
BACHELORARBEIT

Frau
Linda Jurschik

**Systemischer Fetttransport in
Fruchtfliegen**

2023

Fakultät **Angewandte Computer- und
Biowissenschaften**

BACHELORARBEIT

Systemischer Fetttransport in Fruchtfliegen

Autorin:

Linda Jurschik

Studiengang:

Bachelor Biotechnologie

Seminargruppe:

BT20wM-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

Dr. Marko Brankatschk

Weiterer Betreuer:

Dr. Marko Brankatschk

Mittweida, 2023

Bibliografische Angaben

Jurschik, Linda: Systemischer Fetttransport in Fruchtfliegen, 75 Seiten, 24 Abbildungen, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften

Englischer Titel: *Systemic Lipid Transport in Drosophila*

Bachelorarbeit, 2023

Satz: L^AT_EX

Kurzbeschreibung

In der vorliegenden Arbeit wird der Lipidtransport in *Drosophila melanogaster* behandelt. Dabei werden Forschungsergebnisse in Bezug auf Lipidtröpfchen, welche sich in der Körperflüssigkeit der Fruchtfliegen befinden, vorgestellt.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Danksagung.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Energiehomöostase.....	1
1.2 Lipidtröpfchen.....	2
1.2.1 Aufbau und Entwicklung.....	2
1.2.2 Funktionen und Dysregulation.....	4
1.3 Lipidtröpfchen in <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.4 Hämolymphe-Lipidtransport.....	5
1.5 Verwendete Genotypen.....	6
1.6 Grundlagen der Massenspektrometrie.....	6
2 Zielstellung.....	9
3 Material und Methoden.....	10
3.1 Material.....	10
3.1.1 Chemikalien.....	10
3.1.2 Farbstoffe.....	10
3.1.3 Laufmittel.....	10
3.1.4 Geräte.....	11
3.2 Methoden.....	11
3.2.1 Probenvorbereitung.....	11
3.2.2 Lipidextraktion.....	12
3.2.3 Dünnschichtchromatographie.....	13
3.2.4 Massenspektrometrie.....	13
3.2.5 Nahrungsentzug.....	14
3.2.6 Mikroskopie.....	14

3.2.7 Analyse mittels Software	14
4 Ergebnisse	16
4.1 Vergleich der Genotypen	16
4.1.1 Dünnschichtchromatographie	16
4.1.2 Software-Analyse	17
4.2 Vergleich verschiedener Methoden	19
4.3 Zusammensetzung der TAGs	20
4.3.1 Dünnschichtchromatographie	20
4.3.2 Massenspektrometrie	22
4.4 Funktion der Hämolymp-Lipidtröpfchen	29
4.4.1 Dünnschichtchromatographie	29
4.4.2 Mikroskopie	31
5 Diskussion.....	35
5.1 Vergleich der Genotypen	35
5.1.1 Dünnschichtchromatographie	35
5.1.2 Software-Analyse	36
5.2 Vergleich verschiedener Methoden	37
5.3 Zusammensetzung der TAGs	39
5.3.1 Dünnschichtchromatographie	39
5.3.2 Massenspektrometrie	40
5.4 Funktion der Hämolymp-Lipidtröpfchen	45
5.4.1 Dünnschichtchromatographie	45
5.4.2 Mikroskopie	47
6 Ausblick.....	49
7 Zusammenfassung	51
Literatur	72

II. Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau von LDs (links) und Möglichkeiten der Verankerung von LD-assoziierten Proteinen (rechts). Links: Eine Phospholipid-Einzelschicht (blau) umgibt den hydrophoben Kern aus Neutrallipiden (gelb). Proteine (rot, violett und grün) sind an die LD-Oberfläche gebunden. Aus Beller, 2005. Rechts: Darstellung der vier bekannten Möglichkeiten von Proteinen sich an die Oberfläche von LDs zu heften. Aus Walther und Farese, 2012 übersetzt.	3
1.2	Lipidtransport in <i>Drosophila</i>. DAG wird mithilfe von Lipophorin aus dem Fettkörper zur Zielzelle transportiert (adaptiert nach Blacklock und Ryan, 1994; erstellt mit Biorender).....	6
1.3	Schematische Darstellung eines Quadropol-Analysators	8
3.1	Methoden der Probenvorbereitung. Die fünf Methoden, die zum Einsatz kamen sind: (A) Zerdrücken ganzer Fliegen, (B) Verwendung der Fettkörper, (C) Anstechen der Fliege, (D) Einfrieren und (E) Sezieren. Abbildung erstellt mit Biorender.	12
4.1	DC-Platte 1: Vergleich der Genotypen	16
4.2	Intensitäten der PE-Banden	17
4.3	Intensitäten der Sterol-Banden	18
4.4	Intensitäten der TAG-Banden	18
4.5	DC-Platte 2: Vergleich verschiedener Methoden. Bei den jeweils ersten drei Proben einer Methode wurde der Genotyp CantonS verwendet, bei den anderen drei der Genotyp OregonR.....	20
4.6	DC-Platte vor MS. Auf der linken Plattenseite befinden sich Proben mit einem Volumen von 1 µl und auf der rechten Seite welche mit einem Volumen von 3 µl. Methode 1 (M1): Ganze Fliegen. Methode 2 (M2): Fettkörper. Methode 5 (M5): Hämolymphe (Sezieren).	21
4.7	DC-Platte nach MS. Die Aufnahme der Platte nach der MS zeigt in der obersten Bandenreihe deutliche weiße Ausschnitte.	22
4.8	Methode 1 (ganze Fliegen): Vergleich der Proben 7 und 8	23
4.9	Methode 2 (Fettkörper): Vergleich der Proben 9 und 10	23

4.10 Methode 5 (Sezieren): Vergleich der Proben 11 und 12	24
4.11 Massenspektrogramm von ganzen Fliegen	25
4.12 Massenspektrogramm der Fettkörper	25
4.13 Massenspektrogramm der Hämolymphe	26
4.14 Vergleich der Massenspektrogramme von Methode 1 und 2	27
4.15 Vergleich der Massenspektrogramme von Methode 1 und 5	28
4.16 Vergleich der Massenspektrogramme von Methode 2 und 5	29
4.17 Vergleich von hungernden und nicht-hungernden Fliegen. Auf der linken Plattenseite sind die Proben der eintägig hungernden Fliegen (*) und die ihrer Kontrollen aufgetragen, auf der rechten Seite die viertägig hungernden Fliegen (*) und dazugehörigen Kontrollen.....	30
4.18 Kontrolle von nicht-hungernden Fliegen. (A) Die BODIPY-Färbung zeigt viele, unterschiedlich große Strukturen. (B) Bei der DAPI-Färbung ist lediglich ein weißer Punkt deutlich zu sehen. (C) Eine Ansammlung kleiner Punkte ist in der Nilrot-Färbung zu sehen. (D) In der Zusammenlagerung der Bilder A-C sind hauptsächlich grün-gefärbte Strukturen ersichtlich.....	32
4.19 Fliegen nach einem Tag. Die einzelnen Abbildungen zeigen Mikroskopieaufnahmen der BODIPY- (A), DAPI- (B) und Nilrot-Färbung (C) sowie die Überlagerung dieser Einzelbilder (D).....	33
4.20 Fliegen nach vier Tagen. Während in der BODIPY-Färbung (A) zahlreiche helle Punkte zu sehen sind, finden sich in der DAPI-Färbung (B) lediglich ein paar wenige kleine Punkte. Die Nilrot-Färbung (C) zeigt hingegen weniger, aber größere Strukturen auf. Die Überlagerung der drei Einzelbilder weist grüne, rote und blaue Punkte auf (D).	34

III. Tabellenverzeichnis

3.1 Chemikalien.....	10
3.2 Farbstoffe	10
3.3 Zusammensetzung der Laufmittel	10
3.4 Geräte	11
7.1 Datensatz Probe 7	52
7.2 Datensatz Probe 8	55
7.3 Datensatz Probe 9	59
7.4 Datensatz Probe 10	61
7.5 Datensatz Probe 11	65
7.6 Datensatz Probe 12	69

IV. Abkürzungsverzeichnis

AKH	Adipokinetische Hormone
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Photoionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Photoionization)
BODIPY 493/503 ..	Dipyrrromethenbordifluorid (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacen)
CI	Chemische Ionisation
DAGs	Diacylglycerine
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation (Electrospray Ionization)
FAB	Fast Atom Bombardment
GC	Gaschromatographie (Gas Chromatography)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (Green fluoresceing protein)
HTGC	Hochtemperatur-Gaschromatographie (High Temperature Gas Chromatography)
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)
LDs	Lipidtröpfchen
Lpp	Lipophorin
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)
MS	Massenspektrometrie
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organization for Economic Cooperation and Development)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCs	Phosphatidylcholine
PEs	Phosphatidylethanolamine
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
TAGs	Triacylglycerine
TOF	Flugzeitanalysator (Time of Flight)
UAS	Upstream Activating Sequence

V. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir geholfen haben diese Arbeit zu verfassen.

Ein besonderer Dank geht an meine Freunde und Familie, die mich während meines Studiums unterstützt haben und mir mit Rat und Tat beiseite standen.

Des Weiteren möchte ich meinem Betreuer Marko Brankatschk für die zahlreichen Ideen und Tipps sowie die tatkräftige Unterstützung danken.

1 Einleitung

Organismen besitzen grundlegend vier Hauptklassen von Biomolekülen: Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Proteine und Lipide. Alle erfüllen lebenswichtige Aufgaben und sind daher unverzichtbar. Während Nukleinsäuren wie DNA oder RNA jegliche genetische Informationen abspeichern, sind Proteine u.a. an zahlreichen chemischen Reaktionen innerhalb eines Organismus beteiligt bzw. setzen diese um. Kohlenhydrate dienen in erster Linie als Energielieferant und sind überdies wichtig für viele Stoffwechselfvorgänge. Lipide sind Bestandteil von Zellmembranen, wodurch sie die Zelle u.a. vor äußeren Einflüssen schützen. Außerdem spielen Lipide eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Zellen. Ihre wohl bekannteste Funktion ist allerdings die Speicherung von Energie, was wesentlich für die Energiehomöostase ist.

1.1 Energiehomöostase

Unter Energiehomöostase versteht man die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Dafür werden Energiespeicher benötigt, die überschüssige Energie zwischenspeichern und dem Organismus in Zeiten mit mangelnder Nahrung oder erhöhtem Energieverbrauch zur Verfügung stellen. Die Bedeutung der Regulation dieses Gleichgewichts zeigt sich dadurch, dass sowohl eine andauernde zu geringe als auch zu hohe Energieaufnahme nachteilige Auswirkungen auf den Organismus haben. Bei einer dauerhaft zu geringen Energieaufnahme kommt es zu Mangelerscheinungen und schließlich zum Tod. Doch auch eine zu hohe Energieaufnahme ist schädlich, wie ein Blick auf aktuelle Statistiken zeigt. Laut der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (engl.: *Organization for Economic Cooperation and Development*, OECD) lag der Anteil an Erwachsenen mit Übergewicht oder Fettleibigkeit in ausgewählten OECD Ländern im Jahr 2019 bei durchschnittlich knapp 60 %. Spitzenreiter sind hierbei Mexiko und die USA mit einer Übergewichts- und Fettleibigkeitsrate von etwa 75 bzw. 74 % (Radtke, 2022). Übergewicht und Fettleibigkeit führen zu einem erhöhten Risiko für Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie für bestimmte Krebsarten (Thul, 2014) und stellen zudem eine schwerwiegende Belastung der nationalen Gesundheitssysteme dar. Die hohe Adipositasrate ist in erster Linie auf die moderne Lebensweise mit zu hoher Nahrungsaufnahme bei gleichzeitig zu geringer Bewegung zurückzuführen. Daneben gibt es allerdings auch andere Faktoren, die eine Adipositas begünstigen bzw. verstärken können. Zu ihnen zählen epigenetische Effekte, genetische Veranlagung oder Krankheiten, z.B. Hypothyreose (Schilddrüsenunterfunktion).

Um das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und –verwertung aufrechtzuerhalten sind komplexe Regulationen nötig, abhängig von wechselnden Bedingungen wie Aktivität und Nahrungsverfügbarkeit bzw. -aufnahme. Dafür muss eine Feinanpassung des

Stoffwechsels vom gesamten Organismus erfolgen. Diese Anforderung kann sehr gut m.H.v. Insekten demonstriert werden, die Phasen mit sehr hohem Energieverbrauch haben wenn sie fliegen. So können z.B. Wanderheuschrecken für mehrere Stunden fliegen, indem sie gespeicherte Energie umwandeln und verwerten (Ryan und Horst, 2000). Dieses Vermögen, überschüssige Energie zu speichern, ist in allen Organismen von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert. Das bietet den Vorteil, dass auch Organismen mit einem weniger komplexen Genom für die Erforschung von grundlegenden Regulationen des Metabolismus verwendet werden können, deren System zur Energiehomöostase weniger komplex ist als das von Säugern (Thul, 2014). Als Modellorganismus eignet sich dafür die in dieser Arbeit verwendete Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Diese besitzen Fettkörper – ein einzigartiges Organ, welches nur bei Insekten zu finden ist. Dieses erfüllt eine wichtige Aufgabe bei der Speicherung und Bereitstellung von Energie und ist funktionell vergleichbar mit Leber und Adipozyten bei Vertebraten. Innerhalb der Zellen des Fettkörpers und weiteren Organen bzw. Geweben sind die Lipide in speziellen Organellen, den sogenannten Lipidtröpfchen (engl.: *lipid droplets*, LDs), organisiert.

1.2 Lipidtröpfchen

Lipidtröpfchen sind intrazelluläre Organellen, die neutrale Lipide wie beispielsweise TAGs und Sterolester beherbergen. Sie können in jeglicher Art von Zelle vorkommen, von Bakterien über Pflanzen bis hin zu Säugetieren (Fujimoto et al., 2008). Somit spielen sie als Fettspeicher auf zellulärer Ebene eine eminent wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase (Thul, 2014). LDs sind vergleichbar mit Lipoproteinen, da sie sich in ihrem grundlegenden Aufbau gleichen. Erstere sind jedoch mit einem Durchmesser von etwa 100 nm bis 100 µm deutlich größer als Lipoproteine (<20 nm–500 nm) (Walther und Farese, 2012). LDs interagieren untereinander und mit fast allen anderen Organellen in der Zelle, wie z.B. mit Mitochondrien, Peroxisomen, Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Lysosomen. Dabei treten sie über ihre Membranen miteinander in Kontakt, um Lipide, Stoffwechselprodukte und Ionen untereinander auszutauschen (Olzmann und Carvalho, 2019).

1.2.1 Aufbau und Entwicklung

Lipidtröpfchen besitzen einen hydrophoben Kern aus Neutrallipiden (vorrangig TAGs und Sterolester), der von einer einschichtigen Membran aus polaren Lipiden, den Phospholipiden, umgeben wird (Thul, 2014). An der Oberfläche befinden sich Proteine. Ein schematischer Aufbau von LDs und von der Verankerung LD-assoziiierter Proteine ist in Abbildung 1.1 zu sehen. Die Phospholipid-Einzelschicht ist nicht das einzige Merkmal, was LDs von anderen Zellorganellen abgrenzt. Sie entstehen zudem im Gegensatz zu vielen anderen Organellen *de novo*, sprich sie werden nicht durch Wachstum und Teil-

lung bereits existierender Lipidtröpfchen geformt (Thiele und Spandl, 2008). Wie genau dieser Prozess abläuft wird nach wie vor nicht im Detail verstanden. Bekannt ist jedoch, dass die Zusammensetzung dabei in vielen Schritten verläuft und im ER erfolgt. Dabei findet als erstes die Synthese von neutralen Lipiden, z.B. TAGs statt, wobei zahlreiche Proteine beteiligt sind. Bei geringer Lipidkonzentration befinden sie sich zunächst im Intermembranraum des ER. Wenn ihre Konzentration zunimmt, verschmelzen die Lipide letztendlich miteinander. Die dabei entstehenden anfänglichen Zwischenprodukte von Lipidtröpfchen sind kurzlebig und sehr klein, weshalb es schwierig ist sie zu untersuchen. Mit zunehmender Ausdehnung der Lipidtröpfchen lösen sich diese schließlich vom ER. Anschließend dehnen sie sich weiter aus. Diese Expansion kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. So können zum einen einzelne Lipidtröpfchen miteinander verschmelzen und zum anderen TAGs über Membranbrücken des Endoplasmatischen Retikulums zu den Tröpfchen transportiert werden. Zudem kann die Expansion mittels direkter Synthese von TAGs auf der Oberfläche der Lipidtröpfchen erfolgen. Die endgültige Größe ist dabei zelltypabhängig (Olzmann und Carvalho, 2019).

Durch die Entdeckung der LD-assoziierten Proteine erlangten LDs in der Forschung neue Aufmerksamkeit. Mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen konnten so einige LD-assoziierte Proteine identifiziert werden. Zu ihnen zählen z.B. regulatorische Proteine oder Enzyme zum Auf- und Abbau von Lipiden. Durch den einschichtigen Charakter der Membran von LDs können die Proteine nicht als integrale Proteine in diese eingelagert werden. Stattdessen erfolgt die Anheftung über Protein-Protein-Interaktionen, amphipatische Helices, Haarnadelschleifen oder Lipid-Verankerung.

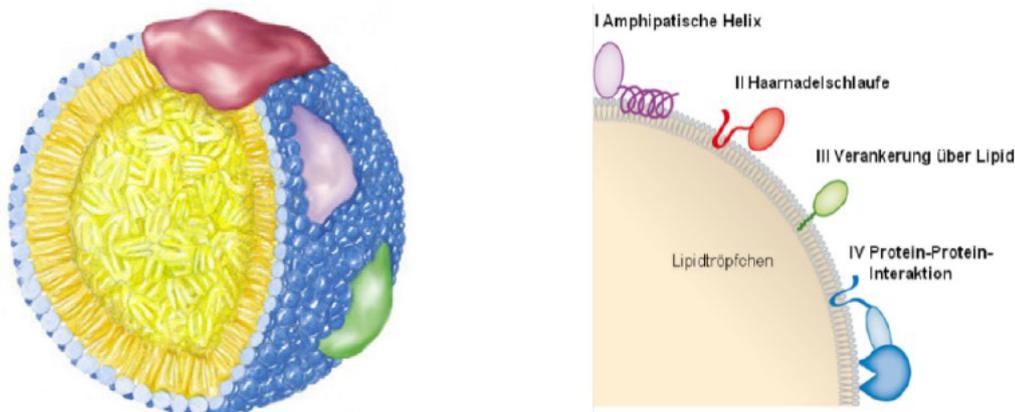


Abbildung 1.1: **Schematischer Aufbau von LDs (links) und Möglichkeiten der Verankerung von LD-assoziierten Proteinen (rechts).** Links: Eine Phospholipid-Einzelschicht (blau) umgibt den hydrophoben Kern aus Neutrallipiden (gelb). Proteine (rot, violett und grün) sind an die LD-Oberfläche gebunden. Aus Beller, 2005. Rechts: Darstellung der vier bekannten Möglichkeiten von Proteinen sich an die Oberfläche von LDs zu heften. Aus Walther und Farese, 2012 übersetzt.

1.2.2 Funktionen und Dysregulation

Die im Kern der Lipidtröpfchen gespeicherten TAGs können in Form von Fettsäuren als Energielieferant für Stoffwechselfvorgänge genutzt werden. Dabei werden die Lipide entweder mittels Lipolyse oder Lipophagie mobil gemacht. Diese Funktion ist vor allem in Zeiten mit mangelnder Nahrung oder während des Zellwachstums, bei dem große Mengen an Phospholipiden synthetisiert werden müssen, um die Ausdehnung der Zellmembran zu gewährleisten, unerlässlich. Lipidtröpfchen schützen zudem die Zelle vor Lipotoxizität, indem sie Fettsäuren sozusagen konfiszieren. Freie Fettsäuren können u.a. in stark zytotoxische Lipidklassen wie beispielsweise Acylcarnitine eingebaut werden und so den Organismus schädigen. Durch das Sicherstellen von Fettsäuren als Teil der TAGs in den Lipidtröpfchen kann diese schädliche Wirkung der Fettsäuren unterbunden werden (Olzmann und Carvalho, 2019). Nicht nur Fettsäuren werden durch LDs auf diese Weise sichergestellt. Im Zytoplasma befindliche LDs können u.a. Transkriptionsfaktoren sicherstellen und somit deren Aktivität im Zellkern regulieren, indem sie diese beispielsweise darin hindern in den Zellkern zu gelangen (Ueno et al., 2013).

Der Großteil der Lipidtröpfchen wird von TAGs ausgemacht, deren biologische Funktionen im Laufe der Evolution stark konserviert wurden. TAGs haben nicht nur als Energiespeicher eine wichtige Stoffwechselfunktion. Sie dienen außerdem als Signalmoleküle und sind Bausteine für strukturelle Membranlipide (Heier und Kühnlein, 2018). Darüber hinaus haben LDs eine wichtige Bedeutung für das Immunsystem. Sie sind Synthesorte bestimmter Signallipide, die bedeutend bei Entzündungen und für die Bekämpfung von Pathogenen sind (Bozza et al., 2011). Außerdem dienen sie als Speicherort für antivirale sowie antibakterielle Proteine (Welte, 2015). Im Gegenzug dazu gibt es allerdings auch Krankheitserreger, die Strategien entwickelt haben um in Lipidtröpfchen des Wirts einzudringen und sich ausreichend mit Lipiden versorgen zu können (Cocchiari et al., 2008; Elamin, Stehr und Singh, 2012).

Aufgrund dessen, dass Lipidtröpfchen zahlreiche wichtige Funktionen von Organismen erfüllen, steht ihre Dysregulation mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung. Zu ihnen zählen Fettleibigkeit, kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes (Olzmann und Carvalho, 2019). Ersteres tritt als direkte Folge von übermäßiger Nahrungsaufnahme auf und ist mit einer erhöhten Speicherung von Lipiden und LDs in Fettgewebe und anderen Geweben verbunden. Das führt wiederum zu Lipotoxizität und Fehlfunktion der betroffenen Organe (Walther und Farese, 2012). Kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes hingegen können Folgeerkrankungen von Adipositas sein.

1.3 Lipidtröpfchen in *Drosophila melanogaster*

Wie bereits weiter oben beschrieben sind Lipidtröpfchen allgegenwärtige und dynamisch regulierte Organellen, die in zahlreichen Zelltypen von Organismen und somit auch in denen von *Drosophila* gefunden werden können. Während der einzelnen Lebensstadien unterziehen sie sich einigen Umwandlungen. Als Embryo dient die Ober-

fläche der Lipidtröpfchen als vorübergehender Speicherplatz für Histone. Während der Larvenentwicklung sammelt *Drosophila* große Mengen an Speicherlipiden im sogenannten Fettkörper an. Die Zellen dieses Organs besitzen zahlreiche unterschiedlich große Lipidtröpfchen, welche den wichtigsten Energiespeicher der sich entwickelnden Fliege darstellen. Andere Organe – wie z.B. bestimmte Regionen des Verdauungstrakts – weisen in diesem Stadium ebenfalls Lipidtröpfchen auf. Die sind in diesen allerdings kleiner als im Fettkörper. Anschließend folgt die Verpuppung. Hierbei wird der Körper grundlegend umstrukturiert. Der bisherige Fettkörper zersetzt sich und wird durch einen adulten ersetzt. In diesem werden nun die große Mehrheit an Lipidtröpfchen gespeichert (Kühnlein, 2012).

1.4 Hämolympf-Lipidtransport

Damit die in dem Fettkörper gespeicherten Lipide zu anderen Geweben und Zellen transportiert werden können, bedarf es einem Transportsystem. Dieser Lipidtransport in der Hämolymphe von Insekten wurde in der Vergangenheit bereits eingehend untersucht. So wurde in den 1960er Jahren ein Protein namens Lipophorin (Lpp) als das entscheidende Transportprotein identifiziert (Blacklock und Ryan, 1994). Im Gegensatz zu den zahlreichen benötigten Lipoproteinen der Vertebraten ist Lipophorin vielseitiger und effektiver als diese, weil es viele verschiedene Lipide zu Geweben transportieren kann, ohne dabei internalisiert und zerstört zu werden (Soulages und Wells, 1994). Zu den Lipiden, aus denen Lipophorin zusammengesetzt ist zählen u.a. Phospholipide, Triacylglycerine (TAGs) und Diacylglycerine (DAGs). Letztere machen dabei bei den meisten Insekten den Großteil der Lipophorine aus, wohingegen Lipide im Fettkörper allgemein als TAGs gespeichert werden (Gilbert und Chino, 1974). So machen beispielsweise beim Seidenspinner DAGs etwa 56 % des Gewichts von Lipophorinen aus, während der Anteil am Gesamtgewicht der TAGs lediglich bei etwa einem Prozent liegt (Chino und Kitazawa, 1981). Diese Transportproteine werden dabei in erster Linie im Fettkörper synthetisiert (Ryan und Horst, 2000).

Der genaue Ablauf des Lipidtransports via Lipophorin in Insekten wurde bereits in anderen Arbeiten detailliert beschrieben (Soulages und Wells, 1994; Blacklock und Ryan, 1994; Gilbert und Chino, 1974), weswegen hier nur eine grobe Zusammenfassung dieses Ablaufs erfolgt. Dabei wird zunächst das im Fettkörper als Energiereserve gespeicherte TAG in DAG umgewandelt, wobei u.a. Adipokinetische Hormone (AKH) eine wichtige Rolle spielen. Wenn nun ein Lipophorin-Partikel an den Fettkörper über Rezeptoren andockt, wird das DAG-Molekül in dieses übertragen. Mit dem beladenen Transportprotein erfolgt anschließend der Transfer über die Hämolymphe vom Fettkörper zur Zielzelle. Bei dieser kann es sich beispielsweise um eine Flugmuskelzelle handeln. Schließlich haben diese Zellen während des Flugs einen erhöhten Energiebedarf. Hier nimmt das Transportprotein erneut über bestimmte Rezeptoren Kontakt mit der Zelle auf. Dadurch wird eine Lipophorin-Lipase aktiviert, welche DAG in seine Bestandteile – Glycerin und Fettsäuren – hydrolysiert. Die Fettsäuren werden in die Zielzelle transferiert und die-

nen dort als Energiequelle. Das nun unbeladene Lipophorin kann über die Hämolymphe zurück zum Fettkörper gelangen, wo es neu beladen wird und somit wiederverwendet werden kann. Dieser Ablauf ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

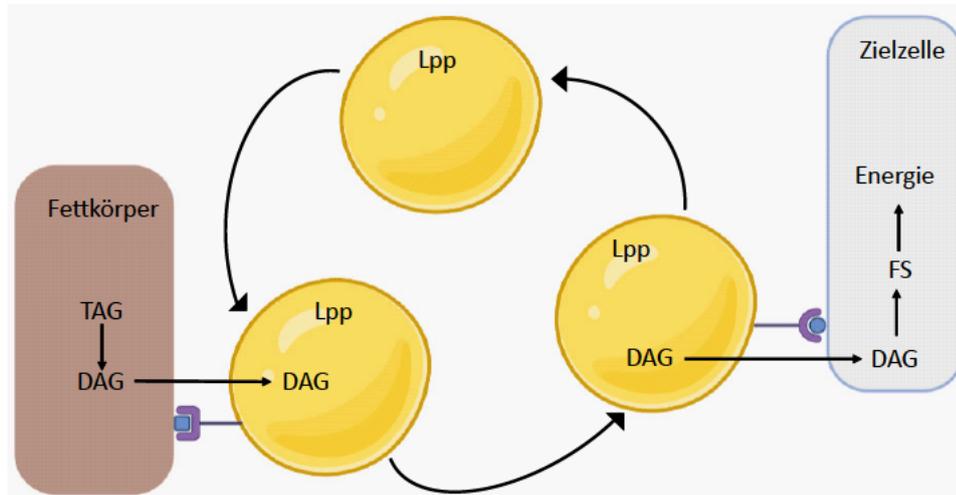


Abbildung 1.2: **Lipidtransport in *Drosophila***. DAG wird mithilfe von Lipophorin aus dem Fettkörper zur Zielzelle transportiert (adaptiert nach Blacklock und Ryan, 1994; erstellt mit Biorender).

1.5 Verwendete Genotypen

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente kamen fünf verschiedene Genotypen von *D. melanogaster* zum Einsatz. Diese sind: CantonS, Foxo:M-cherry (Foxo), Dahomey, W1118 und OregonR. Organismen der unterschiedlichen Genotypen ähneln sich phänotypisch größtenteils, mit einer Ausnahme. So ist beim Genotypen W1118 ein Gen mutiert, wodurch bestimmte Pigmente nicht transportiert werden können. Als Folge dessen sind die Augen von Organismen dieses Genotyps weiß und nicht rot. Der Genotyp Foxo dient als Kontrollorganismus für W1118. Bei Foxo handelt es sich um transgene Fliegen, bei denen ursprünglich das gleiche Gen wie bei W1118 mutiert ist. Durch das künstliche Einfügen eines intakten Gens haben diese Organismen allerdings wieder rote Augen. Der Genotyp Dahomey ist ein Wildtyp und kommt ursprünglich aus dem Staat Benin (ehemals Dahomey). CantonS und OregonR sind ebenfalls Wildtypen, mit Ursprung in den USA.

1.6 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) stellt ein wichtiges chemisches Analyseverfahren dar. Sie dient der Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) von ionisierten Atomen bzw. Molekülen in der Gasphase (Meyer et al., 2022). Das dabei verwendete Massenspektrometer erzeugt ein Massenspektrum, welches die Information von Masse

und Häufigkeit für unterschiedliche Teilchen angibt.

Der Aufbau eines Massenspektrometers beinhaltet drei wesentliche Bestandteile: eine Ionenquelle, einen Analysator und einen Detektor. Die Ionenquelle sorgt für eine Erzeugung bzw. Freisetzung von Ionen aus dem Analyten, der Analysator trennt die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis auf und der Detektor misst den Ionenstrom (Meyer et al., 2022). Die einzelnen Bestandteile des Massenspektrometers können sich von Gerät zu Gerät in ihrer Funktionsweise voneinander unterscheiden, da es verschiedene Techniken von Ionenquelle, Analysator und Detektor gibt. Die Ionisierung der Analytmoleküle kann beispielsweise durch die Elektronenstoß-Ionisation (ESI) oder die chemische Ionisation (CI) erfolgen. Bei dem Analysator wird u.a. zwischen Flugzeit (TOF)- und Quadrupol-Analysator unterschieden, wobei es auch Hybridgeräte gibt, die verschiedene Techniken kombinieren. Als Ionendetektoren eignen sich Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder ein Faraday-Becher. Für die Massenbestimmung muss das zu untersuchende Teilchen als Ion vorliegen. Als Darstellungsweise eignen sich besonders Profilspektren, da sie z.B. Aufschluss über Rauschen im Spektrum geben (Gross, 2019).

In dieser Arbeit kam ein Quadrupol-Massenspektrometer zum Einsatz. Hierbei wird der Analyt über eine chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl.: *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) ionisiert und in ein Quadrupolfeld geleitet, wo die Ionen voneinander getrennt werden. Die APCI zählt zu den milden Ionisationstechniken und dient der Ionisation großer, neutraler Moleküle (Byrdwell, 2001). Der dabei ablaufende Vorgang ist sehr komplex. Vereinfacht gesagt wird der Eluent aus der DC/MS-Kopplung durch eine beheizte Kapillare geführt und in der Gasphase an einer sogenannten Coronanadel durch Entladung ionisiert (Gruber und Gruner, 2016). Der Quadrupol-Analysator besteht aus vier zylindrischen parallel angeordneten Stäben, wobei die sich jeweils gegenüberliegenden Stäbe elektrisch miteinander gekoppelt sind (Gruber und Gruner, 2016). Wird nun eine Spannung angelegt, dann sind jeweils zwei Stäbe positiv und zwei negativ geladen. Die Ionen, welche aus der Ionenquelle in das Quadrupolfeld gelangen, bewegen sich entsprechend ihrer Ladung zu einem der Stäbe. Somit wird beispielsweise ein positiv geladenes Ion von einer negativ geladenen Stange angezogen. Erfolgt nun eine Umpolung, so ändert das Ion seine Bewegungsrichtung und bewegt sich nun in Richtung eines Stabes, welcher zuvor noch positiv und jetzt negativ geladen ist. Dadurch werden die Ionen in Schwingung versetzt und lediglich resonante Ionen gelangen zum Detektor (El-Aneed, Cohen und Banoub, 2009). Als Detektor dient hierbei ein Sekundärelektronenvervielfacher. In Abbildung 1.3 ist ein vereinfachter, schematischer Aufbau eines Quadrupol-Analysators dargestellt.

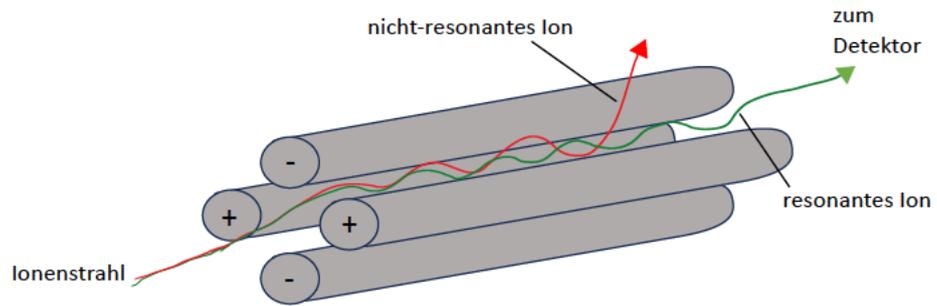


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Quadrupol-Analysators

2 Zielstellung

Bei mikroskopischen Untersuchungen von *Drosophila* Weibchen wurden in der Hämolymphe dieser ebenfalls Lipidtröpfchen vorgefunden. Diese wurden an dieser Stelle jedoch nicht erwartet, da laut Literatur (s.o.) bisher davon ausgegangen wird, dass es sich bei den Lipidtröpfchen ausschließlich um intrazelluläre Organellen handelt. Daher besteht das Interesse darin, die genaue Struktur und Herkunft sowie die Funktion dieser Tröpfchen aufzuklären.

Erste Experimente mittels Dünnschichtchromatographie (DC) zeigten die Zusammensetzung der Lipidtröpfchen verschiedener Genotypen auf. Das erste Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob sich die untersuchten Genotypen in der Menge ihrer Hämolymphe-Lipide voneinander unterscheiden. Daneben soll geklärt werden, warum die TAG-haltigen Lipidtröpfchen in der Hämolymphe bisher von noch keiner anderen Forschungsgruppe entdeckt bzw. untersucht wurden. Anschließend sollen die LDs auf ihre genaue Zusammensetzung überprüft werden, um zu untersuchen, ob sie womöglich einem bestimmten Organ entstammen. Um diese Ziele zu erreichen werden Analysen mittels Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie und Mikroskopie durchgeführt. Des Weiteren soll die Funktion der Hämolymphe-Lipidtröpfchen ermittelt werden. Hierfür wird Fliegen über teils mehrere Tage die Nahrung entzogen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3.1: Chemikalien

Name	Verwendung
Chloroform-Methanol 10:1	Lipidextraktion
Chloroform-Methanol 1:2	Lipidextraktion
Ethanol	Desinfizieren der Fliegen
Kupfersulfat	Sichtbarmachen Lipide
Primulin	Sichtbarmachen Lipide
Trichlormethan/ Chloroform	Waschen DC-Platte

3.1.2 Farbstoffe

Tabelle 3.2: Farbstoffe

Name	Hersteller	Verwendung
BODIPY 493/503	Invitrogen	Anfärben von Lipiden
DAPI	Invitrogen	Anfärben von Nukleinsäuren
Nilrot	Sigma Aldrich LOT BCCC2326	Anfärben von Lipiden

3.1.3 Laufmittel

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Laufmittel

Name	Zusammensetzung	Verwendung
Polares Laufmittel	Dichlormethan:Methanol:Wasser 75:25:2,5 (v:v:v)	Auftrennung Lipide DC
Neutrales Laufmittel	Heptan:Diethylether:Essigsäure 70:30:1 (v:v:v)	Auftrennung Lipide DC

3.1.4 Geräte

Tabelle 3.4: Geräte

Name	Hersteller
Amersham™ Typhoon™ NIR Plus Laserscanner	Cytiva
Axio Imager.Z2	Zeiss
Advion CMS (Compact Mass Spectrometer)	Advion

3.2 Methoden

3.2.1 Probenvorbereitung

Bei der Vorbereitung der Proben kamen fünf verschiedene Methoden zum Einsatz, die in Abbildung 3.1 dargestellt sind. Für alle Proben wurden ausnahmslos weibliche Fliegen des Genotyps CantonS bzw. OregonR verwendet. Die erste Methode bestand darin, ganze Fliegen zu verwenden. Diese wurden in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl PBS getan und dann mithilfe einer Pipettenspitze zerdrückt. Für die zweite Methode wurden die Fliegen zunächst teilweise seziiert. Dabei wurden Kopf und Thorax abgetrennt, so dass nur noch das Abdomen übrig blieb. Aus diesem wurden anschließend alle Organe bis auf die Fettkörper entfernt. Danach wurde das Abdomen inklusive Fettkörper in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl PBS überführt. Die dritte Methode wird als Einfrier-Methode bezeichnet. Hierbei wurden die Fliegen zunächst für ca. drei Stunden bei -80 °C eingefroren. Das führt zu Rissen im Exoskelett, wodurch die Hämolymphe austreten kann. Im Anschluss daran wurden sie in 100 µl PBS aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 g. Hiernach wurden 80 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für Methode 4 wurden die Fliegen in PBS aufgenommen und ihnen ein Loch zwischen Abdomen und Thorax zugefügt. Nach ca. 1-2 Minuten wurden 15 µl der ausgetretenen Hämolymphe in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Bei der letzten Methode wurden die Fliegen in PBS vollständig seziiert. Dabei wurden zunächst Flügel, Beine und Kopf entfernt, bevor der restliche Körper der Länge nach aufgeschnitten wurde. Von der austretenden Hämolymphe wurden 25 µl in ein Reaktionsgefäß aufgenommen. Für die Methoden 4 und 5 wurden die Fliegen einzeln behandelt, sprich es wurde eine Fliege nach der anderen z.B. seziiert. Das angegebene entnommene Volumen der Hämolymphe bezieht sich dabei ebenfalls auf nur eine Fliege.

Die Vorbereitung der Proben unterschied sich zwischen den einzelnen Experimenten insofern, als dass zum Teil nicht alle fünf Methoden Anwendung fanden und die Anzahl der Fliegen pro Probe sowie die verwendeten Genotypen variierten. Bei dem Experiment zum Vergleich verschiedener Methoden kamen alle fünf Methoden zur Anwendung, wobei jeweils fünf Fliegen pro Probe verwendet wurden. Von den jeweils sechs

aufgetragenen Proben pro Methode entsprechen drei dem Genotypen CantonS und drei dem Genotypen OregonR. Bei der Untersuchung der Fragestellungen nach Zusammensetzung der TAGs und der Funktion der Hämolymphe-LDs wurden hingegen lediglich zwei Fliegen pro Probe des Genotyps CantonS eingesetzt. Außerdem fanden nur die Methoden 1, 2 und 5 Anwendung.

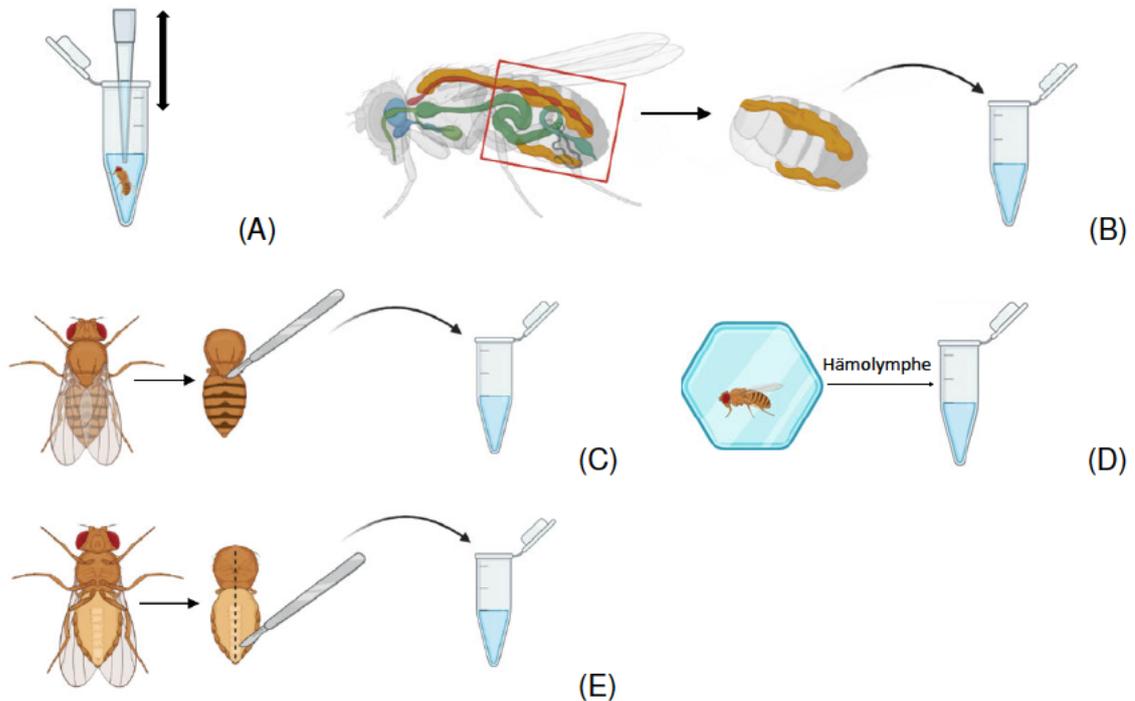


Abbildung 3.1: **Methoden der Probenvorbereitung.** Die fünf Methoden, die zum Einsatz kamen sind: (A) Zerdrücken ganzer Fliegen, (B) Verwendung der Fettkörper, (C) Anstechen der Fliege, (D) Einfrieren und (E) Sezieren. Abbildung erstellt mit Biorender.

3.2.2 Lipidextraktion

Nach der Probenvorbereitung folgte die Lipidextraktion. Zu jeder Probe wurde die jeweils doppelte Menge an Chloroform-Methanol 10:1 hinzugefügt. Aufgrund der unterschiedlichen Probenvolumina variierte die hinzugefügte Menge folglich. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Proben für fünf Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Die organische Phase, welche sich nun im unteren Teil des Reaktionsgefäßes befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die gesamte darin befindliche Flüssigkeit mithilfe von Druckluft ausgedampft. Hiernach wurden zu jeder Probe 12 µl Chloroform-Methanol 1:2 pipettiert. Damit waren die Proben fertig vorbereitet für die Dünnschichtchromatographie.

3.2.3 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Glasplatten verwendet. Zu Beginn wurden einige Markierungen für das Auftragen der Proben auf der Platte gesetzt, bevor sie in einer Chromatographiekammer in Chloroform gesetzt wurde. Nachdem dieses über die komplette Platte gelaufen war, wurde diese an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurden die Proben auf die Platte aufgetragen. Das dabei aufgetragene Probenvolumen unterschied sich zum Teil bei den einzelnen Versuchen. So betrug es beim Experiment zum Vergleich verschiedener Methoden 5 μl . Bei den beiden darauf folgenden Experimenten (4.3 und 4.4) betrug die Volumina hingegen 1 und 3 μl . Die Proben wurden immer in 0,5 μl Schritten auf die Platte pipettiert. Nachdem alle Proben aufgetragen wurden, kam die Platte in die Chromatographiekammer. Diese wurde zuvor mit dem polaren Laufmittel befüllt, sodass dieses ungefähr 2-3 mm hoch in der Kammer stand. Die Platte verblieb in der Kammer bis die Laufmittelfront in etwa die Hälfte der Platte erreicht hatte. Nun wurde die Platte für ca. 20 Minuten trocknen gelassen. Danach kam die Platte erneut in die Chromatographiekammer. In dieser befand sich dieses Mal das neutrale Laufmittel, welches in etwa den gleichen Füllstand wie zuvor das polare Laufmittel aufwies. Nachdem die Laufmittelfront die obere Kante der Platte erreicht hatte, wurde die Platte aus der Kammer entfernt und erneut für ca. 20 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die Platte mittels eines Zerstäubers mit Primulin und in einem Fall zusätzlich mit Kupfersulfat besprüht (Platte in Abschnitt 4.2). Nach dem Besprühen wurde die Platte trocknen gelassen und dann analysiert. Wenn die Platte mit Kupfersulfat besprüht wurde, musste sie nach dem Trocknen zusätzlich für etwa fünf Minuten bei 120 °C gebacken werden, bevor sie analysiert werden konnte. Die Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzscanner.

3.2.4 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie kam ein kompaktes Massenspektrometer inklusive Plattenlesegerät zum Einsatz. Das ermöglicht die direkte Analyse von Banden einer entwickelten DC-Platte, ohne diese weiter vorbereiten zu müssen. Zuerst wurde die Platte in das Lesegerät gelegt und ein ausgewählter Bereich mittig unter dem Laser platziert. Dort senkte sich ein sogenannter Elutionskopf auf die Platte und presste sich kräftig auf diese Stelle, um sie zu versiegeln. Dann floß ein Lösungsmittel aus dem Elutionskopf über die versiegelte Stelle, sodass dieser Bereich aus der Platte herausgelöst wurde. Im Anschluss wurde die Probe in das Massenspektrometer übergeben. In diesem wurden über eine chemische Ionisation (engl.: *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) Ionen aus dem Analyten freigesetzt. Mittels eines Quadropol-Analysators erfolgte dann die Bestimmung der Masse der erzeugten Ionen. Zuletzt wurden sie von einem Detektor detektiert. Der Ablauf wird auf folgender Internetseite gut durch ein kurzes Video gezeigt: <https://www.advion.com/rsc-video/tlcms/>.

3.2.5 Nahrungsentzug

Um die Funktion der Lipidtröpfchen in der Hämolymphe herauszufinden, wurden Fliegen für zwei unterschiedlich lange Zeiträume hungern gelassen. Die Zeiträume betragen dabei einen und vier Tage. Für jeden Zeitraum wurden insgesamt vier Petrischalen mit je 20 Fliegen im Verhältnis 1:3 (Männchen:Weibchen) angesetzt. Zwei dieser Schalen enthielten lediglich 0,6 %-iges Agar-Agar, während zwei weitere zusätzlich Futter enthielten. Letztere beide dienten als Kontrollen. Somit wurden insgesamt 8 Ansätze für die beiden unterschiedlichen Zeitpunkte vorbereitet. Die Fliegen, welche sich lediglich auf dem Agar-Agar befanden, hungerten entsprechend für einen bzw. vier Tage bei 20 °C. Dabei war es wichtig, die Ansätze jeden Tag auf tote Fliegen zu untersuchen und diese gegebenenfalls zu entfernen, da sich die Überlebenden sonst von diesen ernähren und das Experiment somit verfälschen würden. Nach Beendigung jedes Zeitraums wurden von jedem Ansatz sechs Fliegen für die darauf folgende Dünnschichtchromatographie verwendet. Dabei wurden jeweils zwei dieser sechs Fliegen mit der gleichen Methode untersucht. Die drei Methoden die zum Einsatz kamen, waren Methode 1 (ganze Fliegen), 2 (Fettkörper) und 5 (Sezieren).

3.2.6 Mikroskopie

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde pro Probe jeweils eine weibliche Fliege verwendet. Diese wurde nach dem Prinzip von Methode 5 seziiert. Dabei befand sie sich in drei Farbstoffen: BODIPY, DAPI und Nilrot. Ersteres färbt Neutrallipide grün an. DAPI interagiert mit Nukleinsäuren wie DNA und RNA und färbt diese dadurch blau. Nilrot ist ein roter Farbstoff für Phospholipide. Sowohl BODIPY als auch DAPI wurden zuvor 1:5000 und Nilrot 1:1000 mit PBS verdünnt. Von jeder seziierten Fliege wurden 10 µl der erhaltenen Hämolymphe auf ein Objektträger pipettiert. Auf die Probe wurde ein Deckgläschen platziert und dieses mit Nagellack abgedichtet. Bei der Untersuchung unter dem Mikroskop wurden von jeder Probe mehrere Aufnahmen von verschiedenen Stellen gemacht. Dabei wurde eine Stelle in jeweils vier Kanälen aufgenommen. Jeweils ein Kanal zeigte die Färbung der Probe mit einem Farbstoff. Der vierte Kanal zeigte eine Aufnahme im Durchlicht.

3.2.7 Analyse mittels Software

Um die Intensitäten der einzelnen TAG-Banden der verschiedenen Proben genauer miteinander vergleichen zu können, wurden diese mit der Software FIJI ausgewertet. Dafür wurde zunächst die DC Platte mit dem Amersham Typhoon Laserscanner eingescannt. Das entstandene Bild wurde dann mit FIJI geöffnet. Würden nun die Banden analysiert werden, erhielte man den jeweiligen Grauwert dieser. Da dieser jedoch als Durchschnittswert bezogen auf die jeweilige räumliche Ausdehnung einer Bande

errechnet wird, werden so teilweise Werte erhalten, die nicht der eigentlichen Intensität einer Bande entsprechen. Hat z.B. Bande A eine größere räumliche Ausdehnung als Bande B und ist intensiver als diese, so kann es dennoch sein, dass der erhaltene Grauwert von Bande B größer ist. Daher war es wichtig, zunächst die Intensität als optische Dichte zu kalibrieren. Diese Kalibrierung erfolgte nach folgendem Protokoll: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>. Als nächstes wurden die Banden analysiert. Dafür wurden Helligkeit und Kontrast angepasst, so dass alle Banden gut erkennbar waren. Danach wurde ein Thresholdbereich festgelegt, um Banden vom Hintergrund unterscheiden zu können. Anschließend wurde um jede Bande einzeln ein Rechteck als Auswahlbereich gelegt. Nun wurden alle Auswahlbereiche analysiert, wobei lediglich die Werte, die sich in dem zuvor festgelegten Thresholdbereich befanden, zum errechneten durchschnittlichen Wert der optischen Dichte beitrugen. Die erhaltenen Daten wurden in Excel überführt und für die Auswertung als Diagramme dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Genotypen

4.1.1 Dünnschichtchromatographie

In vorherigen Experimenten wurde bereits eine Untersuchung mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt, bei der die fünf Genotypen CantonS, OregonR, W1118, Dahomey und Foxo miteinander verglichen wurden. Dabei wurde die Hämolymphe mittels Sezieren extrahiert. Auf der aufgenommenen DC-Platte – zu sehen in Abbildung 4.1 – scheint es anhand der Intensität der Banden keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen zu geben. Lediglich in den unteren beiden Bandenreihen 4 und 5 unterscheiden sich die ersten neun Proben ziemlich deutlich von den restlichen, da sie zum Teil wesentlich schwächer ausgeprägt sind. Bei den obersten Banden lassen sich zudem kleine Unterschiede finden. Hier fallen die ersten sechs Banden in ihrer Ausdehnung etwas kleiner aus als die übrigen. Die obersten Banden sind insgesamt am stärksten ausgeprägt.

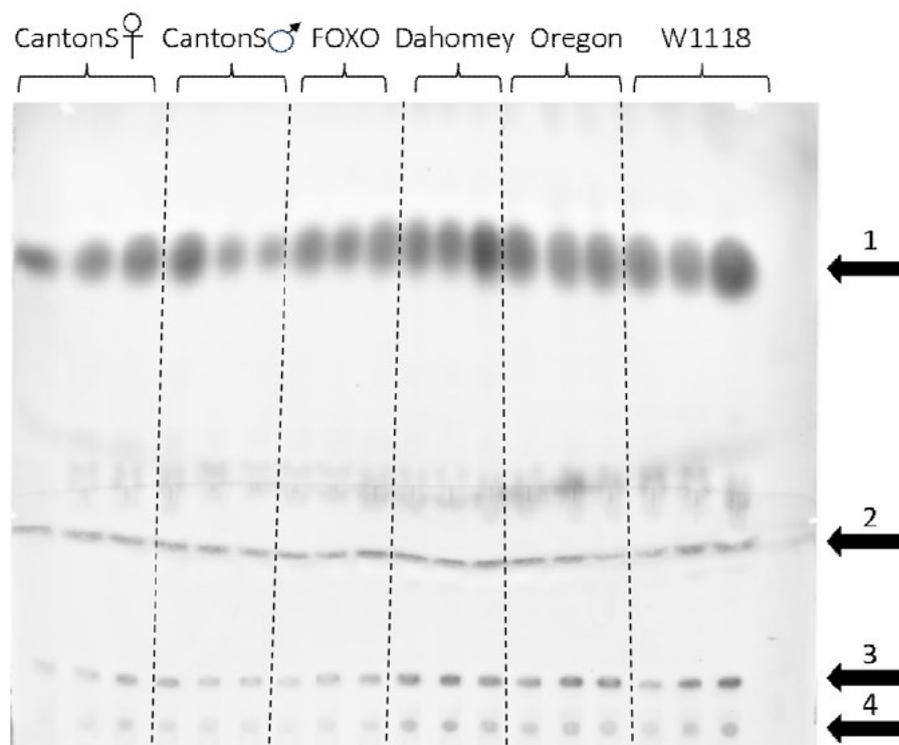


Abbildung 4.1: DC-Platte 1: Vergleich der Genotypen

4.1.2 Software-Analyse

Um die Annahme zu validieren, dass sich die Genotypen nicht nennenswert voneinander in ihrer Lipidzusammensetzung unterscheiden, wurden die einzelnen Lipidklassen mit FIJI analysiert. Dabei wurden die in den Abbildungen 4.2, 4.3 und 4.4 dargestellten Werte erhalten. In der ersten dieser drei Abbildungen sind die Intensitäten der Phosphatidylethanolamine-Banden (PEs) der fünf Genotypen zu sehen. Die Intensität ist als optische Dichte angegeben. Die exakten Werte dieser wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet und sind in den Säulen zu finden. Am oberen Ende der Säulen sind zudem die Standardabweichungen aufgetragen. Diese variieren mehr oder weniger stark zwischen den Genotypen. Gleiches gilt für die Intensitäten an sich. Auffällig ist hierbei, dass ein deutlich sichtbarer Unterschied zwischen den ersten drei und den letzten drei Proben besteht. Die ersten drei Proben haben eine optische Dichte von 0,27 (CantonS Weibchen und Foxo) bzw. 0,28 (CantonS Männchen). Bei den anderen drei Proben liegt sie bei 0,37 (W1118) bzw. 0,38 (Dahomey und OregonR). Somit hat die maximale Differenz zwischen den einzelnen Proben einen Wert von 0,11.

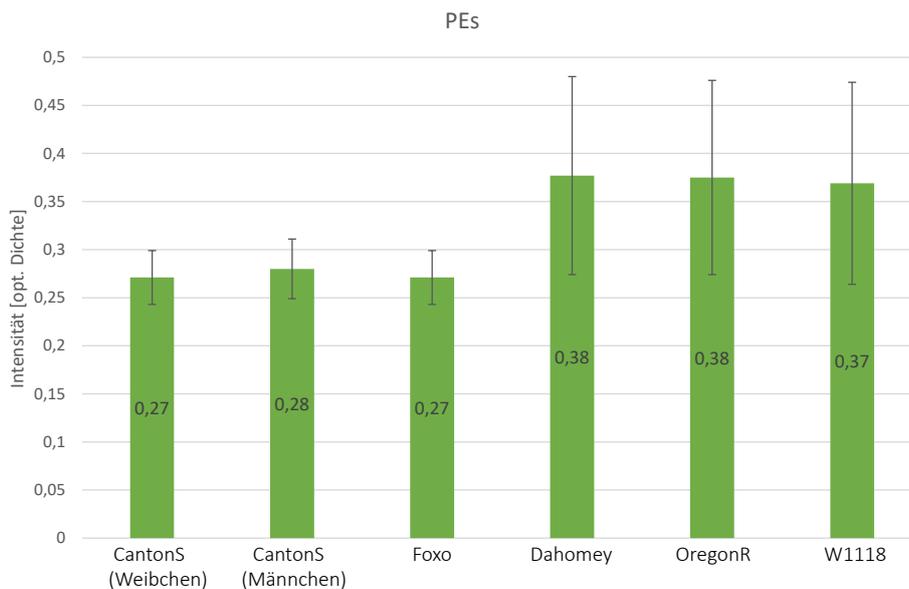


Abbildung 4.2: Intensitäten der PE-Banden

In Abbildung 4.3 sind die Intensitäten der Sterol-Banden zu sehen. Diese unterscheiden sich zwischen den Genotypen, jedoch in einem geringen Ausmaß. Der Genotyp Dahomey weist mit einer Intensität von 0,41 den höchsten Wert für die optische Dichte aller Genotypen auf. Der geringste Wert ist hingegen bei den CantonS Weibchen zu finden (0,36). Die maximale Differenz der optischen Dichte liegt somit bei einem Wert von 0,05.

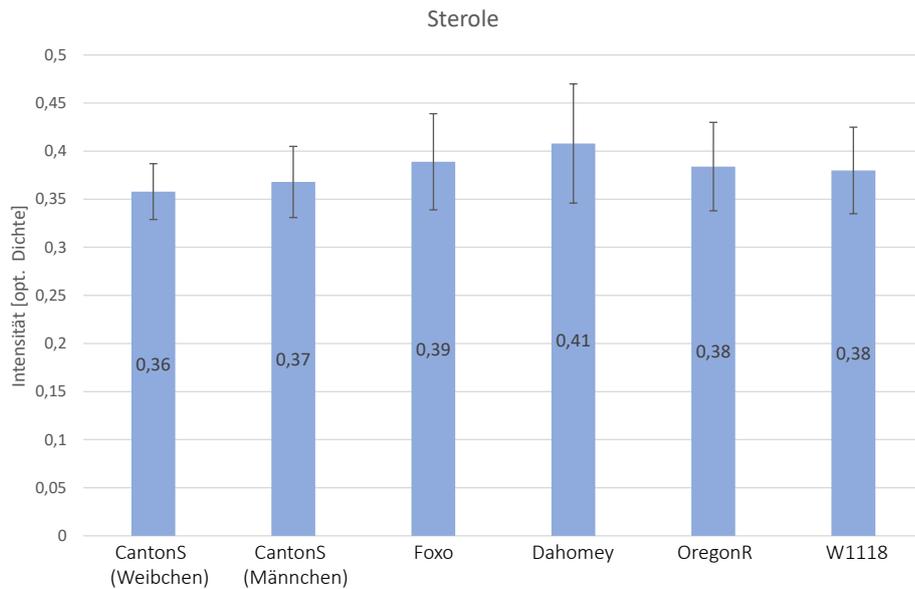


Abbildung 4.3: Intensitäten der Sterol-Banden

Die Intensitäten der TAG-Banden sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Hier sind ebenfalls wie in den beiden vorherigen Abbildungen gewisse Unterschiede zwischen den Genotypen zu finden. Auch hier hat der Genotyp Dahomey insgesamt die höchste Intensität. Der Wert der optischen Dichte beträgt bei ihm 0,56. Die geringste Intensität ist in dieser Abbildung bei den CantonS Männchen zu finden (0,45).

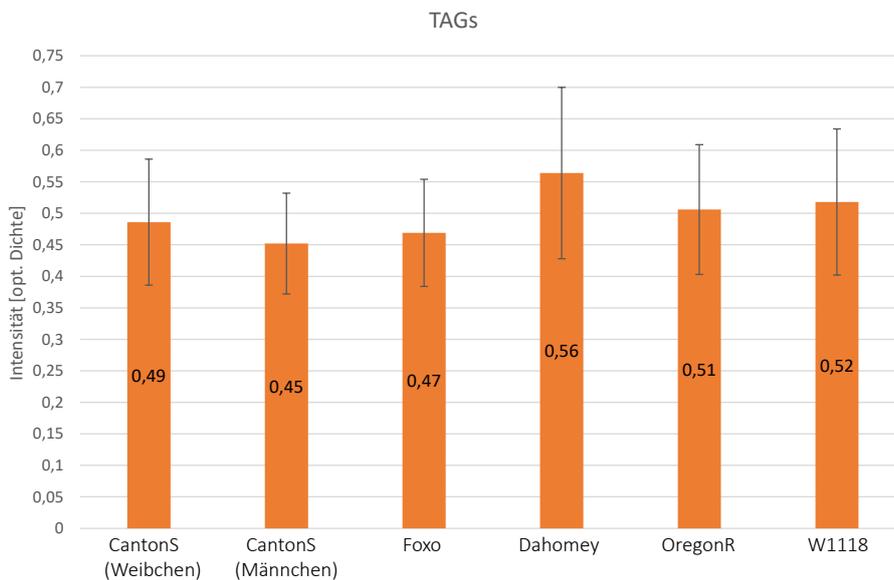


Abbildung 4.4: Intensitäten der TAG-Banden

Werden die verschiedenen Lipidklassen miteinander verglichen, so fällt auf, dass die höchsten Intensitäten bei den TAGs zu finden sind. Sogar der geringste Wert dieser (0,45) übersteigt den jeweils höchsten Wert der PEs (0,38) und Sterole (0,41).

4.2 Vergleich verschiedener Methoden

D. melanogaster bzw. die Hämolymphe dieses Organismus wurde in der Vergangenheit durchaus bereits erforscht. Dennoch wurden bisher keine TAG-haltigen Lipidtröpfchen in der Hämolymphe gefunden. Das wirft die Frage auf, warum sie mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden gefunden wurden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde eine Analyse mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Deren Ergebnis nach Färbung mit Primulin und Kupfersulfat ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Hier sind ganz links die Standards (S; Cholesterol in verschiedenen Verdünnungen) und daneben fünf verschiedenen Methoden aufgeführt. Die fünf Methoden die dabei zum Einsatz kamen wurden in 3.2.1 bereits genau beschrieben. Sie sind auf der Platte von links nach rechts angeordnet, beginnend mit Methode 1. Sowohl bei dieser, als auch bei der folgenden (Fettkörper) und der letzten Methode (Sezieren) sind auf den unterschiedlichen Höhen (1-5) Banden zu sehen. Diese sind bei den Proben der ersten Methode am intensivsten ausgeprägt. Das führt allerdings dazu, dass sie zum Teil nicht voneinander zu trennen sind, was hier auf Bandenreihe 3 zutrifft. Bei den beiden Methoden links von der letzten Methode (Anstech- und Einfrier-Methode) sind insgesamt deutlich weniger und schwächere Banden als bei den drei anderen Methoden ersichtlich. Vor allem bei der Einfrier-Methode fehlen die Banden, mit Ausnahme derer auf Höhe von Bandenreihe 3, komplett. Zusätzlich ist hier ein großer schwarzer Fleck zu erkennen. Die Banden der anderen Methoden unterscheiden sich sichtlich voneinander. Während die untersten drei Bandenreihen 3-5 durch eher gleichmäßig geformte, rechteckige Banden geprägt werden, sind die Banden der Bandenreihe 1 und 2 eher oval bzw. ellipsenförmig. Dadurch besitzen sie auch eine größere Ausdehnung als die weiter unten liegenden Banden. Zudem sind sie intensiver ausgeprägt. Eine Ausnahme stellen hierbei die Banden auf Bandenreihe 2 der ersten fünf Proben von Methode 2 dar. Diese sind im Gegensatz zu den entsprechenden Banden der anderen beiden Methoden kaum auszumachen. Ähnliches gilt für die obersten Banden von Methode 5. Diese sind ebenfalls nicht sehr intensiv.

Bei den ganzen Fliegen tritt an Position vier eine Anomalie auf. Hier fehlt die zweite Bande von oben, wohingegen die Banden auf allen anderen Höhen sehr gut zu erkennen sind. In der folgenden Methode ist ebenfalls eine Unregelmäßigkeit, jedoch an einer anderen Stelle, zu finden. Hier hebt sich die zweite Bande von oben der sechsten Probe in ihrer Stärke deutlich von denen der anderen Proben auf dieser Höhe ab. Erneut ist allerdings kein weiterer Unterschied zwischen dieser und den restlichen Proben der Methode bei den anderen Bandenreihen zu sehen. Bei Methode 5 fehlen die obersten beiden Banden der dritten Probe. Die weiter unten liegenden Banden fehlen hingegen nicht und haben die gleiche Stärke wie die entsprechenden Banden der anderen Proben dieser Methode.

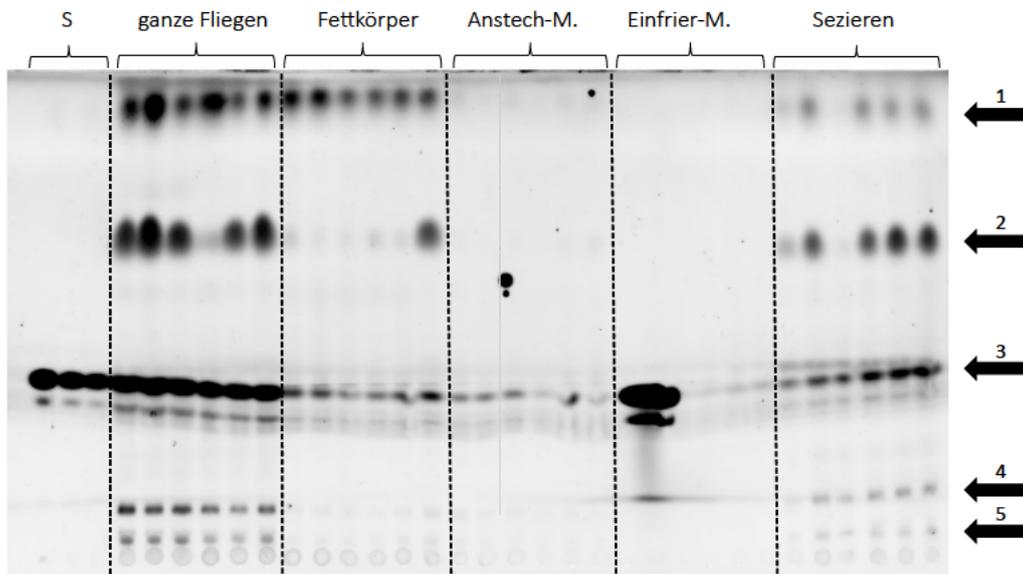


Abbildung 4.5: **DC-Platte 2: Vergleich verschiedener Methoden.** Bei den jeweils ersten drei Proben einer Methode wurde der Genotyp CantonS verwendet, bei den anderen drei der Genotyp OregonR.

4.3 Zusammensetzung der TAGs

4.3.1 Dünnschichtchromatographie

Um die Zusammensetzung der TAGs genauer abzuklären, wurden eine Dünnschichtchromatographie mit anschließender Massenspektrometrie durchgeführt. Das Ergebnis der Platte der Dünnschichtchromatographie vor der MS ist in Abbildung 4.6 zu sehen. In Abbildung 4.7 ist die gleiche Platte nach der MS abgebildet.

Auf der linken Plattenhälfte sind die Banden bei einem Probenvolumen von je 1 μl zu erkennen. Rechts sind diese mit einem Probenvolumen von je 3 μl abgebildet. Die Zahlen 1-4 rechts an der Platte zeigen auf die einzelnen Bandenreihen, welche sich auf unterschiedlichen Höhen befinden. Die Banden ganz oben (1) haben eine wolkenförmige Form und sind z.T. sehr lang gezogen. Das trifft vor allem auf die Banden auf der rechten Plattenseite zu. Zwischen den Bandenreihen 1 und 2 ist eine horizontale Linie zu sehen. Bandenreihe 2 weist eine deutliche Verschiebung auf, sprich es befinden sich nicht alle Banden auf einer Linie, sondern einige z.T. deutlich weiter unten als andere Banden. Davon sind in erster Linie die Banden betroffen, welche sich relativ mittig auf der Platte befinden. Alle Banden dieser Bandenreihe haben eine rechteckige Form und gleichen sich nahezu in ihrer Intensität. Die nächste Bandenreihe (3) weisen wie diese von Bandenreihe 2 eine rechteckige Form auf. Allerdings sind sie nicht so intensiv wie diese. Die Banden der untersten Bandenreihe (4) ähneln in ihrer Form diesen von Bandenreihe 3 sehr. Sie sind jedoch etwas kleiner und zudem weniger intensiv ausgeprägt. Bei der Betrachtung aller Banden der Platte fallen z.T. deutliche Unterschiede bezüglich

der Intensitäten dieser auf. Während die obersten Banden und diese der Bandenreihe 2 sehr stark ausgeprägt sind, fallen die der untersten beiden Bandenreihen mitunter deutlich schwächer aus. Vor allem die Banden auf der linken Plattenseite sind ganz unten sehr viel schwächer zu erkennen als die weiter oben angeordneten Banden auf dieser Seite. Die Banden der Proben der ersten Methode (M1) sind auf beiden Plattenseiten die am intensivsten ausgeprägten Banden. Die Banden der anderen Proben (M2 und M5) weisen untereinander in ihrer Intensität kaum Unterschiede auf, die mit bloßem Auge erkennbar sind. In Abbildung 4.7 sind die einzelnen Banden insgesamt deutlich besser zu erkennen als in Abbildung 4.6. Dennoch unterscheiden sich erstgenannte in ihrer Anordnung und Intensität zueinander nicht von denen in Abbildung 4.6. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die obersten Banden (Bandenreihe 1) größtenteils nicht mehr auf der Platte abgebildet sind. Stattdessen finden sich an diesen Positionen weiße, rechteckige Ausschnitte wieder.

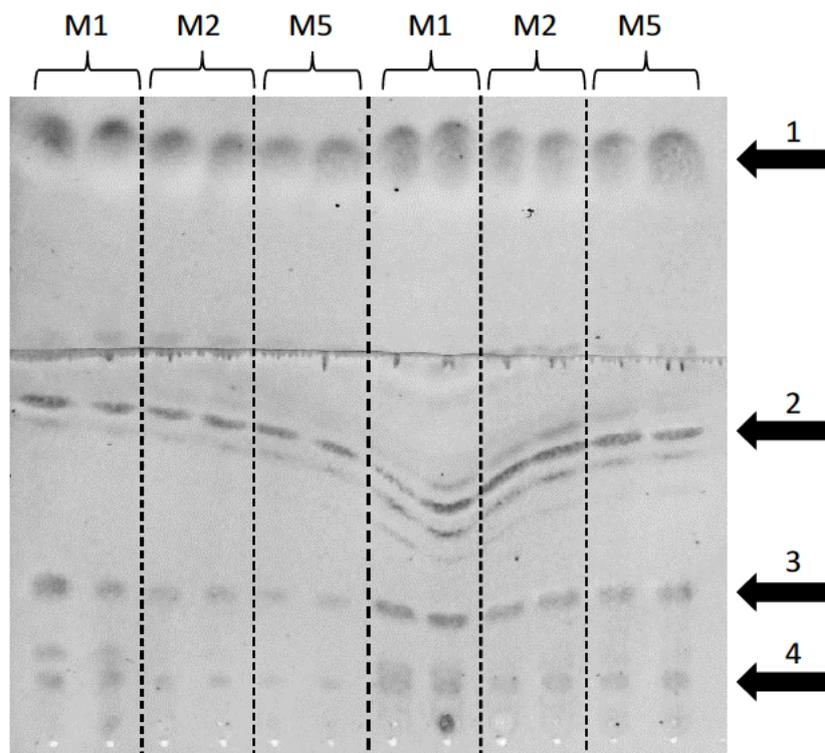


Abbildung 4.6: **DC-Platte vor MS.** Auf der linken Plattenseite befinden sich Proben mit einem Volumen von 1 µl und auf der rechten Seite welche mit einem Volumen von 3 µl. Methode 1 (M1): Ganze Fliegen. Methode 2 (M2): Fettkörper. Methode 5 (M5): Hämolymphe (Sezieren).

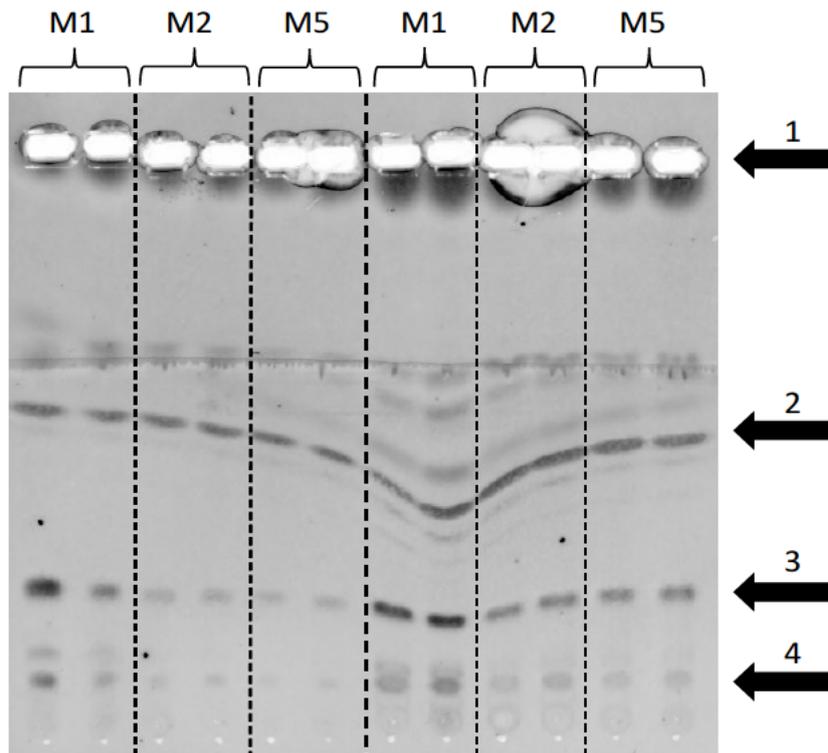


Abbildung 4.7: **DC-Platte nach MS.** Die Aufnahme der Platte nach der MS zeigt in der obersten Bandenreihe deutliche weiße Ausschnitte.

4.3.2 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie wurden die TAG-Banden aller Proben mit dem Plate Express DC-Platten Leser, gekoppelt mit einem kompakten Massenspektrometer, analysiert. Die Häufigkeit der Ionen ist auf der Y-Achse aufgetragen. Auf der X-Achse ist die jeweilige Masse als Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z eines ionisierten Moleküls aufgetragen. Dabei handelt es sich um eine dimensionslose Einheit.

In den folgenden drei Abbildungen 4.8-4.10 werden jeweils die beiden Proben einer Methode mit einem Gesamtvolumen von $3\ \mu\text{l}$ miteinander verglichen. Die Daten sind als Massenspektrogramme dargestellt. Die schwarze Datenreihe stellt hier jeweils die Datenreihe dar, die für die weiter unten folgenden Abbildungen 4.11-4.13 ebenfalls verwendet wurde.

In der Abbildung 4.8 erfolgt der Vergleich der Proben 7 und 8. Wie zu sehen ist, unterscheiden sich die beiden Proben nicht sehr stark voneinander. So weisen sie zumeist bei gleicher Masse ähnlich hohe Peaks auf. Das trifft vor allem für die drei höchsten Peaks zu. Es sind jedoch auch ein paar wenige Unterschiede zu finden. Diese betreffen die Peaks mit einer Masse von etwa 735, 778 und 860. Bei ersteren beiden weist Probe 7 eine deutlich stärkere relative Häufigkeit auf als Probe 8. Das gilt vor allem für den Peak bei einer ungefähren Masse von 735. Bei den Peaks um m/z 860 zeigt sich hingegen das Gegenteil: Hier besitzt Probe 8 eine wesentlich höhere rel. Häufigkeit.

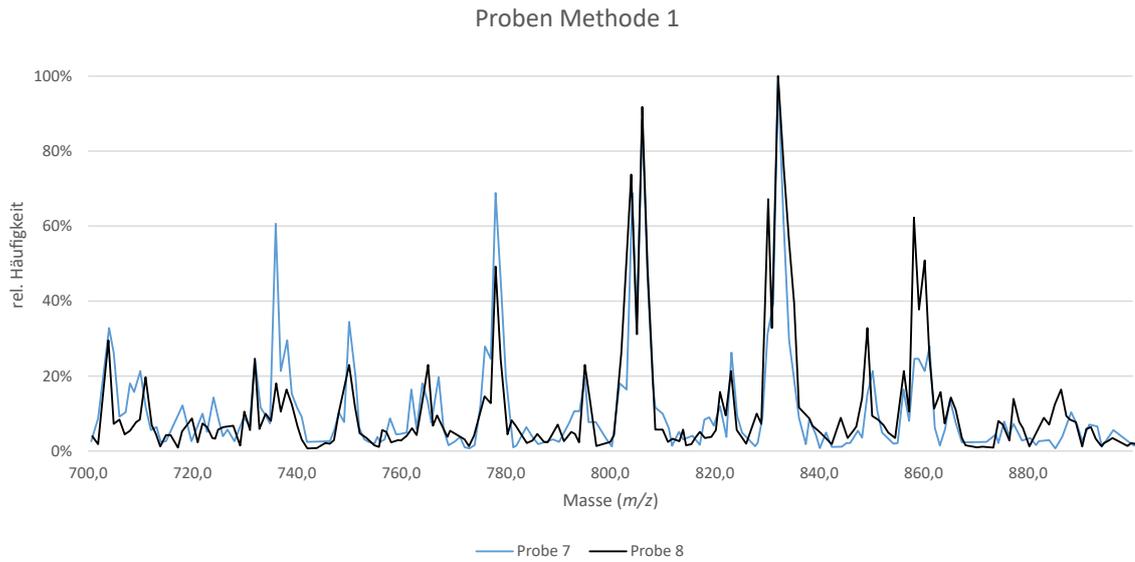


Abbildung 4.8: **Methode 1 (ganze Fliegen):** Vergleich der Proben 7 und 8

Ein Vergleich der Proben 9 und 10 ist in Abbildung 4.9 zu sehen. Es ist klar erkennbar, dass sich beide Proben sehr stark voneinander unterscheiden. Bei Probe 9 sind lediglich

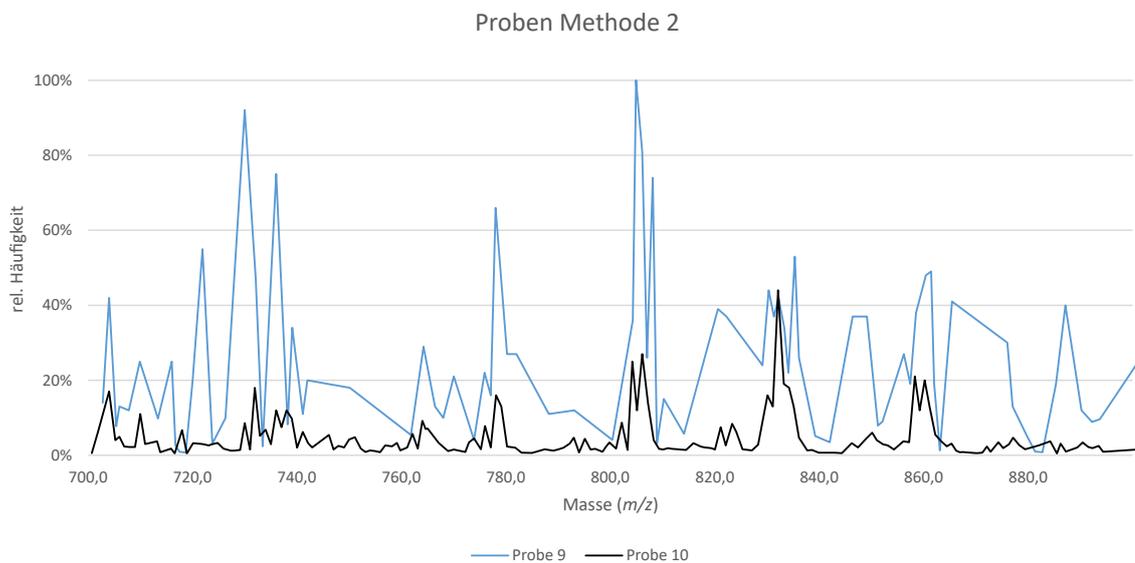


Abbildung 4.9: **Methode 2 (Fettkörper):** Vergleich der Proben 9 und 10

Im Massenspektrogramm der beiden Proben von Methode 5 (4.10) sind nur wenige Unterschiede ersichtlich. Diese belaufen sich zumeist lediglich auf nicht allzu große Differenzen in der rel. Häufigkeit. Es gibt jedoch auch ein paar Peaks, die bei Probe 12 deutlich höher ausfallen als bei Probe 11. Diese lassen sich beispielsweise bei einer

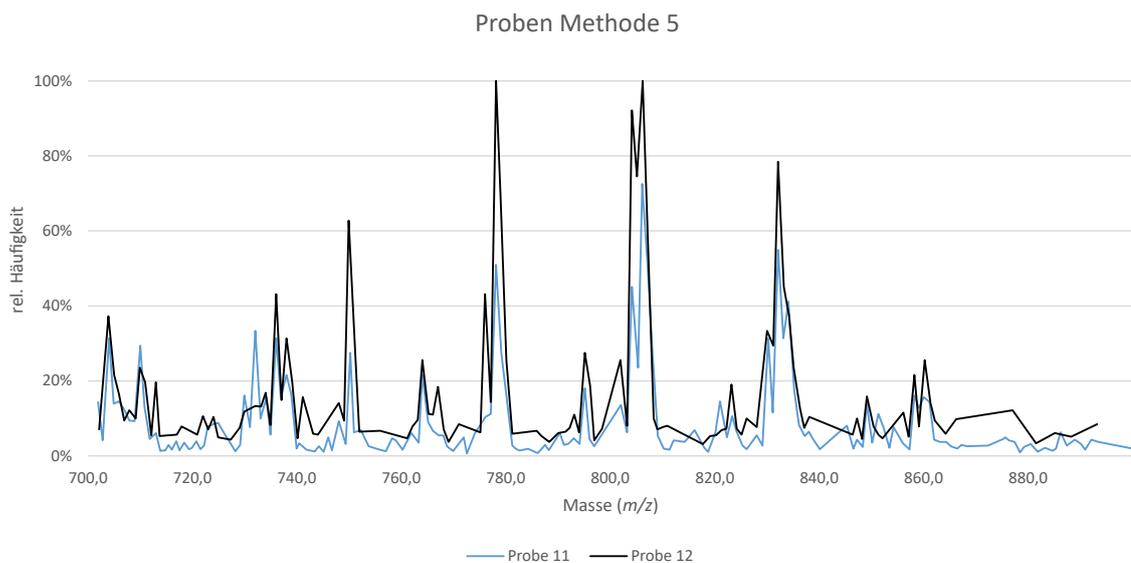


Abbildung 4.10: **Methode 5 (Sezieren)**: Vergleich der Proben 11 und 12

In Abbildung 4.11 ist das Massenspektrogramm einer Probe von Methode 1 zu sehen. Hier sind allgemein betrachtet einige sehr hohe, aber auch einige z.T. sehr niedrige Peaks zu sehen. Der erste etwas höhere Peak befindet sich bei m/z 704. Danach folgen drei Peaks, welche zueinander eine sehr ähnliche relative Häufigkeit aufweisen. Diese beträgt knapp 23 (m/z 765 und 795) bzw. 24,5% (m/z 732). Zwischen den beiden ersten ist bei einer Masse von 778 ein Teilchen mit einem etwas höheren Peak abgebildet. Mit einer rel. Häufigkeit von etwa 74 und 92% folgen zwei sehr intensive Signale. Sie befinden sich bei m/z 804 bzw. 806. Das nächste Teilchen mit einem starken Signal weist eine rel. Häufigkeit von ca. 67% auf und ist bei einer Masse von 830 zu finden. Darauf folgt bei einer Masse von 832 das Teilchen mit dem höchsten Peak, der auch als Basispeak bezeichnet wird. Als intensivstes Signal wird seine absolute Häufigkeit mit einer relativen Häufigkeit von 100% gleichgesetzt. Die drei darauf folgenden, beschrifteten Peaks sind teilweise sehr viel kleiner als dieser. Sie haben rel. Häufigkeiten von knapp 33, 62 und 51% (von links nach rechts).

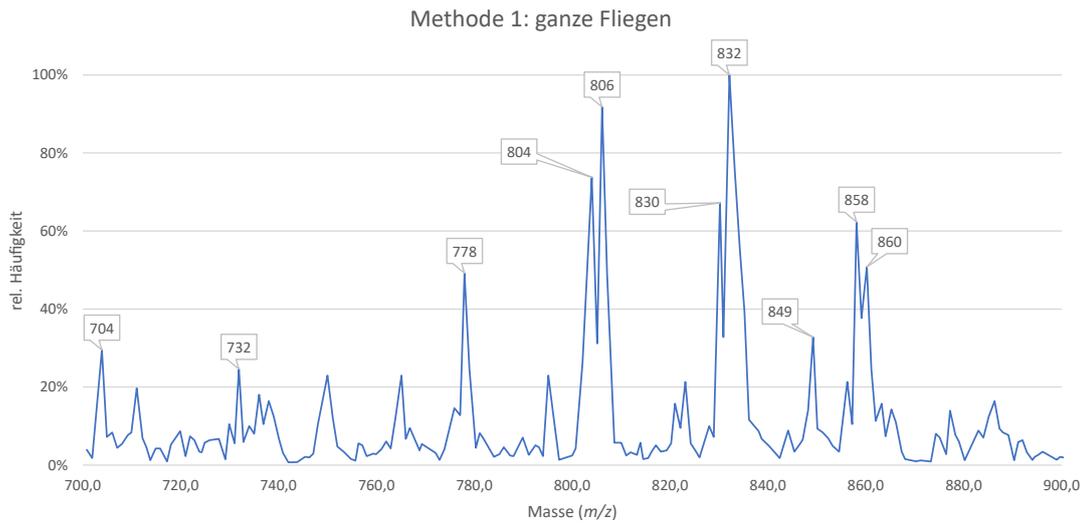


Abbildung 4.11: Massenspektrogramm von ganzen Fliegen

In der folgenden Abbildung (4.12) ist das Massenspektrogramm einer Probe der zweiten Methode ersichtlich. Auch hier sind einige Peaks mit unterschiedlicher Höhe, sprich unterschiedlicher rel. Häufigkeit abgebildet. Bei m/z 704 ist der erste hohe Peak mit einer rel. Häufigkeit von knapp 39% zu finden. Die Teilchen bei einer Masse von 731 a

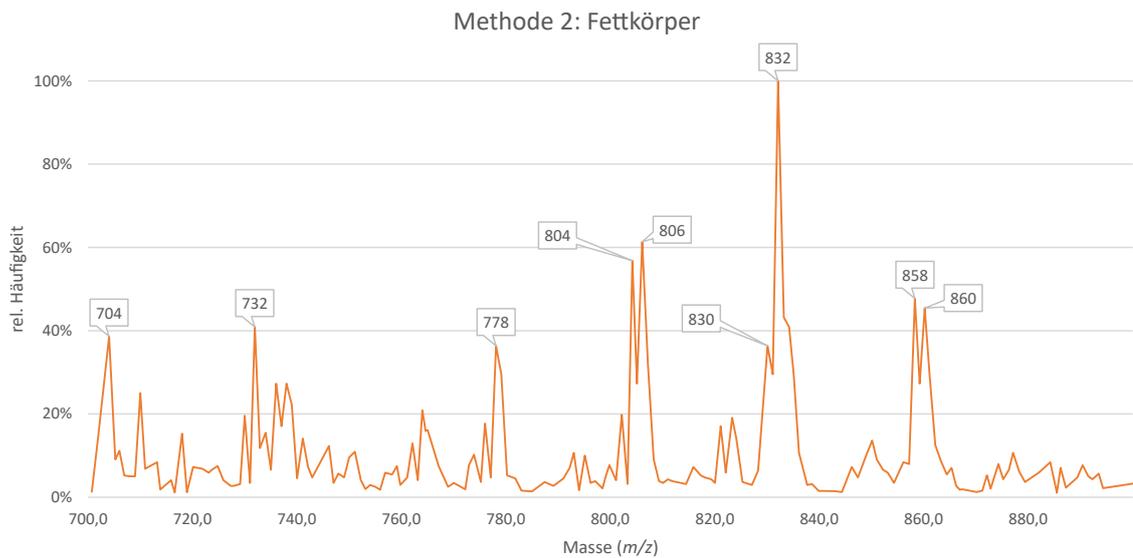


Abbildung 4.12: Massenspektrogramm der Fettkörper

Das Massenspektrogramm einer Probe der mittels Sezieren extrahierten Hämolymphe (Methode 5) ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Hier ist grundlegend ein ähnliches Bild wie bei den beiden vorherigen Abbildungen zu sehen. So gibt es hier ebenfalls zahlreiche Peaks mit verschiedenen rel. Häufigkeiten. Bei m/z von 703,9 ist der erste etwas höhere dieser Peaks mit einer rel. Häufigkeit von ca. 37% zu finden. Die Teilchen mit einer Masse von 736 und 776 weisen nur eine geringfügig höhere rel. Häufigkeit als dieser

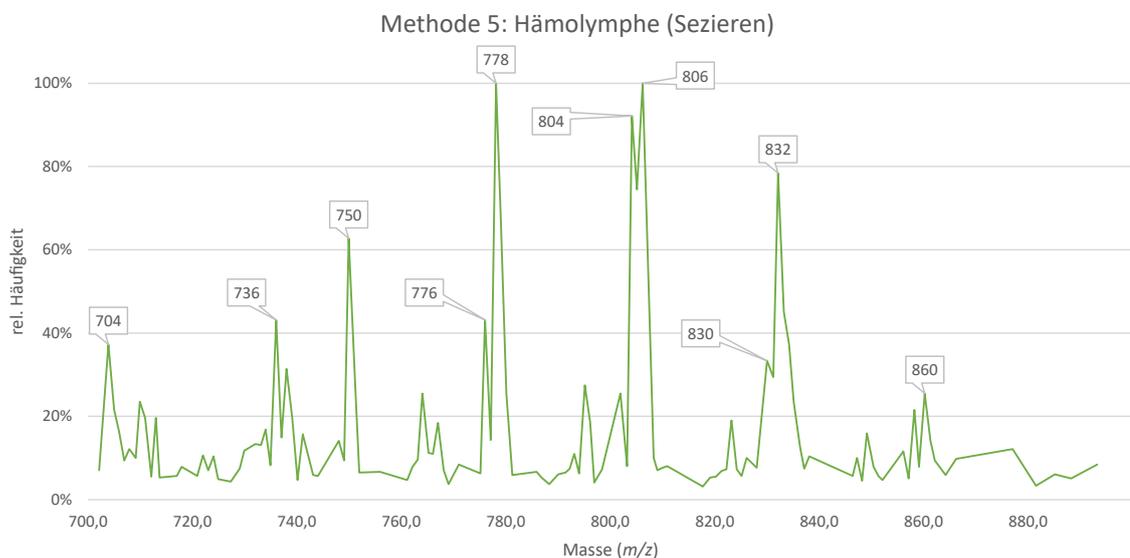


Abbildung 4.13: Massenspektrogramm der Hämolymphe

Bei dem Vergleich der einzelnen Massenspektrogramme miteinander fällt auf, dass das der zweiten Methode insgesamt Peaks mit einer geringen relativen Häufigkeit aufweist. Während beispielsweise beim Massenspektrogramm der ersten Methode neben dem Basispeak vier weitere Peaks mit einer rel. Häufigkeit von über 60% vorliegen, gibt es beim Massenspektrogramm lediglich einen weiteren Peak von über 60%.

Neben den allgemeinen Unterschieden bezüglich der Höhe der Peaks gibt es weitere Unterschiede. Diese beziehen sich darauf, bei welcher Masse sich die stärksten Signale befinden. So ist das Teilchen des jeweils höchsten Peaks der ersten beiden Abbildungen bei einer Masse von 832 zu finden. Dieses ist ebenfalls bei Methode 5 zu finden. Hier kommt es verglichen mit den anderen beiden Methoden am seltensten vor. Zwei weitere, bei Abbildung 4.11 sehr hohe Peaks (m/z 804 bzw. 806) machen in der Abbildung der zweiten Methode ebenfalls mit die höchsten Peaks aus. In letzterer haben sie allerdings eine deutlich geringere rel. Häufigkeit. Bei Methode 5 sind die Peaks an dieser Stelle ebenfalls sehr hoch. Ersterer von beiden hat mit einer rel. Häufigkeit von ca. 92% einen nicht ganz unerheblich höheren Wert als der gleiche Peak bei Methode

1 (rel. Häufigkeit rund 74 %). Bei Methode 5 sind zudem zwei Basispeaks zu finden, wohingegen bei den anderen beiden Methoden nur jeweils einer auftritt.

Um die verschiedenen Methoden untereinander besser vergleichen zu können, wurden jeweils zwei von ihnen in einem Diagramm dargestellt. Der größte absolute Häufigkeitswert wurde dabei mit einer relativen Häufigkeit von 100 % gleichgesetzt. Diese Vergleiche sind in den Abbildungen 4.14-4.16 dargestellt.

Begonnen wird mit dem Vergleich der ersten beiden Methoden (4.14). Bei diesem ist zu erkennen, dass die Peaks bei m/z 704 und 732 bei beiden Methoden nahezu die gleiche relative Häufigkeit aufweisen. Die restlichen Peaks sind hingegen bei der ersten Methode (ganze Fliegen) deutlich höher als bei der Methode 2 (Fettkörper). Vor allem der Peak bei m/z 849 variiert sehr stark zwischen den beiden Methoden. Während an dieser Position bei Methode 2 kaum ein wirklicher Peak auftritt, ist bei Methode 1 dort ein Peak mit einer rel. Häufigkeit von ca. 33 % zu finden.

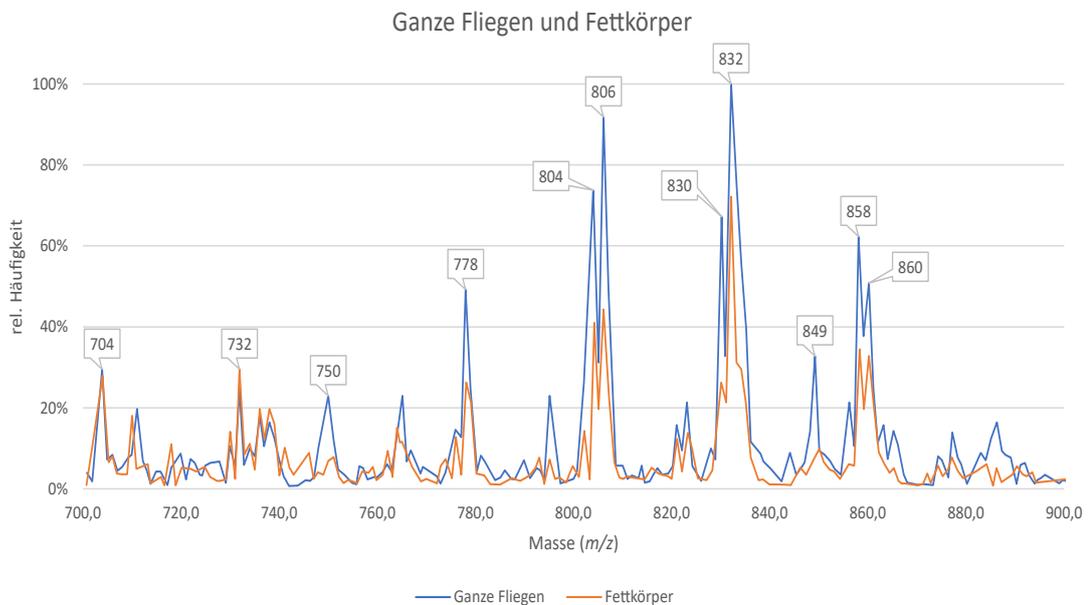


Abbildung 4.14: Vergleich der Massenspektrogramme von Methode 1 und 2

In der Abbildung 4.15 werden die Methoden 1 (ganze Fliegen) und 5 (Hämolymphe) gegenüber gestellt. Hier ist bei einer Masse von 704 ein Teilchen zu finden, das bei beiden Methoden nahezu die gleiche relative Häufigkeit von etwa 30 % hat. Die Peaks bei m/z 732, 830, 849 sowie 858 und 860 sind bei Methode 1 mitunter deutlich höher als bei der fünften Methode. Das ist vor allem für letztere beide Peaks zutreffend. Der erste dieser beiden Peaks bei einer Masse von 858 weist bei Methode 1 ungefähr eine dreifach höhere rel. Häufigkeit auf als bei Methode 5. Bei m/z 736 bis 804 sind hingegen Peaks zu erkennen, welche bei Methode 5 eine größere Häufigkeit haben. Das Signal bei m/z 736 weist bei Methode 5 in etwa eine doppelt so hohe Häufigkeit auf wie bei der ersten Methode. Bei dem folgenden Signal (m/z 750) besteht sogar ein etwas noch größerer Unterschied zwischen den beiden Methoden. Während Methode 5 hier eine rel. Häufigkeit von ca. 52 % besitzt, liegt diese von Methode 1 bei lediglich etwa 21 %. Die Peaks bei m/z 804 und 806 weisen bei beiden Methoden wiederum recht ähnliche Häufigkeiten auf. Ersterer Peak ist hierbei bei Methode 5 etwas höher und letzterer bei Methode 1.

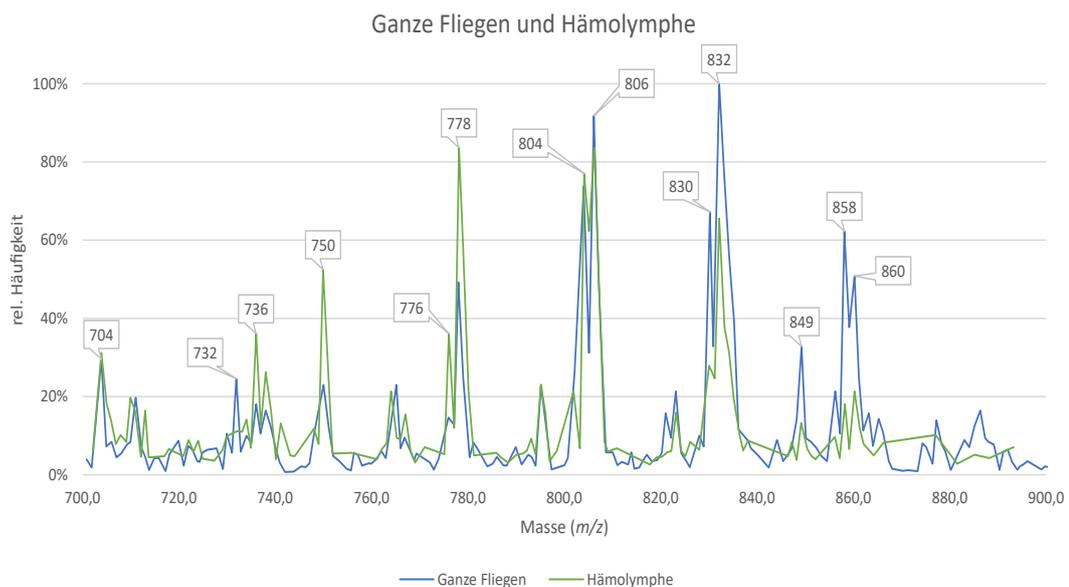


Abbildung 4.15: Vergleich der Massenspektrogramme von Methode 1 und 5

Zuletzt erfolgt der Vergleich des Massenspektrogramms der Fettkörper mit dem der Hämolymphe. Der Großteil aller Signale ist hierbei bei der Probe der Hämolymphe stärker als bei der der Fettkörper. Letztere weist lediglich bei m/z 732 bzw. 832, 858 und 860 höhere Peaks auf als die Probe der Hämolymphe. Vor allem die Teilchen einer Masse von 750, 778 sowie 804 und 806 sind bei Methode 5 durch deutlich höhere Peaks gekennzeichnet, verglichen mit denen von Methode 2. So liegt beispielsweise der Peak bei m/z 750 der Hämolymphe-Probe bei etwas über 60 %, wohingegen der der Fettkörper-Probe bei unter 10 % liegt.

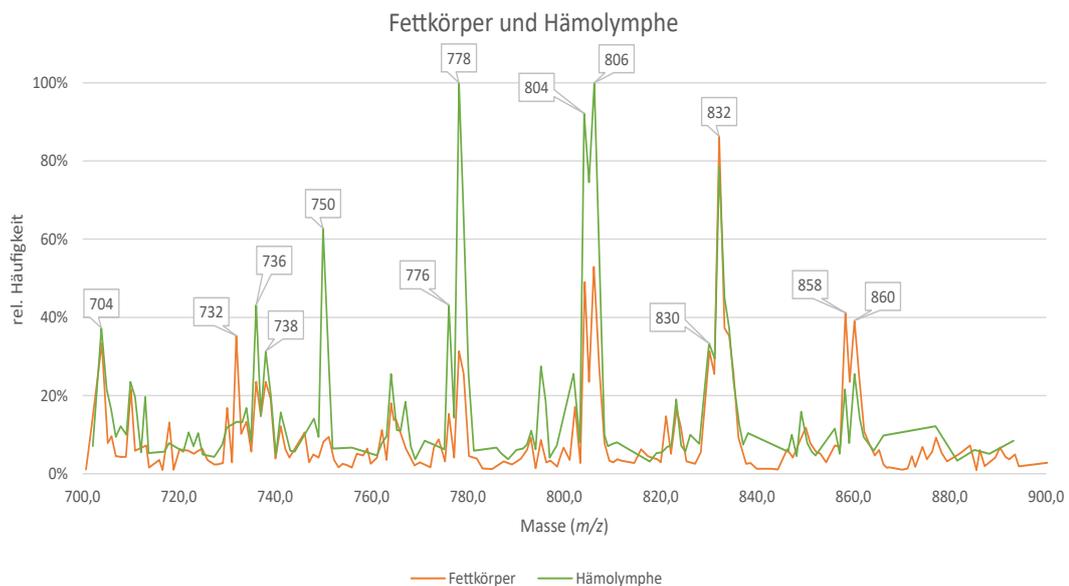


Abbildung 4.16: Vergleich der Massenspektrogramme von Methode 2 und 5

Die zu den erstellten Diagrammen zugehörigen Datensätze der einzelnen Proben sind in Abschnitt 7 (Anhang) zu finden.

4.4 Funktion der Hämolymphe-Lipidtröpfchen

4.4.1 Dünnschichtchromatographie

Aufgrund des hohen TAG-Gehalts in den Hämolymphe-LDs lag die Vermutung nahe, dass sie der Speicherung von Lipiden dienen. Für die Überprüfung dieser These wurde zunächst eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Das Ergebnis dieser ist in Abbildung 4.17 zu sehen. Sowohl auf der linken als auch auf der rechten Plattenseite wurden von jeder der drei verwendeten Methoden (ganze Fliegen, Fettkörper und Sezieren) jeweils zwei unterschiedliche Proben aufgetragen. Auf der linken Seite ist

pro Methode je eine Probe von eintägig hungernden und der dazugehörigen Kontrolle zu finden. Von den vier Tage hungernden Fliegen und den dazugehörigen Kontrollen wurde jeweils eine Probe jeder Methode auf die rechte Seite aufgetragen. Die Proben, welche die hungernden Fliegen enthielten, wurden auf beiden Plattenseiten mit einem Sternchen markiert.

Die zu erkennenden Banden befinden sich auf fünf unterschiedlichen Höhen (Bandenreihe 1-5). Je nach Bandenreihe sind die Banden unterschiedlich intensiv. So sind die obersten Banden mit Abstand am deutlichsten zu erkennen. Die Banden der nächsten Bandenreihe (2) sind hingegen nur sehr schwach ausgeprägt. Gleiches gilt für die untersten Banden (5). In Bandenreihe 3 ist im Gegensatz zu allen anderen Bandenreihen ausnahmslos in jeder Probe eine Bande abgebildet. Diese haben zudem eine recht hohe Intensität.

Bei jeweils der ersten Probe einer Methode (*) fehlen die obersten Banden, mit Ausnahme von Methode 2 auf der linken Plattenseite. Zusätzlich sind bei den mit einem Sternchen markierten Proben auf der rechten Seite keine Banden bei den zwei untersten Bandenreihen erkennbar.

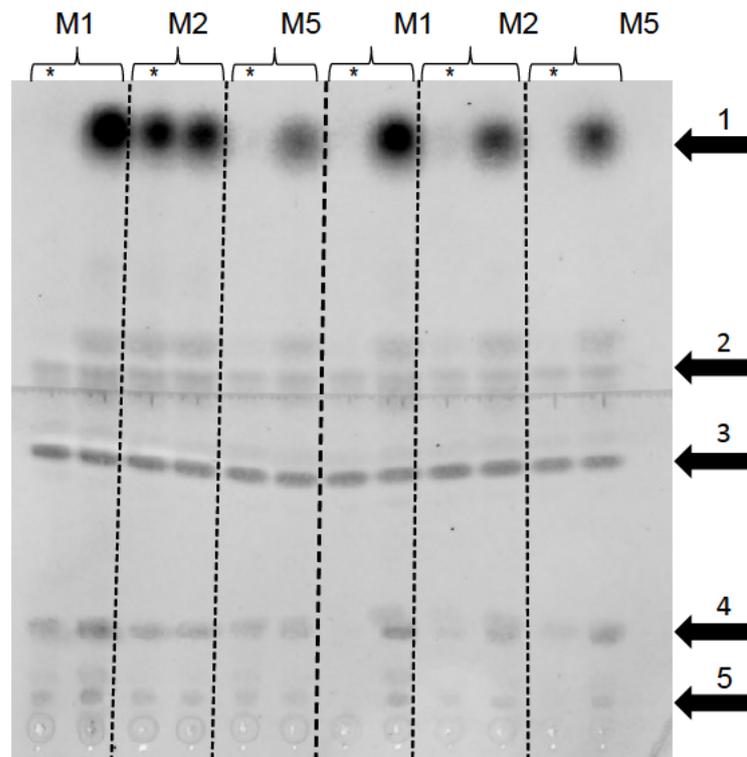


Abbildung 4.17: **Vergleich von hungernden und nicht-hungernden Fliegen.** Auf der linken Plattenseite sind die Proben der eintägig hungernden Fliegen (*) und die ihrer Kontrollen aufgetragen, auf der rechten Seite die viertägig hungernden Fliegen (*) und dazugehörigen Kontrollen.

4.4.2 Mikroskopie

Zusätzlich zur Dünnschichtchromatographie wurden hungernde Fliegen sowie deren Kontrollen mikroskopisch untersucht. In Abbildung 4.18 sind drei der vier Einzelkanäle (A-C) und deren Zusammenlagerung (D) der mikroskopischen Untersuchung einer der Kontrollen zu sehen. Das obere linke Bild (A) zeigt die Strukturen, welche mit BODIPY angefärbt wurden. Hier sind einige helle, weiße Punkte ersichtlich, die in ihrer Größe deutlich variieren. So weisen einige einen Durchmesser von etwa 7-8 μm auf, wohingegen andere mit ca. 2-3 μm kleiner sind. Im nächsten Bild (B) ist die DAPI-Färbung ersichtlich. Hier ist lediglich ein relativ großer, etwas verschwommener Punkt zu finden. Die Nilrot-Färbung ist im untersten der drei Bilder (C) dargestellt. In dieser Aufnahme ist ähnlich wie in der vorherigen lediglich ein heller Fleck auszumachen. Dieser ist aus mehreren einzelnen, kreisrunden Partikeln zusammengesetzt. Etwas links von der Mitte befindet sich in allen drei Bildern eine Anordnung, die je nach Kanal leicht unterschiedliche Formen aufweist und in ihrer Helligkeit variiert. Dabei ist sie im ersten Bild (A) am deutlichsten zu erkennen, wohingegen sie in (B) am schwächsten ist. Die Überlagerung der drei Einzelbilder ist unten rechts dargestellt (D). Sehr gut zu erkennen sind hier die vielen grünen Punkte bzw. kreisförmigen Strukturen, welche sich im Bild verteilt befinden. Die Anordnung, welche zuvor in allen drei Einzelbildern abgebildet war, weist hier eine grün-gelblich-blaue Färbung auf.

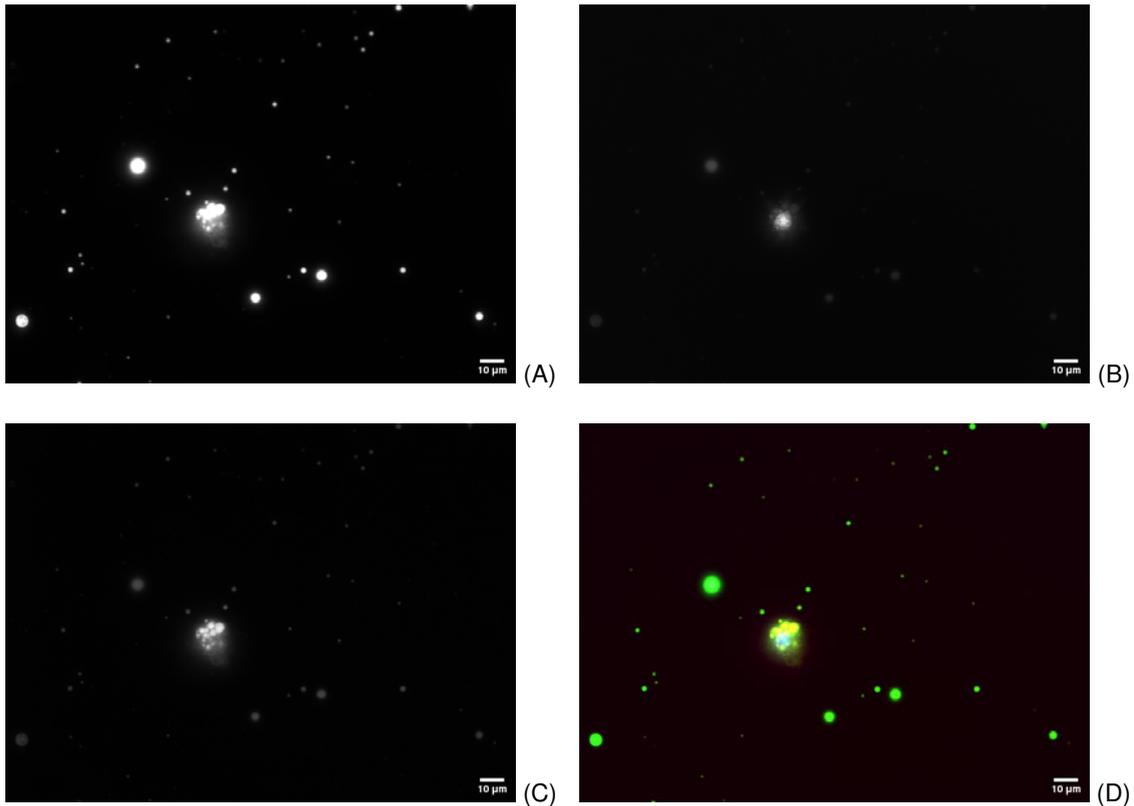


Abbildung 4.18: **Kontrolle von nicht-hungernden Fliegen.** (A) Die BODIPY-Färbung zeigt viele, unterschiedlich große Strukturen. (B) Bei der DAPI-Färbung ist lediglich ein weißer Punkt deutlich zu sehen. (C) Eine Ansammlung kleiner Punkte ist in der Nilrot-Färbung zu sehen. (D) In der Zusammenlagerung der Bilder A-C sind hauptsächlich grün-gefärbte Strukturen ersichtlich.

In der folgenden Abbildung (4.19) sind vier Aufnahmen einer Fliege gezeigt, welche für einen Tag hungerte. Hier sind ebenfalls die einzelnen Kanäle der BODIPY- (A), DAPI- (B) und Nilrot-Färbung (C) sowie die Überlagerung dieser drei Kanäle (D) dargestellt. In allen vier Aufnahmen ist relativ zentral gelegen eine helle Struktur zu erkennen. Diese setzt sich aus mehreren, kleineren kreisförmigen Strukturen zusammen. Zusätzlich sind in allen Bildern, mit Ausnahme von Bild B, weitere kreisförmige Partikel zu finden. Diese variieren in ihrer Größe. So haben einige einen Durchmesser von etwa 3-4 µm und andere einen von ca. 1 µm. Während diese Partikel in A und C als weiß erscheinen, weisen sie in D eine grüne bzw. gelbliche Farbe auf.

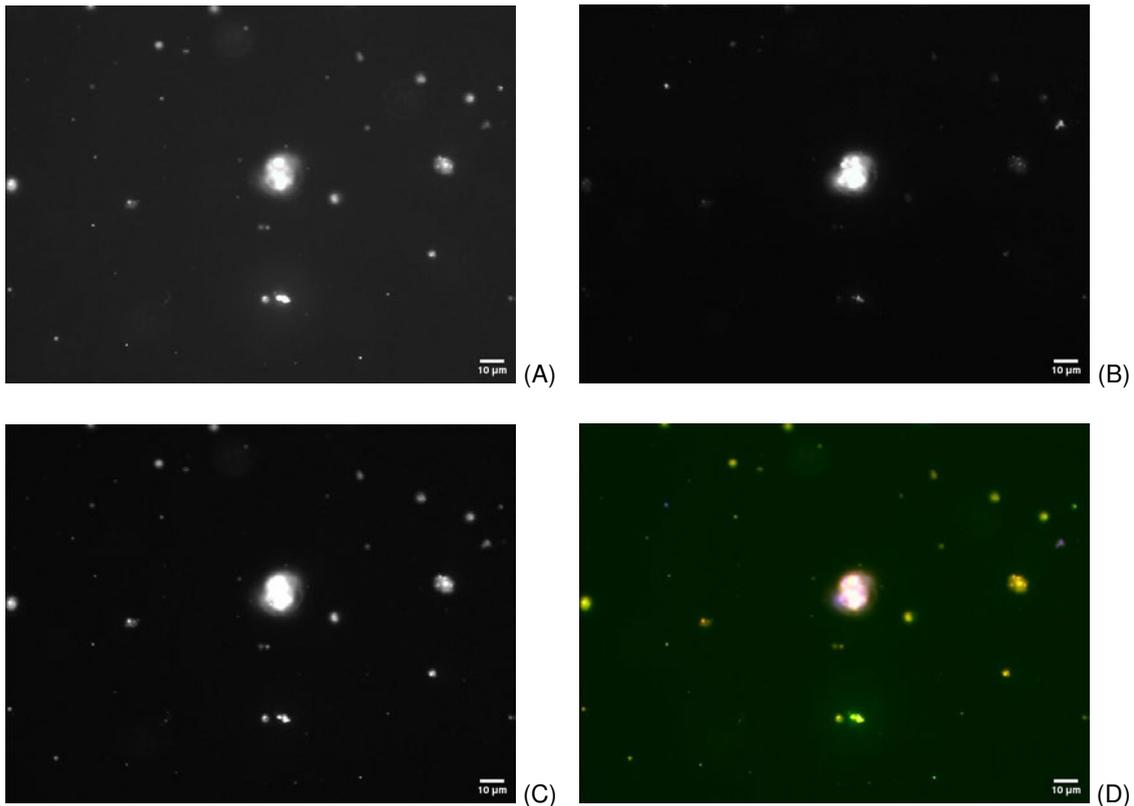


Abbildung 4.19: **Fliegen nach einem Tag.** Die einzelnen Abbildungen zeigen Mikroskopieaufnahmen der BODIPY- (A), DAPI- (B) und Nilrot-Färbung (C) sowie die Überlagerung dieser Einzelbilder (D).

In der Abbildung 4.20 sind vier mikroskopische Aufnahmen von einer Fliege zu sehen, welcher für vier Tage die Nahrung entzogen wurde. Das Bild unten rechts (D) wurde als Überlagerung der drei Einzelbilder (A-C) erstellt. In der oberen linken Abbildung (A) ist die BODIPY-Färbung gezeigt. Hier sind zahlreiche kleine, weiße Punkte zu erkennen, die alle eine ähnliche Größe aufweisen. In dem rechts danebenliegenden Bild (B), welches die DAPI-Färbung zeigt, sind deutlich weniger weiße Punkte zu erkennen. Diese befinden sich hauptsächlich etwas links von der Bildmitte. Die untere linke Abbildung (C) zeigt etwas größere Strukturen als die, die in den vorherigen beiden Bildern zu sehen waren. Hier wurde die Nilrot-Färbung aufgenommen. In der Abbildung (D) sind vor allem in der unteren rechten Bildhälfte einige rote Partikel zu erkennen, die alle eine ähnliche Größe aufweisen. Ihr Durchmesser beträgt in etwa 4 bis 5 μm . Am rechten Bildrand sowie im oberen, mittigen Teil des Bildes sind weitere rote Partikel zu finden. Etwas links von der Mitte des Bildes ist eine Ansammlung mehrerer, kleiner, blauer Punkte auszumachen. Deren Durchmesser ist sichtlich geringer als der von den roten Partikeln und beträgt ca. 1-2 μm . Daneben lassen sich überall im Bild grüne Punkte finden. Diese weisen wie die blauen Punkte einen sehr kleinen Durchmesser auf. Gemessen an der Anzahl dominieren in der Abbildung die grünen Punkte.

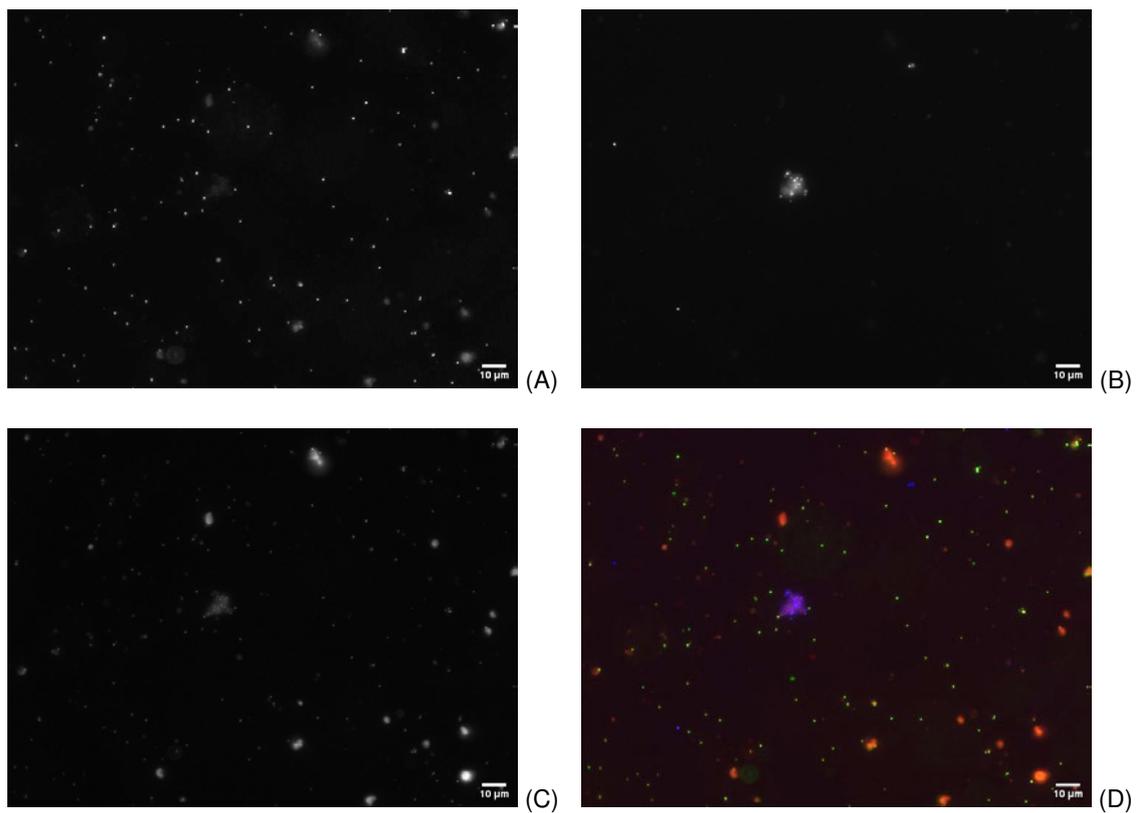


Abbildung 4.20: **Fliegen nach vier Tagen.** Während in der BODIPY-Färbung (A) zahlreiche helle Punkte zu sehen sind, finden sich in der DAPI-Färbung (B) lediglich ein paar wenige kleine Punkte. Die Nilrot-Färbung (C) zeigt hingegen weniger, aber größere Strukturen auf. Die Überlagerung der drei Einzelbilder weist grüne, rote und blaue Punkte auf (D).

5 Diskussion

5.1 Vergleich der Genotypen

5.1.1 Dünnschichtchromatographie

Sowohl bei diesem als auch bei den später folgenden Experimenten wurden die Proben mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Es wurde sich für diese Methode entschieden, weil sie sehr gut dafür geeignet ist chemische Komponenten innerhalb einer Probe aufzutrennen. Das liegt u.a. an den geringen Kosten, der Einfachheit und guten Reproduzierbarkeit, welche die DC mit sich bringt (Santiago und Strobel, 2013).

Die in Abbildung 4.1 dargestellte DC-Platte weist vier verschiedene Lipidklassen auf. Diese sind je nach Polarität unterschiedlich weit auf der Platte gelaufen. Aufgrund dessen, dass die Platte zunächst in polarem Laufmittel stand, lassen sich unterhalb der Laufmittelfront dieses die polaren Lipide finden. Die Laufmittelfront ist etwas oberhalb der Bandenreihe 2 erkennbar. Die polaren Lipide unterscheiden sich in Phosphatidylcholine (PCs), Phosphatidylethanolamine (PEs) und Sterole, beginnend von unten. Ersterer beide sind den Phospholipiden zuzuordnen. Ganz oben sind Triacylglycerine (TAGs) zu finden. Hierbei handelt es sich um Neutrallipide. Die Banden dieser sind am deutlichsten zu erkennen. Das gibt Rückschluss darauf, dass die Lipidtröpfchen in der Hämolymphe einen hohen TAG-Anteil haben. Am kleinsten und schwächsten fallen hier die Banden der männlichen CantonS Fliegen aus. Das ist einfach damit zu begründen, dass Männchen insgesamt weniger Fett (-gewebe) besitzen als Weibchen. Die schwächer ausfallenden PE- und PC-Banden auf der linken Plattenseite könnten zu der Vermutung führen, dass die dort aufgetragenen Proben bzw. die entsprechenden Genotypen einen geringeren Anteil dieser Lipide besitzen. Das ist allerdings wenig schlüssig, da es sich dabei um die Lipidtröpfchen umgebenden Phospholipide handelt. Demnach würde es bedeuten, dass sich in diesen Genotypen weniger der Hämolymphe-LDs befinden. Das konnte jedoch bereits durch mikroskopische Untersuchungen ausgeschlossen werden. Lediglich bei den Männchen von CantonS könnte diese Begründung zutreffend sein, da sie im Vergleich zu Weibchen, wie oben bereits erwähnt, weniger Fett und damit auch weniger LDs besitzen. Bei den Weibchen von CantonS und Foxo muss dieser Unterschied daher auf einen anderen Grund zurückzuführen sein. Eine Möglichkeit ist, dass die Platte nicht gleichmäßig mit Primulin besprüht wurde, wodurch diese Banden im Fluoreszenzscanner nicht so klar erscheinen wie die der anderen Genotypen. Schließlich ist Primulin ein Fluoreszenzfarbstoff und je weniger von diesem auf die Platte bzw. Banden gelangt, umso schwächer sind diese zu erkennen.

Das Anfärbepotential von Primulin wird sowohl durch die Fettsäurezusammensetzung als auch durch die Hauptgruppe des Analyten beeinflusst (Engel und Schiller, 2021). Das könnte möglicherweise einen Einfluss auf die anschließende Auswertung mittels

Software haben. Daher lohnt sich ein Blick auf andere Farbstoffe zum Sichtbarmachen der Lipide. Geeignet wären beispielsweise 2,7-Dichlorfluorescein oder Rhodamin 6G, welche wie Primulin nicht-spezifische, fluoreszente Reagenzien sind und keine Zerstörung der Probe nach sich ziehen (Fuchs, Popkova et al., 2015). Rhodamin ist ebenfalls wie Primulin eine sehr sensitive Reagenz, mit einer Empfindlichkeit, die im niedrigen Nanomolbereich liegt (Fuchs, Süß et al., 2011). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser beiden Reagenzien ist, dass die mit ihnen gefärbten Lipide für mehrere Tage beständig sind und somit auch ggf. zu einem späteren Zeitpunkt analysiert werden können (White et al., 1986; Kishimoto et al., 2001). Während - wie oben erwähnt - das Anfärbepotential von Primulin durch die Struktur von Lipiden beeinflusst wird, ist dies bei Rhodamin 6G nicht der Fall. Weder die Länge der Alkylkette noch das Vorkommen bzw. die Anzahl an Doppelbindungen haben einen Einfluss auf die mit einem Fluoreszenzscanner ermittelte Intensität (Kishimoto et al., 2001). Für eine anschließende Untersuchung der Lipide mittels MS eignet sich jedoch Primulin gegenüber Rhodamin besser (Fuchs, Popkova et al., 2015). In einer 2021 erschienenen Arbeit von Hofmann et al. wird berichtet, dass sich Coomassie (Brilliant Blue) ebenfalls gut für die Sichtbarmachung von Lipiden nach erfolgter Dünnschichtchromatographie eignet. Dieser Farbstoff bindet vermutlich an positiv geladene Komponenten der Hauptgruppen von zwitter-ionischen Lipiden und interagiert zudem mit aromatischen und hydrophoben Teilen dieser Lipide (Hofmann et al., 2021). Somit eignet sich dieser Farbstoff beispielsweise zum Sichtbarmachen von Phospholipiden, aber nicht für TAGs.

5.1.2 Software-Analyse

Für die genaue Auswertung der einzelnen Lipidklassen von den fünf Genotypen CantonS, OregonR, W1118, Dahomey und Foxo wurden Säulendiagramme erstellt. Diese Darstellungsweise ist allerdings nicht die beste. So würden sich Boxplots besser eignen, da sie lediglich die analysierten Werte darstellen. Säulendiagramme hingegen suggerieren, dass z.B. beim Genotypen W1118 in Abbildung 4.2 Werte von null bis 0,37 gemessen wurden. Für eine Darstellung der Werte als Boxplots werden allerdings mehr Daten benötigt. Hierfür müsste die Dünnschichtchromatographie und anschließende Software-Analyse mehrmals wiederholt werden.

In allen drei Diagrammen lassen sich gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen finden. So fällt auf, dass es in Abbildung 4.2 eine relativ deutliche Differenz zwischen den ersten und den letzten drei Genotypen gibt. Diese sind auch bei Betrachtung der dazugehörigen DC-Platte mit bloßem Auge erkennbar (s. Abb. 4.1). Diese Unterschiede lassen sich vermutlich auf Ungenauigkeiten in der Methodik zurückführen, wie z.B. unterschiedliche Volumina an Hämolymphe, die beim Sezieren gewonnen wurden. Des Weiteren fällt auf, dass der Genotyp Dahomey in allen drei Lipidklassen die stärksten Banden aufweist. Das lässt vermuten, dass der in den Proben enthaltene Anteil der entsprechenden Lipide bei diesem Genotyp höher ausfällt als bei den anderen. Das lässt sich wiederum auf Unterschiede bei der Probenvorbereitung zurückführen.

So ist es nicht auszuschließen, dass trotz gleicher Methode über alle Proben hinweg, von einigen Fliegen schlichtweg mehr Hämolymphe gewonnen wurde als von anderen. Die Vermutung, dass Dahomey einen höheren Anteil dieser Lipide enthält als die anderen Genotypen lässt sich ausschließen, weil die Unterschiede zwischen den Genotypen dafür einfach zu gering sind. Es ist hingegen wahrscheinlicher, dass die Unterschiede zwischen allen Genotypen untereinander auf die Software-gestützte Analyse und damit verbundene Fehler zurückzuführen sind. Diese wurde z.T. durch nicht klar voneinander getrennte Banden erschwert. Somit war es nicht einfach, den Auswahlbereich zur Analyse exakt über eine Bande eines Genotyps zu legen. Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass zumindest in einigen wenigen Fällen Teile einer Bande mehreren Genotypen zugeordnet wurde und entsprechend in deren Messdaten mit eingeflossen ist. Dennoch lässt sich sagen, dass die Differenzen allgemein sehr gering sind und es keine grundlegenden Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen gibt. Diese Erkenntnis ist hilfreich für folgende Experimente zur genaueren Untersuchung der Hämolymphe und der darin enthaltenen Lipidtröpfchen. Durch die vernachlässigbar kleinen Unterschiede ist es für die folgenden Experimente ausreichend lediglich einen Genotypen zu untersuchen.

5.2 Vergleich verschiedener Methoden

Das Dünnschichtchromatographie-Experiment zum Vergleich verschiedener Methoden ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Hierbei treten zahlreiche Unterschiede zwischen den Banden der verschiedenen Methoden aber zum Teil auch innerhalb dieser auf. Bevor diese beschrieben werden, ist es wichtig, den einzelnen Bandenreihen die jeweilige Lipidklasse zuzuordnen. Das kann mithilfe des Standards Cholesterol und dem Wissen darüber, wie weit die Lipide über die Platte laufen, erfolgen. Cholesterol ist ein Sterol. Folglich handelt es sich bei den Banden auf dieser Höhe (Bandenreihe 3) um Sterole. Die beiden darunter liegenden Bandenreihen zeigen Phospholipide. Das sind zum einem PCs (Bandenreihe 5) und zum anderen PEs (Bandenreihe 4). Bei den Banden oberhalb der Sterole handelt es sich um Triacylglycerine (TAGs). Ganz oben sind zudem Sterolester zu finden.

Im folgenden Abschnitt erfolgt zunächst der Vergleich der Methoden 3 bis 5. Diese stellen unterschiedliche Methodiken zur Extraktion der Hämolymphe dar. Bei den Methoden 3 und 4 sind lediglich teilweise Sterole zu erkennen. Bei der letzten Methode sind im Gegensatz dazu neben Sterolen auch Phospholipide, Sterolester und TAGs zu finden. Diese Unterschiede weisen darauf hin, dass beim Sezieren der Fliegen eine wesentlich höhere Menge an Hämolymphe gewonnen wird als durch das Anstechen bzw. Einfrieren dieser. Das erklärt wiederum, warum die Hämolymphe-LDs in der in dieser Arbeit beschriebenen Form bisher unentdeckt blieben. Schließlich kamen bei anderen Arbeiten die Anstech- und Einfrier-Methode zum Einsatz, die Sezierungsmethode hingegen nicht. Demzufolge konnten durch diese Vorgehensweisen keine TAG-haltigen Lipidtröpfchen gefunden werden.

Die Proben der ersten Methode weisen über alle Banden hinweg eine intensivere Ausprägung auf als die Proben der Methoden zur Hämolymphe-Extraktion sowie diese der Fettkörper. Das entspricht den Erwartungen, da für erstere Methode schließlich ganze Fliegen und nicht nur ein Teil dieser verwendet wurden. Somit enthielten diese Proben insgesamt einen höheren Anteil an Lipiden aus verschiedenen Organen bzw. Geweben. Anhand der Proben der Fettkörper lässt sich sagen, dass diese in erster Linie Sterolester enthalten. Zusätzlich lassen sich hier größtenteils Sterole finden. Die Banden der TAGs sind – mit Ausnahme der der letzten Probe – ziemlich schwach. Daher lässt sich sagen, dass das entnommene Hämolymphe-Volumen der letzten Methode, sowie die ganzen Fliegen eine höhere Menge an TAGs aufweisen, als die (untersuchte Menge an) Fettkörper. Das kann allerdings auch auf Unterschiede in der Probenvorbereitung zurückgeführt werden. So wurde beispielsweise beim Sezieren gezielt die Hämolymphe extrahiert, wohingegen die Fettkörper im Abdomen verblieben. Dadurch verblieben bei der Lipidextraktion womöglich lediglich ein Teil der Fettkörper und der darin enthaltenen TAGs bzw. Lipide in dem Probenvolumen, welches später auf die DC-Platte aufgetragen wurde. Gleiches gilt für die Phospholipide. Bei der letzten Probe trat vermutlich eine Verunreinigung auf, weswegen die TAG-Bande hier stärker ausgeprägt ist als die übrigen TAG-Banden.

Bei dem schwarzen Fleck, welcher bei der Einfrier-Methode zu sehen ist, handelt es sich vermutlich um eine Verunreinigung. Gleiches gilt für den schwarzen Punkt, der sich relativ mittig bei der Anstech-Methode befindet.

Neben den hier angewandten Vorgehensweisen gibt es weitere, die der Extraktion von Hämolymphe dienen. Eine Methode mit einem hohen Durchsatz wurde 2014 von MacMillan und Hughson beschrieben. Sie etablierten ein Gerät, mit welchem mithilfe eines Luftstroms und Druck Hämolymphe gewonnen werden kann. Hierbei müssen Fliegen nicht - wie es bei allen anderen hier angewandten Methoden der Fall ist - zunächst mithilfe von Kohlenstoffdioxid oder Kälte betäubt werden. Dadurch werden die durch diese Betäubung möglicherweise nachteiligen Auswirkungen auf die biochemischen Eigenschaften verhindert. Mit dieser Methode erzielten sie mit zehn Weibchen durchschnittlich 56 Nanoliter Hämolymphe (MacMillan und Hughson, 2014). Ob das im Vergleich zu den hier angewandten Methoden deutlich mehr oder weniger ist, lässt sich nur sehr schwer sagen. Das hängt damit zusammen, dass bei den hier verwendeten Methoden die jeweilige Ausbeute an Hämolymphe nicht erfasst wurde. Anhand der Experimente ist jedoch klar erkenntlich, dass mittels der Anstech- und Einfrier-Methode eine sehr viel geringere Menge an Hämolymphe im Vergleich zur Sezier-Methode gewonnen wird. Zudem wurden mittels letzterer bei der Mikroskopie je 10 µl einer Probe untersucht, wobei sich anhand der Beobachtungen sagen lässt, dass ein Großteil dieses Volumens tatsächlich der Hämolymphe entsprach. Daher wird mittels Sezier-Methode wahrscheinlich deutlich mehr Hämolymphe erhalten, als mit der von MacMillan und Hughson beschriebenen Methode. Diese ähnelt vom erhaltenen Hämolymphe-Volumen vermutlich eher der Anstech- und Einfrier-Methode. Für zukünftige Untersuchungen wäre es sicherlich nicht ganz uninteressant, diese "neue" Methode mit den hier angewandten Methoden durch Experimente eingehender zu vergleichen.

5.3 Zusammensetzung der TAGs

5.3.1 Dünnschichtchromatographie

In den Abbildungen 4.6 und 4.7 ist die gleiche DC-Platte einmal vor (4.6) und einmal nach der Massenspektrometrie (4.7) dargestellt. Wie beschrieben fallen die Banden auf der linken Plattenhälfte in ihrer Intensität insgesamt schwächer aus, als diese auf der rechten Seite. Der Grund hierfür ist, dass von den Proben auf der rechten Seite ein Volumen von jeweils 3 µl eingesetzt wurde, wohingegen lediglich je 1 µl Probenvolumen auf die linke Plattenseite pipettiert wurden. Bei der horizontalen Linie, welche sich zwischen den Bandenreihen 1 und 2 befindet, handelt es sich um die Laufmittelfront des polaren Laufmittels. Diese ist an dieser Stelle zu erkennen, weil das Laufmittel bis zu dieser Höhe gelaufen ist, bevor die Platte aus dem Laufmittel genommen wurde. Bei den verschiedenen Bandenreihen 1-4 handelt es sich um unterschiedliche Lipide. Diese sind je nach Charakter unterschiedlich weit über die Platte gelaufen. Aufgrund dessen, dass die Platte zunächst in das polare Laufmittel gesetzt wurde, befinden sich unterhalb der Laufmittelfront von diesem polare Lipide. Oberhalb der Laufmittelfront des polaren Laufmittels befinden sich Neutrallipide. In diesem Fall sind es TAGs (Bandenreihe 1). Die Unterscheidung der polaren Lipide kann mit dem Wissen über ihre Position auf der Platte zueinander getroffen werden. Dadurch lassen sich die Sterole (Bandenreihe 2) gut von den Phospholipiden (Bandenreihen 3 und 4) unterscheiden. Letztere sind in PEs (Bandenreihe 3) und PCs (Bandenreihe 4) aufgegliedert. Für die Proben der ersten Methode (M1) wurden ganze Fliegen verwendet, für diese der anderen Methoden (M2 und M5) lediglich Teile der Fliegen. Das erklärt die unterschiedlich intensiven Banden zwischen ersterer und den anderen beiden Methoden, wovon fast ausschließlich die Phospholipide betroffen sind. Schließlich sind in einer ganzen Fliege mehr Phospholipide zu finden als wenn nur der Fettkörper bzw. die Hämolymphe dieser einzeln betrachtet werden. In den Sterolen und TAGs tritt dieser Unterschied ebenfalls auf, jedoch ist er hier deutlich geringer. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Banden der Sterole und TAGs insgesamt deutlich intensiver sind als die der Phospholipide. Dadurch fallen die Unterschiede in den Sterolen und TAGs mit bloßem Auge nicht so deutlich aus, wie diese in den Phospholipiden. Zudem könnte es auf unterschiedliche Verhältnismäßigkeiten der einzelnen Lipide zwischen den Methoden hinweisen. So könnte es sein, dass sich in den ganzen Fliegen verhältnismäßig weniger Sterole und TAGs als Phospholipide befinden, verglichen mit den Fettkörpern und der Hämolymphe. Um diese Vermutung zu bestätigen, könnte z.B. erneut die Software FIJI verwendet werden, um die Intensitäten der jeweiligen Banden zu ermitteln und anschließend miteinander zu vergleichen.

Die Tatsache, dass die Banden in Abbildung 4.7 insgesamt besser zu erkennen sind als in Abbildung 4.6 hat einen einfachen Grund: Die Platte wurde nach der MS zwar mit dem gleichen Gerät wie vor der MS gescannt und aufgenommen, jedoch unter anderen Einstellungen. So wurde beim Scan nach der MS ein anderer Filter ausgewählt, der die Fluoreszenz in einem anderen Wellenlängenbereich misst. Der Wellenlängenbereich

des emittierten Lichts lag beim Scanvorgang vor der MS (Abb. 4.6) bei 515-535 nm. Nach der MS (Abb. 4.7) lag er hingegen bei 560-580 nm. Dieser Bereich eignet sich offensichtlich besser, um die Banden klarer darzustellen. Das wird auch durch Kishimoto et al. bestätigt. Sie haben gezeigt, dass die Intensität der Fluoreszenz abhängig vom Emissionsfilter ist und die intensivsten Signale bei einer Emission von 555 nm erhalten wurden (Kishimoto et al., 2001). Der Filter, welcher für den Scanvorgang nach der MS gewählt wurde, liegt näher an dieser optimalen Emissionswellenlänge. Demzufolge sind die Banden dieser Abbildung intensiver zu erkennen als die Banden der Abbildung vor der MS.

5.3.2 Massenspektrometrie

Um Analysen mittels Massenspektrometer durchzuführen muss zunächst die Wahl eines geeigneten Geräts erfolgen, da sich diese in ihrem Aufbau und ihrer Funktionsweise voneinander unterscheiden. Bei dem hier verwendeten Massenspektrometer handelt es sich um ein Quadropol-Massenspektrometer mit APCI-Technik. Neben der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck gibt es noch zahlreiche weitere Ionisationstechniken. Zu ihnen zählen u.a. die Ionisation mittels Fast Atom Bombardment (FAB), die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl.: *Matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI), die Photoionisation bei Atmosphärendruck (engl.: *atmospheric pressure photoionization*, APPI) und die Elektrospray-Ionisation (engl.: *electrospray ionization*, ESI). Alle Techniken haben Vor- und Nachteile, weswegen sie sich mehr oder weniger gut für die Analyse von Lipiden (im speziellen von TAGs) eignen. Sowohl die ESI- und MALDI-MS, als auch die Photoionisation bei Atmosphärendruck sind moderne Entwicklungen zur Untersuchung von Lipiden mittels MS. Die MALDI-MS hat neben einer hohen Empfindlichkeit weitere Vorteile. Allerdings treten bei der Untersuchung mit dieser Technik auch Nachteile auf, weswegen sie hauptsächlich bei schnellen Screens von Lipidprofilen Anwendung findet (Christie und Han, 2012). Die APPI-MS ist hingegen eine Weiterentwicklung von ESI und APCI. Sie besitzt eine geringere Nachweisgrenze sowie höhere Signalintensitäten als die APCI und ist in etwa 2-4 Mal so empfindlich wie diese (Christie und Han, 2012). Aufgrund dieser Vorteile ist die APPI besser für die Analyse von Lipiden geeignet als die hier verwendete APCI. Dementsprechend wäre es empfehlenswert, bei zukünftigen Experimenten die TAGs bzw. die verschiedenen Lipidklassen allgemein, mit einer APPI-MS zu untersuchen, vorausgesetzt, es steht ein entsprechendes Gerät zur Verfügung.

Ebenso wie es verschiedene Techniken zur Ionisation einer Probe gibt, lassen sich auch unterschiedliche Analysatoren finden. Die wohl am häufigsten verwendeten sind Quadropol-, Ion-Fallen-, Flugzeit- und Fourier-Transformations-Analysatoren. Die Vorteile des hier verwendeten Quadropol-Analysators sind geringe Kosten, eine einfache Instandhaltung, eine relativ geringe Größe und Robustheit (El-Anead, Cohen und Banoub, 2009). Er hat allerdings keine sehr gute Auflösung, sprich chemisch unterschiedliche Ionen mit dem scheinbar gleichen m/z -Wert können von diesem Analysator nicht

voneinander unterschieden werden (Amad und Houk, 1998). Die Fourier-Transformations-Analysatoren können in Ionen-Cyclotron- und Orbitrap-Analysator unterschieden werden. Zwei der größten Vorteile von ersterem sind eine sehr hohe Massengenauigkeit und ein hohes Auflösungsvermögen (Haag, 2016). Allerdings werden für diese Analysatoren große supraleitende Magneten benötigt, wodurch zum einen sehr viel Platz und zum anderen flüssiges Helium, was sehr teuer ist, benötigt wird (Haag, 2016). Das macht seine Anwendung für die hier benötigte Analyse unattraktiv. Der Orbitrap-Analysator ist deutlich kleiner und günstiger als der Ionen-Cyclotron-Analysator und weist bei höheren m/z -Werten ein besseres Auflösungsvermögen als dieser auf (Zubarev und Makarov, 2013). Somit eignet er sich im Vergleich zum anderen Fourier-Transformations-Analysator vor allem in kleineren Laboren mit einem geringeren Budget zur Analyse von Lipiden. Daher lässt sich sagen, dass neben dem verwendeten Quadropol-Analysator ein Orbitrap-Analysator wohl am besten geeignet wäre, um bei zukünftigen Analysen eingesetzt zu werden. Zusätzlich besteht eine weitere Alternative in Hybridgeräten, die mehrere gleiche oder verschiedene Analysatoren miteinander kombinieren und somit die jeweiligen Vorteile dieser vereinen. Ein Beispiel hierfür wäre die Kopplung mehrerer Quadropol-Analysatoren, wodurch eine Verringerung der Peakbreite und eine damit einhergehende höhere Auflösung (im Vergleich zu einem Einzel-Quadropol-Analysator) erreicht werden kann (Amad und Houk, 1998). Dadurch könnten die TAGs zukünftig noch genauer analysiert werden.

Durch die APCI-Technik werden Massenspektren von TAGs erzeugt, die ein protoniertes Molekül als das am häufigsten vorkommende bzw. stärkste Signal und weitere, durch eine geringere Masse und schwächere Signale gekennzeichnete Fragmente aufweisen (Christie und Han, 2012). Das stärkste Signal entspricht somit einem Molekülion. Die Fragment-Ionen entsprechen DAGs und entstehen durch den Zerfall von (instabilen) TAG-Molekülen. Diese Fragment-Ionen sind bei einem m/z -Wert von unter 700 zu finden. Daher sind in den hier dargestellten Massenspektrogrammen lediglich mehrere Molekül-Ionen von unterschiedlichen TAGs zu finden, da auf der X-Achse ein Bereich von m/z 700-900 aufgeführt ist.

Jedem Peak bzw. jeder Masse kann hierbei eine bestimmte relative Häufigkeit zugeordnet werden. Diese sagt aus, wie viele Ionen einer gewissen Masse im Vergleich zu Ionen anderer Masse innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls vom Detektor gezählt wurden. Dabei wurden Datenreihen mit absoluten Häufigkeiten erhalten. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Proben untereinander wurde sich allerdings für eine Darstellungsweise der relativen Häufigkeiten entschieden. Diese Darstellungsweise ermöglicht einen prozentualen Vergleich der einzelnen Peaks innerhalb einer Methode. Das ist allgemein verständlicher als absolute Zahlenwerte.

Bei dem Vergleich von jeweils zwei Proben einer Methode in den Abbildungen 4.8-4.10 treten mehr oder weniger starke Unterschiede auf. Diese sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass es bei der Probenvorbereitung trotz gleicher Vorgehensweise zu kleinen Unterschieden zwischen den einzelnen Proben kam. Schließlich wurden die Proben manuell und nicht automatisiert vorbereitet. Somit könnte beispielsweise bei einer Probe

eine höhere Menge an Hämolymphe extrahiert worden sein als bei einer anderen. Diese Differenzen zwischen zwei sonst gleichen Proben (gleiche Methode der Vorbereitung, gleiches Probenvolumen) fallen in den Abbildungen 4.8 und 4.10 gering aus. Bei dem Vergleich zweier Proben der Methode 2 sind hingegen sehr krasse Unterschiede zu finden. Die Datenreihe von Probe 10 verläuft hierbei so, wie es zu erwarten gewesen wäre, sprich die Peaks sind eng und klar voneinander zu trennen. Bei Probe 9 muss allerdings ein Problem aufgetreten sein. Die Datenreihe dieser Probe ist aufgrund der starken Asymmetrie vieler Peaks sehr untypisch für ein Massenspektrogramm. Warum das so ist, ist fraglich. Eine Verunreinigung der Probe ist unwahrscheinlich, da das abgebildete Massenspektrogramm eher auf einen Fehler bei der Analyse mittels Massenspektrometer hinweist. Deshalb wurde für eine genauere Auswertung der zweiten Methode Probe 10 verwendet (siehe Abb. 4.12). Bei den anderen beiden Methoden wurde sich ebenfalls für jeweils eine Probe entschieden, um eine detaillierte Auswertung durchführen zu können. Die Wahl dieser Proben erfolgte dabei willkürlich. Eine andere, theoretisch mögliche Vorgehensweise bestünde darin, die Mittelwerte (arithmetische Mittel) der relativen Häufigkeit zweier Proben einer Methode zu bilden und folglich diesen Datensatz für die detaillierte Auswertung zu verwenden. Das erwies sich allerdings als nicht praktikabel. Bei Methode 2 ist dies einfach mit dem wahrscheinlich bei der Analyse aufgetretenen Fehler zu begründen, weswegen eine Probe (Probe 9) komplett ungeeignet für weitere Auswertungen ist. Darüber hinaus stimmen die beiden Proben je einer Methode nicht in der Größe der erhaltenen Datensätze überein. So wurden beispielsweise bei der achten Probe 182 Werte für eine Masse und die dazugehörige Häufigkeit erhalten. Bei Probe 7 wurden hingegen nur Daten für 171 Werte erhalten. Dieser Unterschied ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass bei Probe 8 zum Teil Ionen bei bestimmten Massen detektiert wurden, die bei Probe 7 nicht auftraten. Somit fehlen einige bei Probe 8 detektierte Massen und die dazugehörigen Häufigkeiten bei Probe 7 vollständig. Das würde dazu führen, dass letztendlich nur wenige Datenpunkte erhalten werden würden, bei denen die ermittelten Massen zweier Proben exakt übereinstimmen. Das gilt für die Proben aller drei Methoden.

Um die Ergebnisse der MS detaillierter darzustellen, wurden die Daten je einer 3 μ l Probe jeder Methode ausgewertet. Die Wahl fiel auf diese Proben, weil sie durch das höhere Probenvolumen schlichtweg stärker ausgeprägte Banden besaßen, im Vergleich zu den 1 μ l Proben. Die entsprechenden Massenspektrogramme sind in den Abbildungen 4.11-4.13 dargestellt.

Bei der ersten Methode besitzt das am häufigsten vorkommende Ion eine Masse von 832. Weitere, sehr häufig in dieser Probe vorkommende Ionen haben eine Masse von 804, 806 und 830. Die Ionen, welche bei einer Masse von 778 und 860 zu finden sind, kommen in der Probe nur etwa halb so oft vor wie das häufigste Ion, was an ihrer relativen Häufigkeit von etwa 50 % zu erkennen ist. Zusätzlich gibt es weitere Ionen, deren rel. Häufigkeit unter 40 % liegt. Zu diesen zählen u.a. die Ionen mit einer Masse von 704 und 849.

Bei Methode 2 weisen die Peaks allgemein betrachtet eine geringere relative Häufigkeit auf, verglichen mit den anderen beiden Methoden. Daraus lässt sich schlussfolgern,

dass sich in dieser Probe insgesamt weniger Ionen von TAGs und somit auch weniger TAGs an sich befinden, deren Masse zwischen 700 und 900 liegt. Wie bei der ersten Methode ist auch hier das am häufigsten vorkommende Ion bei einer Masse von 832 zu finden. Daneben gibt es lediglich zwei weitere Ionen, die eine rel. Häufigkeit von über 50 % haben und somit recht häufig in der Probe der Fettkörper vorliegen (m/z 804 und 806).

Die Probe von Methode fünf weist im Gegensatz zu denen der anderen beiden Methoden zwei verschiedene Ionen auf, die am häufigsten vorkommen. Diese entsprechen den Basispeaks bei m/z 778 und 806. Außerdem gibt es drei weitere Ionen, deren rel. Häufigkeit teilweise weit über 60 % liegt und die daher sehr oft bzw. in großen Mengen in der Probe vorliegen. Diese sind bei einer Masse von 750, 804 und 832 zu finden.

Die Darstellungsweise mittels der relativen Häufigkeit hat neben den oben erwähnten Vorteilen allerdings auch einen Nachteil. Dieser fällt beim Vergleich der einzelnen Spektrogramme (Abb. 4.11-4.13) auf. So suggeriert die Angabe der rel. Häufigkeit beispielsweise, dass das Ion mit einer Masse von 732 häufiger in der Fettkörperprobe vorkommt als in der der ganzen Fliegen. Schließlich liegt die relative Häufigkeit dieses Ions bei Methode 2 bei über 40 %, wohingegen sie bei Methode 1 lediglich zwischen 20 und 30 % liegt. Das ist darauf zurückzuführen, dass für jede Methode einzeln der größte absolute Häufigkeitswert mit einer relativen Häufigkeit von 100 % gleichgesetzt wurde. Da sich dieser allerdings zwischen den Proben z.T. deutlich unterschied, entsteht diese Verzerrung beim Vergleich der einzelnen Spektrogramme. Daher ist es sinnvoll, die verschiedenen Proben bzw. Methoden untereinander in einem Diagramm zu vergleichen, bei dem eine relative Häufigkeit von 100 % dem größten absoluten Zahlenwert aller Proben entspricht. Eine Darstellung aller Proben in einem Diagramm ist hierfür allerdings eher ungeeignet, da dadurch die einzelnen Proben kaum visuell voneinander unterschieden werden könnten. Daher ist es praktikabler, mehrere Diagramme zu verwenden, in denen jeweils zwei Proben miteinander verglichen werden. Diese sind in den Abbildungen 4.14-4.16 zu finden.

Bei diesem Vergleich der Methoden untereinander fallen mehr oder weniger starke Unterschiede auf. Zu erwarten gewesen wäre, dass Methode 1 bei den Vergleichen bei allen gemessenen Massen die höchsten Peaks aufweist. Das ist schlichtweg damit zu begründen, dass diese Methode auf ganzen Fliegen basiert, während bei den anderen beiden lediglich jeweils ein Teil der Fliegen verwendet wurde. Demnach sollte die Probe der ersten Methode die höchste Menge an TAGs besitzen. Das ist auch größtenteils zutreffend. Gerade beim Vergleich mit der zweiten Methode gibt es im Wesentlichen lediglich ein bis zwei TAG-Ionen, welche in der Probe der Fettkörper etwas häufiger vorkommen als in der der ganzen Fliegen (z.B. bei m/z 732). Dieser Unterschied beläuft sich allerdings nur auf etwa drei bis vier Prozent. Alle anderen detektierten Ionen treten in der Probe der ersten Methode häufiger auf als in der von Methode 2. Die Peaks des Ions der Masse 704 sind bei beiden Proben nahezu gleich hoch, sprich es gibt nur einen minimalen Unterschied in der Häufigkeit des Vorkommens von diesem in beiden Proben. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass das zu diesem Ion gehörige TAG-

Molekül fast ausschließlich im Fettkörper von Fliegen vorkommt. Alle anderen Peaks fallen bei Methode 1 höher aus als bei Methode 2. Das heißt, dass die entsprechenden TAG-Moleküle in ganzen Fliegen in größerer Menge vorkommen, als in den Fettkörpern dieser.

Werden die erste und die letzte Methode, sprich die TAG-Zusammensetzung ganzer Fliegen und die der Hämolymphe miteinander verglichen, so fallen ebenfalls Unterschiede auf. Die Peaks, welche bei Methode 5 höher ausfallen, deuten daraufhin, dass es TAG-Moleküle gibt, welche in der Hämolymphe häufiger vorkommen als in ganzen Fliegen. Dies erscheint zunächst einmal widersprüchlich. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied wäre die Vorgehensweise der Probenvorbereitung. Bei der Probe von Methode 1 wurden ganze Fliegen lediglich zerdrückt, wohingegen bei der Probe der letzten Methode Fliegen seziiert wurden. Durch das Zerdrücken wurde lediglich ein Teil aller TAGs der Fliege gewonnen, da sie bei dieser Vorgehensweise größtenteils intakt blieb. Beim Sezieren wurde hingegen ein Großteil der Hämolymphe erhalten. Somit enthielt diese Probe verhältnismäßig gesehen eine größere Menge an TAGs, welche der Hämolymphe entstammen. Damit lässt sich schlussfolgern, dass u.a. die zu den Ionen einer Masse von 736, 750 und 778 gehörenden TAGs in großen Mengen in der Hämolymphe zu finden sind. Das wird auch bei dem Vergleich von Methode 2 und 5 deutlich (4.16). Hier weisen u.a. die Ionen der Massen 750 und 778 der Hämolymphe-Probe zum Teil eine sehr viel größere rel. Häufigkeit auf als die der Fettkörper-Probe. Demzufolge sind die entsprechenden TAGs in den Fettkörpern in wesentlich geringeren Mengen zu finden als in der Hämolymphe. Im Gegensatz dazu kommt das zum Peak m/z 704 gehörende TAG-Molekül nahezu gleich häufig in Fettkörpern und Hämolymphe vor. Des Weiteren gibt es zwei bis drei TAGs, die häufiger in den Fettkörpern als in der Hämolymphe zu finden sind. Deren Ionen befinden sich bei den Massen 732 sowie 858 und 860. Die zu dem Peak bei m/z 849 gehörenden TAGs kommen in den Fettkörpern und der Hämolymphe, verglichen mit den ganzen Fliegen, in vernachlässigbar geringen Mengen vor. Das führt zu der Erkenntnis, dass diese TAGs aus einem anderen Organ bzw. Gewebe der Fliege stammen müssen. Gleiches gilt für die Ionen der Massen 858 und 860. Diese weisen ebenfalls hohe rel. Häufigkeiten auf, die nicht allein auf die vorkommenden Mengen dieser TAGs in den Fettkörpern und der Hämolymphe zurückzuführen sind. Auch hier stammen die detektierten TAG-Moleküle zumindest zu einem gewissen Teil aus weiteren Organen bzw. Geweben.

Anhand der bei der MS erhaltenen Werte der Molekül- bzw. Ionenmasse können keine genauen Aussagen über die exakte Struktur der dazugehörigen TAGs getroffen werden. Das hängt u.a. mit der Komplexität dieser zusammen. Schließlich unterscheiden sich TAGs in ihrer Gesamt-Kohlenstoff-Anzahl (engl.: *carbon number*, CN), in ihrem Ungesättigtheitsgrad und in der chemischen Zusammensetzung ihrer Alkylgruppen sowie deren Position am Glycerin-Rückgrat (Waktola et al., 2020). Aufgrund dieser komplexen Struktur ist es unmöglich mittels einer eindimensionalen Flüssigchromatographie (engl.: *liquid chromatography*, LC), wie der hier durchgeführten Dünnschichtchromatographie, gekoppelt mit einer MS die exakte Zusammensetzung der jeweiligen TAGs aufzuklären.

Daher ist es sinnvoll einen Blick auf andere, besser geeignete Methoden zu werfen. Eine andere, recht simple Chromatographiemethode ist die Gaschromatographie (GC). Zu den Vorteilen dieser Methode zählen eine hohe Trennschärfe (Waktola et al., 2020), die Möglichkeit verschiedene Säulen mit unterschiedlichen Eigenschaften zu wählen und eine minimale thermische sowie katalytische Zerstörung von empfindlichen Probenkomponenten (Al-Bukhaiti et al., 2017). Eine spezielle Form der GC ist die Hochtemperatur-Gaschromatographie (engl.: *high-temperature gas chromatography*, HTGC). Hierbei erfolgt die Auftrennung der Komponenten eines Gemischs bei Temperaturen von über 300 °C. In einem Bericht von Ruiz-Samblás et al. wird die Analyse von TAGs durch HTGC über einen Zeitraum von 10 Jahren bis zum Jahr 2015 zusammengefasst. Demnach ist die HTGC der Flüssigchromatographie bei der Analyse von TAGs vorzuziehen. Das begründen sie mit Fortschritten in der Chromatographie-Technik und kommen zu dem Schluss, dass es sich bei der HTGC um eine einfache, zuverlässige und zufriedenstellende Methode handelt (Ruiz-Samblás, González-Casado und Cuadros-Rodríguez, 2015). Trotz einiger Vorteile der HTGC gegenüber der DC ist auch diese Methode allein nicht optimal geeignet um TAGs strukturell komplett zu erfassen. Eine bessere Idee ist daher mehrdimensionale anstelle von eindimensionalen Techniken zu verwenden. Diese sind dadurch definiert, dass jede Dimension eine eigenständige Analyse ist, sprich die angewandten Methoden bzw. Techniken auch unabhängig voneinander durchgeführt werden könnten (Waktola et al., 2020). Ein einfaches Beispiel hierfür wäre die Kombination von Flüssig- und Gaschromatographie (LC-GC) mit anschließender MS, wobei die Vorteile beider Chromatographie-Techniken ausgenutzt werden. Dafür werden die einzelnen chemischen Komponenten einer Probe zunächst mittels LC aufgetrennt und anschließend durch eine GC z.B. nach ihrer Größe oder ihrem Siedepunkt voneinander getrennt. Aufgrund der komplementären Eigenschaften beider Dimensionen hat diese Methode ein hohes Auflösungsvermögen und zeigt detaillierte Analysen der gewünschten Komponenten (Janssen und Koning, 2004).

5.4 Funktion der Hämolymp-Lipidtröpfchen

5.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die durchgeführte Dünnschichtchromatographie offenbart einige Unterschiede zwischen den Kontrollen und den hungernden Fliegen. Bei den Kontrollen sind, wie zu erwarten gewesen, über alle Proben hinweg in allen Bandenreihen mehr oder weniger intensive Banden ersichtlich. Diese Ergebnisse stimmen auch mit vorherigen Untersuchungen überein. Die Proben der hungernden Fliegen weisen hingegen insgesamt weniger Banden auf. Das ist schlichtweg damit zu begründen, dass diesen Fliegen für einen bzw. vier Tage die Nahrung entzogen wurde. Folglich mussten sie für diese Dauer ihre Energie aus Fettreserven beziehen. Je nachdem, ob dies für einen oder sogar für vier Tage nötig war, schrumpften die Fettreserven entsprechend stark. Daher sind beispielsweise bei den PEs (Bandenreihe 4) bei den Proben der eintägig hungernden Fliegen noch

(schwache) Banden zu sehen. Bei den viertägig hungernden Fliegen sind an dieser Stelle keinerlei Banden mehr zu erkennen. Da es sich hierbei jedoch um Phospholipide handelt, ist dies lediglich ein indirekter Nachweis für das Schrumpfen der Fettreserven. Aufgrund dessen, dass z.B. die Hämolymphe-LDs von einer Membran umgeben sind, erscheint es logisch, dass beim Schrumpfen bzw. Verlust dieser Strukturen ebenso die Menge an Membranlipiden stark verringert wird. Schließlich besitzen die Lipidtröpfchen in Folge der ausbleibenden Nahrung eine geringere Oberfläche als bei Zugang zu Nahrung. Ein direkter Nachweis dafür, dass die Fettreserven bei Nahrungsentzug schrumpften, sind die fehlenden TAG-Banden (Bandenreihe 1) in den Proben der hungernden Fliegen. An dieser Stelle sind bei den dazugehörigen Kontrollen deutlich Banden zu sehen. Daher können mögliche andere Gründe für das Fehlen der Banden, wie beispielsweise das Auftragen eines zu geringen Probenvolumens oder das unzureichende Besprühen mit Primulin, ausgeschlossen werden. Somit lässt sich klar sagen, dass die Menge an TAGs bei Nahrungsentzug stark zurückgeht. Dieser Rückgang an Speicherlipiden ist in allen angewandten Methoden zu finden. Das muss allerdings nicht zwingend auf ein vollständiges Verschwinden der TAGs hinweisen. Es könnten nach Nahrungsentzug lediglich eine stark verringerte Menge dieser Lipide vorliegen, die unterhalb der Nachweisgrenze der DC bzw. von Primulin liegt. Die weiter unten diskutierten Mikroskopieaufnahmen aus 4.4.2 liefern zumindest bezüglich Methode 5 weitere Erkenntnisse darüber.

Die einzige Ausnahme bzgl. des Rückgangs der TAGs ist hierbei Methode 2. Bei dieser sind die TAGs bei der Probe der eintägig hungernden Fliegen im Vergleich zur Kontrolle nicht zurückgegangen, sprich die Banden der hungernden Fliegen und der Kontrolle weisen in ihren Intensitäten keine Unterschiede auf. Als Ursache dafür könnte eine Verunreinigung der Probe in Betracht kommen. Diese könnte bei der Probenvorbereitung aufgetreten sein. Es ist jedoch auch möglich, dass beim Entzug der Nahrung zunächst die in der Hämolymphe befindlichen Speicherlipide (Lipidtröpfchen) als Energiereserven aufgebraucht werden, bevor auf die in den Fettkörpern enthaltenen TAGs zurückgegriffen wird. Das ist wohl eher zutreffend als eine Verunreinigung. Zu begründen ist dies damit, dass zum einen möglichst sauber und ordentlich gearbeitet wurde, weswegen eine Verunreinigung in so hohem Maße (gleiche Intensität wie die Bande der Kontrolle) eher auszuschließen ist. Zum anderen ist es für den Organismus einfacher und energetisch sinnvoller bereits bestehende mobile Energiereserven (in Form der Hämolymphe-LDs) zu den Zellen mit Bedarf zu transportieren anstatt zunächst Reserven aus den Fettkörpern mobilisieren zu müssen. Diese Erkenntnisse bestätigen den anfänglichen Verdacht, dass die Lipidtröpfchen der Hämolymphe eine Speicherfunktion erfüllen.

Die Banden der Bandenreihe 2 sind aufgrund ihrer Position auf der Platte möglicherweise Diacylglycerine (DAGs). Diese besitzen im Gegensatz zu TAGs nur zwei anstatt drei Fettsäuren. Dennoch lässt sich diese Vermutung nicht bestätigen. Dafür müsste beispielsweise ein entsprechender Standard, sprich ein DAG, auf die Platte aufgetragen werden. Trotz dieser Ungewissheit ist es gut möglich, dass es sich tatsächlich um DAGs handelt. Diese stellen ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Bildung von TAGs dar. Aufgrund dessen, dass TAGs in erheblichen Mengen in den Proben der wohlge-

nährten Fliegen vorkommen, ist es auch durchaus möglich, dass diese zusätzlich diese Vorstufe in Form von DAGs enthalten.

Bei den Banden der Bandenreihe 3 handelt es sich um Sterole. Die Intensität dieser Banden scheint bei allen Proben gleich stark zu sein. Das bedeutet, dass die Sterole nicht durch den Entzug der Nahrung beeinflusst werden. Das erscheint wiederum einleuchtend. Schließlich handelt es sich bei ihnen um Lipide, die für die Zellmembran benötigt werden und somit strukturgebend sind und keine Speicherfunktion erfüllen.

5.4.2 Mikroskopie

Bei Betrachtung der Mikroskopieaufnahmen in den Abbildungen 4.18, 4.19 und 4.20 sind einige Unterschiede zu erkennen - sowohl zwischen den einzelnen Aufnahmen innerhalb einer Abbildung als auch zwischen den verschiedenen Abbildungen. Die Variationen in Größe, Form und Helligkeit der Strukturen in den verschiedenen Einzelaufnahmen sind auf die unterschiedlichen Färbungen zurückzuführen, die jeweils auf einem Bild zu sehen sind. So zeigt die jeweils erste Einzelaufnahme (A) Neutrallipide, da diese durch den Farbstoff BODIPY grün gefärbt werden. DAPI (B) hingegen lagert sich vorzugsweise an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an. Nach Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert dieser Farbstoff am kurzwelligen Ende des sichtbaren Spektrums. Dadurch erscheinen mit DAPI gefärbte Nukleinsäuren blau. Nilrot kann u.a. neutrale Lipide und Phospholipide färben. Bei der Färbung von Neutrallipiden erscheinen diese gelb. Phospholipide werden hingegen rot gefärbt. Die Färbungen der Lipide bzw. DNA werden erst in den Überlagerungen der Einzelbilder ersichtlich, da die Kamera des Mikroskops lediglich schwarz-weiß Bilder aufnimmt. Durch die Zuordnung jedes Einzelbildes zu einer der drei Farben mittels Software entstanden die farbigen Überlagerungen. Durch diese Überlagerung mehrerer Farben sind einigen Strukturen in der jeweiligen letzten Aufnahme nicht eindeutig die Lipidklassen zuordenbar. Daher ist es wichtig, auch die Einzelaufnahmen der unterschiedlichen Farbkanäle darzustellen.

Anhand des Wissens über die Farbstoffe lassen sich die Strukturen in den jeweiligen Einzelaufnahmen und Zusammenlagerungen einordnen. In Abbildung 4.18 sind in der BODIPY-Aufnahme (A) sowie in der Überlagerung der Einzelaufnahmen (D) zahlreiche Lipide in der Hämolymphe zu sehen, welche sich zu Tröpfchen organisieren. Die unterschiedlichen Größen dieser resultieren daraus, dass der Lipidgehalt zwischen den einzelnen Lipidtröpfchen variiert. Folglich enthalten größere Tröpfchen eine höhere Menge an Lipiden als kleinere. Bei diesen Lipiden handelt es sich um TAGs. Das lässt sich daraus schließen, dass BODIPY Neutrallipide wie TAGs färbt und auf der DC-Platte TAGs als einzige Neutrallipide erschienen. Neben den TAGs lassen sich in der Kontrolle weitere Lipide finden. Diese erscheinen in der Nilrot-Färbung als weiße Punkte. In der Ansammlung, welche in der Überlagerung zu sehen ist, erscheinen sie gelb.

In den Aufnahmen der Fliegen nach eintägigem Nahrungsentzug (4.19) zeigt sich ein ähnliches Bild wie in den Aufnahmen der Kontrolle. Hier sind ebenfalls einige unterschiedlich große Lipidtröpfchen in der BODIPY-Aufnahme und der Zusammenlagerung

zu erkennen. Diese sind allerdings allgemein etwas kleiner als die der Kontrolle und auch in geringerer Anzahl vertreten. Die Ursache hierfür ist, dass die hungernden Fliegen die mobilen Hämolymp-*LDs* als Energiequelle nutzen. Dadurch, dass sie allerdings erst für einen Tag hungerten, ist noch kein großer Unterschied zu der Kontrolle zu sehen. Die geringere Anzahl an *LDs* könnte bei diesen hungernden Fliegen auch schlichtweg damit begründet werden, dass die Abbildung lediglich einen etwa 150 mal 200 μm großen Bereich der Probe zeigt. Trotz dessen, dass versucht wurde, einen Bereich zu wählen, der stellvertretend für die gesamte Probe verwendet werden kann, ist es nicht komplett auszuschließen, dass womöglich ein ungünstiger Bereich gewählt wurde. Das dürfte allerdings keine sehr großen Auswirkungen auf eine folgerichtige Auswertung haben.

Die Ansammlung in der Bildmitte hat in allen Einzelaufnahmen eine intensive Helligkeit. Das führt dazu, dass sie in der Überlagerung ebenfalls größtenteils als heller, weißer Fleck erscheint. Dadurch ist es nicht eindeutig möglich zu sagen, welche Lipidklasse in dieser Ansammlung dominiert. Es handelt sich aber vermutlich um eine Mischung aus Phospholipiden und TAGs, welche sich (zumindest teilweise) innerhalb von Zellen befinden.

Die Einzelaufnahmen der Fliegen, welche für vier Tage keine Nahrung enthielten, unterscheiden sich mehr voneinander als es bei den Einzelaufnahmen der vorherigen beiden Abbildungen der Fall ist. Dennoch lassen sich auch hier in der BODIPY-Färbung zahlreiche TAG-haltige Lipidtröpfchen finden. Diese sind aufgrund ihrer grünen Farbe in Aufnahme D als TAG-haltige *LDs* identifizierbar. Sie weisen allerdings mit etwa 1-2 μm eine sehr geringe Größe auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sie dem Organismus zur Speicherung überschüssiger Energie dienen. Daher werden sie in Zeiten von erhöhtem Bedarf bzw. Nahrungsentzug als Energiequelle aufgebraucht. Neben diesen Energiespeichern sind in der Überlagerung D zudem einige Phospholipide erkennbar. Diese wurden mit Nilrot rot angefärbt und sind daher ebenfalls in Einzelaufnahme C zu finden, wo sie jedoch in weißer Farbe erscheinen. In Einzelaufnahme B sind ein paar Zellen zu erkennen. Diese sind fast ausschließlich etwas links von der Bildmitte angeordnet. Durch ihr blaues Erscheinungsbild in der Überlagerung sind sie eindeutig als Zellen einzuordnen.

Die Schwierigkeit bei den mikroskopischen Abbildungen lag in erster Linie darin, gut belichtete Aufnahmen zu machen. Bei dem Wechsel von einem Kanal zum nächsten musste teilweise zunächst die Belichtungszeit angepasst werden. Dadurch wurde die Probe allerdings an dieser Stelle mitunter für einige wenige Sekunden mit Licht einer dem Kanal entsprechenden Wellenlänge ausgesetzt. Mit andauernder Belichtungszeit verblasst allerdings der Farbstoff zunehmend stärker. Das führte dazu, dass einige Aufnahmen stärker belichtet sind als andere.

6 Ausblick

Um die verschiedenen Lipidklassen zu quantifizieren, wurden die auf der DC-Platte aufgetrennten Lipide mit der Software FIJI untersucht. Diese Vorgehensweise ist durchaus sehr zeitintensiv und anfällig für (menschliche) Fehler. Daher wäre es sinnvoll stattdessen enzymatische Methoden für die Quantifizierung der Lipide einzusetzen. Dafür können kommerziell erhältliche Kits, wie z.B. das Lipid Quantification Kit der Firma Cell Biolabs verwendet werden. Das ist im Vergleich zur Software-gestützten Quantifizierung deutlich zeitsparender. Außerdem weisen enzymatische Methoden für gewöhnlich eine höhere Empfindlichkeit auf und sind sehr spezifisch für die unterschiedlichen Lipide (Warnick, 1986).

Für das Sichtbarmachen der aufgetrennten Lipide auf den DC-Platten wurde die Sprühreagenz Primulin verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet nicht-kovalent an den Fettsäurerest von Lipiden (Engel und Schiller, 2021). Aufgrund dessen, dass die Effizienz von Primulin durch die Struktur der Lipide beeinflusst wird, könnten bei zukünftigen Experimenten andere Farbstoffe zum Einsatz kommen. Geeignet wären beispielsweise Rhodamin 6G oder womöglich auch Coomassie Brilliant Blue. Dabei könnten mehrere DC-Experimente, analog zu den in dieser Arbeit beschriebenen, durchgeführt und anschließend mit den verschiedenen Farbstoffen eingefärbt werden. Die unterschiedlich gefärbten (TAG-) Banden könnten dann bezüglich ihrer Intensität analysiert werden. Dadurch wäre ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Farbstoffe möglich und es könnte eine Aussage getroffen werden, welcher am besten geeignet ist.

Für die Darstellung der analysierten Werte der einzelnen Lipidklassen von den fünf Genotypen CantonS, OregonR, W1118, Dahomey und Foxo sollten besser Boxplots anstatt Säulendiagramme verwendet werden. Diese eignen sich besser, um die erhaltenen Daten darzustellen. Das hängt damit zusammen, dass sie die tatsächlichen Daten widerspiegeln. Die Säulendiagramme sorgen wie weiter oben beschrieben hingegen für eine verzerrte Darstellung. Um Boxplots zu erstellen würde allerdings ein wesentlich größerer Datensatz benötigt werden. Daher wäre es nötig, die Experimente der Dünnschichtchromatographie mehrmals zu wiederholen und die Daten entsprechend auszuwerten.

Die exakte Zusammensetzung der TAGs konnte aufgrund der Komplexität dieser nicht mittels der in dieser Arbeit angewandten Methoden (DC und MS) aufgeklärt werden. Demzufolge wäre es für zukünftige Experimente sinnvoll, fortschrittlichere Techniken wie beispielsweise eine Kombination von Flüssig- und Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie zu nutzen. Damit könnten mehr Informationen über die untersuchten TAGs erhalten werden. Das könnte wiederum dabei hilfreich sein, die Unterschiede in der TAG-Zusammensetzung zwischen ganzen Fliegen, Fettkörpern und

der Hämolymphe zu erklären.

Zudem wäre es interessant die Hämolymphe-LDs bei weiterführenden Experimenten mit den vorrangig in Fettkörpern vorkommenden, intrazellulären Lipidtröpfchen sowie mit dem Transportprotein (Lipophorin) zu vergleichen. So soll beispielsweise bei einem weiteren Experiment geklärt werden, ob die Lipidtröpfchen von einer einfachen oder einer doppelten Phospholipidmembran umgeben sind. Dafür werden zwei verschiedene Linien von *Drosophila* miteinander gekreuzt. Diese Linien werden als G31 und T120 bezeichnet. Um den Membrancharakter aufzuklären, kommt das GAL4/UAS-System zum Einsatz. Dieses basiert auf einem bestimmten, für das Wachstum auf Galaktose benötigten Gen, welches in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu finden ist. Dieses wird als *GAL4* bezeichnet und erfüllt eine regulatorische Funktion: Es wirkt als Transkriptionsfaktor, da es die Transkription seiner Zielgene aktiviert indem es Coaktivatoren über seine transaktivierende Domäne zum Promotor lockt. Dabei bindet GAL4 an eine sogenannte UAS (engl.: *upstream activating sequence*) -Region (Traven, Jelacic und Sopta, 2006). Das GAL4/UAS-System wurde 1993 erstmals genutzt, um gezielt Gene in *Drosophila* zu exprimieren (Brand und Perrimon, 1993). Durch eine gezielte Genexpression kann beispielsweise die Funktion eines Gens während der Entwicklung des Organismus untersucht werden. In unserem Fall dient das GAL4/UAS-System dazu, den Membrancharakter der in der Hämolymphe befindlichen LDs aufzuklären. Aufgrund dessen, dass dieses System nicht natürlicherweise in *D. melanogaster* zu finden ist, müssen zwei Linien mit jeweils einem Teil des Systems miteinander gekreuzt werden. Die erste Linie (G31) kann mit Hilfe des Lipophorin-Promotors GAL4 produzieren. Dieser Promotor ist zellspezifisch und ist lediglich in Fettkörperzellen zu finden. Die zweite Linie (T120) dient als Reporter. Sie besitzt eine bestimmte UAS, die GAL4 erkennt. GAL4 stellt hierbei den Promotor für die Expression von GFP dar. Das GFP kann nun bei einem doppelschichtigen Membrancharakter der Lipidtröpfchen in diese als Transmembrananker eingebaut werden. Somit können bei den Nachkommen der Kreuzung dieser beiden Linien die Membranen der LDs genauer untersucht werden.

7 Zusammenfassung

Nachdem bereits geklärt war, dass die in der Hämolymphe von *D. melanogaster* befindlichen Lipidtröpfchen aus TAGs, Sterolen und Phospholipiden zusammengesetzt sind, wurden sie in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Das erste Ziel bestand darin die verschiedenen Genotypen auf Unterschiede in der Zusammensetzung ihrer Hämolymphe-Lipidtröpfchen zu untersuchen. Hierfür wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt und die Intensitäten der einzelnen Banden der verschiedenen Genotypen mittels Software analysiert. Dabei traten gewisse Unterschiede auf, sowohl zwischen den einzelnen Lipidklassen, als auch zwischen den Genotypen. Diese sind jedoch sehr gering, weswegen sich allgemein sagen lässt, dass sich die Genotypen nicht wesentlich bezüglich der Zusammensetzung ihrer Hämolymphe-LDs voneinander unterscheiden. Durch diese Erkenntnis kamen bei weiteren Experimenten lediglich maximal zwei verschiedene Genotypen zum Einsatz.

Als nächstes erfolgte eine Untersuchung mittels fünf verschiedenen Methoden. Dadurch konnte geklärt werden, warum die Hämolymphe-LDs noch nicht zuvor von anderen Forschungsgruppen beobachtet wurden. Der Grund dafür ist, dass bei bisherigen Methoden eine sehr geringe Menge an Hämolymphe gewonnen wurde, wohingegen durch das Sezieren der Fliegen eine erheblich größere Menge dieser erhalten wird. Mithilfe dieses Wissens wurde lediglich diese Methode bei weiteren Untersuchungen, die sich mit der Zusammensetzung und Funktion dieser Lipidtröpfchen auseinandersetzten, eingesetzt. Durch massenspektrometrische Analysen konnte die Zusammensetzung der TAGs der Hämolymphe-LDs sowie die der Fettkörper und der ganzen Fliegen genauer aufgeschlüsselt werden. Dabei traten zwischen den unterschiedlichen Methoden gewisse Differenzen bezüglich Art und Häufigkeit verschiedener TAGs auf. Anhand dieses Vergleichs lässt sich schlussfolgern, dass die TAG-haltigen Hämolymphe-LDs tatsächlich Hämolymphe-spezifische Strukturen sind und nicht aus den Fettkörpern stammen. Das warf weitere Fragen auf, z.B. nach der Funktion dieser LDs. Mit einem weiteren Experiment, bei dem Fliegen für einen bzw. vier Tage die Nahrung entzogen wurde, konnte diese Frage geklärt werden. Demnach erfüllen sie eine Speicherfunktion, was aufgrund ihres hohen TAG-Gehalts bereits vermutet und anhand einer Analyse mittels Dünnschichtchromatographie und von Mikroskopieaufnahmen bestätigt wurde. Durch ihr Vorkommen in der Hämolymphe können sie in Zeiten mangelnder Nahrung bzw. erhöhtem Energieverbrauch zügig mobil gemacht und verwertet werden.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Ziele dieser Arbeit erreicht wurden. Dennoch sollten zukünftig weitere Experimente durchgeführt werden, um die Struktur der Hämolymphe-LDs weiter aufzuklären. Dadurch könnten mehr Informationen erlangt werden – auch darüber, inwiefern sich die Hämolymphe-LDs mit intrazellulären LDs der Fettkörper und anderer Organe gleichen.

Anhang

Tabelle 7.1: Datensatz Probe 7

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
700,6	1,6E+05	2,62%
701,9	5,3E+05	8,69%
704,0	2,0E+06	32,79%
704,9	1,6E+06	26,23%
706,0	5,6E+05	9,18%
707,2	6,3E+05	10,33%
708,0	1,1E+06	18,03%
708,8	9,6E+05	15,74%
710,0	1,3E+06	21,31%
711,0	7,2E+05	11,80%
712,0	3,4E+05	5,57%
713,1	3,9E+05	6,39%
713,9	1,5E+05	2,46%
714,9	1,6E+05	2,62%
718,1	7,4E+05	12,13%
719,8	1,6E+05	2,62%
721,9	6,1E+05	10,00%
722,8	3,1E+05	5,08%
724,0	8,7E+05	14,26%
725,0	5,1E+05	8,36%
725,8	2,4E+05	3,93%
726,7	3,5E+05	5,74%
728,0	1,6E+05	2,62%
729,8	5,5E+05	9,02%
730,9	4,2E+05	6,89%
731,9	1,5E+06	24,59%
733,0	7,1E+05	11,64%
733,9	5,9E+05	9,67%
734,8	4,5E+05	7,38%
735,9	3,7E+06	60,66%
736,9	1,3E+06	21,31%
738,1	1,8E+06	29,51%
739,0	9,3E+05	15,25%
740,1	6,9E+05	11,31%
740,9	5,6E+05	9,18%
741,9	1,5E+05	2,46%
746,3	1,6E+05	2,62%
747,2	3,6E+05	5,90%
748,0	6,3E+05	10,33%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
749,0	4,7E+05	7,70%
750,0	2,1E+06	34,43%
751,2	1,2E+06	19,67%
751,9	3,8E+05	6,23%
752,9	1,9E+05	3,11%
753,7	1,5E+05	2,46%
754,8	1,2E+05	1,97%
755,4	2,3E+05	3,77%
755,9	1,5E+05	2,46%
756,8	1,9E+05	3,11%
757,8	5,3E+05	8,69%
759,0	2,7E+05	4,43%
759,8	2,8E+05	4,59%
761,0	3,0E+05	4,92%
761,9	1,0E+06	16,39%
762,9	3,6E+05	5,90%
764,0	1,1E+06	18,03%
765,0	8,1E+05	13,28%
765,7	4,6E+05	7,54%
767,1	1,2E+06	19,67%
768,1	3,4E+05	5,57%
769,0	9,2E+04	1,51%
770,3	1,6E+05	2,62%
771,2	2,3E+05	3,77%
772,1	6,2E+04	1,02%
773,0	4,3E+04	0,70%
774,0	9,7E+04	1,59%
775,1	7,5E+05	12,30%
776,0	1,7E+06	27,87%
777,1	1,5E+06	24,59%
778,0	4,2E+06	68,85%
779,1	2,6E+06	42,62%
780,0	1,2E+06	19,67%
781,4	5,8E+04	0,95%
782,0	9,1E+04	1,49%
783,9	3,9E+05	6,39%
785,2	2,1E+05	3,44%
786,2	1,1E+05	1,80%
789,0	1,9E+05	3,11%
790,2	1,5E+05	2,46%
792,1	4,6E+05	7,54%
793,1	6,5E+05	10,66%
794,1	6,5E+05	10,66%
795,1	1,2E+06	19,67%
795,8	4,7E+05	7,70%
797,2	4,7E+05	7,70%
799,2	2,0E+05	3,28%
800,3	7,3E+04	1,20%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
801,8	1,1E+06	18,03%
803,1	1,0E+06	16,39%
804,2	4,2E+06	68,85%
805,0	2,0E+06	32,79%
806,1	5,4E+06	88,52%
807,1	2,8E+06	45,90%
808,1	1,1E+06	18,03%
808,6	7,1E+05	11,64%
810,0	6,1E+05	10,00%
811,2	3,7E+05	6,07%
811,8	8,5E+04	1,39%
813,1	3,1E+05	5,08%
813,9	1,9E+05	3,11%
815,7	2,5E+05	4,10%
817,1	1,0E+05	1,64%
818,0	5,1E+05	8,36%
818,9	5,5E+05	9,02%
819,8	4,1E+05	6,72%
821,0	7,3E+05	11,97%
822,2	2,3E+05	3,77%
823,2	1,6E+06	26,23%
824,3	5,7E+05	9,34%
825,2	3,0E+05	4,92%
827,7	8,0E+04	1,31%
828,2	1,3E+05	2,13%
829,1	5,5E+05	9,02%
830,1	1,9E+06	31,15%
831,2	2,4E+06	39,34%
832,1	6,1E+06	100,00%
833,1	3,8E+06	62,30%
834,2	1,8E+06	29,51%
836,1	5,4E+05	8,85%
837,4	1,1E+05	1,80%
838,1	5,2E+05	8,52%
839,3	2,7E+05	4,43%
840,1	4,7E+04	0,77%
841,3	3,0E+05	4,92%
841,7	2,1E+05	3,44%
842,4	6,6E+04	1,08%
844,3	7,0E+04	1,15%
845,2	1,3E+05	2,13%
845,9	1,3E+05	2,13%
847,4	3,3E+05	5,41%
848,2	2,2E+05	3,61%
849,2	9,2E+05	15,08%
850,2	1,3E+06	21,31%
851,1	6,6E+05	10,82%
852,0	3,0E+05	4,92%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
854,2	1,2E+05	1,97%
855,0	1,3E+05	2,13%
856,1	1,0E+06	16,39%
857,2	4,9E+05	8,03%
858,2	1,5E+06	24,59%
859,0	1,5E+06	24,59%
860,2	1,3E+06	21,31%
861,1	1,7E+06	27,87%
862,1	3,8E+05	6,23%
863,1	9,1E+04	1,49%
864,1	3,6E+05	5,90%
865,0	8,4E+05	13,77%
866,1	4,6E+05	7,54%
867,3	1,4E+05	2,30%
872,0	1,5E+05	2,46%
873,8	2,7E+05	4,43%
874,3	1,3E+05	2,13%
875,4	4,8E+05	7,87%
876,3	2,6E+05	4,26%
877,2	4,4E+05	7,21%
878,8	1,7E+05	2,79%
880,4	2,1E+05	3,44%
881,5	9,7E+04	1,59%
882,0	1,6E+05	2,62%
884,0	1,8E+05	2,95%
885,2	4,3E+04	0,70%
886,5	2,3E+05	3,77%
888,2	6,3E+05	10,33%
889,4	4,2E+05	6,89%
890,3	1,6E+05	2,62%
891,7	4,3E+05	7,05%
893,2	4,0E+05	6,56%
894,1	7,1E+04	1,16%
896,3	3,4E+05	5,57%
900,0	1,0E+05	1,64%
902,2	4,3E+04	0,70%

Tabelle 7.2: Datensatz Probe 8

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
700,8	2,4E+05	3,93%
701,9	1,1E+05	1,80%
703,9	1,8E+06	29,51%
704,9	4,4E+05	7,21%
706,0	5,1E+05	8,36%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
707,0	2,7E+05	4,43%
708,0	3,3E+05	5,41%
709,2	4,7E+05	7,70%
709,9	5,1E+05	8,36%
711,0	1,2E+06	19,67%
712,2	4,2E+05	6,89%
713,0	2,8E+05	4,59%
713,8	7,5E+04	1,23%
714,9	2,6E+05	4,26%
715,8	2,6E+05	4,26%
717,2	5,6E+04	0,92%
718,0	3,2E+05	5,25%
719,9	5,3E+05	8,69%
721,0	1,4E+05	2,30%
721,9	4,5E+05	7,38%
722,8	3,9E+05	6,39%
723,8	2,1E+05	3,44%
724,3	2,0E+05	3,28%
724,9	3,5E+05	5,74%
725,9	3,9E+05	6,39%
727,8	4,1E+05	6,72%
729,1	8,8E+04	1,44%
729,9	6,4E+05	10,49%
731,0	3,4E+05	5,57%
731,9	1,5E+06	24,59%
732,8	3,6E+05	5,90%
734,0	6,1E+05	10,00%
735,0	4,9E+05	8,03%
736,0	1,1E+06	18,03%
736,9	6,4E+05	10,49%
738,0	1,0E+06	16,39%
739,0	7,6E+05	12,46%
740,1	4,0E+05	6,56%
740,9	1,9E+05	3,11%
742,0	4,3E+04	0,70%
743,8	4,7E+04	0,77%
745,4	1,3E+05	2,13%
746,3	1,2E+05	1,97%
747,1	1,8E+05	2,95%
748,0	6,3E+05	10,33%
750,0	1,4E+06	22,95%
751,1	7,3E+05	11,97%
752,0	2,9E+05	4,75%
753,3	2,1E+05	3,44%
754,8	9,5E+04	1,56%
755,7	6,9E+04	1,13%
756,3	3,4E+05	5,57%
757,1	3,1E+05	5,08%
758,0	1,4E+05	2,30%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
759,4	1,8E+05	2,95%
759,9	1,7E+05	2,79%
761,0	2,5E+05	4,10%
762,0	3,7E+05	6,07%
762,9	2,6E+05	4,26%
763,9	7,6E+05	12,46%
765,1	1,4E+06	22,95%
766,0	4,1E+05	6,72%
766,8	5,8E+05	9,51%
768,0	3,7E+05	6,07%
768,8	2,3E+05	3,77%
769,3	3,3E+05	5,41%
772,1	1,9E+05	3,11%
772,9	7,9E+04	1,30%
773,9	2,5E+05	4,10%
775,9	8,9E+05	14,59%
777,1	7,8E+05	12,79%
778,0	3,0E+06	49,18%
779,0	1,5E+06	24,59%
780,3	2,7E+05	4,43%
781,1	5,0E+05	8,20%
781,9	4,1E+05	6,72%
784,0	1,3E+05	2,13%
785,1	1,7E+05	2,79%
786,0	2,8E+05	4,59%
787,3	1,5E+05	2,46%
788,0	1,4E+05	2,30%
789,9	4,3E+05	7,05%
791,1	1,6E+05	2,62%
792,5	3,1E+05	5,08%
793,2	2,8E+05	4,59%
794,0	1,4E+05	2,30%
795,1	1,4E+06	22,95%
796,1	8,1E+05	13,28%
797,3	8,1E+04	1,33%
800,0	1,5E+05	2,46%
800,7	2,6E+05	4,26%
802,1	1,6E+06	26,23%
804,0	4,5E+06	73,77%
805,1	1,9E+06	31,15%
806,1	5,6E+06	91,80%
807,1	3,0E+06	49,18%
808,6	3,5E+05	5,74%
810,0	3,5E+05	5,74%
811,0	1,5E+05	2,46%
811,9	2,0E+05	3,28%
813,2	1,6E+05	2,62%
813,9	3,5E+05	5,74%
814,5	9,2E+04	1,51%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
815,5	1,1E+05	1,80%
816,3	2,2E+05	3,61%
817,1	3,1E+05	5,08%
818,1	2,1E+05	3,44%
819,3	2,3E+05	3,77%
820,2	3,4E+05	5,57%
821,0	9,6E+05	15,74%
822,1	5,8E+05	9,51%
823,1	1,3E+06	21,31%
824,2	3,4E+05	5,57%
825,2	2,2E+05	3,61%
826,0	1,2E+05	1,97%
828,0	6,1E+05	10,00%
828,9	4,4E+05	7,21%
830,2	4,1E+06	67,21%
830,9	2,0E+06	32,79%
832,1	6,1E+06	100,00%
833,2	4,6E+06	75,41%
834,2	3,4E+06	55,74%
835,2	2,4E+06	39,34%
836,1	7,1E+05	11,64%
838,1	5,3E+05	8,69%
838,7	4,1E+05	6,72%
840,2	3,0E+05	4,92%
842,4	1,1E+05	1,80%
844,1	5,4E+05	8,85%
845,4	2,1E+05	3,44%
846,6	3,4E+05	5,57%
847,1	4,0E+05	6,56%
848,2	8,6E+05	14,10%
849,2	2,0E+06	32,79%
850,1	5,7E+05	9,34%
851,2	5,1E+05	8,36%
852,3	4,2E+05	6,89%
853,2	3,0E+05	4,92%
854,5	2,1E+05	3,44%
856,2	1,3E+06	21,31%
857,2	6,4E+05	10,49%
858,1	3,8E+06	62,30%
859,1	2,3E+06	37,70%
860,2	3,1E+06	50,82%
861,1	1,5E+06	24,59%
862,0	6,9E+05	11,31%
863,2	9,6E+05	15,74%
864,0	4,5E+05	7,38%
865,2	8,7E+05	14,26%
866,1	6,7E+05	10,98%
867,3	2,1E+05	3,44%
868,0	9,2E+04	1,51%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
870,2	5,8E+04	0,95%
871,2	7,2E+04	1,18%
873,3	5,7E+04	0,93%
874,3	4,9E+05	8,03%
875,1	4,3E+05	7,05%
876,4	1,7E+05	2,79%
877,2	8,5E+05	13,93%
878,3	4,7E+05	7,70%
879,0	3,7E+05	6,07%
880,2	7,5E+04	1,23%
883,0	5,4E+05	8,85%
884,0	4,3E+05	7,05%
885,1	7,6E+05	12,46%
886,3	1,0E+06	16,39%
887,3	5,7E+05	9,34%
888,0	5,1E+05	8,36%
889,1	4,7E+05	7,70%
890,3	7,5E+04	1,23%
891,1	3,6E+05	5,90%
892,0	3,9E+05	6,39%
892,9	2,0E+05	3,28%
894,0	7,9E+04	1,30%
894,5	1,3E+05	2,13%
895,2	1,6E+05	2,62%
896,1	2,1E+05	3,44%
899,0	8,3E+04	1,36%
899,7	1,3E+05	2,13%
902,2	8,9E+04	1,46%
903,4	3,1E+05	5,08%
904,5	1,1E+05	1,80%

Tabelle 7.3: Datensatz Probe 9

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
702,8	1,4E+06	14,00%
704,0	4,2E+06	42,00%
705,4	7,7E+05	7,70%
706,0	1,3E+06	13,00%
707,8	1,2E+06	12,00%
709,9	2,5E+06	25,00%
713,4	9,8E+05	9,80%
716,0	2,5E+06	25,00%
716,7	2,7E+05	2,70%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
717,5	9,1E+04	0,91%
718,7	7,3E+04	0,73%
720,0	2,0E+06	20,00%
721,9	5,5E+06	55,00%
723,8	3,1E+05	3,10%
726,3	9,9E+05	9,90%
730,0	9,2E+06	92,00%
732,1	4,7E+06	47,00%
733,4	2,4E+05	2,40%
736,0	7,5E+06	75,00%
738,2	8,2E+05	8,20%
739,1	3,4E+06	34,00%
741,1	1,1E+06	11,00%
742,0	2,0E+06	20,00%
750,1	1,8E+06	18,00%
761,8	5,4E+05	5,40%
764,2	2,9E+06	29,00%
766,4	1,3E+06	13,00%
768,0	1,0E+06	10,00%
770,0	2,1E+06	21,00%
773,9	4,1E+05	4,10%
775,9	2,2E+06	22,00%
777,1	1,6E+06	16,00%
778,0	6,6E+06	66,00%
780,2	2,7E+06	27,00%
782,0	2,7E+06	27,00%
788,2	1,1E+06	11,00%
793,1	1,2E+06	12,00%
800,4	4,1E+05	4,10%
804,3	3,6E+06	36,00%
804,9	1,0E+07	100,00%
806,1	8,1E+06	81,00%
807,0	2,6E+06	26,00%
808,1	7,4E+06	74,00%
808,9	3,1E+05	3,10%
810,2	1,5E+06	15,00%
814,1	5,7E+05	5,70%
820,6	3,9E+06	39,00%
822,2	3,7E+06	37,00%
829,1	2,4E+06	24,00%
830,3	4,4E+06	44,00%
831,3	3,7E+06	37,00%
832,2	4,2E+06	42,00%
833,3	3,4E+06	34,00%
834,1	2,2E+06	22,00%
835,3	5,3E+06	53,00%
836,1	2,6E+06	26,00%
839,2	5,1E+05	5,10%
842,0	3,5E+05	3,50%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit
846,4	3,7E+06	37,00%
849,1	3,7E+06	37,00%
851,2	7,9E+05	7,90%
852,1	9,0E+05	9,00%
856,2	2,7E+06	27,00%
857,4	1,9E+06	19,00%
858,5	3,8E+06	38,00%
860,4	4,8E+06	48,00%
861,4	4,9E+06	49,00%
862,0	1,9E+06	19,00%
863,1	1,3E+05	1,30%
865,4	4,1E+06	41,00%
876,0	3,0E+06	30,00%
877,0	1,3E+06	13,00%
879,8	4,9E+05	4,90%
881,3	9,6E+04	0,96%
882,7	8,1E+04	0,81%
885,3	1,9E+06	19,00%
887,1	4,0E+06	40,00%
890,2	1,2E+06	12,00%
892,2	8,9E+05	8,90%
893,7	9,6E+05	9,60%
903,5	3,0E+06	30,00%

Tabelle 7.4: Datensatz Probe 10

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.3
700,7	5,7E+04	1,30%	0,93%	0,57%
701,9	6,3E+05	14,32%	10,33%	6,30%
704,0	1,7E+06	38,64%	27,87%	17,00%
705,2	4,0E+05	9,09%	6,56%	4,00%
706,0	4,9E+05	11,14%	8,03%	4,90%
706,9	2,3E+05	5,23%	3,77%	2,30%
707,9	2,2E+05	5,00%	3,61%	2,20%
709,0	2,2E+05	5,00%	3,61%	2,20%
710,0	1,1E+06	25,00%	18,03%	11,00%
710,9	3,0E+05	6,82%	4,92%	3,00%
713,2	3,7E+05	8,41%	6,07%	3,70%
713,8	8,1E+04	1,84%	1,33%	0,81%
715,9	1,8E+05	4,09%	2,95%	1,80%
716,6	5,1E+04	1,16%	0,84%	0,51%
718,0	6,7E+05	15,23%	10,98%	6,70%
718,9	5,2E+04	1,18%	0,85%	0,52%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.3
720,1	3,2E+05	7,27%	5,25%	3,20%
721,9	3,0E+05	6,82%	4,92%	3,00%
723,1	2,6E+05	5,91%	4,26%	2,60%
723,7	2,9E+05	6,59%	4,75%	2,90%
724,8	3,3E+05	7,50%	5,41%	3,30%
725,9	1,8E+05	4,09%	2,95%	1,80%
727,3	1,2E+05	2,73%	1,97%	1,20%
727,9	1,2E+05	2,73%	1,97%	1,20%
729,1	1,4E+05	3,18%	2,30%	1,40%
730,0	8,6E+05	19,55%	14,10%	8,60%
731,0	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
731,9	1,8E+06	40,91%	29,51%	18,00%
732,9	5,2E+05	11,82%	8,52%	5,20%
734,0	6,8E+05	15,45%	11,15%	6,80%
735,0	2,9E+05	6,59%	4,75%	2,90%
736,0	1,2E+06	27,27%	19,67%	12,00%
737,0	7,5E+05	17,05%	12,30%	7,50%
738,0	1,2E+06	27,27%	19,67%	12,00%
739,0	9,8E+05	22,27%	16,07%	9,80%
740,0	2,0E+05	4,55%	3,28%	2,00%
741,1	6,2E+05	14,09%	10,16%	6,20%
742,1	3,2E+05	7,27%	5,25%	3,20%
742,9	2,1E+05	4,77%	3,44%	2,10%
746,1	5,4E+05	12,27%	8,85%	5,40%
747,0	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
747,9	2,5E+05	5,68%	4,10%	2,50%
749,0	2,1E+05	4,77%	3,44%	2,10%
750,0	4,2E+05	9,55%	6,89%	4,20%
751,1	4,8E+05	10,91%	7,87%	4,80%
752,2	1,8E+05	4,09%	2,95%	1,80%
753,1	8,5E+04	1,93%	1,39%	0,85%
754,0	1,3E+05	2,95%	2,13%	1,30%
755,0	1,1E+05	2,50%	1,80%	1,10%
755,9	8,0E+04	1,82%	1,31%	0,80%
756,9	2,6E+05	5,91%	4,26%	2,60%
758,2	2,4E+05	5,45%	3,93%	2,40%
759,1	3,3E+05	7,50%	5,41%	3,30%
759,8	1,3E+05	2,95%	2,13%	1,30%
761,1	2,1E+05	4,77%	3,44%	2,10%
762,1	5,7E+05	12,95%	9,34%	5,70%
763,1	1,8E+05	4,09%	2,95%	1,80%
764,0	9,2E+05	20,91%	15,08%	9,20%
764,6	7,0E+05	15,91%	11,48%	7,00%
765,0	7,1E+05	16,14%	11,64%	7,10%
767,1	3,3E+05	7,50%	5,41%	3,30%
768,9	1,1E+05	2,50%	1,80%	1,10%
770,0	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
772,2	8,3E+04	1,89%	1,36%	0,83%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.3
772,9	3,4E+05	7,73%	5,57%	3,40%
773,9	4,5E+05	10,23%	7,38%	4,50%
775,2	1,6E+05	3,64%	2,62%	1,60%
776,0	7,8E+05	17,73%	12,79%	7,80%
777,1	2,1E+05	4,77%	3,44%	2,10%
778,1	1,6E+06	36,36%	26,23%	16,00%
779,1	1,3E+06	29,55%	21,31%	13,00%
780,2	2,3E+05	5,23%	3,77%	2,30%
781,8	2,0E+05	4,55%	3,28%	2,00%
783,0	7,0E+04	1,59%	1,15%	0,70%
785,0	6,2E+04	1,41%	1,02%	0,62%
787,4	1,6E+05	3,64%	2,62%	1,60%
789,1	1,2E+05	2,73%	1,97%	1,20%
790,1	1,6E+05	3,64%	2,62%	1,60%
791,0	2,0E+05	4,55%	3,28%	2,00%
792,2	3,1E+05	7,05%	5,08%	3,10%
793,0	4,7E+05	10,68%	7,70%	4,70%
794,0	7,3E+04	1,66%	1,20%	0,73%
795,1	4,4E+05	10,00%	7,21%	4,40%
796,2	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
797,1	1,7E+05	3,86%	2,79%	1,70%
798,5	9,3E+04	2,11%	1,52%	0,93%
799,1	2,2E+05	5,00%	3,61%	2,20%
799,8	3,4E+05	7,73%	5,57%	3,40%
801,1	1,8E+05	4,09%	2,95%	1,80%
802,2	8,7E+05	19,77%	14,26%	8,70%
803,3	1,4E+05	3,18%	2,30%	1,40%
804,2	2,5E+06	56,82%	40,98%	25,00%
805,1	1,2E+06	27,27%	19,67%	12,00%
806,1	2,7E+06	61,36%	44,26%	27,00%
807,2	1,4E+06	31,82%	22,95%	14,00%
808,3	4,0E+05	9,09%	6,56%	4,00%
809,3	1,7E+05	3,86%	2,79%	1,70%
810,1	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
811,0	1,9E+05	4,32%	3,11%	1,90%
811,8	1,7E+05	3,86%	2,79%	1,70%
814,5	1,4E+05	3,18%	2,30%	1,40%
815,9	3,2E+05	7,27%	5,25%	3,20%
817,3	2,3E+05	5,23%	3,77%	2,30%
818,1	2,1E+05	4,77%	3,44%	2,10%
819,3	1,9E+05	4,32%	3,11%	1,90%
820,0	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
821,1	7,5E+05	17,05%	12,30%	7,50%
822,1	2,6E+05	5,91%	4,26%	2,60%
823,3	8,4E+05	19,09%	13,77%	8,40%
824,1	6,2E+05	14,09%	10,16%	6,20%
825,3	1,6E+05	3,64%	2,62%	1,60%
827,1	1,3E+05	2,95%	2,13%	1,30%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (<i>c/s</i>)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.3
828,3	2,8E+05	6,36%	4,59%	2,80%
830,1	1,6E+06	36,36%	26,23%	16,00%
831,1	1,3E+06	29,55%	21,31%	13,00%
832,1	4,4E+06	100,00%	72,13%	44,00%
833,2	1,9E+06	43,18%	31,15%	19,00%
834,2	1,8E+06	40,91%	29,51%	18,00%
835,1	1,3E+06	29,55%	21,31%	13,00%
836,1	4,7E+05	10,68%	7,70%	4,70%
837,7	1,3E+05	2,95%	2,13%	1,30%
838,6	1,4E+05	3,18%	2,30%	1,40%
839,9	6,7E+04	1,52%	1,10%	0,67%
842,9	6,5E+04	1,48%	1,07%	0,65%
844,3	5,5E+04	1,25%	0,90%	0,55%
846,2	3,2E+05	7,27%	5,25%	3,20%
847,4	2,1E+05	4,77%	3,44%	2,10%
849,0	4,5E+05	10,23%	7,38%	4,50%
850,1	6,0E+05	13,64%	9,84%	6,00%
851,0	4,0E+05	9,09%	6,56%	4,00%
852,2	2,9E+05	6,59%	4,75%	2,90%
853,1	2,6E+05	5,91%	4,26%	2,60%
854,3	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
856,1	3,7E+05	8,41%	6,07%	3,70%
857,2	3,5E+05	7,95%	5,74%	3,50%
858,3	2,1E+06	47,73%	34,43%	21,00%
859,2	1,2E+06	27,27%	19,67%	12,00%
860,2	2,0E+06	45,45%	32,79%	20,00%
861,1	1,3E+06	29,55%	21,31%	13,00%
862,2	5,5E+05	12,50%	9,02%	5,50%
863,3	3,8E+05	8,64%	6,23%	3,80%
864,4	2,4E+05	5,45%	3,93%	2,40%
865,3	3,1E+05	7,05%	5,08%	3,10%
866,2	1,2E+05	2,73%	1,97%	1,20%
866,9	7,8E+04	1,77%	1,28%	0,78%
867,4	8,3E+04	1,89%	1,36%	0,83%
870,1	5,4E+04	1,23%	0,89%	0,54%
871,2	7,0E+04	1,59%	1,15%	0,70%
872,1	2,3E+05	5,23%	3,77%	2,30%
872,8	9,1E+04	2,07%	1,49%	0,91%
874,3	3,5E+05	7,95%	5,74%	3,50%
875,2	1,9E+05	4,32%	3,11%	1,90%
876,3	2,9E+05	6,59%	4,75%	2,90%
877,1	4,7E+05	10,68%	7,70%	4,70%
878,3	2,7E+05	6,14%	4,43%	2,70%
879,4	1,6E+05	3,64%	2,62%	1,60%
882,0	2,6E+05	5,91%	4,26%	2,60%
884,2	3,7E+05	8,41%	6,07%	3,70%
885,5	4,7E+04	1,07%	0,77%	0,47%
886,2	3,1E+05	7,05%	5,08%	3,10%

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.3
887,2	1,0E+05	2,27%	1,64%	1,00%
889,4	2,1E+05	4,77%	3,44%	2,10%
890,4	3,4E+05	7,73%	5,57%	3,40%
891,5	2,2E+05	5,00%	3,61%	2,20%
892,3	1,9E+05	4,32%	3,11%	1,90%
893,5	2,5E+05	5,68%	4,10%	2,50%
894,3	9,5E+04	2,16%	1,56%	0,95%
900,9	1,5E+05	3,41%	2,46%	1,50%
903,4	8,9E+04	2,02%	1,46%	0,89%
905,4	1,6E+05	3,64%	2,62%	1,60%

Tabelle 7.5: Datensatz Probe 11

Masse (<i>m/z</i>)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.6
701,9	7,3E+05	19,73%	14,31%
702,8	2,1E+05	5,68%	4,12%
704,0	1,6E+06	43,24%	31,37%
704,9	7,1E+05	19,19%	13,92%
705,9	7,4E+05	20,00%	14,51%
706,9	6,3E+05	17,03%	12,35%
707,9	4,8E+05	12,97%	9,41%
708,9	4,7E+05	12,70%	9,22%
710,0	1,5E+06	40,54%	29,41%
710,8	6,7E+05	18,11%	13,14%
711,8	2,3E+05	6,22%	4,51%
713,0	3,1E+05	8,38%	6,08%
713,8	6,9E+04	1,86%	1,35%
714,8	7,4E+04	2,00%	1,45%
715,4	1,5E+05	4,05%	2,94%
716,0	8,3E+04	2,24%	1,63%
716,9	2,0E+05	5,41%	3,92%
717,5	7,4E+04	2,00%	1,45%
718,4	1,8E+05	4,86%	3,53%
719,3	9,0E+04	2,43%	1,76%
719,9	1,1E+05	2,97%	2,16%
720,7	2,0E+05	5,41%	3,92%
721,5	8,9E+04	2,41%	1,75%
722,2	1,4E+05	3,78%	2,75%
722,9	4,0E+05	10,81%	7,84%
724,0	4,3E+05	11,62%	8,43%
724,9	4,5E+05	12,16%	8,82%
726,2	2,9E+05	7,84%	5,69%
727,1	1,9E+05	5,14%	3,73%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.6
728,2	6,3E+04	1,70%	1,24%
729,1	1,5E+05	4,05%	2,94%
729,9	8,2E+05	22,16%	16,08%
731,0	3,9E+05	10,54%	7,65%
732,0	1,7E+06	45,95%	33,33%
733,0	5,1E+05	13,78%	10,00%
734,1	7,9E+05	21,35%	15,49%
734,9	2,9E+05	7,84%	5,69%
736,0	1,6E+06	43,24%	31,37%
736,9	8,0E+05	21,62%	15,69%
738,0	1,1E+06	29,73%	21,57%
738,9	8,3E+05	22,43%	16,27%
739,9	1,0E+05	2,70%	1,96%
740,4	1,7E+05	4,59%	3,33%
741,8	8,4E+04	2,27%	1,65%
743,4	6,0E+04	1,62%	1,18%
744,2	1,3E+05	3,51%	2,55%
745,1	5,6E+04	1,51%	1,10%
746,0	2,5E+05	6,76%	4,90%
746,7	7,4E+04	2,00%	1,45%
748,0	4,7E+05	12,70%	9,22%
749,3	1,6E+05	4,32%	3,14%
750,2	1,4E+06	37,84%	27,45%
750,9	3,2E+05	8,65%	6,27%
752,2	3,5E+05	9,46%	6,86%
753,7	1,3E+05	3,51%	2,55%
756,0	8,2E+04	2,22%	1,61%
757,0	6,1E+04	1,65%	1,20%
758,2	2,4E+05	6,49%	4,71%
758,9	2,1E+05	5,68%	4,12%
760,2	8,5E+04	2,30%	1,67%
761,9	3,1E+05	8,38%	6,08%
763,3	1,8E+05	4,86%	3,53%
764,0	1,1E+06	29,73%	21,57%
765,1	4,6E+05	12,43%	9,02%
766,0	3,4E+05	9,19%	6,67%
767,1	2,8E+05	7,57%	5,49%
768,0	2,8E+05	7,57%	5,49%
768,7	1,3E+05	3,51%	2,55%
769,9	6,4E+04	1,73%	1,25%
771,9	2,5E+05	6,76%	4,90%
772,5	3,3E+04	0,89%	0,65%
774,0	3,0E+05	8,11%	5,88%
776,1	5,3E+05	14,32%	10,39%
777,1	5,7E+05	15,41%	11,18%
778,1	2,6E+06	70,27%	50,98%
779,1	1,4E+06	37,84%	27,45%
780,3	6,9E+05	18,65%	13,53%
781,2	1,4E+05	3,78%	2,75%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.6
781,9	9,6E+04	2,59%	1,88%
782,6	7,3E+04	1,97%	1,43%
784,2	9,7E+04	2,62%	1,90%
786,1	3,8E+04	1,03%	0,75%
787,5	1,5E+05	4,05%	2,94%
788,2	7,7E+04	2,08%	1,51%
790,3	3,1E+05	8,38%	6,08%
791,1	1,5E+05	4,05%	2,94%
791,9	1,6E+05	4,32%	3,14%
793,0	2,4E+05	6,49%	4,71%
794,1	1,6E+05	4,32%	3,14%
795,1	9,2E+05	24,86%	18,04%
796,0	2,3E+05	6,22%	4,51%
796,9	1,3E+05	3,51%	2,55%
802,0	6,9E+05	18,65%	13,53%
803,2	3,2E+05	8,65%	6,27%
804,1	2,3E+06	62,16%	45,10%
805,3	1,2E+06	32,43%	23,53%
806,1	3,7E+06	100,00%	72,55%
807,1	2,6E+06	70,27%	50,98%
808,0	1,5E+06	40,54%	29,41%
809,1	2,7E+05	7,30%	5,29%
810,2	9,8E+04	2,65%	1,92%
811,3	8,4E+04	2,27%	1,65%
812,1	2,1E+05	5,68%	4,12%
814,2	1,9E+05	5,14%	3,73%
816,1	3,5E+05	9,46%	6,86%
818,0	1,1E+05	2,97%	2,16%
818,7	5,3E+04	1,43%	1,04%
820,1	3,2E+05	8,65%	6,27%
821,0	7,4E+05	20,00%	14,51%
822,3	2,5E+05	6,76%	4,90%
823,3	5,4E+05	14,59%	10,59%
824,1	3,4E+05	9,19%	6,67%
825,3	1,4E+05	3,78%	2,75%
826,1	8,9E+04	2,41%	1,75%
828,0	2,8E+05	7,57%	5,49%
829,1	1,4E+05	3,78%	2,75%
830,2	1,6E+06	43,24%	31,37%
831,1	5,9E+05	15,95%	11,57%
832,1	2,8E+06	75,68%	54,90%
833,1	1,6E+06	43,24%	31,37%
834,1	2,1E+06	56,76%	41,18%
835,2	9,0E+05	24,32%	17,65%
836,1	4,2E+05	11,35%	8,24%
837,2	2,7E+05	7,30%	5,29%
838,0	3,3E+05	8,92%	6,47%
838,8	2,3E+05	6,22%	4,51%
840,1	8,9E+04	2,41%	1,75%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.6
843,9	3,3E+05	8,92%	6,47%
845,3	4,1E+05	11,08%	8,04%
846,5	9,8E+04	2,65%	1,92%
847,2	2,2E+05	5,95%	4,31%
848,3	1,2E+05	3,24%	2,35%
849,1	7,0E+05	18,92%	13,73%
850,1	1,8E+05	4,86%	3,53%
851,3	5,7E+05	15,41%	11,18%
852,3	3,8E+05	10,27%	7,45%
853,4	1,1E+05	2,97%	2,16%
854,2	3,9E+05	10,54%	7,65%
856,0	1,7E+05	4,59%	3,33%
857,3	8,7E+04	2,35%	1,71%
858,2	8,2E+05	22,16%	16,08%
859,1	6,5E+05	17,57%	12,75%
860,0	8,0E+05	21,62%	15,69%
861,1	7,3E+05	19,73%	14,31%
862,0	2,2E+05	5,95%	4,31%
863,1	1,9E+05	5,14%	3,73%
864,3	1,9E+05	5,14%	3,73%
865,2	1,3E+05	3,51%	2,55%
866,4	1,0E+05	2,70%	1,96%
867,2	1,5E+05	4,05%	2,94%
868,3	1,3E+05	3,51%	2,55%
872,3	1,4E+05	3,78%	2,75%
875,2	2,3E+05	6,22%	4,51%
875,6	2,5E+05	6,76%	4,90%
876,3	2,1E+05	5,68%	4,12%
877,4	1,9E+05	5,14%	3,73%
878,4	4,6E+04	1,24%	0,90%
879,2	1,2E+05	3,24%	2,35%
880,5	1,6E+05	4,32%	3,14%
881,8	5,7E+04	1,54%	1,12%
883,2	1,1E+05	2,97%	2,16%
884,7	7,0E+04	1,89%	1,37%
885,3	1,0E+05	2,70%	1,96%
886,2	3,2E+05	8,65%	6,27%
887,4	1,4E+05	3,78%	2,75%
888,9	2,2E+05	5,95%	4,31%
890,1	1,6E+05	4,32%	3,14%
890,9	8,3E+04	2,24%	1,63%
892,1	2,2E+05	5,95%	4,31%
893,4	1,9E+05	5,14%	3,73%
902,5	6,7E+04	1,81%	1,31%

Tabelle 7.6: Datensatz Probe 12

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2
702,1	3,6E+05	7,06%	5,90%
703,9	1,9E+06	37,25%	31,15%
705,0	1,1E+06	21,57%	18,03%
705,9	8,4E+05	16,47%	13,77%
706,9	4,8E+05	9,41%	7,87%
707,9	6,2E+05	12,16%	10,16%
709,1	5,1E+05	10,00%	8,36%
709,9	1,2E+06	23,53%	19,67%
710,9	1,0E+06	19,61%	16,39%
712,1	2,8E+05	5,49%	4,59%
713,0	1,0E+06	19,61%	16,39%
713,7	2,7E+05	5,29%	4,43%
717,0	2,9E+05	5,69%	4,75%
717,9	4,0E+05	7,84%	6,56%
720,9	2,9E+05	5,69%	4,75%
722,0	5,4E+05	10,59%	8,85%
723,0	3,6E+05	7,06%	5,90%
724,0	5,3E+05	10,39%	8,69%
724,9	2,5E+05	4,90%	4,10%
727,3	2,2E+05	4,31%	3,61%
729,0	3,8E+05	7,45%	6,23%
729,9	6,0E+05	11,76%	9,84%
732,0	6,8E+05	13,33%	11,15%
733,1	6,7E+05	13,14%	10,98%
734,0	8,6E+05	16,86%	14,10%
734,9	4,2E+05	8,24%	6,89%
736,0	2,2E+06	43,14%	36,07%
737,0	7,6E+05	14,90%	12,46%
738,0	1,6E+06	31,37%	26,23%
739,1	1,0E+06	19,61%	16,39%
740,1	2,4E+05	4,71%	3,93%
741,1	8,0E+05	15,69%	13,11%
743,1	3,0E+05	5,88%	4,92%
744,0	2,9E+05	5,69%	4,75%
748,0	7,2E+05	14,12%	11,80%
749,0	4,8E+05	9,41%	7,87%
749,9	3,2E+06	62,75%	52,46%
751,2	1,3E+06	25,49%	21,31%
751,9	3,3E+05	6,47%	5,41%
755,9	3,4E+05	6,67%	5,57%
761,1	2,4E+05	4,71%	3,93%
762,1	4,0E+05	7,84%	6,56%
763,1	4,9E+05	9,61%	8,03%
764,0	1,3E+06	25,49%	21,31%
765,2	5,7E+05	11,18%	9,34%
766,0	5,6E+05	10,98%	9,18%
767,0	9,4E+05	18,43%	15,41%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2
768,1	3,6E+05	7,06%	5,90%
769,0	1,9E+05	3,73%	3,11%
771,0	4,3E+05	8,43%	7,05%
775,1	3,2E+05	6,27%	5,25%
776,0	2,2E+06	43,14%	36,07%
777,1	7,3E+05	14,31%	11,97%
778,1	5,1E+06	100,00%	83,61%
779,0	3,5E+06	68,63%	57,38%
780,1	1,3E+06	25,49%	21,31%
781,2	3,0E+05	5,88%	4,92%
785,9	3,4E+05	6,67%	5,57%
786,8	2,7E+05	5,29%	4,43%
788,3	1,9E+05	3,73%	3,11%
790,0	3,1E+05	6,08%	5,08%
791,4	3,3E+05	6,47%	5,41%
792,2	3,8E+05	7,45%	6,23%
793,1	5,6E+05	10,98%	9,18%
794,0	3,2E+05	6,27%	5,25%
795,1	1,4E+06	27,45%	22,95%
796,1	9,5E+05	18,63%	15,57%
796,9	2,1E+05	4,12%	3,44%
798,4	3,7E+05	7,25%	6,07%
801,9	1,3E+06	25,49%	21,31%
803,2	4,1E+05	8,04%	6,72%
804,1	4,7E+06	92,16%	77,05%
805,1	3,8E+06	74,51%	62,30%
806,2	5,1E+06	100,00%	83,61%
807,2	2,9E+06	56,86%	47,54%
808,3	5,1E+05	10,00%	8,36%
809,0	3,6E+05	7,06%	5,90%
810,0	3,9E+05	7,65%	6,39%
810,9	4,1E+05	8,04%	6,72%
817,7	1,6E+05	3,14%	2,62%
819,1	2,7E+05	5,29%	4,43%
820,2	2,8E+05	5,49%	4,59%
821,3	3,5E+05	6,86%	5,74%
822,2	3,7E+05	7,25%	6,07%
823,2	9,7E+05	19,02%	15,90%
824,2	3,7E+05	7,25%	6,07%
825,1	2,9E+05	5,69%	4,75%
826,1	5,1E+05	10,00%	8,36%
828,0	3,9E+05	7,65%	6,39%
830,0	1,7E+06	33,33%	27,87%
831,2	1,5E+06	29,41%	24,59%
832,1	4,0E+06	78,43%	65,57%
833,2	2,3E+06	45,10%	37,70%
834,2	1,9E+06	37,25%	31,15%
835,1	1,2E+06	23,53%	19,67%

Masse (m/z)	max. Intensität (c/s)	rel. Häufigkeit	rel. Häufigkeit bzgl. Tabelle 7.2
836,3	6,4E+05	12,55%	10,49%
837,1	3,8E+05	7,45%	6,23%
838,1	5,3E+05	10,39%	8,69%
846,4	2,9E+05	5,69%	4,75%
847,2	5,1E+05	10,00%	8,36%
848,2	2,3E+05	4,51%	3,77%
849,1	8,1E+05	15,88%	13,28%
850,4	4,0E+05	7,84%	6,56%
851,3	2,9E+05	5,69%	4,75%
852,1	2,4E+05	4,71%	3,93%
856,1	5,9E+05	11,57%	9,67%
857,1	2,6E+05	5,10%	4,26%
858,2	1,1E+06	21,57%	18,03%
859,1	4,0E+05	7,84%	6,56%
860,2	1,3E+06	25,49%	21,31%
861,3	7,2E+05	14,12%	11,80%
862,1	4,8E+05	9,41%	7,87%
864,2	3,0E+05	5,88%	4,92%
866,2	5,0E+05	9,80%	8,20%
877,0	6,2E+05	12,16%	10,16%
881,5	1,7E+05	3,33%	2,79%
885,1	3,1E+05	6,08%	5,08%
888,2	2,6E+05	5,10%	4,26%
893,2	4,3E+05	8,43%	7,05%

Literatur

- Amad, MH und RS Houk (1998) High-Resolution Mass Spectrometry with a Multiple Pass Quadrupole Mass Analyzer. *Analytical Chemistry* 70:S. 4885–4889.
- El-Aneed, A, A Cohen und J Banoub (2009) Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* 44:S. 210–230.
- Beller, M (2005). Identification and characterization of Drosophila lipid droplet-associated proteins. Diss. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Blacklock, BJ und RO Ryan (1994) Hemolymph Lipid Transport. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24:S. 855–873.
- Bozza, PT, I Bakker-Abreu, RA Navarro-Xavier und C Bandeira-Melo (2011) Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 85:S. 205–213.
- Brand, AH und N Perrimon (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:S. 401–415.
- Al-Bukhaiti, WQ, A Noman, AS Qasim und A Al-Farga (2017) Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research* 6:S. 123–128.
- Byrdwell, WC (2001) Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Lipids. *Lipids* 36:S. 327–346.
- Chino, H und K Kitazawa (1981) Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects. *Journal of Lipid Research* 22:S. 1042–1052.
- Christie, WW und X Han (2012) Lipid Analysis. Kap. *Introduction to mass spectrometric analysis of lipids in lipidomics*: Woodhead Publishing.
- Cocchiaro, JL, Y Kumar, ER Fischer und RH Valdivia (2008) Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 105:S. 9379–9384.
- Elamin, AA, M Stehr und M Singh (2012) Lipid Droplets and Mycobacterium leprae Infection. *Journal of Pathogens* 2012.
- Engel, KM und J Schiller (2021) The value of coupling thin-layer chromatography to mass spectrometry in lipid research - a review. *Journal of Chromatography B* 1185.
- Fuchs, B, Y Popkova, R Süß und J Schiller (2015) Instrumental Thin-Layer Chromatographie. Kap. *Separation of (Phospho)Lipids by Thin-Layer Chromatography*: S. 375–405. Elsevier. ISBN: 978-0-12-417223-4.
- Fuchs, B, R Süß, K Teuber, M Eibisch und J Schiller (2011) Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *Journal of Chromatography A* 1218:S. 2754–2774.
- Fujimoto, T, Y Ohsaki, J Cheng, M Suzuki und Y Shinohara (2008) Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology* 130:S. 263–279.

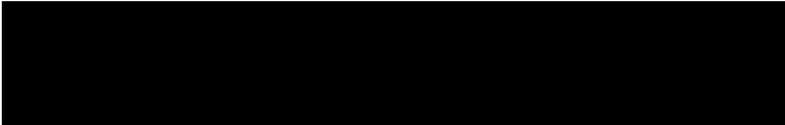
- Gilbert, LI und H Chino (1974) Transport of lipids in insects. *Journal of Lipid Research* 15:S. 439–456.
- Gross, JH (2019) Massenspektrometrie. Kap. *Konzept der MS*: Springer-Verlag.
- Gruber, L und A Gruner (2016) Medizintechnik. Kap. *Grundlagen und Verfahren der Massenspektrometrie*: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Haag, AM (2016) Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. Kap. *Mass Analyzers and Mass Spectrometers*: Springer.
- Heier, C und RP Kühnlein (2018) Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 210:S. 1163–1184.
- Hofmann, T, M Barth, A Meister, PL Kastritis und C Schmidt (2021) Thin-Layer Chromatography and Coomassie Staining of Phospholipids for Fast and Simple Lipidomics Sample Preparation. *Analysis Sensing* 1:S. 171–179.
- Janssen, HG und S de Koning (2004) On-line LC-GC and comprehensive two-dimensional LCxGC-ToF MS for the analysis of complex samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:S. 1944–1947.
- Kishimoto, K, R Urade, T Ogawa und T Moriyama (2001) Nondestructive Quantification of Neutral Lipids by ThinLayer Chromatography and Laser-Fluorescent Scanning: Suitable Methods for “Lipidome” Analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281:S. 657–662.
- Kühnlein, RP (2012) Lipid droplet-based storage fat metabolism in *Drosophila*. *Journal of Lipid Research* 53:S. 1430–1436.
- MacMillan, H und BN Hughson (2014) A high-throughput method of hemolymph extraction from adult *Drosophila* without anesthesia. *Journal of Insect Physiology* 63:S. 27–31.
- Meyer, HE, T Fröhlich, E Nordhoff und K Kuhlmann (2022) Bioanalytik. Kap. *Massenspektrometrie*: Springer-Verlag.
- Olzmann, JA und P Carvalho (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews* 20:S. 137–155.
- Radtke, R. (2022) *Anteil der Erwachsenen mit Übergewicht oder Fettleibigkeit in ausgewählten OECD-Ländern im Jahr 2019*. URL: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/153908/umfrage/fettleibigkeit-unter-erwachsenen-in-oecd-laendern/> (aufgerufen am 08.08.2023).
- Ruiz-Samblás, C, A González-Casado und L Cuadros-Rodríguez (2015) Triacylglycerols Determination by Hightemperature Gas Chromatography in the Analysis of Vegetable Oils and Foods: A Review of the Past 10 Years. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55:S. 1618–1631.
- Ryan, RO und DJ van der Horst (2000) Lipid Transport Biochemistry and its Role in Energy Production. *Annual Review of Entomology* 45:S. 223–260.
- Santiago, M und S Strobel (2013) Methods in Enzymology. Kap. *Chapter Twenty-Four - Thin Layer Chromatography*: Academic Press.
- Soulages, JL und MA Wells (1994) Lipophorin: The Structure Of An Insect Lipoprotein And Its Role In Lipid Transport In Insects. *Advances in Protein Chemistry* 45:S. 371–415.

- Thiele, C und J Spandl (2008) Cell biology of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology* 20:S. 378–385.
- Thul, J (2014). Studien am Lipidtröpfchen-assoziierten *Drosophila melanogaster* Protein CG2254. Diss. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Traven, A, B Jelacic und M Sopta (2006) Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Reports* 7:S. 496–499.
- Ueno, M, WJ Shen, S Patel, AS Greenberg, S Azhar und FB Kraemer (2013) Fat-specific protein 27 modulates nuclear factor of activated T cells 5 and the cellular response to stress. *Journal of Lipid Research* 54:S. 734–743.
- Waktola, HD, AX Zeng, ST Chin und PJ Mariott (2020) Advanced Gas Chromatography and Mass Spectrometry Technologies for Fatty Acids and Triacylglycerols Analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 129.
- Walther, TC und RV Farese (2012) Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annual Review of Biochemistry* 81:S. 687–714.
- Warnick, GR (1986) Enzymatic Methods For Quantification of Lipoprotein Lipids. *Methods in Enzymology* 129:S. 101–123.
- Welte, MA (2015) Expanding Roles for Lipid Droplets. *Current Biology Review* 25:S. 470–481.
- White, T, S Bursten, D Federighi, RA Lewis und E Nudelman (1986) High-Resolution Separation and Quantification of Neutral Lipid and Phospholipid Species in Mammalian Cells and Sera by Multi-One-Dimensional Thin-Layer Chromatography. *Analytical Biochemistry* 258:S. 109–117.
- Zubarev, RA und A Makarov (2013) Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 85:S. 5287–5616.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.



Dresden, 23. August 2023