergleich mit bereits publizierten Ergebnissen haben gezeigt, dass Generalisierungen von Ergebnissen über die Wirt-Symbiont-Beziehung selbst in so einfachen Modellorganismen wie Drosophila schwierig sind, da sie durch multiple Faktoren beeinflusst werden können. Obwohl das Drosophila Darmmikrobiom aus deutlich weniger bakteriellen Spezies besteht als z. B. in Säugern, gibt es selbst hier in der Komposition deutliche Unterschiede, die durch die Haltungsbedingungen, Nahrungsangebote und andere Umweltbedingungen beeinflusst werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Genotyp der Fliege ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, wenn die Interaktionen zwischen Wirt und Mikrobiom analysiert werden. Der Genotyp der Fliege war in Analysen der Mikrobiomkomposition, des Bakteriengehalts und des Einflusses des Darmmikrobioms auf die Entwicklung, die lokomotorische Aktivität und den Metabolismus, sowie die Persistenz der Bakterien ein entscheidender Faktor. Dieser Faktor wird allerdings in den meisten Publikationen vernachlässigt und Ergebnisse, die nur anhand eines Drosophila Genotyps erzielt werden, als universell übertragbare Fakten dargestellt. So decken sich die hier erzielten Ergebnisse teilweise mit publizierten Daten, zeigen aber auch deutliche Unterschiede, die wahrscheinlich in der Verwendung unterschiedlicher Fliegenlinien begründet sind. Dies beweist, dass selbst in einem so simplen Modellorganismus wie Drosophila melanogaster während der Interpretation der Ergebnisse die Variabilität durch verschiedene Genotypen in Betracht gezogen werden muss.

Die Analysen der Interaktion sind durch zahlreiche Varianzen wie dem Futter, den Haltungsbedingungen im Labor, dem Genotyp des Wirts, der Mikrobiomkomposition und anderen Umweltbedingungen beeinflusst, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse zusätzlich erschwert. Es wäre daher nötig, verschiedene Parameter zu vereinheitlichen, um die Varianzen zu minimieren. Die Verwendung eines chemisch definierten Futters, welches für die Haltung von *Drosophila* entwickelt wurde, könnte die Differenzen im Nährstoffgehalt eliminieren (Piper *et al.*, 2014). Mit Hilfe dieses Futters kann der Einfluss des Mikrobioms auf den Wirt unter definierteren Bedingungen untersucht werden und gezielt Nährstoffe wie z. B. essentielle Aminosäuren

Fazit und Ausblick

oder Cholesterol entfernt werden und so der wachstumsfördernde Effekt des Mikrobioms unter bestimmten Mangelbedingungen im Vergleich zu axenischen Fliegen oder der Vor- oder Nachteil einer Reassoziation mit einer bestimmten bakteriellen Spezies untersucht werden.

Zurzeit besteht die Ansicht, dass das Mikrobiom nur transient mit der Fliege verbunden ist. Die Persistenz des Darmmikrobioms konnte bisher noch nicht für in Labor-gehaltenen *Drosophila* gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass Bakterien des Darmmikrobioms anders als zuvor angenommen, stabile Assoziationen mit dem Wirt eingehen, welche in Stresssituationen die Nährstoffversorgung und Entwicklung sichern können. Durch die Analyse dieser möglichen stabilen Assoziationen können womöglich weiterführende Schlüsse zur Interaktion von höheren Organismen wie Säugetieren mit ihrem Darmmikrobiom gezogen werden, was für die Therapie von Dysbiosen im Menschen von essentieller Bedeutung wäre.

Diese Studie hat mehrfach gezeigt, dass der Genotyp der Fliege eine entscheidende Rolle in der Interaktion mit dem Mikrobiom darstellt, so dass in zukünftigen Untersuchungen mehrere Fliegenstämme vergleichend getestet werden sollten, um Ergebnisse zu erzielen, die generalisierbar sind. Auch würden Sequenzierungen der Genome von z. B. *white[-]* und Oregon-R und Transkriptom-Analysen Aufschluss darüber geben, warum die Interaktionen mit den Darmbakterien zwischen verschiedenen Fliegenstämmen so unterschiedlich ausfallen. Der offensichtliche Unterschied zwischen *white[-]* und Oregon-R ist das *white* Gen. Durch Deletion oder Überexpression dieses Gens könnte dessen Rolle in der Interaktion mit dem Mikrobiom untersucht werden. Auch die genetische Charakterisierung der Darmbakterien kann weitere Einblicke in die Interaktion geben, wenn diese z. B. Stamm-spezifisch sind. Über Genomanalysen können so Mutationen, Deletionen oder neu erworbene Gene zwischen verschiedenen Bakterienstämmen identifiziert werden, die die Interaktion mit dem Wirt beeinflussen. Auch Bibliotheken von Bakterienmutanten sind sehr gut geeignet um in Expressionsanalysen mikrobielle Produkte zu bestimmen, die auf den Wirt Einfluss nehmen (Matos *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2011).

Neben den Einflüssen des Genotyps auf zahlreiche Ergebnisse, konnte das Mikrobiom jedoch zwischen den Fliegenstämmen übertragen werden. Es hat sich gezeigt, dass die Komposition des übertragenen Mikrobioms während der larvalen Entwicklung relativ unverändert bleibt, in den adulten Tieren sich aber zwischen den verschiedenen Fliegenstämmen unterschiedlich verändert. Hier entsteht eine größere Variation in der Mikrobiomkomposition die so möglicherweise zu den unterschiedlichen Ausprägungen z. B. im Metabolismus oder der Persistenz der Bakterien führt. So sind wahrscheinlich je nach Entwicklungsstadium des Wirts unterschiedliche Interaktionen mit dem Mikrobiom wichtig. In der Larve sind die Nährstoffzufuhr und Wachstumssignale der Bakterien wichtig, wohingegen in adulten Tieren, die Fortpflanzung und die Fitness durch eine bestimmte Mikrobiomkomposition gefördert werden, die je nach Genotyp unterschiedlich ausfällt. Im Hinblick auf die Therapie einer Mikrobiomdysbiose durch Antibiotika oder Fäkaltransplantationen, ist es daher von großer Bedeutung zu verstehen, welche Funktionen das Mikrobiom in bestimmten Lebensstadien hat und wie stabil das "neue" Mikrobiom mit einem bestimmten Genotyp des Wirts assoziiert ist und seine Funktionen im neuen Wirt übernimmt.

4 Material

4.1 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller	
Accu-Jet Pro	Brand	
Arktik Thermal PCR Cycler	Thermo Scientific	
Autoklav VX-95	Systec	
Axiophot, Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	
Bioruptor Next Gen	Diagenode	
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad	
Ecotron, Brutschrank	Infors HT	
Fast Prep FP120 BIO101	Savant	
Gelelektrophoresekammer	Biozym	
Glaskügelchen (Glass beads), 425-600 μm	Sigma Life Science	
Handhomogenisator, Kontes™ Pellet Pestle™ Motor	Kimble Chase	
Handpistille	NeoLab	
Heizblock	Bioer Technology Co.,LTP	
Inkubator Infors GT Ecotron	Infors AG	
Inkubator IPP110Plus	Memmert	
Inkubator Heraeus B12	Thermo Scientific	
Intas Gelimager iX	Intas	
Keramikkugeln, 7 mm	Sturm Präzision GmbH	
LSM 710, Konfokalmikroskop	Zeiss	
Magnetrührer mit Heizplatte, MR 3001	Heidolph	
Magnetrührer mit Heizplatte, VMS-A	VWR	
Magnetrührer VMS-A	VWR	
Mikrowelle Sharp		
ano Drop 2000 c Spectrophotometer Thermo Scientific, Peqlab		
Peltier-Kühlbrutschrank IPP110	Memmert	
pH-Meter PB-11	Sartorius	
Pipette: 1.000 μL, 200 μL, 20 μL, 10 μl	BioHit	
Plattenlesegerät Synergy MX	BioTek	
CFX Connect Real-Time System	BioRad	
Rüttelzentrifuge Fast Prep FP120	Bio101 Savant	
Stereomikroskop EZ 4D	Leica	
Thermomixer compact	Eppendorf	
Tiefkühlschrank (-80 °C) Model 905	Thermo Scientific	
Trockenschrank Heratherm OGS100 Thermo Scientific		
Vortex Genie 2	Scientific Industries	
Waage, Kern ABJ80-4NM	Kern & Sohn	
Waage, Kern EW 2200-2NM	Kern & Sohn	
Wasserbad JB Academy JBA18	J Grant Instruments	

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Fresco21	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Pico21	Thermo Scientific

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Spezielle verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Polypropylen Fliegenröhrchen	VWR
Hard-shell PCR Plates 96-well, thin-wall	Biorad
PCR plate seal Microseal 'B' Film	Biorad
2 mL Schraubdeckel Röhrchen	Neolab

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien wurden über die Firmen Sarstedt oder Neolab bezogen.

4.3 Chemikalien und Futterkomponenten

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Futterkomponenten.

Bezeichnung	Hersteller	
Agar (Bacto)	Becton Dickinson	
Agarose	Biozym	
Albumin vom Rind (bovine serum albumin, BSA)	Sigma-Aldrich	
Ammoniumcitrat (NH_4) ₃ ($C_6H_5O_7$)	Alfa Aesar	
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem	
Apfelsaft (naturtrüb)	Fruchtstern, Netto	
Bleiche	DanKlorix Hygiene Reiniger	
Calciumchlorid Hexahydrat CaCl ₂ x 6H ₂ O	Sigma-Aldrich	
Casein-Hydrolysat	Sigma-Aldrich	
Citronensäure x H ₂ O	Sigma-Aldrich	
Chloroform CHCl ₃	VWR Chemicals	
Cycloheximid	Sigma-Aldrich	
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	AppliChem	
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	AppliChem	
Erythromycin	Sigma-Aldrich	
Essigsäure CH ₃ COOH	VWR Chemicals	
Ethanol, p.a. C₂H₅OH	ChemSolute	
Ethanol, technisch, vergällt C₂H₅OH	ZCL Uni Düsseldorf	
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA - Dinatriumsalz - Dihydrat	AppliChem	
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N,N'- tetraessigsäure (EGTA)	Applichem	
Fleischextrakt	Carl Roth	
Fluorescein-Natrium	Sigma-Aldrich	
Formamid	Invitrogen	
Frischhefe	Wonnemeyer Feinkost	
D-(+)-Glucose-Monohydrat C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	Sigma-Aldrich	

Bezeichnung	Hersteller
Glycerol C ₃ H ₈ O ₃	Carl Roth
Glycerol Reagenz	Sigma-Aldrich
Glycerol Standard Lösung	Sigma-Aldrich
Glykogen von der Rinderleber	Sigma-Aldrich
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt (Bacto)	Becton Dickinson
Immersol 518 F	Zeiss
Kaliumchlorid KCl	Grüssing GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Grüssing GmbH
Kanamycinsulfat	AppliChem
Magnesiumsulfat Heptahydrat MgSO ₄ x 7H ₂ O	AppliChem
Maismehl	Küchenmeister, Kaufland
Malzextrakt	Demeter
Mangan(II)-sulfat Monohydrat MnSO ₄ x H ₂ O	Alfa Aesar
D-Mannitol C ₆ H ₁₄ O ₆	AppliChem
Methyl-4-hydroxybenzoat, Nipagin	Sigma-Aldrich
Midori Green	Advanced Nippon Genetics Europe GmbH
Mowiol 40-88 (Poly(vinyl alcohol)	Sigma-Aldrich
Mowiol, DABCO	Carl Roth
Natriumacetat C ₂ H ₃ NaO ₂	Grüssing GmbH
Natriumchlorid NaCl	Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid Plätzchen NaOH	AppliChem
Paraformaldehyd	Grüssing GmbH
Pepton aus Casein (Trypsinverdau)	Carl Roth
Pepton (Bacto)	Becton Dickinson
Polenta	Alnatura
Propionsäure CH ₃ CH ₂ COOH	Acros Organic
Propylgallat	Sigma-Aldrich
D(+)-Saccharose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	VWR Chemicals & Roth
Salzsäure, technisch (37 %) HCl	ZCL Uni Düsseldorf
Schwefelsäure H ₂ SO ₄	VWR Chemicals
Sojamehl	Bauckhof
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Tris Base	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
Trockenhefe	Bruggemann
Trypton (Bacto)	Becton Dickinson
Tween 80	Sigma-Aldrich
Zuckerrübensirup	Grafschafter

4.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer.

Name	Inhalt
10x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4 add 1.000 mL vollentsalztes H ₂ O (VE)
50x TAE Puffer	242 g Tris base 57,1 mL Essigsäure 100 mL EDTA [0,5 M] (pH 8,0) add 1.000 mL vollentsalztes H ₂ O (VE)
Embryowash	1 mL Triton X-100 14 g NaCl Add 200 mL VE H ₂ O sterilfiltrieren
Squishing Puffer	10 mM Tris-Cl (pH 8,2) 1 mM EDTA 25 mM NaCl Sterilfiltrieren
Nipaginlösung	100 g Nipagin 700 mL 96 % Ethanol 300 mL VE H ₂ O
Lyse Puffer für Gram-positive Bakterien	20 mM Tris-Cl 2 mM EDTA 1,2 % Triton X-100 20 mg/mL Lysozym
Fixierpuffer (10 % PFA) ("RNA-fix")	100 mL 10x PBS 100 mL EGTA [0,5 M] (pH 8,0) 700 mL VE H ₂ O 100 g Paraformaldehyd erhitzen bis alles gelöst ist, abkühlen lassen anschließend mit HCl pH 7 einstellen mit VE H ₂ O auf 1.000 mL auffüllen vor Verwendung 1:2 mit 1x PBS verdünnen
Carnoy's Solution	60 % Ethanol (p.a.) 30 % Chloroform 10 % Essigsäure
Hybridisierungspuffer (H-Puffer) 2x konzentriert	10,51 g NaCl 20 mL Tris-HCl [0,2 M] (pH 7,5) 0,2 mL SDS [10 %] Add 100 mL VE H ₂ O Formamid je nach gewünschter Konzentration im 1x konzentrierten Puffer dazugeben
Waschpuffer-2 (W2-Puffer)	5,255 g NaCl 10 mL Tris-HCl [0,2 M] (pH 7,5) 0,1 mL SDS [10 %] Add 100 mL VE H ₂ O

Name	Inhalt
Resuspensionspuffer (R-Puffer)	0,146 g NaCl 10 mL Tris-HCl [0,2 M] (pH 7,5) Add 100 mL VE H ₂ O
Mowiol	für 50 mL 12 g Glycerol, puriss p.a. 12 mL VE H ₂ O 4,8 g Mowiol 4-88 24 mL Tris-HCI [0,2 M] (pH 7,5) 125 mg DABCO Mowiol 100 mg Propylgallat

4.5 Oligonukleotide und FISH Sonden

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zum Nachweis von Bakterienspezies in *Drosophila*. Diese wurden mit *Primer-Blast* designed oder aus bereits publizierten Quellen entnommen.

Organismus	Gen	Primername	Sequenz 5' – 3'	Größe	Quelle
Acetobacter	16S	At16S-For2	TCCCGCAAGGGACCTACA	147 bp	Diese Arbeit
tropicalis	rRNA	At16S-Rev2	TGTCACCGGCAGTCTCTCT		
Lactobacillus	16S	Lf16S-For2	TTGATGCTTGCATTAGCTTGACTTA	97 bp	Diese Arbeit
fructivorans	rRNA	Lf16S-Rev2	TCCAGGTGTTATCCCCTTCTTC		
Lactobacillus	recA	Lp-recA-For	CGTGGTCGGATCGTGGAAAT	133 bp	Diese Arbeit
plantarum		Lp-recA-Rev	CGGGGTCTAGTGCGTTTTCA		
Lactobacillus	recA	Lb_recA-F	GCAGTTGCCGAGGTCCAA	64 bp	(Stevenson
brevis		Lb_recA-R	CCAACGCATTTTCAGCATCA		<i>et al.,</i> 2006)
Acetobacter	16S	A.pas_For	GGCTTGAATGTAGAGGCTGCAA	73 bp	Diese Arbeit
pasteurianus	rRNA	A.pas_Rev	GCCATGCAGCACCTGTGTTA		
D. melanogaster	dfd	Dfd-for	GTAGCGAAGAAACCCACCAA	121 bp	(Early et al.,
(Referenzgen)		Dfd-rev	ACGCTCCACTCACCTCATTC		2017)

Tabelle 9: 16S rRNA- V3-V4-Primer zur Sequenzierung des Darmmikrobioms ohne Adaptersequenz und Primer zur Klonierung des gesamten 16S rRNA Gens in den TOPO TA Vektor.

Nr.	Name	Sequenz 5' – 3'	Größe	Quelle
1	S-D-Bact-0341-b-S-17	CCTACGGGNGGCWGCAG	464 bp	(Klindworth <i>et al.,</i> 2013)
2	S-D-Bact-0785-a-A-21	GACTACHVGGGTATCTAATCC		
3	S-D-Bact-0008-a-S-1/GM3F	AGAGTTTGATCMTGGC	1500 bp	(Klindworth <i>et al.,</i> 2013)
4	S-D-Bact-1492-a-A-16/GM4R	TACCTTGTTACGACTT		

Gen	Primername	Sequenz 5' – 3'	Größe	Quelle
Drosomycin	Droso_for	GCAGATCAAGTACTTGTTCGCCC	200	(Shibata <i>et al.,</i> 2013)
	Droso_rev	CTTCGCACCAGCACTTCAGACTGG		
Attacin B	AttB-DF	CATCGCCCAATCGTGCTACT	64	(Douglas <i>et al.,</i> 2011)
	AttB-DR	GGACCACTCGTCCACTTGCT		
Cecropin A2	cecro-DF	TGGCAAGAAAATCGAACGTGTTGGT	102	(Douglas <i>et al.,</i> 2011)
	cecro-DR	CCTCGAGCAGTGGCTGCAACA		
Diptericin A	dipteri-DF	GCAGTTCACCATTGCCGTCGC	133	(Douglas <i>et al.,</i> 2011)
	dipteri-DR	ACCGCCGCCTCCCTGAAGAT		
rp49	rp49_for	ATCGGTTACGGATCGAACAA	200	(Liu <i>et al.,</i> 2016)
(Referenzgen)	rp49_rev	GACAATCTCCTTGCGCTTCT		

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide zur Analyse der AMP Expression in Drosophila.

Tabelle 11: Verwendete FISH Sonden. Die Sonden Eub338 und Lacto722 wurden aus der Sonden-Datenbank *Probebase* (http://probebase.csb.univie.ac.at/node/8) entnommen. Die Sonde für *Acetobacter* wurde mithilfe des Webtools *decipher* (http://www2.decipher.codes/DesignProbes.html) hergestellt.

Name	Sequenz 5'-3'	Spezifität	Fluorochrom	Anregung/	Quelle
				Detektion	
Eub338	GCTGCCTCCCGT	Eubacteria	Atto425	485/464-488	(Alm <i>et al.,</i> 1996;
(S-D-Bact-	AGGAGT				Amann <i>et al.,</i>
0338-a-A-18)					1990)
Lacto722	YCACCGCTACAC	Lactobacillus	Atto594	633/640-750	(Alm <i>et al.,</i> 1996;
(S-G-Lacb-	ATGRAGTTCCAC				Sghir <i>et al.,</i>
0722-a-A-25)	т				1998)
Aceto	CGCCTTTGACCC	Acetobacter	Atto488	488/500-550	Diese Arbeit
	TCAGG				

4.6 Antibiotika

Tabelle 12: Verwendete Antibiotika in axenischen Fliegenfuttern.

Name	Konzentration der Stammlösungen	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/mL in H ₂ O	50 μg/mL
Erythromycin	50 mg/mL in Ethanol	50 μg/mL
Kanamycin	10 mg/mL in H ₂ O	50 μg/mL
Tetracyclin	25 mg/mL in Ethanol	50 μg/mL

4.7 Reagenzien, Enzyme, DNA-Farbstoffe

Tabelle 13: Verwendete Reagenzien, Enzyme und DNA-Farbstoffe.

Name	Hersteller
Amyloglukosidase (Aspergillus niger)	Sigma-Aldrich
EcoRI-HF	New England Biolabs
GeneRulerDNA Ladder Mix	Thermo Scientific
5x HF Puffer	New England Biolabs
Phusion HF Polymerase	New England Biolabs

Name	Hersteller
Lysozym von Hühnereiweiß	Fluka Analytical
Proteinase K	Thermo Scientific
Prolong [™] Gold antifade reagent	Invitrogen
RNase	Thermo Scientific
ToPro1 515/531	Invitrogen, Thermo Scientific
ToPro3 642/661	Invitrogen, Thermo Scientific

4.8 Molekularbiologische und metabolische Kits

Tabelle 14: Verwendete Kits.

Name	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN
QIAamp DNA mini Kit	QIAGEN
Glucose (GO) Assay Kit	Sigma-Aldrich
GoScript™ Reverse Transcriptase Mix	Promega
GoTaq qPCR Master Mix	Promega
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen
Triglycerides Reagent	Thermo Scientific

4.9 Nährmedien und Fliegenfutter

Tabelle 15: Nährmedien für Bakterien. Alle Medien wurden vor Verwendung bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Name	Menge/Bestandteile
MRS Medium (Lactobacilli)	10 g Pepton aus Casein
	10 g Fleischextrakt
	5 g Hefeextrakt
	20 g Glucose
	1 g Tween 80
	2 g K ₂ HPO ₄
	5 g Natriumacetat
	2 g Ammoniumcitrat
	0,2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,05 g MnSO ₄ x H ₂ O
	(15 g Agar)
	1000 mL VE H ₂ O
	рН 6,2 – 6,5
ACE Medium (Acetobacter) (Blum et al., 2013)	10 g Glucose
	15 g Pepton aus Casein
	8 g Hefeextrakt
	(15 g Agar)
	1000 mL VE H ₂ O
	Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min:
	5 mL Ethanol, 3 mL Essigsäure, 0,1 g Cycloheximid

Name	Menge/Bestandteile
Acetic Acid Bacterium Medium (Acetobacter	5 g Bactopepton
tropicalis)	5 g Hefeextrakt
	5 g Glucose
	1 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	(15 g Agar)
	1000 mL VE H ₂ O
	рН 6,6-7,0
YPM Medium (Acetobacter pasteurianus)	5 g Hefeextrakt
	3 g Pepton
	25 g Mannitol
	(12 g Agar)
	1000 mL VE H ₂ O
Luria Bertani (LB) Medium	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	10 g Bacto Trypton
	(15 g Agar)
	рН 7,5
	1000 mL VE H ₂ O
RAE Medium	40 g Glucose
	10 g Pepton
	10 g Hefeextrakt
	1 g Citronensäure x H ₂ O
	3.38 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	980 ml VE H ₂ O
	Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min:
	10 ml Essigsäure
	10 ml Ethanol (p.a.)

Tabelle 16: Verwendete Fliegenfutter.

Name	Menge/Bestandteile
Standardfutter	5 g Agar
	71 g Polenta
	9,5 g Sojamehl
	16,8 g Trockenhefe
	40 g Zuckerrübensirup
	45 g Malzextrakt
	1000 mL H ₂ O
	Nach dem Aufkochen und Abkühlen auf 60 °C
	15 mL Nipaginlösung (10 % in 70 % EtOH)
	4,5 mL Propionsäure
Axenisches Glucose-Hefe-Fliegenfutter (Newell et	20 g Trockenhefe
al., 2014)	22 g Glucose Monohydrat
	2,4 g Agar
	200 mL VE H ₂ O
	Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min:
	0,84 mL Propionsäure
	3 mL Nipaginlösung (10 % in 70 % EtOH)

Name	Menge/Bestandteile
Axenisches Glucose-Maismehl-Hefe Futter (Blum et	22 g Glucose Monohydrat
<i>al.,</i> 2013)	14 g Maismehl
	10 g Trockenhefe
	1,2 g Agar
	200 mL VE H ₂ O
	Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min:
	0,84 mL Propionsäure
	3 mL Nipaginlösung (10 % in 70 % EtOH)
Axenisches Maismehl-Hefeextrakt-Futter (Storelli et	16 g Maismehl
<i>al.</i> , 2011)	16 g Hefeextrakt
	1,64 g Agar
	200 mL VE H ₂ O
	Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min:
	0,84 mL Propionsäure
	3 mL Nipaginlösung (10 % in 70 % EtOH)
Axenisches Hefe-Futter (Shin et al., 2011)	69,7 g Maismehl
	96 g Saccharose
	Verschiedene Mengen Trockenhefe (2 %, 1 %, 0,5 %,
	0,25 %, 0,1 %)
	15 g Agar
	1000 mL VE H ₂ O
	Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min:
	0,84 mL Propionsäure
	3 mL Nipaginlösung (10 % in 70 % EtOH)
Apfelsaftagarplatten	40 g Agar
	17 g Saccharose
	1000 mL VE H ₂ O
	Aufkochen bis Saccharose und Agar gelöst sind
	340 mL Apfelsaft
	20 mL Nipaginlösung (10 % in 70 % EtOH)
Low sugar diet/High sugar diet (Backhaus et al.,	10 g Agar
1984), (Musselman <i>et al.,</i> 2011)	80 g Trockenhefe
	20 g Hefeextrakt
	20 g Pepton
	51,3 g Saccharose (LSD)
	Oder
	342 g Saccharose (HSD)
	2 mL MgSO ₄ x 6H ₂ O [1 M]
	3,4 mL CaCl ₂ x 2H ₂ O [1 M]
	1000 mL VE H ₂ O

4.10 Bakterienstämme

Tabelle 17: Verwendete Bakterienstämme.

DSMZ No.	Name	Art	Anzucht
3509	Acetobacter pasteurianus	Gram-negativ	26-28 °C, YPM Medium, aerob
11825	Acetobacter pomorum	Gram-negativ	30 °C, RAE Medium, aerob
15551	Acetobacter tropicalis	Gram-negativ	30 °C, Acetic Acid Bacterium Medium, aerob
6897	Escherichia coli K12 DH5α	Gram-negativ	37 °C LB Medium, aerob
3504	Gluconobacter sp.	Gram-negativ	26-28 °C, YPM Medium, aerob
20054	Lactobacillus brevis	Gram-positiv	30 °C, MRS Medium, mikroaerophil
20203	Lactobacillus fructivorans	Gram-positiv	30 °C, MRS Medium, mikroaerophil
20314	Lactobacillus pentosus	Gram-positiv	30 °C, MRS Medium, mikroaerophil
20174	Lactobacillus plantarum	Gram-positiv	30 °C, MRS Medium, mikroaerophil
21775	Lactobacillus senmaizukei	Gram-positiv	30 °C, MRS Medium, mikroaerophil

4.11 Fliegenstämme

Tabelle 18: Verwendete Fliegenstämme.

Fliegenlinie	Externe Nummer	Genotyp
Oregon-R	-	
white[-]	VDRC60000	w[1118]
DGRP-208	BL25174	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-301	BL25175	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-303	BL25176	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-304	BL25177	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-307	BL25179	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-313	BL25180	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-315	BL25181	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-324	BL25182	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-335	BL25183	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-357	BL25184	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-358	BL25185	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-360	BL25186	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-362	BL25187	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-375	BL25188	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-379	BL25189	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-380	BL25190	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-391	BL25191	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-399	BL25192	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-427	BL25193	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-437	BL25194	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-486	BL25195	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-517	BL25197	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-555	BL25198	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-639	BL25199	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-707	BL25200	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set

Fliegenlinie	Externe Nummer	Genotyp
DGRP-712	BL25201	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-730	BL25202	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-732	BL25203	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-765	BL25204	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-786	BL25206	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-799	BL25207	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-820	BL25208	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-852	BL25209	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-859	BL25210	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-365	BL25445	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-705	BL25744	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set
DGRP-714	BL25745	Sequenced isogenic reference wild type strain, core 40 set

5 Methoden

5.1 Drosophila melanogaster Methoden

5.1.1 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden, wenn nicht anders vermerkt, auf Standardfutter (siehe Material 4.9 Tabelle 16) bei 25 °C und einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Axenische Fliegenlinien in den Dauerkulturen wurden auf autoklaviertem Glucose-Hefe-Futter (siehe Tabelle 16) gehalten, welches mit den in Tabelle 12 aufgelisteten Antibiotika angesetzt wurde. Fliegen mit einem normalen Mikrobiom werden als konventionell gehaltene Linien (KH) bezeichnet.

5.1.2 Untersuchung des Darmmikrobioms von verschiedenen Wildtypfliegenlinien

Um das Darmmikrobiom von vier verschiedenen DGRP Fliegenlinien (Mackay *et al.*, 2012) zu untersuchen, wurden diese für basale Messungen für zwei Generationen mit gleicher parentaler Dichte auf Standardfutter (SD) gehalten. Acht L3 Larven sowie acht sechs Tage alte Männchen oder Weibchen wurden für eine anschließende DNA-Extraktion bei -80 °C eingefroren.

Um den Einfluss eines Futterwechsels auf das Darmmikrobiom zu untersuchen wurden die vier DGRP Linien ebenfalls für zwei Generationen mit gleicher parentaler Dichte auf dem Standardfutter gehalten. Anschließend wurden adulte Fliegen auf ein Zucker-reduziertes Futter (0,15 M Saccharose) (engl. *low sugar diet*, LSD) transferiert und nach vier Tagen Eiablage entfernt. Die daraus resultierenden Fliegen wurden als einen Tag alte Tiere entweder auf neues LSD, neues Standardfutter oder auf ein Futter mit erhöhtem Zuckergehalt (1 M Saccharose) (engl. *high sugar diet*, HSD) transferiert (Tabelle 16). Nach fünf Tagen und einem Fliegenalter von sechs Tagen wurden die Fliegen für die anschließende DNA-Extraktion und 16S-Sequenzierung bei -80 °C eingefroren.

5.1.3 Herstellung axenischer Fliegen

Das Protokoll wurde aus (Wayland *et al.*, 2014) entnommen und modifiziert. Für die Herstellung axenischer Fliegen, wurden adulte Tiere in einen Flugkäfig gesetzt, der mit einer Apfelsaftagarplatte verschlossen wurde, welche mit etwas Frischhefe versehen war. Nach einem ersten Plattenwechsel nach 24 h, wurden die Embryonen, die innerhalb der nächsten 24 Stunden auf der Apfelsaftagarplatte abgelegt wurden, mit Embryowash (siehe Material 4.4 Tabelle 7) abgewaschen und in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Zum Dechorionieren wurden die Embryonen für 2 min mit 50 % Bleiche und anschließend mit VE H₂O gewaschen. Da die Embryonen in der Bleiche nur sehr langsam absinken, wurde ein kurzer Zentrifugationsschritt von 15 s bei 300 rpm eingefügt. Zur endgültigen Sterilisation wurden die Embryonen anschließend in 70 % Ethanol geschwenkt und nach einem weiteren VE H₂O Waschschritt in 200 µL Embryowash resuspendiert und 20 µL mit einer Pipette auf den gewünschten Futter ausgebracht.

Methoden

5.1.4 Entwicklung axenischer Fliegen unter Mangelbedingungen

Um die Entwicklungsfähigkeit der axenischer Fliegen unter Mangelbedingungen zu testen, wurden fünf Futter mit verschiedenen Hefekonzentrationen angesetzt (siehe Material 4.9 Tabelle 16, axenisches Hefe-Futter). Auf diese wurden KH und axenische Fliegen für eine Eiablage von 24 h gegeben. Anschließend wurden die Parentaltiere verworfen und die Zeitspanne bis zur Entwicklung der ersten Puppen sowie die Anzahl der Puppen dokumentiert.

5.1.5 Lokomotorische Messungen von axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen

Die lokomotorische Aktivität von Fliegen lässt sich mit Hilfe eines Aktivitätsmonitors (engl. activity monitor (Trikinetics)) bestimmen. Dafür werden die Tiere einzeln in Kunststoffröhrchen gesetzt, die in Messkammern mit einer Lichtschranke gesteckt werden können. Über die Unterbrechung dieser Lichtschranke durch die Bewegung der Fliege kann so ihre Aktivität pro Zeit ermittelt werden. Es wurden pro Kondition jeweils 32 Röhrchen mit je einer Fliege in eine Messkammer gesetzt und die Fliegen für sieben Tage bei 25 °C und einem 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus gehalten. In ein Ende der Röhrchen wurde zuvor steriles Glucose-Hefe-Futter ohne Antibiotika gefüllt (siehe Tabelle 16), damit die Aktivität und die zirkadiane Rhythmik der axenischen und konventionell gehaltenen Fliegen über mehrere Tage beobachtet werden konnte. Die Datenaufnahme erfolgte pro Minute und die anschließende Auswertung der Daten wurde mithilfe eines Python-Skripts durchgeführt.

5.1.6 Messung der Futteraufnahmemenge von adulten Fliegen

Um zu überprüfen, ob verschiedene Fliegenlinien über einen definierten Zeitraum unterschiedlich viel Futter aufnehmen wurde die Menge mittels Fluorescein-Messung analysiert. Dazu wurden 30 männliche sechs Tage alte Fliegen auf Standardfutter, das bei der Herstellung mit 200 μ g/mL Fluorescein versetzt wurde, gesetzt und für 30 min bei 25 °C gehalten. Als Positivkontrolle wurden 30 männliche, sechs Tage alte Fliegen am Vortag auf Hungermedium (0,5 % Agarose in H₂O) gesetzt, um die Fliegen für ca. 16 h zu hungern. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls die gleiche Anzahl Fliegen auf das Fluorescein-Futter gegeben, dann aber für 30 min bei 4 °C gehalten, um eine Futteraufnahme zu minimieren.

Anschließend wurden die Fliegen sediert und auf Flüssigstickstoff eingefroren. Für die Fluorescein-Messung wurden die Fliegen zwei Mal in 1x PBS gewaschen und in 300 μ L 10 mM Tris (pH 7,4) mit einer Keramikkugel in einer Rüttelzentrifuge homogenisiert. Grobe Zellteile wurden bei 2.400 x g für 5 min abzentrifugiert, anschließend der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 5 min bei 21.100 x g zentrifugiert. Von diesem Überstand wurden 100 μ L in eine 96-well-Platte überführt (komplett schwarz, mit flachem Boden und im Plattenlesegerät (BioTek) gemessen (Extinktion 475-485 nm, Emission 510-528 nm). Zur Quantifizierung der Fluorescein-Menge wurde eine Standardreihe in 10 mM Tris mit einer Startkonzentration von 0,3125 μ g/mL mit sieben 1:2 Verdünnungen angelegt und ebenfalls im Plattenlesegerät gemessen. Anschließend wurde die Fluorescein-Menge pro Tier berechnet.
Methoden

5.1.7 Quantifizierung der Faeces-Menge

Zur Quantifizierung der Faeces, die von den Fliegen ausgeschieden werden, wurden jeweils fünf männliche, einen Tag alte Fliegen für 24 h in ein mit Aluminiumfolie ausgekleidetes Futterröhrchen mit Standardfutter gesetzt. Die Folie wurde anschließend entnommen, die Faeces gezählt und die Anzahl pro Tier berechnet.

5.1.8 Mikrobiomaustausch zwischen Fliegenlinien

Um das Darmmikrobiom von einer Fliegenlinie auf eine andere zu übertragen, wurden zunächst axenische Glucose-Hefe-Futter (GH) mit 30 männlichen Fliegen einer Linie bestückt, damit diese über ihre Faeces das Futter für sieben Tag vorinokulieren. Anschließend wurden diese Fliegen verworfen und frisch sterilisierte Embryonen (siehe 5.1.3) auf dieses Futter transferiert. Um eine interne Kontrolle zu haben, wurden Embryonen von white[-] und Oregon-R jeweils gemischt auf vorinokuliertes Futter von white[-] oder Oregon-R Männchen gegeben. Die Fliegen entwickelten sich auf diesem Futter und nahmen durch die Nahrung das Darmmikrobiom der adulten Fliegen auf. Die adulten Tiere wurden nach dem Schlüpfen entweder für qPCR Analysen gesammelt (acht Tiere pro Kondition) oder nach Linie in neue GH-Futterröhrchen separiert, weitere zehn Tage gealtert und dann eingefroren. (Abb. 65). Um außerdem den Mikrobiomaustausch in L3 Larven zu analysieren, mussten die Larven von Oregon-R und white[-] unterscheidbar gemacht werden. Daher wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Anna Härle Kreuzungen von beiden Linien mit den Treiberlinien (w[*],Sb[1]/TM3, P{w[+mC]=ActGFP}JMR2, Ser[1] und w[1118];sna[Sco]/CyO, P{w[+mC]=sChFP}2) angesetzt, die im Larvenstadium fluoreszieren (Härle, 2018). Die Embryonen der white[-] und Oregon-R Kreuzungen wurden ebenfalls sterilisiert und auf vorinokuliertes Futter gegeben, bis sie das L3 Stadium erreicht hatten und anschließend nach GFP- oder mCherry-Fluoreszenz getrennt und pro Kondition aus fünf Larven DNA extrahiert und mittels qPCR analysiert.



Abb. 65: Übersichtsschema des Mikrobiomaustauschs in adulten Fliegen. Männliche Fliegen der Linien *white[-]* und Oregon-R wurden verwendet, um autoklaviertes Futter mit den Bakterien in ihren Faeces zu inokulieren. Anschließend wurde eine Mischung aus axenischen *white[-]* und Oregon-R Embryonen auf dieses Futter gegeben und nach der Entwicklung zu adulten Tieren das Darmmikrobiom der einen Tag und zehn Tage alten Fliegen mittels qPCR analysiert.

5.1.9 Quantifizierung des Darmmikrobioms

Die Menge der Bakterien in *white[-]* und Oregon-R *Drosophila* sollte über einen Alterszeitraum von sechs bis 23 Tage gemessen und dabei untersucht werden, welchen Einfluss eine äußerliche Pertubation durch regelmäßiges Umsetzen der Fliegen auf den Bakteriengehalt hat. Dafür wurden frisch geschlüpfte männliche Fliegen zu je 30 Tieren auf frisches Futter transferiert, sodass diese bis zu einem Alter von sechs Tagen ein normales Darmmikrobiom aufbauen konnten. Ab diesem Alter wurde ein Teil der Fliegen zwei Mal pro Tag auf neues Futter transferiert und dagegen ein anderer Teil der Fliegen auf dem selben Futter belassen. Zur Quantifizierung des Darmmikrobioms in den transferierten und nicht transferierten Fliegen wurden jeweils neun Fliegen in einem Alter von sechs, neun, 13, 16, 20 und 23 Tagen in einem 1,5 mL

Methoden

Reaktionsgefäß gesammelt und 10 min bei -20 °C betäubt. Anschließend wurden die Fliegen durch Waschen mit 10 % Bleiche, 70 % Ethanol und drei Mal 1x PBS äußerlich sterilisiert. Die Fliegen wurden in 200 μL 1x PBS mit einem elektrischen Handhomogenisator homogenisiert und auf 1 mL mit 1x PBS aufgefüllt, (1:10 Verdünnung). Es wurden außerdem Verdünnungen bis 10⁻⁶ angelegt und jeweils im Duplikat 100 μL der Homogenisate auf MRS- bzw. ACE-Agarplatten ausplattiert. Die MRS-Agarplatten wurden im Anaerobentopf unter mikroaerophilen Bedingungen mittels Anaerocult C (Merck) bei 28 °C für 72 h inkubiert, die ACE-Agarplatten für fünf Tage bei 28 °C unter aeroben Bedingungen. Nach der Inkubation wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt und pro Fliege berechnet. Außerdem wurden von allen Zeitpunkten die Platten der 1:10 Verdünnungen fotografiert, anschließend die Kolonien mit 1x PBS abgewaschen und die entstandenen Bakteriensuspensionen mit 1:2 Glycerin bei -80 °C als Dauerkultur eingefroren, um diese für anschließende Sequenzierungen des Mikrobioms und für Reassoziationen axenischer Fliegen zu verwenden.

5.1.10 Reassoziation von Drosophila mit verschiedenen Darmbakterien

Sterilisierte Embryonen sollten mit verschiedenen Darmmikrobiomen, welche aus *Drosophila* isoliert wurden, reassoziiert werden. So sollte der Einfluss der Bakterien auf das Wachstum und die Entwicklung der Fliegen analysiert werden. Zur Reassoziation wurden Bakterien verwendet, die während der Quantifizierung des Darmmikrobioms in Oregon-R und *white[-]* auf MRS- und ACE-Agarplatten kultiviert wurden. Dabei sollte getestet werden, ob ein Darmmikrobiom von jungen Fliegen (sechs Tage alt) einen anderen Einfluss auf die Entwicklung der sterilisierten Embryonen hat, als ein Darmmikrobiom von alten Fliegen (23 Tage alt). Außerdem wurden Darmbakterien aus Fliegen, die zwei Mal pro Tag auf neues Futter transferiert wurden (23 Tage alt) verwendet, um den Einfluss der Perturbation auf das Darmmikrobiom und den Wachstumsvorteil der verschiedenen Mikrobiome auf die Fliege zu untersuchen.

Für die Reassoziation wurden zunächst die Darmbakterien aus den Glycerinkulturen der Bakterienquantifizierung (siehe 5.1.9) wieder auf MRS- oder ACE-Agarplatten ausgestrichen und den entsprechenden Bedingungen angezogen. Anschließend wurden die Bakterien mit sterilem 1x PBS von den Platten abgewaschen und die OD₆₀₀ auf 1 oder 25 eingestellt, um die sterilen Embryonen mit zwei unterschiedlichen Bakterienmengen zu reassoziieren. Als Kontrolle wurden einige Futterröhrchen mit 0,25 % Hefe-Futter für drei Tage mit Darmbakterien vorinokuliert. Dazu wurden 30 männliche Fliegen (jeweils *white[-]* oder Oregon-R) pro Röhrchen abgezählt, damit diese das Futter mit Darmbakterien aus ihren Faeces inokulieren. Außerdem wurden als Kontrollen zusätzlich Embryonen, die mit Embryowash von den Apfelsaftagarplatten während der Sterilisierung abgewaschen wurden und vollständig axenische Embryonen (mit 10 % Bleiche und 70 % Ethanol behandelt) ohne zusätzlich reassoziierte Bakterien auf das Hefe-Futter gegeben.

Die Embryonen wurden wie in 5.1.3 beschrieben sterilisiert und je 20 μ L der Embryonen auf 0,25 % Hefe-Futter (siehe Material 4.9 Tabelle 16) verteilt und anschließend 100 μ L der Bakteriensuspensionen hinzugegeben. Die Fliegen wurden bei 25 °C gehalten und es wurde die Zeit bis zur Verpuppung, sowie die Anzahl der Puppen dokumentiert.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 DNA-Extraktion aus Larven, adulten Fliegen und Bakterienkulturen

Extraktion für Next Generation Sequencing

Für die DNA-Extraktion aus ganzen Fliegen für das *Next Generation Sequencing* des Darmmikrobioms und die Resequenzierung einzelner isolierter Darmbakterien aus *Drosophila*, wurde das QIAGEN *QIAamp DNA mini* Kit verwendet. Dazu wurden pro Kondition acht sechs Tage alte Fliegen oder acht L3 Larven bei -80 °C eingefroren. Die Fliegen wurden anschließend mit 70 % Ethanol und sterilem 1x PBS gewaschen und anschließend in 50 μL ATL Puffer und 0,5 % Reagent DX (zur Schaumminimierung) mit einer elektrischen Handpistille homogenisiert. Es wurden weitere 130 μL ATL Puffer mit Reagent DX und 20 μL Proteinase K hinzugefügt und die Homogenisate für 30 min bei 56 °C im Schüttelinkubator (600 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 2 mL Schraubdeckelröhrchen überführt, in denen sich 0,2 g Glaskügelchen befanden. Die Homogenisate wurden so in einer Rüttelzentrifuge zweimal für 20 s weiter aufgeschlossen und danach eine weitere Stunde bei 56 °C inkubiert. RNA wurde mit Hilfe von 4 μL RNase A für 2 min bei Raumtemperatur (RT) verdaut und anschließend 200 μL AL Puffer zu den Proben gegeben und weitere 30 min bei 70 °C und 10 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Lysate in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und mit dem halben Volumen Ethanol (p.a.) gemischt und auf die Säulen geladen. Die Waschschritte wurden laut Herstellerangaben durchgeführt und die DNA in 200 μL Nuklease-freiem Wasser (5 min Inkubation, RT) eluiert.

Anschließend war für die Aufkonzentrierung der DNA eine Natrium-Acetat-Fällung nötig. Für die Fällung wurden die Proben 1:10 mit einem 3 M Natrium-Acetat-Puffer (pH 4,8-5,2) (Endkonzentration 0,3 M), sowie 100 µg/mL Glykogen und der zweifachen Menge Ethanol vermischt. Die DNA wurde über Nacht bei -20 °C gefällt und anschließend durch Zentrifugation (30 min, 21.100 x g, 4 °C) aufkonzentriert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert (15 min, 21.100 x g, 4 °C). Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend je nach gewünschter DNA-Konzentration in 6-20 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

Für die DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen war eine Homogenisation nicht nötig. Hier wurden die Bakterien direkt in 180 μL Lyse Puffer für Gram-positive Bakterien mit 20 mg/mL Lysozym bei 37 °C für eine Stunde verdaut. Anschließend wurden 4 μL RNase A zu den Proben gegeben und 2 min bei RT inkubiert. Danach folgte ein weiterer Lyseschritt mit 200 μL AL Puffer, sowie 20 μL Proteinase K für 30 min bei 56 °C. Für den finalen Aufschluss der Proben wurden die Suspension für 15 min auf 95 °C erhitzt. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurden sie mit 200 μL Ethanol (p.a.) gemischt und auf die Säule geladen. Die anschließenden Waschschritte wurden laut Herstellerangaben durchgeführt und die DNA in 200 μL Nuklease-freiem Wasser nach einer Inkubation von 5 min bei RT eluiert.

Methoden

Extraktion für qPCR Analysen

Um die bakterielle Zusammenstellung des Darmmikrobioms mittels qPCR zu analysieren, wurde aus ganzen L3 Larven und adulten Fliegen DNA extrahiert. Dazu wurde das *DNeasy Blood and Tissue* Kit (QIAGEN) mit Modifikationen verwendet. Es wurden zunächst acht Larven oder acht adulte Fliegen bei -80 °C eingefroren und anschließend mit 70 % Ethanol und sterilem 1x PBS äußerlich sterilisiert. Die Tiere wurden mit Hilfe einer Keramikkugel (Ø 7 mm) und 200 mg Glaskügelchen (Ø 425-600 µm) in einer Rüttelzentrifuge in einem Gemisch aus 180 µl Lyse Puffer (siehe Material 4.4 Tabelle 7) und 200 µL AL Puffer homogenisiert. Danach wurden 20 mg/mL Lysozym zum Homogenisat gegeben und dieses für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Inkubation mit 20 µL Proteinase K (QIAGEN) für 2 h bei 56 °C schloss die Proben weiter auf. Zusätzlich wurde RNA durch 4 µL RNase A verdaut (30 min, 37 °C). Für die Bindung an den Säulen, wurden die Proben mit 200 µL Ethanol (p.a.) gemischt und auf die Säule geladen. Die anschließenden Waschschritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 200 µL Nukleasefreiem Wasser eluiert und die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

5.2.2 DNA-Extraktion aus einzelnen Fliegen

Um die Sterilität der axenischen Fliegen zu untersuchen, wurde DNA aus einzelnen Fliegen extrahiert (Gloor *et al.*, 1993). Dafür wurden die Tiere in 1,5 mL Reaktionsgefäßen in 50 μL Squishing Puffer (siehe Material 4.4 Tabelle 7) homogenisiert und anschließend mit 200 μg/mL Proteinase K für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Hitzeinaktivierung (2 min, 95 °C) und Zentrifugation (2 min, 16.200 x g) konnte dann 1 μL als DNA-Template in eine PCR Reaktion eingesetzt werden.

5.2.3 Klonierungsstrategie für 16S rRNA Gene

Für die Bestimmung einzelner isolierter Darmbakterien aus *Drosophila* wurde aus den Bakterienkulturen genomische DNA gewonnen (siehe 5.2.1), welche als Template für die Vervielfältigung des 16S rRNA Gens diente. Für die 16S PCR wurden die Sequenzierprimer (GM3F und GM4R, siehe Material 4.5 Tabelle 9) aus (Klindworth *et al.*, 2013) verwendet, die ein Produkt von ca. 1500 bp erzeugen. Diese wurden anschließend mit dem TOPO TA Vektor aus dem TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) ligiert und in chemokompetente *E. coli* DH5 α transformiert. Zur Selektion wurden die transformierten Bakterien auf LB Platten mit 50 µg/mL Ampicillin angezogen.

5.2.4 Alkalische Lyse

Von den in Flüssigkultur über Nacht gewachsenen *E. coli*-Klonen wurden 2 mL bei 16.200 x g für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μL Puffer 1 (10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Anschließend wurden 200 μL Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und 300 μL Puffer 3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugegeben und das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Die ausgefallenen Proteine und Zellreste wurden bei 16.200 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 800 μL Isopropanol gemischt. Die DNA wurde anschließend 140

Methoden

bei -20 °C für 30 min gefällt und bei 16.200 x g für 15-30 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min, 16.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und zuletzt in 50 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Ein Teil der Plasmid DNA wurde zur Kontrolle mit EcoRI-HF (New England Biolabs) verdaut, welches das 16S rRNA-Insert ausschneidet und der gesamte Restriktionsverdau mittels Agarose-Gelelektrophorese (1 % Gel) analysiert. Plasmide mit richtiger Größe von Vektor und Insert wurden erneut mittels Plasmid Präparation (QIAGEN) aus den *E. coli*-Klonen extrahiert.

5.2.5 Plasmid Präparation und Sanger Sequenzierung

Für nachfolgende Sequenzierungen der klonierten Plasmide wurden diese mit Hilfe des *QlAprep Spin Miniprep* Kits (QIAGEN) aus *E. coli* extrahiert. Das Protokoll wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die 16S rRNA-Inserts der Plasmide von der Firma Source Bioscience mittels Sanger Sequenzierung analysiert und anschließend mittels des Webtools von NCBI BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) einer Bakterienspezies zugeordnet.

5.2.6 RNA Extraktion aus adulten Fliegen

Für die RNA Extraktion aus ganzen Fliegen wurde ein adaptiertes Protokoll mit dem QIAGEN *RNeasy* Kit und Trizol verwendet. Dafür wurden acht bis zehn adulte männliche Fliegen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zu den noch gefrorenen Fliegen wurden 200 μL Trizol gegeben und die Fliegen darin mit einer Metallpistille homogenisiert. Anschließend wurden weitere 800 μL Trizol hinzugefügt, mit einem Vortexer gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Für die Trennung der wässrigen, RNA-enthaltenden und organischen Phase, wurden 200 μL Chloroform hinzugefügt, für 15 s mit dem Vortexer gemischt, 1 min inkubiert und anschließend erneut mit dem Vortexer gemischt. Zur klaren Phasentrennung wurden die Proben 10 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Von den Proben konnten zwei Mal 200 μL der oberen Phase abgenommen und jeweils mit 700 μL RLT Puffer (*RNeasy* Kit, QIAGEN) gemischt werden. Die Proben wurden mit 500 μL Ethanol (p.a.) gemischt, sukzessive auf die QIAGEN *MiniElute* Säulen geladen und 15 s bei 9.600 x g zentrifugiert. Die Säulen wurden dann mit 500 μL RPE Puffer (*RNeasy* Kit) und zwei Mal mit 700 μL 80 % Ethanol gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurden die Säulen 5 min bei 21.100 x g zentrifugiert und die RNA danach in 30 μL RNase-freiem Wasser, nach 5minütiger Inkubation, eluiert. Die RNA wurde anschließend zur cDNA-Synthese verwendet.

5.2.7 Synthese komplementärer DNA (cDNA)/ Reverse Transkription

Die reverse Transkription der extrahierten RNA wurde mit Hilfe des *GoScript Reverse Transcriptase Mix* (Promega) durchgeführt. Pro Reaktion wurden $1 \mu g$ RNA eingesetzt und das Protokoll laut Herstellerangaben angewendet.

5.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde unter anderem für die Überprüfung der Sterilität der axenischen Fliegen durchgeführt. Hierfür wurde DNA aus einzelnen Fliegen gewonnen (siehe 5.2.2) und 1 μ L als DNA-Template eingesetzt. Es wurden die 16S rRNA Primer Nr. 1 und 2 aus Tabelle 9 verwendet, die ein Produkt von ca. 500 bp bilden und eine PCR mit der Phusion HF DNA Polymerase durchgeführt. Außerdem wurden PCRs durchgeführt, deren Produkte anschließend zur Klonierung und Sequenzierung des 16S rRNA Gens einzelner Bakterienisolate verwendet wurden. Hier wurden 16S rRNA Primer mit einer Produktlänge von ca. 1500 bp verwendet (siehe Material 4.5 Tabelle 9, Primer Nr. 3 und 4). Ein 25 μ L PCR Ansatz beinhaltet 5 μ L 5x HF Puffer, 0,5 μ L dNTPs [10 mM], jeweils 1,25 μ L Forward und Revers Primer [je 10 μ M], 0,25 μ L Phusion HF DNA Polymerase und 1 μ L Template-DNA. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 19 dargestellt.

qPCR Schritt	Temperatur	Zeit			
Initiale Denaturierung	98 °C	0:30 min			
25-30 Zyklen der folgenden Denaturierung, Annealing und Elongation					
Denaturierung	98 °C	0:10 min			
Annealing	60 °C	0:30 min			
Elongation	72 °C	0:15 min			
Finale Elongation	72 °C	5:00 min			
Kühlung	8 °C	∞			

Tabelle 19: Temperaturprotokoll für PCR mit einer Phusion HF DNA Polymerase zur Amplifikation des 16S rRNA Gens.

5.2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde der *GoTaq qPCR Mastermix* (Promega) verwendet. Pro 25 μL Ansatz wurden 5 μL cDNA oder gDNA (4 ng/μL) eingesetzt. Jede Probe wurde in technischen Triplikaten gemessen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 (Primer für Detektion bakterieller DNA) und 10 (Primer zur Expressionsanalyse antimikrobieller Peptide) aufgelistet. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: qPCR-Temperaturprotokoll mit anschließender Schmelzkurve. Die Fluoreszenz der entstandenen Produkte wurde nach jedem Elongationsschritt gemessen. Außerdem wurde die Abnahme der Fluoreszenz während der Schmelzkurve nach jedem Temperaturschritt von 0,5 °C gemessen.

qPCR Schritt	Temperatur	Zeit			
Initiale Denaturierung	95 °C	2:00 min			
40 Zyklen der folgenden Denaturierung und Annealing/Elongation					
Denaturierung	95 °C	0:15 min			
Annealing und Elongation	60 °C / 62 °C	1:00 min			
Denaturierung	95 °C	1:00 min			
Annealing	58 °C	1:00 min			
Schmelzkurve	65 °C – 95 °C in 0,5 ° C Schritten	0:05 min pro Temperaturschritt			

Methoden

5.2.10 Mikrobiom-Sequenzierung

Für die 16S rRNA-Sequenzierung wurden DNA-Extraktionen von den Fliegen und Larven der gewünschten Konditionen durchgeführt. Die Qualität der gewonnenen DNA wurde vom *Genomics & Transcriptomics* Labor um Prof. Dr. Karl Köhrer (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) bestimmt und für das Illumina *Next Generation Sequencing* vorbereit. Dafür wurde die DNA zunächst fragmentiert und zur Vervielfältigung (engl. *library preparation*) mittels PCR mit den Primern aus Tabelle 9 (S-D-Bact-0341-b-S-17 und S-D-Bact-0785-a-A-21), welche an die V3/V4 Region des 16S rRNA Gens binden, amplifiziert. Diese Primer tragen zusätzliche Illumina Adaptersequenzen, damit die DNA Fragmente im nächsten Schritt auf eine sogenannte *"Flow Cell"* geladen werden können, auf welcher die Fragmente je nach Adapter an oberflächengebundene Oligos binden (Illumina, Inc., 2016). Um mehrere Proben gleichzeitig zu sequenzieren, werden außerdem so genannte Barcode-Sequenzen an die Fragmente angebracht (*Multiplexing*), um die einzelnen Proben nach der Sequenzierung an diesen Barcodes zu identifizieren. Auf der *Flow Cell* werden die Fragmente noch einmal amplifiziert um klonale Cluster zu bilden. Diese Cluster werden anschließend über die Inkorporation von fluoreszenten Nukleotiden und deren Emission auf der *Flow Cell* sequenziert (Illumina, Inc., 2016). Die Sequenzierung wurde mit einem *MiSeq* Gerät (Illumina) durchgeführt. Die Rohdaten wurden anschließend mit dem Metagenomics Analysis Server MG-Rast (https://www.mg-rast.org/) analysiert.

5.3 Biochemische Methoden

Die nachfolgenden Methoden wurden zur Bestimmung verschiedener Metabolite in *Drosophila* verwendet. Diese wurden als Kenngrößen des Metabolismus zum Vergleich von axenischen und konventionell gehaltenen Larven und Fliegen herangezogen. Zur Bestimmung der Metabolite wurden von den verschiedenen Konditionen oder Fliegenlinien je fünf wandernde L3 Larven (gewaschen in 1x PBS) bzw. acht sechs Tage alte männliche oder weibliche Fliegen pro Probe gesammelt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben wurden in 1 mL 0,05 % Tween®-20 gegeben und mit einer Keramikkugel (Ø 7 mm) in einer Fast Prep FP120 Rüttelzentrifuge (Bio101 Savant) homogenisiert. Die anschließende Inkubation für 5 min bei 70 °C inaktivierte alle enzymatischen Reaktionen und grobe Zelltrümmer wurde abzentrifugiert (3 min, 18,8 x g, 4 °C).

5.3.1 Bestimmung des Triacylglycerolgehalts

Die Bestimmung des Triacylglycerolgehalts (TAG) der Larven und Fliegen wurde mit dem *Triglycerid Reagent* Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. Die Proben der Larven, männlichen und weiblichen Fliegen wurden unverdünnt in eine 96-well-Mikrotestplatte (Sarstedt) gegeben und 200 µL des *Triglyceride Reagents* hinzugefügt. Außerdem wurde zur Bestimmung des absoluten TAG-Gehalts pro Probe ein Glycerol-Standard (Sigma-Aldrich) in einer seriellen Verdünnung mit 0,05 % Tween®-20 angefertigt (1:2 Verdünnungen; Startkonzentration: 1,25 mg/mL). Die Proben wurden bei 37 °C für 45 min inkubiert und anschließend die kolorimetrische Absorption bei 510 nm in einem Platten-Lesegerät (BioTek) gemessen. Der TAG-Gehalt wurde auf die Anzahl der Tier normiert.

5.3.2 Bestimmung des Glucose- und Glykogengehalts

Die Menge von Glucose und Glykogen wurde in den Larven und Fliegen mit Hilfe des *GO Assay Reagent* Kits (Sigma-Aldrich) und einem abgeänderten Protokoll von J. Tennessen bestimmt (Tennessen *et al.*, 2014). Die Proben wurden für die Glucose-Messung unverdünnt und für die Glykogen-Messung entweder 1:3 für Männchen, 1:5 für Weibchen und 1:2 für Larven verdünnt in eine 96-well-Mikrotestplatte gegeben. Zur Bestimmung der absoluten Mengen wurden der Glucosestandard des *GO Assay Reagent* Kits und ein Glykogenstandard (1 mg/mL Glykogen (Sigma-Aldrich) in Wasser gelöst) hergestellt. Dann wurden 84 μ L 0,05 % Tween[®]-20 mit 16 μ L des Glucose- bzw. Glykogenstandards vermischt und eine serielle 1:2 Verdünnung angesetzt. Zur Bestimmung der freien Glucose wurden 100 μ L des GO Reagenz (siehe Herstellerangaben) zu den Proben gegeben. Um die Menge der Gesamtglucose zu bestimmen, wurde zu den Proben 100 μ L *GO Reagenz* mit *Amyloglucosidase* (0,1 %) hinzugegeben. Die Proben wurde bei 37 °C eine Stunde inkubiert und die Reaktion anschließend mit 100 μ L H₂SO₄ [12 N] gestoppt. Die Glucosemenge wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Die Glykogenmenge der Proben konnte anschließend durch Subtraktion der freien Glucose von der Gesamtglucose bestimmt werden und wurde auf die Anzahl der Tiere normiert.

5.3.3 Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe des *Pierce BCA Assay* Kits (Life Technologies) laut Protokoll des Herstellers. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA, engl. *bovine serum albumin*) in einer 1:2 Verdünnungsreihe mit 0,05 % Tween[®]-20 angesetzt (Startkonzentration: 1 mg/mL). Die Proben wurden für die Messung unverdünnt eingesetzt und anschließend auf die Anzahl der Tiere normiert.

5.4 Histologische Methoden

5.4.1 Präparation und Fixierung von larvalen und adulten Fliegendärmen

Zur visuellen Analyse der Darmbakterien in *Drosophila* Larven und adulten Fliegen, wurden Därme von L3 Larven oder von sechs Tage alten männlichen Fliegen in 1x PBS präpariert. Dabei war es wichtig, die Därme in vollständiger Länge, einschließlich des Kropfes und des Proventrikulus zu präparieren, damit die Lokalisation der Darmbakterien genau analysiert werden konnte. Die Därme wurden *in Carnoy's Solution* (siehe Material 4.4 Tabelle 7) für 5 min bei RT fixiert und anschließend zwei Mal mit 1x PBS gewaschen. Die Därme wurden mit dem DNA-Farbstoff ToPro1 (Invitrogen) für 30 min in einer 1:100 Verdünnung gefärbt und nach einem weiteren Waschschritt mit 1x PBS, in *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen) auf Objektträgern eingebettet.

Methoden

5.4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Bakterien in Drosophila Därmen

Zum Test der publizierten universellen FISH-Sonde Eub338 und Lacto722 (Amann *et al.*, 1990; Sghir *et al.*, 1998) und der neu generierten Sonden für *Acetobacter* wurden diese zunächst an Bakteriensuspensionen von *E. coli* und verschiedenen *Acetobacter* und *Lactobacilli* Arten im Rahmen der Bachelorarbeit von Anna Härle getestet (Härle, 2018). Übernachtkulturen der Bakterien wurden abzentrifugiert und in 500 µL Fixierpuffer (1:2 in 1x PBS, 5 % Paraformaldehyd, Material 4.4 Tabelle 7) für 15 min fixiert. Das Zellpellet wurde anschließend zwei Mal in 1x PBS gewaschen (jeweils resuspendiert und bei 9,600 x g für 2 min abzentrifugiert). Für die Fluoreszenz*-in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde das Zellpellet in 100 µL Hybridisierungspuffer (H-Puffer, 4 µM Sonde, 40 % Formamid, Material 4.4 Tabelle 7) resuspendiert und für 3 h bei 46 °C lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µL Waschpuffer 2 (W2) gewaschen (15 min bei 48 °C). Im Waschpuffer kann eine Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff ToPro1 oder ToPro3 (1:100) erfolgen. Dafür wurden die Zellen weitere 15 min im W2-Puffer inkubiert. Zuletzt wurden die Proben in 500 µL Resuspensionspuffer (R-Puffer) für 5 min gewaschen und in neuem R-Puffer resuspendiert. 10 µL der Bakterien wurden auf eine Objektträger verteilt und an der Luft getrocknet. Zur Fixierung wurden 60 µL Mowiol auf die Zellen gegeben und diese mit einem Deckglas versiegelt.

Um die Bakterien, die mit den Faeces der Fliegen ausgeschieden werden, mittels FISH zu analysieren, wurde in Zusammenarbeit mit Anna Härle ein Protokoll zur Detektion dieser Bakterien direkt auf Mikroskopieobjektträgern etabliert. Dazu wurden männliche und weibliche *white[-]* Fliegen unbestimmten Alters in einen kleinen Ablagekäfig gegeben und dieser mit zwei Objektträgern verschlossen. Etwas Hefe wurde als Nahrung in den Ablagekäfig gegeben. Die Käfige wurden über Nacht bei 25 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden abgelegte Embryonen von den Objektträgern entfernt, die abgelegten Faeces für 1,5 h lufttrocknen lassen und dann mit 200-300 µL Fixierpuffer (1:2 in 1x PBS, 5 % Paraformaldehyd) für 15 min fixiert. Der Objektträger wurde mit 300 µL 1x PBS gewaschen. Für die Hybridisierung wurden die Faeces mit 150 µL H-Puffer (40 % Formamid, 4 µM FISH Sonde) bedeckt und für drei Stunden bei 46 °C in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Anschließend wurde der H-Puffer von den Objektträgern abgenommen und diese mit 150 µL W2-Puffer inklusive To-Pro3 oder To-Pro1 (1:100 verdünnt) gewaschen und gleichzeitig gegengefärbt. Dafür wurden die Objektträger zunächst für 15 min bei 48 °C und anschließend weitere 15 min bei RT inkubiert. Zuletzt wurden die Faeces mit 150 µL R-Puffer gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Faeces wurden mit 60 µL Mowiol oder 20 µL *Prolong Gold antifade reagent* und einem Deckglas abgedeckt.

Zur FISH der Bakterien in larvalen oder adulten Därmen wurden die Därme zunächst in 1x PBS aus den Tieren präpariert. Anschließend wurden diese in *Carnoy's Solution* für 5 min bei RT fixiert und mit 1x PBS zwei Mal gewaschen. Anschließend wurden die Därme für 10 min bei 37 °C mit 10 mg/mL Lysozym behandelt, damit die Zellwände gram-positiver Bakterien durchlässiger für die DNA-Sonden werden und wieder mit 1x PBS gewaschen. Für die FISH wurden die Därme in H-Puffer mit 4 µM Sonde und 40 % Formamid bei 46 °C über Nacht in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Därme in

145

W2-Puffer für 30 min bei 48 °C inkubiert, um überschüssige Sonden auszuwaschen. Hier konnte eine zusätzliche Färbung mit den DNA-Farbstoffen ToPro1 oder ToPro3 eingefügt werden. Die Färbung erfolgte im W2-Puffer in einer 1:100 Verdünnung für 15 min bei 48 °C und weitere 15 min bei RT. Die Därme wurden dann in R-Puffer aufgenommen und zur Mikroskopie auf einem Objektträger in 20 µL *Prolong Gold antifade reagent* eingebettet.

5.4.3 Konfokalmikroskopie

Die Analyse der mit ToPro1 oder FISH gefärbten Därme wurde mit einem Konfokalmikroskop (LSM 710 oder 780), sowie einem Operetta CLS High-Content Analysis System durchgeführt. Dabei wurden für die Übersichtsaufnahmen der Därme ein 5x oder 10x Luftobjektiv und für die Nahaufnahmen ein 63x Öl-Immersionsobjektiv verwendet.

5.5 Statistik

Statistische Signifikanzen zwischen zwei unabhängigen Proben wurden, wenn nicht anders beschrieben, mittels zweiseitigen, ungepaarten t-Test analysiert. Die unterschiedlichen p-Werte wurden mit Asterisken gekennzeichnet und zeigen die Stärke der Signifikanz an: $p \ge 0,05$ nicht signifikant (n. s.), p < 0,05 *, p < 0,01 ***, p < 0,001 *** und p < 0,0001 ****.

5.6 Datenanalyse

Alle Datenanalysen erfolgten mithilfe von MS Excel (Versionen 2013 und 2019). Die Sequenzierdaten wurden mit MG-RAST analysiert (Version 4.0.3). Die Mikroskopieaufnahmen wurden mithilfe der ZEN software (version 2.6) analysiert. Die Messungen in den Aktivitätsmonitoren wurden mit der Software Trikinetics *Drosophila* Activity Monitor Analyzer Version 0.1 (2017-10-24) (https://mathias-beller.shinyapps.io/trikinetics_activitymonitor/) analysiert. Genomanalysen der Resequenzierungen der aus *Drosophila* isolierten Bakterienspezies wurden mit der Software Geneious Prime 2019.2.1 durchgeführt.

5.7 Genomweite Assoziationsstudien

Die metabolischen Unterschiede, sowie Entwicklungsunterschiede auf verschiedenen Futtern zwischen KH und axenischen DGRP Fliegen wurden mit Hilfe einer genomweiten Assoziationsstudie (engl. *Genome wide association study,* GWAS) analysiert. Hier können Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single-nucleotide polymorphisms,* SNPs) gefunden werden, die mit einem Merkmal signifikant assoziiert sind. Für die GWAS wurde das web-basierte Tool (http://dgrp2.gnets.ncsu.edu/) verwendet, welches speziell für die DGRP Fliegenlinien konstruiert wurde (Huang *et al.,* 2014; Mackay *et al.,* 2012). Die Manhattan-Plots wurden mit dem R Paket *"qqman"* (R core team 2014; Version 3.3.1) und der Hilfe von Lisa Jehrke erstellt.

6 Anhang

6.1 Resequenzierung der aus Drosophila isolierten Darmbakterien

Tabelle 21: *Read* Zahlen der Resequenzierung der aus Oregon-R oder *white[-]* isolierten Darmbakterien. Die genutzten *reads* wurden in der Alinierung an ein Referenzgenom in der *Geneious Prime* Software verwendet. Die ungenutzten *reads* konnten nicht zugeordnet werden.

bakterielle	Anzahl	genutzte	ungenutze	ø	Standard-	MinMax.	Spezies laut
Isolate	reads	reads	reads	Readlänge	abweichung	Readlänge	Resequenzierung
MRS Isolat 2							
aus Oregon-R	3734112	2533941	1180091	138,5	24,4	35 bis 151	L. plantarum
MRS Isolat 4							
(MRS) aus							
Oregon-R	3911314	2775139	1136175	138,4	24,3	36 bis 151	L. plantarum
MRS Isolat 4							
(ACE) aus							
Oregon-R	3490514	2423778	1066736	144	18,2	37 bis 151	A. indonesiensis
ACE Isolat 1 aus							
Oregon-R	3611622	278374	3333248	140,5	22,3	38 bis 151	Mischkultur?
ACE Isolat 2 aus							
Oregon-R	3062678	262952	2799726	147	13,5	39 bis 151	Mischkultur?
MRS Isolat 2							
aus white[-]	3785508	2846933	938575	138,7	23,8	40 bis 151	L. plantarum
MRS Isolat 4							
aus white[-]	3404770	2453531	951239	142,8	19,5	41 bis 151	L. plantarum
ACE Isolat 1 aus							
white[-]	3420918	2118868	1302050	141,4	21,3	42 bis 151	A. pasteurianus
ACE Isolat 2							
(ACE) aus							
white[-]	3588090	108001	3480089	139,2	24,3	43 bis 151	Mischkultur?
ACE Isolat 2							
(MRS) aus							
white[-]	3403708	2178973	1224735	142	20,7	44 bis 151	L. brevis

6.2 Sequenzierungen von vier DGRP Fliegenlinien unter verschiedenen Konditionen

Tabelle 22: *Read* Zahlen der basalen 16S rRNA-Sequenzierung DGRP Larven und sechs Tage alten Fliegen. Als Negativkontrollen wurden axenische Oregon-R Fliegen gemessen. Vergleich der gefilterten *read* Zahlen des *Genomic* & *Transcriptomic* Labors HHU (GTL) mit den nach der Qualitätskontrolle (QK) von MG-Rast analysierten *read* Zahlen.

Probe/Fliegenlinie	Zahl der gefilterten reads	reads bis Genus	Zahl der reads nach MG-
	aus GTL	klassifiziert (GTL)	RAST QK
859 L3 (a)	700.181	88,81 %	187.572
859 L3 (b)	624.520	89,94 %	156.186
301 L3 (a)	533.339	89,50 %	108.557
303 L3 (a)	545.563	93,06 %	120.647
303 L3 (b)	472.704	92,53 %	110.049
315 L3 (a)	578.032	90,75 %	119.379

Probe/Fliegenlinie	Zahl der gefilterten reads	% r <i>eads</i> bis Genus	Zahl der reads nach MG-
	aus GTL	klassifiziert (GTL)	RAST QK
315 L3 (b)	796.880	90,68 %	203.937
859 🗗 (a)	637.577	85,74 %	217.286
859 🗗 (b)	829.267	86,49 %	285.966
301 🗗 (a)	430.305	86,29 %	105.904
301 🗗 (b)	481.381	87,07 %	124.046
303 🗗 (a)	710.348	92,86 %	167.405
303 🗗 (b)	955.794	92,38 %	243.443
315 🗗 (a)	431.866	85,17 %	105.306
315 🗗 (b)	624.836	78,19 %	139.987
859 😲 (a)	577.387	85,71 %	217.813
859 😲 (b)	731.285	86,21 %	268.415
301 😲 (a)	774.445	91,39 %	196.496
301 😲 (b)	362.347	91,12 %	60.060
303 😲 (a)	234.258	94,02 %	36.063
303 😲 (b)	411.204	93,08 %	60.478
315 😲 (b)	190.115	89,50 %	34.612
ax. OrR 🗗	155.274	32,27 %	19.844
ax. OrR 💡	150.621	27,84 %	21.340
Mittelwert	539.147	84,19 %	137.949,6
Median	561.475	89,50 %	122.346,5

Tabelle 23: *Read* Zahlen der 16S rRNA-Sequenzierung der DGRP sechs Tage alten Männchen nach dem Wechsel auf verschiedene Futter. Vergleich der gefilterten *read* Zahlen des *Genomic and Transcriptomic* Labors HHU (GTL) mit den nach der Qualitätskontrolle (QK) von MG-Rast analysierten *read* Zahlen. (a) und (b) beschreiben die im Duplikat sequenzierten Linien. Die Fliegen wurden nach der Entwicklung auf *low sugar diet* (LSD) auf Standardfutter (SD), *high sugar diet* (HSD) oder SD transferiert und in einem Alter von sechs Tagen das Mikrobiom sequenziert.

Probe/Fliegenlinie	Zahl der gefilterten reads	reads bis Genus	Zahl der <i>reads</i> nach MG-
	aus GTL	klassifiziert (GTL)	RAST QK
🗗 859 SD (b)	429.043	89,49 %	271.038
🗗 859 SD (a)	569.099	89,41 %	340.781
් 859 LSD (b)	611.323	92,26 %	360.321
🗗 859 LSD (a)	672.379	91,20 %	406.442
් 859 HSD (b)	617.357	88,54 %	383.924
🗗 859 HSD (a)	517.153	88,98 %	333.907
🗗 315 SD (b)	792.214	95,98 %	486.344
🗗 315 SD (a)	1.121.807	94,83 %	662.028
🗗 315 LSD (b)	865.382	96,42 %	516.749
🗗 315 LSD (a)	1.155.192	96,00 %	703.564
🗗 315 HSD (b)	930.401	64,40 %	394.170
🗗 315 HSD (a)	291.790	75,88 %	166.511
🗗 303 SD (b)	855.030	96,86 %	515.768

Probe/Fliegenlinie	Zahl der gefilterten reads	reads bis Genus	Zahl der reads nach MG-
	aus GTL	klassifiziert (GTL)	RAST QK
🗗 303 SD (a)	1.234.186	86,54 %	714.503
🗗 303 LSD (b)	999.673	95,65 %	576.689
🗗 303 LSD (a)	1.133.911	95,74 %	671.610
🗗 303 HSD (b)	491.041	37,43 %	186.714
් 303 HSD (a)	687.074	48,35 %	293.518
🗗 301 SD (b)	311.657	92,94 %	186.232
🗗 301 SD (a)	688.854	91,70 %	379.787
🗗 301 LSD (b)	398.792	95,51 %	229.898
🗗 301 LSD (a)	740.003	94,91 %	435.262
🗗 301 HSD (b)	768.792	78,60 %	398.487
🗗 301 HSD (a)	449.204	42,15 %	187.928
Mittelwert	722.140	84,16 %	408.423,96
Median	687.964	91,45 %	389.047

Tabelle 24: *Read* Zahlen der 16S rRNA-Sequenzierung der DGRP sechs Tage alten Weibchen nach dem Wechsel auf verschiedene Futter. Die Tabelle zeigt die gleiche Durchführung und Analyse wie Tabelle 23.

Probe/Fliegenlinie	Zahl der gefilterten reads	reads bis Genus	Zahl der <i>reads</i> nach MG-
	aus GTL	klassifiziert (GTL)	RAST QK
😲 859 SD (b)	202.726	96,64 %	165.181
စ္မိ 859 SD (a)	264.372	96,33 %	204.608
😲 859 LSD (b)	255.479	97,14 %	175.692
🕄 859 LSD (a)	337.384	96,65 %	241.634
😲 859 HSD (b)	232.942	96,39 %	177.862
😲 859 HSD (a)	169.391	96,33 %	145.814
😲 315 SD (b)	206.756	97,75 %	105.548
😲 315 SD (a)	292.289	97,36 %	138.460
😲 315 LSD (b)	230.049	95,86 %	106.573
😲 315 LSD (a)	368.959	95,75 %	179.556
😲 315 HSD (b)	270.353	97,24 %	110.487
😲 315 HSD (a)	181.437	74,74 %	90.746
😲 303 SD (b)	190.338	96,83 %	96.423
😲 303 SD (a)	259.575	94,63 %	118.431
😲 303 LSD (b)	251.337	96,87 %	114.311
😲 303 LSD (a)	319.010	95,37 %	149.534
😲 303 HSD (b)	266.733	55,75 %	117.680
😲 303 HSD (a)	171.670	85,73 %	86.945
😲 301 SD (b)	178.611	96,65 %	80.526
😲 301 SD (a)	264.687	95,37 %	111.668
😲 301 LSD (b)	225.333	96,52 %	97.517
😲 301 LSD (a)	219.090	92,79 %	96.950
😲 301 HSD (b)	223.069	14,77 %	123.825

Probe/Fliegenlinie	Zahl der gefilterten reads	<i>reads</i> bis Genus	Zahl der <i>reads</i> nach MG-
	aus GTL	klassifiziert (GTL)	RAST QK
🔋 301 HSD (a)	135.365	6,27 %	80.618
Mittelwert	238.206	86,07 %	129.857,9
Median	231.496	96,33 %	115.995,5

6.3 Metabolitmessungen der konventionell gehaltenen und axenischen DGRP



Abb. 66: Triacylglycerolgehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien. (1. und 2. Messung). Linien in denen keine konventionell gehaltenen und axenischen Fliegen gemessen werden konnten, wurden aus der vergleichenden Analyse ausgeschlossen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Es wurden pro Linie jeweils Quadruplikate aus je acht sechs Tage alte männliche Fliegen analysiert.

Anhang



Abb. 67: Proteingehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien. (1. und 2. Messung). Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abbildung 66.



Abb. 68: Glucosegehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien. (1. und 2. Messung). Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abbildung 66.



Abb. 69: Glykogengehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien. (1. und 2. Messung). Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abbildung 66.

6.4 qPCR Ergebnisse des Mikrobiomaustauschs in Larven und adulten Fliegen



Abb. 70: Detailierte Ergebnisse der qPCR Quantifikation der fünf verschiedenen Bakterienspezies in den drei (Larven) und vier (Adulte) unabhängigen Wiederholungen des Mikrobiomaustauschs zwischen Oregon-R und *white[-]*. Jede Box stellt die relative Abundanz des jeweiligen Bakteriums in den Larven oder Fliegen dar (Ct *dfd* – Ct Bakterium), die sich entweder auf einem *white[-]* oder Oregon-R Mikrobiom entwickelt hatten.







6.5 Test-Färbungen verschiedener Bakterien mit dem DNA-Farbstoff ToPro1

Abb. 71: Test-Färbungen von verschiedenen Bakterien mit dem DNA-Farbstoff ToPro1. Die Proben von *E. coli* und den *type strains* der im *Drosophila* Darmmikrobiom vorkommenden Bakterien wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit ToPro1 gefärbt. Die Aufnahmen wurden an einem Konfokalmikroskop LSM710 erstellt.



6.6 Reassoziation von axenischen Fliegen mit isolierten Mikrobiomen

Abb. 72: Gesamtübersicht über Reassoziationsstudien von axenischen *white[-]* Embryonen auf 0,25 % Hefefutter, die mit aus verschiedenen Fliegenkonditionen isolierten Bakterien reassoziiert wurden. Es wurde die Zeit bis zur Verpuppung und die Anzahl der Puppen dokumentiert, um den wachstumsfördernden Effekt der Mikrobiome zu analysieren. Die Bakterien wurden zuvor auf MRS- und ACE-Agarplatten jeweils aus sechs Tage alten und 23 Tage alten nicht transferierten (Kontr.) und transferierten männlichen *white[-]* Fliegen isoliert. (A) Reassoziation von *white[-]* Embryonen mit Bakterien, die auf MRS- und (B) auf ACE-Medium isoliert wurden. Die Embryonen wurden mit verschiedenen Mengen von Bakterien reassoziiert, um eine Dosisabhängigkeit des wachstumsfördernden Effekts zu untersuchen (100 μL OD₆₀₀= 1 oder 100 μL OD₆₀₀= 25). Als Kontrollen wurden die Entwicklung von Embryonen auf vorinokulierten Futterröhrchen, sowie von Embryonen, die von den Apfelsaftagarplatten gewaschen wurden (Embryowash) und von axenischen Embryonen analysiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen mit mindestens drei Fliegenröhrchen pro Kondition. Die statistische Signfikanz

zwischen den einzelnen Wachstumskurven wurde durch einen Permutationstest analysiert und die exakten p-Werte für alle paarweisen Vergleiche sind in der Matrix (unten) dargestellt.



Abb. 73: Gesamtübersicht über Reassoziationsstudien von axenischen Oregon-R Embryonen auf 0,25 % Hefefutter, die mit aus verschiedenen Fliegenkonditionen isolierten Bakterien reassoziiert wurden. Es wurde die Zeit bis zur Verpuppung und die Anzahl der Puppen dokumentiert, um den wachstumsfördernden Effekt der Mikrobiome zu analysieren. Die Bakterien wurden zuvor auf MRS- und ACE-Agarplatten jeweils aus sechs Tage alten und 23 Tage alten nicht transferierten und aus 23 Tage alten transferierten männlichen Oregon-R Fliegen isoliert. (C) Reassoziation von Oregon-R Embryonen mit Bakterien, die auf MRS- und (D) auf ACE-Medium isoliert wurden. Die Abbildung zeigt die gleiche Durchführung wie Abbildung 72.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

Aas, J., Gessert, C.E., and Bakken, J.S. (2003). Recurrent Clostridium difficile colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. Clin. Infect. Dis. *36*, 580–585.

Abe, T., Yamazaki, D., Murakami, S., Hiroi, M., Nitta, Y., Maeyama, Y., and Tabata, T. (2014). The NAV2 homolog Sickie regulates F-actin-mediated axonal growth in Drosophila mushroom body neurons via the non-canonical Rac-Cofilin pathway. Development *141*, 4716–4728.

Adair, K.L., Wilson, M., Bost, A., and Douglas, A.E. (2018). Microbial community assembly in wild populations of the fruit fly Drosophila melanogaster. ISME J. *12*, 959–972.

Aggarwal, K., Rus, F., Vriesema-Magnuson, C., Ertürk-Hasdemir, D., Paquette, N., and Silverman, N. (2008). Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. PLoS Pathog. *4*, e1000120.

Aghajanian, P., Takashima, S., Paul, M., Younossi-Hartenstein, A., and Hartenstein, V. (2016). Metamorphosis of the Drosophila visceral musculature and its role in intestinal morphogenesis and stem cell formation. Dev. Biol. *420*, 43–59.

Aguila, J.R., Suszko, J., Gibbs, A.G., and Hoshizaki, D.K. (2007). The role of larval fat cells in adult Drosophila melanogaster. J. Exp. Biol. *210*, 956–963.

Alikhan, N.-F., Petty, N.K., Ben Zakour, N.L., and Beatson, S.A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. BMC Genomics *12*, 402.

Alm, E.W., Oerther, D.B., Larsen, N., Stahl, D.A., and Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. Appl. Environ. Microbiol. *62*, 3557–3559.

Amann, R., and Fuchs, B.M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. Nat. Rev. Microbiol. *6*, 339–348.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. *56*, 1919–1925.

Anagnostou, C., Dorsch, M., and Rohlfs, M. (2010). Influence of dietary yeasts on Drosophila melanogaster life-history traits. Entomol Exp Appl *136*, 1–11.

Andres, A.J., Fletcher, J.C., Karim, F.D., and Thummel, C.S. (1993). Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of Drosophila ecdysteroid-regulated transcription. Dev. Biol. *160*, 388–404.

Apidianakis, Y., and Rahme, L.G. (2011). Drosophila melanogaster as a model for human intestinal infection and pathology. Dis. Model. Mech. *4*, 21–30.

Apostolopoulou, A.A., Köhn, S., Stehle, B., Lutz, M., Wüst, A., Mazija, L., Rist, A., Galizia, C.G., Lüdke, A., and Thum, A.S. (2016). Caffeine taste signaling in drosophila larvae. Front. Cell Neurosci. *10*, 193.

Asling, B., Dushay, M.S., and Hultmark, D. (1995). Identification of early genes in the Drosophila immune response by PCRbased differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. Insect Biochem. Mol. Biol. *25*, 511– 518.

Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N., et al. (2009). Whole-genome analyses reveal genetic instability of Acetobacter pasteurianus. Nucleic Acids Res. *37*, 5768–5783.

Backhaus, B., Sulkowski, E., and Schlote, F.W. (1984). A semi-synthetic, general-purpose medium for D. melanogaster. Drosoph Inf Serv *60*, 210–212.

Bäckhed, F. (2012). Host responses to the human microbiome. Nutr. Rev. 70 Suppl 1, S14-7.

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 15718–15723.

Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., et al. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. Cell Host Microbe *17*, 690–703.

Bakula, M. (1969). The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of Drosophila melanogaster. J. Invertebr. Pathol. 14, 365–374.

Bellen, H.J., and Yamamoto, S. (2015). Morgan's legacy: fruit flies and the functional annotation of conserved genes. Cell *163*, 12–14.

Belvin, M.P., and Anderson, K.V. (1996). A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *12*, 393–416.

Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C., Goossens, H., Desager, K.N., and Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. Gut Pathog *5*, 10.

Bi, J., Sehgal, A., Williams, J.A., and Wang, Y.-F. (2018). Wolbachia affects sleep behavior in Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol. *107*, 81–88.

Blum, J.E., Fischer, C.N., Miles, J., and Handelsman, J. (2013). Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of Drosophila melanogaster. MBio 4, e00860–13.

Bonfini, A., Liu, X., and Buchon, N. (2016). From pathogens to microbiota: How Drosophila intestinal stem cells react to gut microbes. Dev. Comp. Immunol.

Bosco-Drayon, V., Poidevin, M., Boneca, I.G., Narbonne-Reveau, K., Royet, J., and Charroux, B. (2012). Peptidoglycan sensing by the receptor PGRP-LE in the Drosophila gut induces immune responses to infectious bacteria and tolerance to microbiota. Cell Host Microbe *12*, 153–165.

Bost, A., Franzenburg, S., Adair, K.L., Martinson, V.G., Loeb, G., and Douglas, A.E. (2017). How gut transcriptional function of Drosophila melanogaster varies with the presence and composition of the gut microbiota. Mol. Ecol. *27*, 1848–1859.

Bost, A., Martinson, V.G., Franzenburg, S., Adair, K.L., Albasi, A., Wells, M.T., and Douglas, A.E. (2018). Functional variation in the gut microbiome of wild Drosophila populations. Mol. Ecol. *27*, 2834–2845.

Boutros, M., Agaisse, H., and Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in Drosophila. Dev. Cell *3*, 711–722.

Broderick, N.A. (2016). Friend, foe or food? Recognition and the role of antimicrobial peptides in gut immunity and Drosophila-microbe interactions. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci. *371*.

Broderick, N.A., and Lemaitre, B. (2012). Gut-associated microbes of Drosophila melanogaster. Gut Microbes 3, 307–321.

Broderick, N.A., Buchon, N., and Lemaitre, B. (2014). Microbiota-induced changes in drosophila melanogaster host gene expression and gut morphology. MBio *5*, e01117–14.

Buchon, N., Broderick, N.A., Chakrabarti, S., and Lemaitre, B. (2009a). Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in Drosophila. Genes Dev. *23*, 2333–2344.

Buchon, N., Broderick, N.A., Poidevin, M., Pradervand, S., and Lemaitre, B. (2009b). Drosophila intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. Cell Host Microbe *5*, 200–211.

159

Buchon, N., Osman, D., David, F.P.A., Fang, H.Y., Boquete, J.-P., Deplancke, B., and Lemaitre, B. (2013a). Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in Drosophila. Cell Rep. *3*, 1725–1738.

Buchon, N., Broderick, N.A., and Lemaitre, B. (2013b). Gut homeostasis in a microbial world: insights from Drosophila melanogaster. Nat. Rev. Microbiol. *11*, 615–626.

Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014). Immunity in Drosophila melanogaster--from microbial recognition to wholeorganism physiology. Nat. Rev. Immunol. *14*, 796–810.

Bulet, P., Dimarcq, J.L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., and Hoffmann, J.A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of Drosophila carries an O-glycosylated substitution. J. Biol. Chem. *268*, 14893–14897.

Busslinger, M., Moschonas, N., and Flavell, R.A. (1981). Beta + thalassemia: aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. Cell 27, 289–298.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. *55*, 611–622.

Cao, Y., Shen, J., and Ran, Z.H. (2014). Association between Faecalibacterium prausnitzii Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. Gastroenterol Res Pract *2014*, 872725.

Capo, F., Charroux, B., and Royet, J. (2016). Bacteria sensing mechanisms in Drosophila gut: Local and systemic consequences. Dev. Comp. Immunol.

Capo, F., Wilson, A., and Di Cara, F. (2019). The Intestine of Drosophila melanogaster: An Emerging Versatile Model System to Study Intestinal Epithelial Homeostasis and Host-Microbial Interactions in Humans. Microorganisms *7*.

Carrasco-Rando, M., Atienza-Manuel, A., Martín, P., Burke, R., and Ruiz-Gómez, M. (2016). Fear-of-intimacy-mediated zinc transport controls the function of zinc-finger transcription factors involved in myogenesis. Development *143*, 1948–1957.

Carvalho, M., Schwudke, D., Sampaio, J.L., Palm, W., Riezman, I., Dey, G., Gupta, G.D., Mayor, S., Riezman, H., Shevchenko, A., et al. (2010). Survival strategies of a sterol auxotroph. Development *137*, 3675–3685.

Cenit, M.C., Sanz, Y., and Codoñer-Franch, P. (2017). Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. World J. Gastroenterol. 23, 5486–5498.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., and Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J. Microbiol. Methods *69*, 330–339.

Chandler, J.A., Lang, J.M., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., and Kopp, A. (2011). Bacterial communities of diverse Drosophila species: ecological context of a host-microbe model system. PLoS Genet. 7, e1002272.

Chandler, J.A., Eisen, J.A., and Kopp, A. (2012). Yeast communities of diverse Drosophila species: comparison of two symbiont groups in the same hosts. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 7327–7336.

Chanyi, R.M., Craven, L., Harvey, B., Reid, G., Silverman, M.J., and Burton, J.P. (2017). Faecal microbiota transplantation: Where did it start? What have studies taught us? Where is it going? SAGE Open Med. *5*, 2050312117708712.

Chapman, R.F. (2013). The Insects Structure and Function (Cambridge, UK: Cambridge University Press).

Chaston, J.M., Newell, P.D., and Douglas, A.E. (2014). Metagenome-wide association of microbial determinants of host phenotype in Drosophila melanogaster. MBio *5*, e01631–14.

Church, R.B., and Robertson, F.W. (1966). Biochemical analysis of genetic differences in the growth of Drosophila. Genet Res 7, 383.

Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., and O'Toole, P.W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. PLoS One *4*, e6669.

Claesson, M.J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., et al. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *108 Suppl 1*, 4586–4591.

Clark, R.I., Salazar, A., Yamada, R., Fitz-Gibbon, S., Morselli, M., Alcaraz, J., Rana, A., Rera, M., Pellegrini, M., Ja, W.W., et al. (2015). Distinct Shifts in Microbiota Composition during Drosophila Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality. Cell Rep. *12*, 1656–1667.

Coen, D.M. (2001). Quantitation of rare DNAs by PCR. Curr. Protoc. Immunol. Chapter 10, Unit 10.21.

Cooke, J., and Sang, J.H. (1970). Utilization of Sterols by Larvae of Drosophila melanogastaer. J. Insect Physiol. 16, 801–812.

Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibnsouda, S., and Vincent, A. (1999). Head versus trunk patterning in the Drosophila embryo; collier requirement for formation of the intercalary segment. Development *126*, 4385–4394.

David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature *505*, 559–563.

Davis, G.H. (1955). The classification of Lactobacilli from the human mouth. J. Gen. Microbiol. 13, 481–493.

Deshpande, S.A., Carvalho, G.B., Amador, A., Phillips, A.M., Hoxha, S., Lizotte, K.J., and Ja, W.W. (2014). Quantifying Drosophila food intake: comparative analysis of current methodology. Nat. Methods *11*, 535–540.

Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1994). Characterization and transcriptional profiles of a Drosophila gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. Eur. J. Biochem. *221*, 201–209.

Dobson, A.J., Chaston, J.M., Newell, P.D., Donahue, L., Hermann, S.L., Sannino, D.R., Westmiller, S., Wong, A.C.-N., Clark, A.G., Lazzaro, B.P., et al. (2015). Host genetic determinants of microbiota-dependent nutrition revealed by genome-wide analysis of Drosophila melanogaster. Nat. Commun. *6*, 6312.

Douglas, A.E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. Annu Rev Entomol *60*, 17–34.

Douglas, A.E., Bouvaine, S., and Russell, R.R. (2011). How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. Proc. Biol. Sci. *278*, 333–338.

Early, A.M., Shanmugarajah, N., Buchon, N., and Clark, A.G. (2017). Drosophila genotype influences commensal bacterial levels. PLoS One *12*, e0170332.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Science *308*, 1635–1638.

Ekengren, S., and Hultmark, D. (1999). Drosophila cecropin as an antifungal agent. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 965–972.

Ellekilde, M., Selfjord, E., Larsen, C.S., Jakesevic, M., Rune, I., Tranberg, B., Vogensen, F.K., Nielsen, D.S., Bahl, M.I., Licht, T.R., et al. (2014). Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. Sci. Rep. *4*, 5922.

Elya, C., Zhang, V., Ludington, W.B., and Eisen, M.B. (2016). Stable Host Gene Expression in the Gut of Adult Drosophila melanogaster with Different Bacterial Mono-Associations. PLoS One *11*, e0167357.

Erkosar, B., and Leulier, F. (2014). Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: novel insights from the Drosophila model. FEBS Lett. *588*, 4250–4257.

Erkosar, B., Storelli, G., Defaye, A., and Leulier, F. (2013). Host-intestinal microbiota mutualism: "learning on the fly". Cell Host Microbe 13, 8–14.

Erkosar, B., Defaye, A., Bozonnet, N., Puthier, D., Royet, J., and Leulier, F. (2014). Drosophila microbiota modulates host metabolic gene expression via IMD/NF-κB signaling. PLoS One *9*, e94729.

Erkosar, B., Storelli, G., Mitchell, M., Bozonnet, L., Bozonnet, N., and Leulier, F. (2015). Pathogen Virulence Impedes Mutualist-Mediated Enhancement of Host Juvenile Growth via Inhibition of Protein Digestion. Cell Host Microbe *18*, 445–455.

Erkosar, B., Yashiro, E., Zajitschek, F., Friberg, U., Maklakov, A.A., van der Meer, J.R., and Kawecki, T.J. (2018). Host diet mediates a negative relationship between abundance and diversity of Drosophila gut microbiota. Ecol. Evol. *8*, 9491–9502.

Faith, J.J., Guruge, J.L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A.L., Clemente, J.C., Knight, R., Heath, A.C., Leibel, R.L., et al. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. Science *341*, 1237439.

Fast, D., Duggal, A., and Foley, E. (2018). Monoassociation with Lactobacillus plantarum Disrupts Intestinal Homeostasis in Adult Drosophila melanogaster. MBio 9.

Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (1994). Insect immunity. Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. J. Biol. Chem. *269*, 33159–33163.

Fink, C., Staubach, F., Kuenzel, S., Baines, J.F., and Roeder, T. (2013). Noninvasive analysis of microbiome dynamics in the fruit fly Drosophila melanogaster. Appl. Environ. Microbiol. *79*, 6984–6988.

Fischer, C.N., Trautman, E.P., Crawford, J.M., Stabb, E.V., Handelsman, J., and Broderick, N.A. (2017). Metabolite exchange between microbiome members produces compounds that influence Drosophila behavior. Elife *6*.

Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., and Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. Gut Microbes *3*, 289–306.

Foley, E., and O'Farrell, P.H. (2004). Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi screen. PLoS Biol. *2*, E203.

Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *104*, 13780–13785.

Fry, A.J., Palmer, M.R., and Rand, D.M. (2004). Variable fitness effects of Wolbachia infection in Drosophila melanogaster. Heredity *93*, 379–389.

Fuss, B., Becker, T., Zinke, I., and Hoch, M. (2006). The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in Drosophila. Nature 444, 945–948.

Gall, J.G., and Pardue, M.L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *63*, 378–383.

Gammon, K.S., Livens, S., Pawlowsky, K., Rawling, S.J., Chandra, S., and Middleton, A.M. (2007). Development of real-time PCR methods for the rapid detection of low concentrations of Gluconobacter and Gluconacetobacter species in an electrolyte replacement drink. Lett. Appl. Microbiol. *44*, 262–267.

García, E., Llull, D., Muñoz, R., Mollerach, M., and López, R. (2000). Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of Streptococcus pneumoniae. Res. Microbiol. *151*, 429–435.

Glittenberg, M.T., Kounatidis, I., Christensen, D., Kostov, M., Kimber, S., Roberts, I., and Ligoxygakis, P. (2011). Pathogen and host factors are needed to provoke a systemic host response to gastrointestinal infection of Drosophila larvae by Candida albicans. Dis. Model. Mech. *4*, 515–525.

Gloor, G.B., Preston, C.R., Johnson-Schlitz, D.M., Nassif, N.A., Phillis, R.W., Benz, W.K., Robertson, H.M., and Engels, W.R. (1993). Type I repressors of P element mobility. Genetics *135*, 81–95.

Görigk, S.A. (2016). Studien zur Wirt-Mikrobiom Interaktion am Beispiel von Drosophila melanogaster. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gray, M.W., Sankoff, D., and Cedergren, R.J. (1984). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. *12*, 5837–5852.

Gruntenko, N.E., Ilinsky, Y.Y., Adonyeva, N.V., Burdina, E.V., Bykov, R.A., Menshanov, P.N., and Rauschenbach, I.Y. (2017). Various Wolbachia genotypes differently influence host Drosophila dopamine metabolism and survival under heat stress conditions. BMC Evol. Biol. *17*, 252.

Guo, L., Karpac, J., Tran, S.L., and Jasper, H. (2014). PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. Cell *156*, 109–122.

Han, G., Lee, H.J., Jeong, S.E., Jeon, C.O., and Hyun, S. (2017). Comparative Analysis of Drosophila melanogaster Gut Microbiota with Respect to Host Strain, Sex, and Age. Microb. Ecol. 74, 207–216.

Härle, A. (2018). Nachweis des Darmmikrobioms von Drosophila melanogaster mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Harper, A., Naghibi, M.M., and Garcha, D. (2018). The role of bacteria, probiotics and diet in irritable bowel syndrome. Foods 7.

Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., and Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Annu Rev Entomol *54*, 285–302.

Hermann-Bank, M.L., Skovgaard, K., Stockmarr, A., Larsen, N., and Mølbak, L. (2013). The Gut Microbiotassay: a highthroughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. BMC Genomics *14*, 788.

Heys, C., Lizé, A., Blow, F., White, L., Darby, A., and Lewis, Z.J. (2018). The effect of gut microbiota elimination in Drosophila melanogaster: A how-to guide for host-microbiota studies. Ecol. Evol. *8*, 4150–4161.

Horne, I., Haritos, V.S., and Oakeshott, J.G. (2009). Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. Insect Biochem. Mol. Biol. *39*, 547–567.

Hu, H.-J., Park, S.-G., Jang, H.B., Choi, M.-K., Park, K.-H., Kang, J.H., Park, S.I., Lee, H.-J., and Cho, S.-H. (2015). Obesity alters the microbial community profile in korean adolescents. PLoS One *10*, e0134333.

Huang, J.-H., and Douglas, A.E. (2015). Consumption of dietary sugar by gut bacteria determines Drosophila lipid content. Biol. Lett. *11*, 20150469.

Huang, W., Massouras, A., Inoue, Y., Peiffer, J., Ràmia, M., Tarone, A.M., Turlapati, L., Zichner, T., Zhu, D., Lyman, R.F., et al. (2014). Natural variation in genome architecture among 205 Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel lines. Genome Res. *24*, 1193–1208.

Illumina, Inc. (2016). An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Illumina, Inc.

Imler, J.-L., and Bulet, P. (2005). Antimicrobial peptides in Drosophila: structures, activities and gene regulation. Chem. Immunol. Allergy *86*, 1–21.

Inamine, H., Ellner, S.P., Newell, P.D., Luo, Y., Buchon, N., and Douglas, A.E. (2018). Spatiotemporally Heterogeneous Population Dynamics of Gut Bacteria Inferred from Fecal Time Series Data. MBio *9*.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. World J. Gastroenterol. *21*, 8787–8803.

Verzeichnisse

Jehrke, L. (2019). Modellierung metabolischer Entscheidungsprozesse mit Hilfe des Modellorganismus Drosophila melanogaster als experimentelles Testsystem. Doctoral dissertation. Mathematische Modellierung biologischer Systeme, Systembiologie des Fettstoffwechsels der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Jehrke, L., Stewart, F.A., Droste, A., and Beller, M. (2018). The impact of genome variation and diet on the metabolic phenotype and microbiome composition of Drosophila melanogaster. Sci. Rep. *8*, 6215.

Jones, R.M., Luo, L., Ardita, C.S., Richardson, A.N., Kwon, Y.M., Mercante, J.W., Alam, A., Gates, C.L., Wu, H., Swanson, P.A., et al. (2013). Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. EMBO J. *32*, 3017–3028.

Jumbo-Lucioni, P., Ayroles, J.F., Chambers, M.M., Jordan, K.W., Leips, J., Mackay, T.F., and De Luca, M. (2010). Systems genetics analysis of body weight and energy metabolism traits in Drosophila melanogaster. BMC Genomics *11*, 297.

Kaneko, T., Goldman, W.E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., and Silverman, N. (2004). Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the Drosophila IMD pathway. Immunity *20*, 637–649.

Kang, D.-W., Adams, J.B., Gregory, A.C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., Khoruts, A., Geis, E., Maldonado, J., McDonough-Means, S., et al. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. Microbiome *5*, 10.

Kasai, C., Sugimoto, K., Moritani, I., Tanaka, J., Oya, Y., Inoue, H., Tameda, M., Shiraki, K., Ito, M., Takei, Y., et al. (2015). Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. BMC Gastroenterol. *15*, 100.

Keebaugh, E.S., Yamada, R., Obadia, B., Ludington, W.B., and Ja, W.W. (2018). Microbial quantity impacts drosophila nutrition, development, and lifespan. iScience *4*, 247–259.

Kietz, C., Pollari, V., and Meinander, A. (2018). Generating Germ-Free Drosophila to Study Gut-Microbe Interactions: Protocol to Rear Drosophila Under Axenic Conditions. Curr. Protoc. Toxicol. *77*, e52.

Kim, E.-K., Park, Y.M., Lee, O.Y., and Lee, W.-J. (2013). Draft Genome Sequence of Lactobacillus brevis Strain EW, a Drosophila Gut Pathobiont. Genome Announc. 1.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., et al. (2003). Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 1990–1995.

Kleino, A., Myllymäki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L.-M., Oksanen, K., Ulvila, J., Hultmark, D., Valanne, S., and Rämet, M. (2008). Pirk is a negative regulator of the Drosophila Imd pathway. J. Immunol. *180*, 5413–5422.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. *41*, e1.

Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., et al. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. BMC Microbiol. *17*, 120.

Komminoth, P. (1992). Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. Diagn Mol Pathol 1, 142–150.

Kostic, A.D., Howitt, M.R., and Garrett, W.S. (2013). Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. Genes Dev. 27, 701–718.

Koyle, M.L., Veloz, M., Judd, A.M., Wong, A.C.-N., Newell, P.D., Douglas, A.E., and Chaston, J.M. (2016). Rearing the Fruit Fly Drosophila melanogaster Under Axenic and Gnotobiotic Conditions. J. Vis. Exp.

Krause, C., Wolf, C., Hemphälä, J., Samakovlis, C., and Schuh, R. (2006). Distinct functions of the leucine-rich repeat transmembrane proteins capricious and tartan in the Drosophila tracheal morphogenesis. Dev. Biol. *296*, 253–264.

Kylsten, P., Kimbrell, D., Daffre, S., Samakovlis, C., and Hultmark, D. (1992). The lysozyme locus in Drosophila melanogaster: different genes are expressed in midgut and salivary glands. Molec. Gen. Genet. *232*.

Langer-Safer, P.R., Levine, M., and Ward, D.C. (1982). Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *79*, 4381–4385.

Larsen, N., Vogensen, F.K., van den Berg, F.W.J., Nielsen, D.S., Andreasen, A.S., Pedersen, B.K., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., Hansen, L.H., and Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. PLoS One *5*, e9085.

Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Claes, I.J.J., De Hertogh, G., Vermeire, S., Buyse, J., Van Immerseel, F., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J. (2011). FISH analysis of Lactobacillus biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. Lett. Appl. Microbiol. *52*, 220–226.

Lee, I.-C., Caggianiello, G., van Swam, I.I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P.A., Spano, G., and Kleerebezem, M. (2016). Strain-Specific Features of Extracellular Polysaccharides and Their Impact on Lactobacillus plantarum-Host Interactions. Appl. Environ. Microbiol. *82*, 3959–3970.

Lee, K.-A., Kim, S.-H., Kim, E.-K., Ha, E.-M., You, H., Kim, B., Kim, M.-J., Kwon, Y., Ryu, J.-H., and Lee, W.-J. (2013). Bacterialderived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in Drosophila. Cell *153*, 797–811.

Lee, K.-S., Kwon, O.-Y., Lee, J.H., Kwon, K., Min, K.-J., Jung, S.-A., Kim, A.-K., You, K.-H., Tatar, M., and Yu, K. (2008). Drosophila short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. Nat. Cell Biol. *10*, 468–475.

Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of Drosophila melanogaster. Annu. Rev. Immunol. 25, 697–743.

Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997). Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 14614–14619.

Levashina, E.A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J.M., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (1995). Metchnikowin, a novel immuneinducible proline-rich peptide from Drosophila with antibacterial and antifungal properties. Eur. J. Biochem. *233*, 694–700.

Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature 444, 1022–1023.

Li, H., Qi, Y., and Jasper, H. (2016). Preventing Age-Related Decline of Gut Compartmentalization Limits Microbiota Dysbiosis and Extends Lifespan. Cell Host Microbe *19*, 240–253.

Liu, X., Hodgson, J.J., and Buchon, N. (2017). Drosophila as a model for homeostatic, antibacterial, and antiviral mechanisms in the gut. PLoS Pathog. *13*, e1006277.

Liu, Y., Liao, S., Veenstra, J.A., and Nässel, D.R. (2016). Drosophila insulin-like peptide 1 (DILP1) is transiently expressed during non-feeding stages and reproductive dormancy. Sci. Rep. *6*, 26620.

Losasso, C., Eckert, E.M., Mastrorilli, E., Villiger, J., Mancin, M., Patuzzi, I., Di Cesare, A., Cibin, V., Barrucci, F., Pernthaler, J., et al. (2018). Assessing the influence of vegan, vegetarian and omnivore oriented westernized dietary styles on human gut microbiota: A cross sectional study. Front. Microbiol. *9*, 317.

Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature 489, 220–230.

Ma, D., Bou-Sleiman, M., Joncour, P., Indelicato, C.-E., Frochaux, M., Braman, V., Litovchenko, M., Storelli, G., Deplancke, B., and Leulier, F. (2019). Commensal Gut Bacteria Buffer the Impact of Host Genetic Variants on Drosophila Developmental Traits under Nutritional Stress. iScience *19*, 436–447.

Mackay, T.F.C., Richards, S., Stone, E.A., Barbadilla, A., Ayroles, J.F., Zhu, D., Casillas, S., Han, Y., Magwire, M.M., Cridland, J.M., et al. (2012). The Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel. Nature *482*, 173–178.

Magnusson, K.R., Hauck, L., Jeffrey, B.M., Elias, V., Humphrey, A., Nath, R., Perrone, A., and Bermudez, L.E. (2015). Relationships between diet-related changes in the gut microbiome and cognitive flexibility. Neuroscience *300*, 128–140.

Maillet, F., Bischoff, V., Vignal, C., Hoffmann, J., and Royet, J. (2008). The Drosophila peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. Cell Host Microbe *3*, 293–303.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *103*, 15611–15616.

Marianes, A., and Spradling, A.C. (2013). Physiological and stem cell compartmentalization within the Drosophila midgut. Elife 2, e00886.

Martino, M.E., Bayjanov, J.R., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., Siezen, R., van Hijum, S.A.F.T., and Leulier, F. (2015). Resequencing of the Lactobacillus plantarum Strain WJL Genome. Genome Announc. *3*.

Martino, M.E., Joncour, P., Leenay, R., Gervais, H., Shah, M., Hughes, S., Gillet, B., Beisel, C., and Leulier, F. (2018). Bacterial Adaptation to the Host's Diet Is a Key Evolutionary Force Shaping Drosophila-Lactobacillus Symbiosis. Cell Host Microbe 24, 109–119.e6.

Maslanka, R., Kwolek-Mirek, M., and Zadrag-Tecza, R. (2018). Autofluorescence of yeast Saccharomyces cerevisiae cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications. J. Microbiol. Methods *146*, 55–60.

Matos, R.C., Schwarzer, M., Gervais, H., Courtin, P., Joncour, P., Gillet, B., Ma, D., Bulteau, A.-L., Martino, M.E., Hughes, S., et al. (2017). D-Alanylation of teichoic acids contributes to Lactobacillus plantarum-mediated Drosophila growth during chronic undernutrition. Nat. Microbiol.

Matsuo, K., Ota, H., Akamatsu, T., Sugiyama, A., and Katsuyama, T. (1997). Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. Gut 40, 782–789.

Matzkin, L.M., Johnson, S., Paight, C., and Markow, T.A. (2013). Preadult parental diet affects offspring development and metabolism in Drosophila melanogaster. PLoS One *8*, e59530.

McQuin, C., Goodman, A., Chernyshev, V., Kamentsky, L., Cimini, B.A., Karhohs, K.W., Doan, M., Ding, L., Rafelski, S.M., Thirstrup, D., et al. (2018). CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. PLoS Biol. *16*, e2005970.

Metaxakis, A., and Partridge, L. (2013). Dietary restriction extends lifespan in wild-derived populations of Drosophila melanogaster. PLoS One *8*, e74681.

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., et al. (2008). The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics *9*, 386.

Micchelli, C.A. (2014). Whole-mount immunostaining of the adult Drosophila gastrointestinal tract. Methods 68, 273–279.

Miele, L., Giorgio, V., Alberelli, M.A., De Candia, E., Gasbarrini, A., and Grieco, A. (2015). Impact of gut microbiota on obesity, diabetes, and cardiovascular disease risk. Curr. Cardiol. Rep. *17*, 120.

Miguel-Aliaga, I., Jasper, H., and Lemaitre, B. (2018). Anatomy and Physiology of the Digestive Tract of Drosophila melanogaster. Genetics *210*, 357–396.

Mistry, R., Kounatidis, I., and Ligoxygakis, P. (2017). Interaction Between Familial Transmission and a Constitutively Active Immune System Shapes Gut Microbiota in Drosophila melanogaster. Genetics *206*, 889–904.

Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., and Castillo, F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. J. Bacteriol. *181*, 6573–6584.

Morris, O., Liu, X., Domingues, C., Runchel, C., Chai, A., Basith, S., Tenev, T., Chen, H., Choi, S., Pennetta, G., et al. (2016). Signal integration by the ikb protein pickle shapes drosophila innate host defense. Cell Host Microbe *20*, 283–295.

Morton, D.B., Clemens-Grisham, R., Hazelett, D.J., and Vermehren-Schmaedick, A. (2010). Infertility and male mating behavior deficits associated with Pde1c in Drosophila melanogaster. Genetics *186*, 159–165.

Musselman, L.P., Fink, J.L., Narzinski, K., Ramachandran, P.V., Hathiramani, S.S., Cagan, R.L., and Baranski, T.J. (2011). A highsugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type Drosophila. Dis. Model. Mech. *4*, 842–849.

Musselman, L.P., Fink, J.L., Maier, E.J., Gatto, J.A., Brent, M.R., and Baranski, T.J. (2018). Seven-Up Is a Novel Regulator of Insulin Signaling. Genetics 208, 1643–1656.

Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2011). Interactions between Gut Microbiota and Host Metabolism Predisposing to Obesity and Diabetes. Annu. Rev. Med. *62*, 361–380.

Naikkhwah, W., and O'Donnell, M.J. (2012). Phenotypic plasticity in response to dietary salt stress: Na+ and K+ transport by the gut of Drosophila melanogaster larvae. J. Exp. Biol. *215*, 461–470.

Nakano, T., and Suzuki, K. (1989). Genetic cause of a juvenile form of Sandhoff disease. Abnormal splicing of betahexosaminidase beta chain gene transcript due to a point mutation within intron 12. J. Biol. Chem. *264*, 5155–5158.

Necşulea, A., and Lobry, J.R. (2007). A new method for assessing the effect of replication on DNA base composition asymmetry. Mol. Biol. Evol. 24, 2169–2179.

Neil Sarkar, I. (2013). Methods in Biomedical Informatics - A Pragmatic Approach (Academic Press).

Newell, P.D., and Douglas, A.E. (2014). Interspecies interactions determine the impact of the gut microbiota on nutrient allocation in Drosophila melanogaster. Appl. Environ. Microbiol. *80*, 788–796.

Newell, P.D., Chaston, J.M., Wang, Y., Winans, N.J., Sannino, D.R., Wong, A.C.N., Dobson, A.J., Kagle, J., and Douglas, A.E. (2014). In vivo function and comparative genomic analyses of the Drosophila gut microbiota identify candidate symbiosis factors. Front. Microbiol. *5*, 576.

Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., and Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? Dis. Model. Mech. *8*, 1–16.

Obadia, B., Güvener, Z.T., Zhang, V., Ceja-Navarro, J.A., Brodie, E.L., Ja, W.W., and Ludington, W.B. (2017). Probabilistic invasion underlies natural gut microbiome stability. Curr. Biol. *27*, 1999–2006.e8.

Obadia, B., Keebaugh, E.S., Yamada, R., Ludington, W.B., and Ja, W.W. (2018). Diet influences host-microbiota associations in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *115*, E4547–E4548.

Obata, F., Fons, C.O., and Gould, A.P. (2018). Early-life exposure to low-dose oxidants can increase longevity via microbiome remodelling in Drosophila. Nat. Commun. *9*, 975.

Ochiai, H. (2015). Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site-Specific Endonucleases. Int. J. Mol. Sci. 16, 21128–21137.

Ooi, J.H., Waddell, A., Lin, Y.-D., Albert, I., Rust, L.T., Holden, V., and Cantorna, M.T. (2014). Dominant effects of the diet on the microbiome and the local and systemic immune response in mice. PLoS One *9*, e86366.

Overend, G., Luo, Y., Henderson, L., Douglas, A.E., Davies, S.A., and Dow, J.A.T. (2016). Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the Drosophila midgut. Sci. Rep. *6*, 27242.

Pais, I.S., Valente, R.S., Sporniak, M., and Teixeira, L. (2018). Drosophila melanogaster establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria. PLoS Biol. *16*, e2005710.

Park, D.-Y., Ahn, Y.-T., Park, S.-H., Huh, C.-S., Yoo, S.-R., Yu, R., Sung, M.-K., McGregor, R.A., and Choi, M.-S. (2013). Supplementation of Lactobacillus curvatus HY7601 and Lactobacillus plantarum KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. PLoS One *8*, e59470.

Pascacio-Villafán, C., Williams, T., Birke, A., and Aluja, M. (2016). Nutritional and non-nutritional food components modulate phenotypic variation but not physiological trade-offs in an insect. Sci. Rep. *6*, 29413.

Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., van Asch, B., Pinto, N., Gusmão, L., and Amorim, A. (2010). Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. Nucleic Acids Res. *38*, e203.

Petkau, K., Fast, D., Duggal, A.D., and Foley, E. (2016). Comparative evaluation of the genomes of three common Drosophila - associated bacteria. The Company of Biologists Ltd.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. *30*, e36.

Piper, M.D.W., Blanc, E., Leitão-Gonçalves, R., Yang, M., He, X., Linford, N.J., Hoddinott, M.P., Hopfen, C., Soultoukis, G.A., Niemeyer, C., et al. (2014). A holidic medium for Drosophila melanogaster. Nat. Methods *11*, 100–105.

Reedy, A.R., Luo, L., Neish, A.S., and Jones, R.M. (2019). Commensal microbiota induced redox signaling activates proliferative signals in the intestinal stem cell microenvironment. Development.

Remus, D.M., van Kranenburg, R., van Swam, I.I., Taverne, N., Bongers, R.S., Wels, M., Wells, J.M., Bron, P.A., and Kleerebezem, M. (2012). Impact of 4 Lactobacillus plantarum capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. Microb. Cell Fact. *11*, 149.

Ridley, E.V., Wong, A.C.-N., Westmiller, S., and Douglas, A.E. (2012). Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of Drosophila melanogaster. PLoS One 7, e36765.

Ross, J., Jiang, H., Kanost, M.R., and Wang, Y. (2003). Serine proteases and their homologs in the Drosophila melanogaster genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. Gene *304*, 117–131.

Ryu, J.H., Kim, S.H., Lee, H.Y., Bai, J.Y., Nam, Y.D., Bae, J.W., Lee, D.G., Shin, S.C., Ha, E.M., and Lee, W.J. (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in Drosophila. Science *319*, 777–782.

Ryuda, M., Tabuchi, M., Matsumoto, H., Matsumura, T., Ochiai, M., and Hayakawa, Y. (2018). A gene-driven recovery mechanism: Drosophila larvae increase feeding activity for post-stress weight recovery. Arch Insect Biochem Physiol *97*.

Sam, Q.H., Chang, M.W., and Chai, L.Y.A. (2017). The Fungal Mycobiome and Its Interaction with Gut Bacteria in the Host. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Samakovlis, C., Kimbrell, D.A., Kylsten, P., Engström, A., and Hultmark, D. (1990). The immune response in Drosophila: pattern of cecropin expression and biological activity. EMBO J. *9*, 2969–2976.

Sang, J., and King, R. (1961). Nutrional requirements of axenically cultured Drosophila melanogaster adults. J. Exp. Biol. 38, 793–809.

Sannino, D.R., Dobson, A.J., Edwards, K., Angert, E.R., and Buchon, N. (2018). The Drosophila melanogaster Gut Microbiota Provisions Thiamine to Its Host. MBio *9*.

Sansone, C.L., Cohen, J., Yasunaga, A., Xu, J., Osborn, G., Subramanian, H., Gold, B., Buchon, N., and Cherry, S. (2015). Microbiota-Dependent Priming of Antiviral Intestinal Immunity in Drosophila. Cell Host Microbe 18, 571–581.

Sbahi, H., and Di Palma, J.A. (2016). Faecal microbiota transplantation: applications and limitations in treating gastrointestinal disorders. BMJ Open Gastroenterol. *3*, e000087.

Schmidt, T.S.B., Raes, J., and Bork, P. (2018). The human gut microbiome: from association to modulation. Cell *172*, 1198–1215.

Schou, M.F., Kristensen, T.N., Pedersen, A., Karlsson, B.G., Loeschcke, V., and Malmendal, A. (2017). Metabolic and functional characterization of effects of developmental temperature in Drosophila melanogaster. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *312*, R211–R222.

Schretter, C.E., Vielmetter, J., Bartos, I., Marka, Z., Marka, S., Argade, S., and Mazmanian, S.K. (2018). A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in Drosophila. Nature *563*, 402–406.

Schwarzer, M., Makki, K., Storelli, G., Machuca-Gayet, I., Srutkova, D., Hermanova, P., Martino, M.E., Balmand, S., Hudcovic, T., Heddi, A., et al. (2016). Lactobacillus plantarum strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. Science *351*, 854–857.

Schwiertz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., and Hardt, P.D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity (Silver Spring) *18*, 190–195.

Sekihara, S., Shibata, T., Hyakkendani, M., and Kawabata, S.-I. (2016). RNA interference directed against the Transglutaminase gene triggers dysbiosis of gut microbiota in Drosophila. J. Biol. Chem.

Selkrig, J., Mohammad, F., Ng, S.H., Chua, J.Y., Tumkaya, T., Ho, J., Chiang, Y.N., Rieger, D., Pettersson, S., Helfrich-Förster, C., et al. (2018). The Drosophila microbiome has a limited influence on sleep, activity, and courtship behaviors. Sci. Rep. *8*, 10646. Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. BioRxiv. Serbus, L.R., White, P.M., Silva, J.P., Rabe, A., Teixeira, L., Albertson, R., and Sullivan, W. (2015). The impact of host diet on Wolbachia titer in Drosophila. PLoS Pathog. *11*, e1004777.

Sghir, A., Antonopoulos, D., and Mackie, R.I. (1998). Design and evaluation of a Lactobacillus group-specific ribosomal RNAtargeted hybridization probe and its application to the study of intestinal microecology in pigs. Syst Appl Microbiol *21*, 291– 296.

Sharon, G., Cruz, N.J., Kang, D.-W., Gandal, M.J., Wang, B., Kim, Y.-M., Zink, E.M., Casey, C.P., Taylor, B.C., Lane, C.J., et al. (2019). Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. Cell *177*, 1600–1618.e17.

Shibata, T., Sekihara, S., Fujikawa, T., Miyaji, R., Maki, K., Ishihara, T., Koshiba, T., and Kawabata, S. (2013). Transglutaminasecatalyzed protein-protein cross-linking suppresses the activity of the NF-κB-like transcription factor relish. Sci. Signal. *6*, ra61.

Shin, S.C., Kim, S.-H., You, H., Kim, B., Kim, A.C., Lee, K.-A., Yoon, J.-H., Ryu, J.-H., and Lee, W.-J. (2011). Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. Science *334*, 670–674.

Siezen, R.J., Francke, C., Renckens, B., Boekhorst, J., Wels, M., Kleerebezem, M., and van Hijum, S.A.F.T. (2012). Complete resequencing and reannotation of the Lactobacillus plantarum WCFS1 genome. J. Bacteriol. *194*, 195–196.

Simhadri, R.K., Fast, E.M., Guo, R., Schultz, M.J., Vaisman, N., Ortiz, L., Bybee, J., Slatko, B.E., and Frydman, H.M. (2017). The Gut Commensal Microbiome of Drosophila melanogaster Is Modified by the Endosymbiont Wolbachia. mSphere 2.

Spellerberg, I.F., and Fedor, P.J. (2003). A tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the "Shannon-Wiener" Index. Glob. Ecol. Biogeogr. *12*, 177–179.

Staubach, F., Baines, J.F., Künzel, S., Bik, E.M., and Petrov, D.A. (2013). Host species and environmental effects on bacterial communities associated with Drosophila in the laboratory and in the natural environment. PLoS One *8*, e70749.

Stevenson, D.M., Muck, R.E., Shinners, K.J., and Weimer, P.J. (2006). Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. Appl. Microbiol. Biotechnol. *71*, 329–338.

Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J., and Leulier, F. (2011). Lactobacillus plantarum promotes Drosophila systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. Cell Metab. *14*, 403–414.

Strigini, M., and Leulier, F. (2016). The role of the microbial environment in Drosophila post-embryonic development. Dev. Comp. Immunol.

Swidsinski, A., Weber, J., Loening-Baucke, V., Hale, L.P., and Lochs, H. (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. J. Clin. Microbiol. *43*, 3380–3389.

Takashima, S., Younossi-Hartenstein, A., Ortiz, P.A., and Hartenstein, V. (2011). A novel tissue in an established model system: the Drosophila pupal midgut. Dev. Genes Evol. 221, 69–81.

Tamaki, F.K., Padilha, M.H.P., Pimentel, A.C., Ribeiro, A.F., and Terra, W.R. (2012). Properties and secretory mechanism of Musca domestica digestive chymotrypsin and its relation with Drosophila melanogaster homologs. Insect Biochem. Mol. Biol. *42*, 482–490.

Téfit, M.A., Gillet, B., Joncour, P., Hughes, S., and Leulier, F. (2017). Stable association of a Drosophila-derived microbiota with its animal partner and the nutritional environment throughout a fly population's life cycle. J. Insect Physiol.

Tennessen, J.M., Barry, W.E., Cox, J., and Thummel, C.S. (2014). Methods for studying metabolism in Drosophila. Methods *68*, 105–115.

Teusink, B., van Enckevort, F.H.J., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E.J., and Siezen, R.J. (2005). In silico reconstruction of the metabolic pathways of Lactobacillus plantarum: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. Appl. Environ. Microbiol. *71*, 7253–7262.

Toomey, M.E., Panaram, K., Fast, E.M., Beatty, C., and Frydman, H.M. (2013). Evolutionarily conserved Wolbachia-encoded factors control pattern of stem-cell niche tropism in Drosophila ovaries and favor infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *110*, 10788–10793.

Trinder, M., Daisley, B.A., Dube, J.S., and Reid, G. (2017). Drosophila melanogaster as a High-Throughput Model for Host-Microbiota Interactions. Front. Microbiol. *8*, 751.

Tryselius, Y., Samakovlis, C., Kimbrell, D.A., and Hultmark, D. (1992). CecC, a cecropin gene expressed during metamorphosis in Drosophila pupae. Eur. J. Biochem. *204*, 395–399.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature *444*, 1027–1031.

Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., et al. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature *457*, 480–484.

Tvede, M., and Rask-Madsen, J. (1989). Bacteriotherapy for chronic relapsing Clostridium difficile diarrhoea in six patients. Lancet 1, 1156–1160.

Unckless, R.L., Rottschaefer, S.M., and Lazzaro, B.P. (2015). A genome-wide association study for nutritional indices in Drosophila. G3 (Bethesda) 5, 417–425.

Ureña, E., Manjón, C., Franch-Marro, X., and Martín, D. (2014). Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *111*, 7024–7029.

Vacchini, V., Gonella, E., Crotti, E., Prosdocimi, E.M., Mazzetto, F., Chouaia, B., Callegari, M., Mapelli, F., Mandrioli, M., Alma, A., et al. (2017). Bacterial diversity shift determined by different diets in the gut of the spotted wing fly Drosophila suzukii is primarily reflected on acetic acid bacteria. Environ. Microbiol. Rep. *9*, 91–103.

Valanne, S., Wang, J.-H., and Rämet, M. (2011). The Drosophila Toll signaling pathway. J. Immunol. 186, 649-656.

Vandeputte, D., Kathagen, G., D'hoe, K., Vieira-Silva, S., Valles-Colomer, M., Sabino, J., Wang, J., Tito, R.Y., De Commer, L., Darzi, Y., et al. (2017). Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. Nature *551*, 507–511.

Walsh, C.J., Guinane, C.M., O'Toole, P.W., and Cotter, P.D. (2014). Beneficial modulation of the gut microbiota. FEBS Lett. *588*, 4120–4130.

Wang, Y., and Staubach, F. (2018). Individual variation of natural D.melanogaster-associated bacterial communities. FEMS Microbiol. Lett. *365*.

Wang, R.F., Cao, W.W., and Cerniglia, C.E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. *62*, 1242–1247.

Wayland, M.T., Defaye, A., Rocha, J., Jayaram, S.A., Royet, J., Miguel-Aliaga, I., Leulier, F., and Cognigni, P. (2014). Spotting the differences: probing host/microbiota interactions with a dedicated software tool for the analysis of faecal outputs in Drosophila. J. Insect Physiol. *69*, 126–135.

Wei, J.H., Yin, X., and Welander, P.V. (2016). Sterol synthesis in diverse bacteria. Front. Microbiol. 7, 990.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. *173*, 697–703.

Werren, J.H., Baldo, L., and Clark, M.E. (2008). Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. Nat. Rev. Microbiol. *6*, 741–751.

Werthebach, M., Stewart, F.A., Gahlen, A., Mettler-Altmann, T., Akhtar, I., Maas-Enriquez, K., Droste, A., Eichmann, T.O., Poschmann, G., Stühler, K., et al. (2019). Control of Drosophila Growth and Survival by the Lipid Droplet-Associated Protein CG9186/Sturkopf. Cell Reports.

Whon, T.W., Shin, N.-R., Jung, M.-J., Hyun, D.-W., Kim, H.S., Kim, P.S., and Bae, J.-W. (2017). Conditionally Pathogenic Gut Microbes Promote Larval Growth by Increasing Redox-Dependent Fat Storage in High Sugar Diet-Fed Drosophila. Antioxid. Redox Signal. 43–43.

Wicker, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, D., Hultmark, D., Samakovlis, C., and Hoffmann, J.A. (1990). Insect immunity. Characterization of a Drosophila cDNA encoding a novel member of the diptericin family of immune peptides. J. Biol. Chem. *265*, 22493–22498.

Wong, A.C.N., Vanhove, A.S., and Watnick, P.I. (2016). The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from Drosophila melanogaster. Dis. Model. Mech. *9*, 271–281.

Wong, A.C.-N., Chaston, J.M., and Douglas, A.E. (2013). The inconstant gut microbiota of Drosophila species revealed by 16S rRNA gene analysis. ISME J. *7*, 1922–1932.

Wong, A.C.-N., Dobson, A.J., and Douglas, A.E. (2014). Gut microbiota dictates the metabolic response of Drosophila to diet. J. Exp. Biol. *217*, 1894–1901.

Wong, A.C.-N., Luo, Y., Jing, X., Franzenburg, S., Bost, A., and Douglas, A.E. (2015). The Host as the Driver of the Microbiota in the Gut and External Environment of Drosophila melanogaster. Appl. Environ. Microbiol. *81*, 6232–6240.

Wong, A.C.-N., Wang, Q.-P., Morimoto, J., Senior, A.M., Lihoreau, M., Neely, G.G., Simpson, S.J., and Ponton, F. (2017). Gut Microbiota Modifies Olfactory-Guided Microbial Preferences and Foraging Decisions in Drosophila. Curr. Biol. 27, 2397– 2404.e4.

Wong, C.N.A., Ng, P., and Douglas, A.E. (2011). Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly Drosophila melanogaster. Environ. Microbiol. *13*, 1889–1900.
Wu, S.-C., Cao, Z.-S., Chang, K.-M., and Juang, J.-L. (2017). Intestinal microbial dysbiosis aggravates the progression of Alzheimer's disease in Drosophila. Nat. Commun. *8*, 24.

Yakushi, T., and Matsushita, K. (2010). Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. *86*, 1257–1265.

Yang, B., Wang, Y., and Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC Bioinformatics *17*, 135.

Yatsunenko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature *486*, 222–227.

Ye, Y.H., Seleznev, A., Flores, H.A., Woolfit, M., and McGraw, E.A. (2016). Gut microbiota in Drosophila melanogaster interacts with Wolbachia but does not contribute to Wolbachia-mediated antiviral protection. J. Invertebr. Pathol. *143*, 18–25.

Yiu, J.H.C., Dorweiler, B., and Woo, C.W. (2017). Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism. J. Mol. Med. *95*, 13–20.

Zeng, Y.A., and Verheyen, E.M. (2004). Nemo is an inducible antagonist of Wingless signaling during Drosophila wing development. Development *131*, 2911–2920.

Zhai, Z., Huang, X., and Yin, Y. (2017). Beyond immunity: The Imd pathway as a coordinator of host defense, organismal physiology and behavior. Dev. Comp. Immunol.

Zhang, T., and Fang, H.H.P. (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. Appl. Microbiol. Biotechnol. *70*, 281–289.

Zug, R., and Hammerstein, P. (2012). Still a host of hosts for Wolbachia: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. PLoS One 7, e38544.

7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über Homologien im Verdauungssystem vom Menschen und Drosophila melanogaster	5
Abb. 2: Modell für die verschiedenen Parameter im Wirt, die sich gegenseitig, sowie die Entwicklung, den Metabolismus	
und die Fitness des Wirts beeinflussen	14
Abb. 3: Bakteriengehalt der Embryonen und Abnahme der Kolonien durch die einzelnen Waschschritte im Protokoll zur	
Sterilisation von white[-] und Oregon-R Embryonen.	16
Abb. 4: Agarosegel einer Nachweis-PCR des 16S rRNA Gens in axenischen Drosophila.	17
Abb. 5: Test der Spezifitäten der einzelnen publizierten Primerpaare für einen Bakteriennachweis mittels qPCR	21
Abb. 6: Test der Spezifitäten der einzelnen neu entwickelten Primerpaare für einen Bakteriennachweis mittels qPCR	22
Abb. 7: Test der Spezifitäten weiterer neu entwickelter Primerpaare für einen Bakteriennachweis mittels qPCR	23
Abb. 8: Test der Amplifikationseffizienzen der spezifischen Primerpaare.	25
Abb. 9: Ct-Werte des Drosophila-Gens deformed (dfd), welches zur relativen Quantifizierung von Bakterien-DNA in den	
Fliegenproben verwendet wurde	27
Abb. 10: Beispielhafte Quantifizierung der bakteriellen DNA aus einer qPCR mit speziesspezifischen Primern	27
Abb. 11: Absolute read-Zahlen der Resequenzierungen der einzelnen aus Oregon-R und white[-] Fliegen isolierten	
Darmbakterien	29
Abb. 12: Exemplarische Darstellung der Genomanalysen in Geneious Prime.	32
Abb. 13: Vergleich der Genome des Referenzstamms L. plantarum WCFS1 mit den resequenzierten L. plantarum Stämme	n
MRS Isolat 2 und 4 aus Oregon-R und MRS Isolat 2 und 4 aus white[-] Fliegen, die auf MRS-Agarplatten isoliert wurden	33

Abb. 14: Vergleich der Genome des Referenzstamms A. pasteurianus IFO-3283-01 mit dem des resequenzierten	
A. pasteurianus Stamms ACE Isolat 1 aus white[-] Fliegen, welcher auf ACE-Agarplatten isoliert wurde	4
Abb. 15: Vergleich der Genome des Referenzstamms L. brevis ATCC367 mit dem des resequenzierten L. brevis Stamms ACE	
Isolat 2 aus white[-] Fliegen, der auf MRS-Agarplatten isoliert wurde	5
Abb. 16: Übersicht über die Spezifität der drei FISH-Sonden Eub338-Atto425, Aceto-Atto488 und Lacto722-Atto594 in	
verschiedenen Bakteriensuspensionen	7
Abb. 17: Übersicht über die Spezifität der drei FISH-Sonden an verschiedenen Bakteriensuspensionen	8
Abb. 18: FISH-Analysen an Faeces von adulten white[-] Fliegen mit den Sonden Eub338-Atto425 (blau) und Aceto-Atto488	
(grün) 4	0
Abb. 19: Vergleich von Paraformaldehyd und Carnoy's Solution Fixierung an larvalen Därmen	.1
Abb. 20: FISH an larvalen Därmen von Drosophila mit Eub338-Atto425 und verschiedenen Hybridisierungszeiten	.2
Abb. 21: FISH am Darm einer white[-] L3 Larve	.3
Abb. 22: Bestimmung der TAG-Mengen der DGRP Linien unter basalen Bedingungen	5
Abb. 23: Rarefaction Analyse der basalen DGRP-Sequenzierungen 4	6
Abb. 24: Sequenzierergebnisse der axenischen Oregon-R Fliegen auf Speziesebene 4	.7
Abb. 25: Mikrobiomkomposition auf Speziesebene der vier sequenzierten DGRP Linien unter basalen Futterbedingungen. 4	.8
Abb. 26: Rarefaction Analyse der Sequenzierung von männlichen Fliegen der vier DGRP Linien 301, 303, 315 und 859 5	0
Abb. 27: Rarefaction Analyse der Sequenzierung von weiblichen Fliegen der vier DGRP Linien 301, 303, 315 und 859 5	0
Abb. 28: Hauptkomponentenanalyse der Sequenzierergebnisse der vier DGRP Linien unter basalen Futterbedingungen,	
sowie nach einem Futterwechsel von LSD auf LSD, LSD auf SD und LSD auf HSD5	1
Abb. 29: Hierarchisches Clustering der Sequenzierergebnisse der vier DGRP Linien unter basalen Futterbedingungen, sowie	
nach einem Futterwechsel von LSD auf LSD, LSD auf SD und LSD auf HSD.	2
Abb. 30: Korrelationsmatrix der gemessenen Metabolite der Fliegen sowie ihrem Darmmikrobiom (links) und scatter plots	
einzelner korrelierter Parameter (rechts)	3
Abb. 31: Wachstum der konventionell gehaltenen (KH) (je links) und axenischen (je rechts) DGRP Fliegen in der ersten	
Generation, die sich auf den drei getesteten Futtern entwickelten	5
Abb. 32: Wachstum der konventionell gehaltenen (KH) (je links) und axenischen (je rechts) DGRP Fliegen in der zweiten	
Generation, deren Elterntiere sich bereits auf den gleichen drei Futtern entwickelt hatten.	6
Abb. 33: Manhattan-Plots der GWAS, welche die mit den Differenzen der Entwicklungsfähigkeit der KH und axenischen	
DGRP Fliegen assoziierten SNPs darstellt	7
Abb. 34: Gemeinsame und individuelle Gene, in denen SNPs liegen, die mit der Wachstumsfähigkeit der DGRP Linien auf	
den jeweiligen Futtern assoziiert sind5	9
Abb. 35: Unterschiede im TAG- (oben) und Proteingehalt (unten) von konventionell gehaltenen und axenischen DGRP	
Männchen (sechs Tage alt)6	1
Abb. 36: Unterschiede im Glucose- (oben) und Glykogengehalt (unten) zwischen konventionell gehaltenen und axenischen	
DGRP Männchen (sechs Tage alt)6	2
Abb. 37: Manhattan-Plots der GWAS, welche die mit den Differenzen der Metabolitmessungen der KH und axenischen	
DGRP Fliegen assoziierten SNPs darstellt6	3
Abb. 38: Entwicklung der Puppen von konventionell gehaltenen und axenischen white[-] und Oregon-R Fliegen unter	
Hefemangelbedingungen6	5
Abb. 39: Quantifizierung verschiedener Metabolite aus white[-] oder Oregon-R L3 Larvenextrakten	7

Abb. 40: Metabolische Messungen aus konventionell gehaltenen sechs Tage alten Fliegen, axenischen sechs Tage alten
Fliegen aus Dauerkulturen mit und ohne Antibiotika und frisch axenischen sechs Tag alten Fliegen von white[-] und Oregon-
R, die sich auf Glucose-Hefe-Futter entwickelten
Abb. 41: Aktivitätsmonitor-Messungen von KH und axenischen Oregon-R und white[-] Weibchen (oben) und Männchen
(unten) über die Zeit
Abb. 42: Einfluss eines Darmmikrobioms auf die Gesamtaktivität von konventionell gehaltenen und axenischen Oregon-R
und white[-] Weibchen (oben) und Männchen (unten) über einen Zeitraum von sieben Tagen
Abb. 43: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von wandernden Oregon-R und white[-] L3 Larven
Abb. 44: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von weiblichen und männlichen sechs Tage alten adulten Oregon-R und
white[-] Fliegen
Abb. 45: Gemessene Fluoresceinmenge, die von white[-] und Oregon-R Männchen über das Futter aufgenommen wurde. 73
Abb. 46: Faeces-Anzahl pro männlicher Fliege von white[-] und Oregon-R über 24 Stunden
Abb. 47: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von wandernden L3 Larven von fluoreszent-gekreuzten Oregon-R und
white[-] nach einem Austausch der Darmbakterien75
Abb. 48: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Bakterien-spezifischen qPCR-Ergebnisse des Mikrobiomaustauschs in Larven
aus drei biologisch unabhängigen Wiederholungen
Abb. 49: Zusammensetzung des Darmmikrobioms von weiblichen und männlichen adulten Fliegen von Oregon-R und
white[-] nach einem Austausch der Darmbakterien in einem Alter von einem und zehn Tagen
Abb. 50: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Bakterien-spezifischen qPCR-Ergebnisse des Mikrobiomaustauschs in einen
Tag (links) und zehn Tage (rechts) alten männlichen Fliegen aus vier Wiederholungen
Abb. 51: Basale Immunantwort von Oregon-R im Vergleich zu white[-] Fliegen
Abb. 52: Auswirkungen eines Darmmikrobiom-Austauschs mit einem white[-] Mikrobiom auf das Immunsystem von einen
und zehn Tage alten Oregon-R männlichen, verpaarten Fliegen im Vergleich zu white[-] männlichen, verpaarten Fliegen 80
Abb. 53: Veränderungen des Bakteriengehalts im Darmmikrobiom von white[-] (links) und Oregon-R Männchen (rechts) 82
Abb. 54: Übersicht über die kolonie-bildenden Einheiten (KBE) in den einzelnen Wiederholungen des Ausplattierens von
sechs Tage alten white[-] und Oregon-R Männchen auf MRS- und ACE-Agarplatten.
Abb. 55: Übersicht über die Morphologie und Anzahl der Bakterienkolonien der ausplattierten männlichen white[-] und
Oregon-R Fliegen auf MRS-Agarplatten
Abb. 56: Übersicht über die Morphologie und Anzahl der Bakterienkolonien der ausplattierten männlichen white[-] und
Oregon-R Fliegen auf ACE-Agarplatten
Abb. 57: Ergebnisse des Next Generation Sequencing der isolierten Mikrobiome aus männlichen Oregon-R und white[-]
Fliegen dargestellt durch den Shannon alpha diversity index
Abb. 58: Bakterielle Komposition der isolierten Mikrobiome aus männlichen white[-] und Oregon-R Fliegen verschiedenen
Alters, die anhand Next Generation Sequencing des 16S rRNA Gens detektiert wurde
Abb. 59: Bakterielle Komposition der isolierten Mikrobiome aus männlichen white[-] und Oregon-R Fliegen verschiedenen
Alters, die anhand Next Generation Sequencing des 16S rRNA Gens detektiert wurden.
Abb. 60: Expressionsanalysen der antimikrobiellen Peptide, attacin B, diptericin, cecropin A2 und drosomycin
Abb. 61: Expressionsanalysen der antimikrobiellen Peptide, attacin B, diptericin, cecropin A2 und drosomycin
Abb. 62: Vergleich von Därmen von nicht transferierten und transferierten neun Tage alten männlichen Oregon-R Fliegen.
Abb. 63: Anzahl der Bakterien pro Darmabschnitt in nicht transferierten und transferierten neun Tage alten Oregon-R
Männchen

Abb. 64: Reassoziation von axenischen white[-] und Oregon-R Embryonen auf 0,25 % Hefefutter mit aus verschiedenen	
Fliegenkonditionen isolierten Bakterien.	. 98
Abb. 65: Übersichtsschema des Mikrobiomaustauschs in adulten Fliegen1	137
Abb. 66: Triacylglycerolgehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien 1	150
Abb. 67: Proteingehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien	151
Abb. 68: Glucosegehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien	152
Abb. 69: Glykogengehalt von konventionell und axenisch gehaltenen sechs Tage alten Männchen der DGRP Linien 1	153
Abb. 70: Detailierte Ergebnisse der qPCR Quantifikation der fünf verschiedenen Bakterienspezies in den drei (Larven) und	ł
vier (Adulte) unabhängigen Wiederholungen des Mikrobiomaustausch-Experiments1	154
Abb. 71: Färbungen von verschiedenen Bakterien mit dem DNA-Farbstoff ToPro11	155
Abb. 72: Gesamtübersicht über Reassoziationsstudien von axenischen white[-] Embryonen auf 0,25 % Hefefutter, die mit	
aus verschiedenen Fliegenkonditionen, auf MRS-Agarplatten isolierten Bakterien reassoziiert wurden	156
Abb. 73: Gesamtübersicht über Reassoziationsstudien von axenischen Oregon-R Embryonen auf 0,25 % Hefefutter, die m	it
aus verschiedenen Fliegenkonditionen auf ACE-Agarplatten isolierten Bakterien reassoziiert wurden 1	157

Tabelle 1: Prozentuale Anteile der Zutaten der verschiedenen axenischen Futter	18
Tabelle 2: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und anschließender BLAST Analyse der subklonierten 16S rRNA Gene	aus
den aus Oregon-R und white[-] isolierten Darmbakterien.	28
Tabelle 3: Signifikant assoziierte SNPs in KH und axenischen Fliegen, die auf verschiedenen Futtern gehalten wurden	58
Tabelle 4: Verwendete Geräte	123
Tabelle 5: Spezielle verwendete Verbrauchsmaterialien.	124
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Futterkomponenten.	124
Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer	126
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zum Nachweis von Bakterienspezies in Drosophila.	127
Tabelle 9: 16S rRNA-V3-V4-Primer zur Sequenzierung des Darmmikrobioms ohne Adaptersequenz und Primer zur	
Klonierung des gesamten 16S rRNA Gens in den TOPO TA Vektor	127
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide zur Analyse der AMP Expression in Drosophila	128
Tabelle 11: Verwendete FISH Sonden.	128
Tabelle 12: Verwendete Antibiotika in axenischen Fliegenfuttern.	128
Tabelle 13: Verwendete Reagenzien, Enzyme und DNA-Farbstoffe	128
Tabelle 14: Verwendete Kits	129
Tabelle 15: Nährmedien für Bakterien	129
Tabelle 16: Verwendete Fliegenfutter	130
Tabelle 17: Verwendete Bakterienstämme	132
Tabelle 18: Verwendete Fliegenstämme	132
Tabelle 19: Temperaturprotokoll für PCR mit einer Phusion HF DNA Polymerase zur Amplifikation des 16S rRNA Gens	142
Tabelle 20: qPCR-Temperaturprotokoll mit anschließender Schmelzkurve.	142
Tabelle 21: Read Zahlen der Resequenzierung der aus Oregon-R oder white[-] isolierten Darmbakterien	147
Tabelle 22: Read Zahlen der basalen 16S rRNA-Sequenzierung DGRP Larven und sechs Tage alten Fliegen	147
Tabelle 23: Read Zahlen der 16S rRNA-Sequenzierung der DGRP sechs Tage alten Männchen nach dem Wechsel auf	
verschiedene Futter.	148
Tabelle 24: Read Zahlen der 16S rRNA-Sequenzierung der DGRP sechs Tage alten Weibchen nach dem Wechsel auf	
verschiedene Futter.	149
	175

7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aceto-Sonde	Acetobacter Bakterien bindende Sonde
AG	Arbeitsgruppe
AMPs	Antimikrobielle Peptide
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin; engl. Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAFE	engl. Capillary Feeder
cDNA	komplementäre DNA, engl. complementary deoxyribonucleic acid
Ct	Schwellenwert-Zyklus, engl. threshold cycle
d. h.	das heißt
Dfd	Deformed
DGRP	Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
dNTPs	Gesamtheit aller Desoxyribonukleinphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FWD	Vorwärts, engl. forward (Primer)
gDNA	Genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien, engl. genome-wide association studies
h	hora/Stunde
HSD	Futter mit erhöhter Zuckerkonzentration, engl. high sugar diet
H-Puffer	Hybridisierungspuffer
IMD	Immundefizienz, engl. immune defiency
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheiten
КН	Konventionell gehaltene Drosophila (mit Darmmikrobiom)
L3	drittes larvales Stadium
LSD	Niedrigzuckerfutter, engl. low sugar diet
M	mol/L
min	Minute
Mio.	Millionen
mL	Milliliter
mRNA	messenger RNA
n.s.	Nicht signifikant
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei λ=600 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. phosphate buffered saline
PC	Hauptkomponente, engl. principle component
PCA	Hauptkomponentenanalyse, engl. principle component analysis
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. polymerase chain reaction

PFA	Paraformaldehyd
рН	Logarithmus der H₃O+ Ionen in mol/L
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
REV	Rückwärts, engl. reverse (Primer)
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure, engl. ribonuleic acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. Reactive Oxygen Species
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. rounds per minute
R-Puffer	Resuspensionspuffer
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur ODER Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SD	Standardfutter, engl. standard diet
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate
sec	secunda/Sekunde
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus, engl. single-nucleotide polymorphism
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
Taq	Thermus aquaticus
TLR	Toll like Rezeptor, engl. Toll like receptor
TOR	Target of Rapamycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VE	vollentsalzt
W2-Puffer	Waschpuffer 2
xg	multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung
z. B.	Zum Beispiel

Danksagung

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen Menschen in meinem Leben bedanken, die mich während meiner Promotion und der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein großer Dank gilt besonders:

Jun.-Prof. Dr. Mathias Beller, der mir die Chance gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchzuführen und mir während der gesamten Zeit mit viel Unterstützung und Rat zur Seite stand und mir in vielen Dingen ein sehr guter Mentor war, auch wenn ich noch so wenig über die Arbeit mit *Drosophila* wusste, mir die Chance gegeben hat, dieses Projekt durchzuführen.

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

Prof. Dr. Thomas Klein und seiner Arbeitsgruppe, in der ich meine Arbeiten mit *Drosophila* durchführen konnte und oft Hilfe in "Fliegensachen" erhalten habe.

Prof. Dr. Karl Köhrer und seiner Arbeitsgruppe, für die Durchführungen der *Next Generation Sequencing* Experimente.

Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Beller für die schöne und lustige Zeit im Labor, in den Frühstückspausen und Laborausflügen. Vor allem möchte ich besonders den technischen Assistentinnen Andrea Droste und Petra Kolkhof danken, die mir bei so vielen Dingen im Laboralltag eine große Hilfe waren und auch durch zahlreiche Gespräche emotional immer eine große Stütze waren.

Auch gilt mein Dank Lisa Jehrke, die mit mir zusammen in das "Projekt Promotion" gestartet ist und mich über die Jahre immer wieder unterstützt und aufgebaut hat und immer ein offenes Ohr und ein sehr gutes Händchen für Computerprobleme hatte.

Mein weiterer Dank gilt Michael Werthebach, der durch seine positive und herzliche Art immer für gute Stimmung in der Arbeitsgruppe gesorgt hat und als erfahrener Doktorand immer zur Hilfe war.

Auch möchte ich mich bei Irfan Akhtar bedanken, der mir mit den FISH-Analysen am Konfokalmikroskop sehr geholfen hat und bei Jürgen Schönborn, der bei meinen Computerproblemen immer zur Stelle war.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinen Bachelor- und Masterstudenten bedanken, die ich während meiner Promotion betreuen durfte. Es hat mir viel Freude gemacht, euch in euren Laborarbeiten zu unterstützen und habe dabei auch selber viel gelernt.

Ein weiterer Dank für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit geht an Anna Siemen und Lisa Jehrke.

Zu guter Letzt möchte ich mich vor allem bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für die vor allem moralische und emotionale Unterstützung bedanken. Besonders danke ich meinen Eltern, Susanne und Robert Stewart, die immer bedingungslos in allen Lebenslagen an mich geglaubt haben.

9 Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 17.12.2019

Fiona Anne Stewart