



**Charakterisierung des circadianen Drosophila Metaboloms unter Zuhilfenahme  
massenspektrometrischer Methoden**

**Characterization of the circadian Drosophila metabolome by applying mass-  
spectrometry-based approaches**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Integrative Biologie

vorgelegt von

**Stefan Schäbler**

aus

Würzburg

Würzburg, 2021



**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r:** Prof. Dr. Thomas Müller

**1. Betreuer:** Dr. Agnes Fekete

**2. Betreuer:** Prof. Dr. Christian Wegener

**3. Betreuer:** Prof. Dr. Charlotte Helfrich-Förster

**4. Betreuer:** Prof. Dr. Dr. Martin Müller

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

“Ceci n'est pas une pomme”

René Magritte

Zusammenfassung:

Die Fähigkeit sich an die Rotation der Erde und den daraus resultierenden Tag- und Nacht-Rhythmus anzupassen, basiert auf einer komplexen Regulation verschiedener physiologischer Prozesse. Auf molekularer Ebene liegt diesen Prozessen eine Orchestration von Uhr-Genen zugrunde – auch als innere Uhr bezeichnet – die einen aktivierenden bzw. reprimierenden Einfluss auf die Expression einer Vielzahl weiterer Gene hat. Ausgehend von dieser Regulation lassen sich auf unterschiedlichsten Ebenen tageszeitabhängige, wiederkehrende Rhythmen beobachten.

Während diese wiederkehrenden Rhythmen auf einigen Ebenen bereits gut erforscht und beschrieben sind, gibt es weitere Ebenen wie den Metabolismus, über die das Wissen bisher noch begrenzt ist.

So handelt es sich bei *Drosophila* beispielsweise um den Organismus, dessen innere Uhr auf molekularer Ebene wahrscheinlich mit am besten charakterisiert ist. Dennoch ist bisher nur wenig über Stoffklassen bekannt, deren Metabolismus durch die innere Uhr kontrolliert wird.

Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine gestörte innere Uhr auf die Anlage der Energiespeicher auswirkt, inwiefern dies allerdings einen Einfluss auf dem intermediären Stoffwechsel hat, blieb bisher weitgehend unerforscht. Auch die Frage, welche Metaboliten wiederkehrende, tageszeitabhängige Rhythmen aufweisen, wurde bisher nur für eine begrenzte Anzahl Metaboliten untersucht.

Bei der hier durchgeführten Arbeit wurden deshalb zunächst die globalen Metabolit-Profile von Fliegen mit einer auf molekularer Ebene gestörten inneren Uhr (*per<sup>01</sup>*) mit Fliegen, die über eine funktionale Uhr verfügen (CantonS), zu zwei Zeitpunkten verglichen. Um die Anzahl der zeitgleich untersuchten Gewebe und somit die Komplexität der Probe zu reduzieren, wurden hierfür die Köpfe von den Körpern der Fliegen getrennt und separat analysiert. Beide Körperteile wurden sowohl auf kleine hydrophile als auch auf hydrophobe Metaboliten hin mittels UPLC-ESI-qTOF-MS untersucht. Die anschließend durchgeführte, statistische Analyse brachte hervor, dass sich Unterschiede zwischen den beiden Fliegenlinien besonders in den Spiegeln der essentiellen Aminosäuren, den Kynureninen, den Pterinaten sowie den Spiegeln der Glycero(phospho)lipiden und Fettsäureester zeigten. Bei den Lipiden zeigte sich, dass die Auswirkungen weniger ausgeprägt für die Anlage der Speicher- und Strukturlipide als für die Intermediate des Lipidabbaus, die Diacylglycerole (DAGs) sowie die Acylcarnitine (ACs), waren.

Um zu bestätigen, dass die innere Uhr tatsächlich einen regulatorischen Einfluss auf die ausgemachten Stoffwechselwege hat, wurden anschließend die Spiegel aller Mitglieder darauf

hin untersucht, ob diese wiederkehrende, tageszeitabhängige Schwankungen aufweisen. Hierfür wurden Proben alle zwei Stunden über drei aufeinanderfolgende Tage genommen und analysiert, bevor mittels JTK\_CYCLE eine statistische Analyse der Daten durchgeführt und die Metaboliten herausgefiltert wurden, die ein rhythmisches Verhalten bei einer Periodenlänge von 24h zeigten. Hierbei bestätigte sich, dass besonders die Mitglieder des intermediären Lipidmetabolismus hiervon betroffen waren. So konnten zwar auch für einige Aminosäuren robuste Rhythmen ausgemacht werden, besonders ausgeprägt waren diese jedoch erneut bei den DAGs und den ACs. Die abschließende Untersuchung letzterer unter Freilaufbedingungen (DD) sowie in *per<sup>01</sup>* brachte hervor, dass die ausgemachten Rhythmen unter diesen Bedingungen entweder nicht mehr detektiert werden konnten oder deutlich abgeschwächt vorlagen. Lediglich zwei kurzkettige ACs zeigten auch unter DD-Bedingungen statistisch signifikante Rhythmen in ihren Spiegeln. Dies spricht dafür, dass neben der Regulation durch die innere Uhr weitere Faktoren, wie beispielsweise das Licht, eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

## Summary

The ability to adapt to the rotation of the earth and to the resulting day and night rhythm is based on a complex regulation of various endogenous processes. At the molecular level, these processes are based on an orchestration of clock genes - also known as the endogenous clock - which have an activating or repressing influence on the expression of diverse clock-controlled genes. Based on this regulation, recurring rhythms depending on the time of day can be observed at various levels, ranging from gene expression to behavior. While these recurring rhythms have been well characterized on certain output levels, little is known, however, on other levels like their influence on metabolism. *Drosophila* for example, is an organism whose endogenous clock is probably best characterized at the molecular level. However, little is known about substance classes and metabolic pathways that are controlled by the endogenous clock.

It has already been shown that an impaired endogenous clock affects energy storage, but how an impaired clock influences intermediary lipid metabolism remains still unknown. Additionally, little is known on metabolites or metabolite classes, that display recurring, time-dependent rhythms. So far this has only been studied for certain metabolites or metabolite classes. Therefore, we compared global metabolite profiles at two timepoints between flies with an impaired endogenous clock (*per<sup>01</sup>*) and WT flies, possessing a functional clock (CantonS). In order to reduce the number of different tissues studied at once and thus the complexity of the sample, fly heads were separated from fly bodies and analyzed separately. In both body parts levels of small hydrophilic

and hydrophobic metabolites were studied using UPLC-ESI-qTOF-MS. The subsequent statistical analysis revealed differences between the two fly lines, associated with the metabolism of essential amino acids, kynurenines, pterinates, glycerol(phospho)lipids and fatty acid esters. Closer inspection of the lipid classes being affected revealed, that the effects were less pronounced for the formation of storage- and structural- lipids, compared to the intermediates of lipid degradation, the diacylglycerols (DAGs) and acylcarnitines (ACs).

In order to confirm that the endogenous clock has indeed a regulatory influence on these metabolic pathways, the levels of all members were studied in a time-course experiment to determine, whether they display recurring, time-of-day-dependent fluctuations. For this purpose, samples were taken every two hours for three consecutive days, with heads and bodies analyzed separately, before a statistical analysis was carried out using JTK\_CYCLE. The results were then filtered for those metabolites that showed a rhythmic behavior with a period length of 24 hours. The results confirmed that members of the intermediary lipid metabolism were particularly affected. Although robust rhythms could be detected for some amino acids, multiple DAG and AC species showed even more pronounced rhythms. The subsequent analysis of the latter under freerunning conditions (DD) and in *per<sup>01</sup>* showed that the identified rhythms either diminished completely under these conditions or were significantly weakened. Only two short-chain ACs showed statistically significant rhythms in their levels under DD conditions. This suggests that in addition to regulation by the internal clock, other factors, such as light, seem to play a crucial role.

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1.1 Die innere Uhr.....   | 11 |
| 1.2 Molekulare Grundlage der inneren Uhr .....                              | 13 |
| 1.3 Zentrale und periphere Uhren .....                                      | 15 |
| 1.4 Einfluss der inneren Uhr auf die Genexpression .....                    | 16 |
| 1.5 Einfluss der inneren Uhr auf den Metabolismus .....                     | 17 |
| 1.5.1 Einfluss von PER auf Metabolitspiegel .....                           | 18 |
| 1.5.2 Tageszeitabhängige Rhythmen in Metabolitspiegeln .....                | 19 |
| 1.6 Zielsetzung .....   | 23 |
| 2 Material und Methoden .....   | 25 |
| 2.1 Fliegenstämme und Aufzucht.....   | 25 |
| 2.1.1 Stämme.....   | 25 |
| 2.1.2 Entrainment-Bedingungen und Probennahme .....                         | 25 |
| 2.2 Bestimmung grundlegender Eigenschaften.....                             | 25 |
| 2.2.1 Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts.....                       | 25 |
| 2.2.2 Gesamtprotein.....  | 26 |
| 2.3 Probenvorbereitung LC-MS.....   | 26 |
| 2.3.1 Ungerichtete Analyse der hydrophilen und lipophilen Metaboliten ..... | 26 |
| 2.3.2 Gerichtete Carnitin- und Acylcarnitinanalyse .....                    | 27 |
| 2.4 LC-MS Analyse.....  | 27 |
| 2.4.1 Allgemeine Probeneingabe.....   | 27 |
| 2.4.2 Chromatographische Bedingungen .....                                  | 28 |
| 2.4.2.1 Ungerichtete Analyse .....  | 28 |
| 2.4.2.1.1 Organische Phase .....  | 28 |
| 2.4.2.1.2 Wässrige Phase .....  | 28 |
| 2.4.2.2 Gerichtete Analyse der Carnitine.....                               | 29 |
| 2.4.3 MS -Bedingungen.....  | 29 |
| 2.4.3.1 MS-Bedingungen der qualitativen Untersuchung am LC-qTOF-MS .....    | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 2.4.3.2 MS-Bedingungen der semi-quantitativen Untersuchung von Carnitine und Acylcarnitinen am LC-QQQ-MS ..... | 29 |
| 2.4.4 Datenpräprozessierung .....  | 31 |
| 2.4.4.1 Feature-Erkennung und Retentionszeitkorrektur .....  | 31 |
| 2.4.4.2 Annotation der detektierten features .....   | 32 |
| 2.4.4.3 Identifizierung der ausgemachten per Metaboliten .....   | 32 |
| 2.4.4.4 Metabolit-Profiling .....  | 34 |
| 2.5 JTK_CYCLE Analyse .....  | 37 |
| 3 Ergebnisse.....  | 38 |
| 3.1 Globales Metabotyping .....  | 38 |
| 3.1.1 Generelle Eigenschaften der untersuchten Fliegenstämme .....   | 38 |
| 3.1.2 Ungerichtete, vergleichende Metabolomanalyse von per <sup>01</sup> und WT <sub>CS</sub> Fliegen.....     | 39 |
| 3.1.2.1 Datenpräprozessierung und statistische Auswertung .....  | 40 |
| 3.1.2.3 Identifizierung der ausgemachten per Metaboliten .....   | 41 |
| 3.1.3 Metabolit-Profiling.....   | 43 |
| 3.1.3.1 Aminosäure profiling .....   | 43 |
| 3.1.3.2 Metabolit-Profiling der Mitglieder des Kynurenine-Stoffwechselweges .....                              | 46 |
| 3.1.3.3 Metabolit-Profiling der Mitglieder des Transsulfurierungs-Stoffwechselweg .....                        | 48 |
| 3.1.3.4 Metabolit-Profiling der Mitglieder des Purinmetabolismus .....   | 50 |
| 3.1.4 Lipid Profiling.....   | 53 |
| 3.1.4.1 Strukturlipide .....   | 54 |
| 3.1.4.2 Lipide des Energiestoffwechsels .....  | 57 |
| 3.1.4.2.1 Speicherlipide .....   | 57 |
| 3.1.4.2.2 Transportlipide (DAGs) .....   | 59 |
| 3.1.4.2.3 Carnitin und Acetylcarnitine .....   | 60 |
| 3.2 Tageszeitabhängige Schwankungen in Metabolitspiegeln .....   | 63 |
| 3.2.1 Ungerichtete Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in Metabolitspiegeln.....                      | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.2.2 Gerichtete Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in den Spiegeln der identifizierten per-Metaboliten.....                             | 65  |
| 3.2.2.1 Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in den Spiegeln der hydrophilen per-Metaboliten.....  | 66  |
| 3.2.2.2 Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in den Lipidspiegeln.....   | 69  |
| 3.2.2.2.1 Verhalten der gesamt- bzw. speziesspezifischen TAG-Spiegel über die Zeit   | 69  |
| 3.2.2.2.2 Verhalten der gesamt- bzw. speziesspezifischen DAG-Spiegel über die Zeit   | 72  |
| 3.2.2.2.3 Verhalten der gesamt- bzw. speziesspezifischen AC-Spiegel über die Zeit ..   | 73  |
| 3.2.2.2.4 Ist rhythmisches Verhalten der Carnitin Spiegel auch in WTCS Fliegen unter DD- bzw. per01 Fliegen unter LD-Bedingungen beobachtbar?..... | 75  |
| 4 Diskussion .....   | 81  |
| 4.1 Auswirkung der per-Mutation auf Anlage der Speichermoleküle .....  | 81  |
| 4.2 Wiederkehrende, tageszeitabhängige Schwankungen in Metabolitspiegeln .....   | 83  |
| 4.3 Einfluss der PER- abhängigen Uhr auf ausgemachte Stoffwechselwege .....  | 85  |
| 4.3.1 Methionin Metabolismus.....  | 85  |
| 4.3.2 Trp und der Kynureninstoffwechsel .....  | 86  |
| 4.3.3 Synthese von Neurotransmittern .....   | 87  |
| 4.4 Zusammenhang zwischen der inneren Uhr und dem Lipidmetabolismus .....  | 89  |
| 4.4.1 Auswirkungen auf die Intermediate der Lipidoxidation .....   | 89  |
| 4.4.2 Tageszeitabhängige Koordination des Lipidstoffwechsels .....   | 90  |
| 4.4.3 Rhythmen in ACs als direkte Folge von Futteraufnahme oder Aktivität? .....   | 92  |
| 4.5 Konstitutiv niedrigere AC-Spiegel als Folge von Hungerstress in per01? .....   | 93  |
| 4.6 Ausblick .....   | 95  |
| 5 Abkürzungsverzeichnis.....   | 96  |
| 6 Literaturverzeichnis.....  | 99  |
| 7 Anhang .....   | 112 |
| 7.1 Angehängte Abbildungen.....  | 112 |
| 7.2 Angehängte Tabellen .....  | 156 |
| Danksagung .....   | 197 |

Lebenslauf .....198  
Affidavit.....202  
Eidesstattliche Erklärung .....203

# 1 Einleitung

Schlafqualität, verbrannte Kalorien, Schrittzahl, Herzrate und optimaler Trainingsbereich, GPS-Standort, die heutigen Termine, ungelesene e-Mails und SMS, die aktuelle Wetterlage – all das kann ein Blick auf die Smartwatch verraten. Manche Modelle können sogar Herzrhythmusstörungen erkennen, den Blutdruck messen und Notrufe absetzen. Natürlich zeigen sie auch die Zeit an – aber das ist fast schon Nebensache. Die klassische Armbanduhr ist ein Auslaufmodell. Ja, sie wird noch getragen, aber dann doch eher als Modeaccessoire und Statussymbol. Ein Grund dafür ist sicherlich auch, dass die Tageszeit an sich nur noch eine untergeordnete Rolle in unserem Leben spielt. Freie Verfügbarkeit zu jeder Zeit – Unsere Tagesabläufe richten sich schon längst nicht mehr nach dem natürlichen Licht-Dunkel-Rhythmus. Wenn es dunkel wird, schalten wir das Licht an und dann geht es weiter.

Aber was macht das mit uns? Studien haben ergeben, dass bei Menschen, die Schichtarbeit leisten, das Erkrankungsrisiko für verschiedene Krebsarten, Magen-Darm- und metabolische Erkrankungen signifikant erhöht ist (Knutsson 2003; Sigurdardottir et al. 2012; Schernhammer et al. 2003; Tynes et al. 1996). Als ursächlich sehen die Forscher die ständige Desynchronisation zwischen dem gelebten und dem biologischen Tag, die bei Schichtarbeit zwangsläufig eintritt, wenn sich Phasen, in denen nachts gearbeitet und tagsüber geschlafen, mit Phasen, in denen „normal“ gearbeitet und geschlafen wird, unregelmäßig abwechseln.

Während dem gelebten Tag kaum noch Grenzen gesetzt sind, wird der biologische Tag bestimmt durch die innere Uhr. Bei jedem Lebewesen, von der Hefe bis zum Menschen, reguliert sie eine Vielzahl physiologischer Prozesse angefangen bei der Genexpression bis hin zum Metabolismus.

## 1.1 Die innere Uhr

Zuerst beschrieben wurde die innere Uhr im frühen 18. Jahrhundert durch den französischen Astronomen Jean Jacques d'Ortous De Mairan. Dieser konnte in einem Experiment beobachten, dass sich die Blätter der Pflanze *Mimosa pudica* zu einer bestimmten Tageszeit öffneten und einige Stunden später wieder schlossen, obwohl die Pflanze in einer abgedunkelten Box aufbewahrt wurde und somit Licht als Stimulus für das Öffnen bzw. Schließen ausgeschlossen werden konnte (Mairan 1729). Dennoch wiederholte sich der beschriebene Vorgang auf einer täglichen Basis. Ausgehend von dieser Beobachtung, konnte in weiteren Studien inzwischen für nahezu alle Organismen eine, dem Organismus innewohnende, Uhr nachgewiesen werden, die, aufgrund ihrer Periodenlänge von ungefähr 24 h, als circadiane Uhr (lat. circa diem, ungefähr ein Tag) bezeichnet wird.

Weisen endogene Prozesse, hervorgerufen durch diese Uhr, wiederkehrende, tageszeitabhängige Schwankungen auf, so spricht man von circadianen Rhythmen. Wie für Uhren typisch, wird die Zeitmessung durch die circadiane Uhr auch dann aufrechterhalten, wenn keine äußeren Einflussfaktoren, wie beispielsweise Licht, Wärme oder Sozialkontakt vorliegen. Die Bedingung in der keine Einflussfaktoren, auch Zeitgeber genannt, auf den Organismus einwirken, bezeichnet man als Freilauf. Unter Freilaufbedingungen ist das Verhalten der circadianen Uhr ähnlich dem einer klassischen Automatikuhr, deren Takt meist etwas schneller bzw. langsamer ist als exakt eine Sekunde. Dies führt dazu, dass ein Tag im Freilauf in den seltensten Fällen exakt 24h aufweist. Um dem entgegenzuwirken, müssen sowohl Automatikuhren als auch die circadiane Uhr immer wieder mit einem Zeitgeber abgeglichen werden. Dieser Vorgang wird bei der circadianen Uhr Entrainment genannt und ermöglicht es den Organismen, flexibel auf eine dauerhafte Veränderung im Licht-Dunkel Rhythmus zu reagieren.

Um zweifelsfrei bestimmen zu können, dass ein beobachteter Rhythmus tatsächlich durch die innere Uhr reguliert wird, müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein. 1. Fortlauf ohne externe Zeitgeber: Der Rhythmus setzt sich auch unter Freilaufbedingungen fort. 2. Entrainment: Der Rhythmus reagiert auf dauerhafte Veränderungen im Licht-Dunkel-Rhythmus und passt sich daran an. 3. Temperaturkompensation: Der Rhythmus ist unabhängig von der Temperatur und keine Folge von Temperaturschwankungen (PITTENDRIGH 1960; Aschoff 1965).

Die Prozesse, die von der inneren Uhr reguliert werden, sind vielfältig und lassen sich auf der Verhaltens- sowie der physiologischen und molekularen Ebene beobachten (Panda et al. 2002b). Hierzu zählen auf der physiologischen Ebene neben dem Schlafverhalten, zum Beispiel auch die tageszeitabhängige Schwankung von Hormonspiegeln und der Körpertemperatur (Refinetti 2010; Morris et al. 2012; Tsang et al. 2014).

„Social Jetlag“ (SJL) nennt man das Phänomen, wenn die innere Uhr um mehr als eine Stunde von der tatsächlichen Tageszeit verschoben ist. Angesichts der Vielzahl an Prozessen, die von der inneren Uhr beeinflusst werden, verwundert es nicht, dass eine dauerhaft gestörte innere Uhr sich negativ auf den Organismus auswirkt. Denn auch wenn sich die innere Uhr an Änderungen im Licht-Dunkel-Rhythmus anpassen kann, so sind dieser Anpassungsfähigkeit dennoch Grenzen gesetzt. Kommt es dauerhaft zu einer Desynchronisation zwischen dem gelebten und dem natürlichen Tag, können nicht nur Übergewicht und erhöhte Suchtanfälligkeit die Folge sein (Roenneberg et al. 2012; Wittmann et al. 2006), auch das Erkrankungsrisiko steigt – für Typ 2 Diabetes und das metabolische Syndrom ist es beispielsweise doppelt so hoch (Koopman et al. 2017). Dass manche Menschen stärker unter SJL leiden als andere, hängt damit zusammen, dass verschiedene Chronotypen existieren. Die beiden Extreme bezeichnet man dabei als Lerchentyp,

bei dem es sich um Frühaufsteher handelt und als Eulentyp, den Spätaufsteher. Während ersterer kein Problem mit einem frühen Arbeitsbeginn hat, führt dieser beim Eulentyp zum SJL.

Die Mechanismen, die beschreiben, von welchen Faktoren der Chronotyp abhängt und was die Grundlage der Korrelation von SJL mit den diversen Erkrankungen ist, sind noch weitestgehend unverstanden. Metabolomanalysen, die die Zusammenhänge der inneren Uhr näher untersuchen, könnten dazu beitragen, diese Unklarheiten besser zu verstehen. Hier setzt die vorliegende Arbeit an, indem sie im Modellorganismus *Drosophila* diejenigen Metabolitklassen und Stoffwechselwege identifizieren will, deren Regulation im Zusammenhang mit der inneren Uhr stehen.

## 1.2 Molekulare Grundlage der inneren Uhr

Die Grundlage für unser heutiges Verständnis der circadianen Uhr auf molekularer Ebene setzten Konopka und Benzer 1971 mit der Entdeckung des ersten Uhr-Gens in *Drosophila*, dem *period*-Gen. In einem *forward genetics approach* entdeckten sie Fliegen, die sich phänotypisch vom Wildtyp durch ein verändertes Schlupfverhalten der Puppen und durch eine veränderte Lokomotoraktivität im Freilauf auszeichneten. Dabei unterschieden sie zum einen zwischen Fliegen, deren periodisch wiederkehrendes Verhalten eine Periodendauer aufwies die kürzer (*per<sup>S</sup>*) bzw. länger (*per<sup>L</sup>*) als die des Wildtyps war. Zum anderen entdeckten sie eine Fliegenlinie, bei der sowohl das Schlupfverhalten als auch die Lokomotoraktivität unter Freilaufbedingungen komplett arrhythmisch war (*per<sup>01</sup>*). Die Unterschiede in der Periodendauer ließen sich auf die Mutation eines einzigen Gens zurückführen, das ausgehend von dieser Entdeckung *period* (*per*) genannt wurde. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der zugrunde liegende Mechanismus, der ein temporär koordiniertes Verhalten ermöglicht, sowohl vor, als auch nach der Metamorphose aktiv ist (Konopka und Benzer 1971).

Neben dem *per*-Gen und dem daraus resultierenden PER-Protein wurden in darauf aufbauenden Arbeiten, weitere Gene und Proteine identifiziert, die grundlegend an der Entstehung circadianer Rhythmen beteiligt sind. Diese werden allgemein als molekulare circadiane Oszillatoren bezeichnet. Ein streng reguliertes Zusammenspiel dieser Oszillatoren bildet hierbei die Grundlage der circadianen Uhr. In *Drosophila* handelt es sich bei diesen Oszillatoren neben *per* im Wesentlichen um die Uhr-Gene, *timeless* (*tim*), *clock* (*clk*) und *cycle* (*cyc*), die für die circadianen Oszillatorproteine, PER, TIM, CLK und CYC codieren. Sie bilden die Grundlage für zwei interagierende Rückkopplungsschleifen (Sehgal et al. 1994; Allada et al. 1998; Rutila et al. 1998). Das Heterodimer aus CLK und CYC, das über eine E-Box bindende Domäne verfügt und dadurch als Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl von Genen fungiert, bildet hierbei die aktivierende

Schleife. Unter den Genen, auf die CLK/CYC als Transkriptionsfaktor einwirkt, sind auch *per* und *tim* (Taylor und Hardin 2008). Deren Genprodukt, die Oszillatorproteine PER und TIM, heterodimerisieren nach der Translation im Cytoplasma und bilden die reprimierende Schleife. Für die Dimerisierung von PER und TIM ist zunächst die Phosphorylierung von TIM durch die Proteinkinase shaggy (SGG) nötig (Martinek et al. 2001). Die anschließende Bildung des Heterodimers verhindert, dass PER durch die Double-Time (DBT) Kinase phosphoryliert und anschließend durch das F-Box Protein SLIMB ubiquiniert wird, was zum Abbau von PER im Proteasom führen würde (Kloss et al. 1998; Price et al. 1998; Grima et al. 2002). Mit dem Erreichen eines Konzentrationsmaximums ca. 6h nach der Initiation der Transkription – was der Mitte der Dunkelperiode entspricht – wandern PER und TIM in den Nucleus, wo sie als Repressor auf den CLK/CYC Komplex wirken und somit die weitere Expression von *per* verhindern (Curtin et al. 1995; Meyer et al. 2006). Die Interaktion der beiden Rückkopplungsschleifen bildet letztendlich allerdings nur das Grundgerüst für eine rhythmische Genexpression. Zusätzlich kommt es phylaübergreifend durch verschiedene posttranslationale Modifikationen der umgebenden Histone (Brown 2011) und der Uhrproteine selbst zu einer weiteren Feintuning der circadianen Uhr und der rhythmischen Genexpression (Brown et al. 2012; Kojima et al. 2011). Gene, die eine durch die Uhr hervorgerufene, rhythmische Expression aufweisen werden auch als durch die Uhr regulierte Gene bezeichnet (engl. clock controlled genes; CCGs).

Das Prinzip der Transkriptionellen-Translationalen Rückkopplungsschleifen, wie für *Drosophila* vorgestellt, wird als Grundlage für circadiane Uhren in allen Modellsystemen angesehen (Brown et al. 2012). So finden sich im Säugersystem die Oszillatorproteine Period (PER 1-3) und Cryptochrom (CRY1, 2), die die Basis der negativen Rückkopplungsschleife bilden und so negativ auf die eigene Transkription einwirken. Demgegenüber steht das Heterodimer aus CLOCK und BMAL1/NPAS2 das unter anderem als Transkriptionsfaktor die Expression des *per*- und *cry*-Gens aber auch die Expression einer Reihe weiterer CCGs initiiert.

Einer der Hauptunterschiede zwischen *Drosophila*s molekularer Uhr und der von Säugern, liegt in der Funktionsweise von CRY. Während CRY im Säugersystem selbst als Uhrprotein fungiert, wird dessen Funktion in *Drosophila* durch TIM übernommen. CRY ermöglicht in *Drosophila* hingegen die Anpassung an Veränderungen im Licht:Dunkel Rhythmus, indem es als Blaulichtsensor fungiert (Stanewsky et al. 1998). Man geht davon aus, dass es in Folge einer Lichtperzeption von CRY, zu einem Abbau von TIM kommt. Dies führt dazu, dass durch Lichtblitze in *Drosophila* die innere Uhr zurückgesetzt werden kann und es zu Phasenverschiebungen in der Lokomotion und dem Schlupfverhalten kommt (Stanewsky et al. 1998; Busza et al. 2004).

### 1.3 Zentrale und periphere Uhren

*Drosophila*'s zentrale Uhr besteht aus etwa 150 Uhr-Neuronen, die in laterale und dorsale Neuronen (LNs und DNs) unterteilt werden. Eines der am besten auf neuronaler Ebene untersuchten circadianen Phänomene ist die Lokomotoraktivität. So konnte gezeigt werden, dass das klassische Aktivitätsprofil von *Drosophila* mit je einer Aktivitätsspitze am Morgen und am Abend durch ein Zusammenspiel verschiedener Uhr-Neuronen hervorgerufen wird. Grime et al. zeigten zuerst, dass die Morgenaktivität in *per*<sup>01</sup>-Fliegen wiederhergestellt werden kann, indem *per* ausschließlich in den kleinen, ventralen lateralen Neuronen (LNvs) exprimiert wird (Grima et al. 2004). Für die Abendaktivität hingegen, ist eine rhythmische Expression von *per* sowohl in den LNvs als auch in den kleinen, dorsalen lateralen Neuronen nötig (LNds) (Stoleru et al. 2004). Anschließende Untersuchungen zeigten, dass neben den LNvs und LNds weitere Neuronen für das Generieren der Morgen- bzw. Abendaktivität notwendig sind, was von Helfrich-Förster zusammengefasst wurde (Helfrich-Förster et al. 2007). Zu weiteren Verhaltensweisen, die in *Drosophila* von der zentralen Uhr abhängig sind, zählt das Schlupfverhalten, die Brautwerbung bzw. die Paarung, die Immunantwort, der Schlaf, das Erkennen von chemischen Stimuli und die Reaktion auf Licht sowie das Lernverhalten (zusammengefasst von: Allada und Chung 2010).

Neben der Expression der Uhr-Gene in den Uhr-Neuronen, konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass Uhr-Gene, allen voran *per*, nicht nur in den Uhr-Neuronen sondern auch in anderen Geweben, sowohl im Gehirn als auch im übrigen Körper, rhythmisch exprimiert werden (Saez und Young 1988; Liu et al. 1988). Diese Oszillationen werden auch dann aufrechterhalten, wenn unterschiedliche Gewebe (Kopf, Thorax, Abdomen) in Zellkultur gehalten werden und somit keine Verbindung zwischen der zentralen Uhr in den Uhr-Neuronen und den untersuchten Geweben besteht. Dies deutete erstmals darauf hin, dass es neben der zentralen Uhr in den Uhr-Neuronen, gewebespezifische, zellautonome periphere Uhren gibt (Plautz et al. 1997). Der Grad der Abhängigkeit der gewebespezifischen periphereren Uhren von der zentralen Uhr ist dabei unterschiedlich ausgeprägt. In *Drosophila* unterscheidet man periphere Uhren, wie die in den Malphigischen Gefäßen oder dem Fettkörper, die unabhängig von der zentralen Uhr sind, von solchen, bei denen die periphere Uhr direkt oder indirekt von der zentralen Uhr abhängt (Giebultowicz und Hege 1997; Hege et al. 1997; Myers et al. 2003; Krupp et al. 2008; Xu et al. 2008). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich das rhythmische, durch die innere Uhr gesteuerte, Fressverhalten der Fliegen ändert, wenn deren Fettkörper-Uhr gewebespezifisch ausgeknockt wird, während die ebenfalls circadiane, aber durch die Uhr-Neuronen gesteuerte Lokomotion der Fliegen ungestört fortgesetzt wird (Xu et al. 2008). Ein ähnlicher Effekt konnte auch in Mäusen nachgewiesen werden. Diese zeigten eine Verschiebung der Phase in der

Oszillation circadianer Regulatorgene, wenn sie dazu gezwungen wurden, zu einer für sie untypischen Zeit (während der Lichtphase) zu fressen (Damiola 2000; Stokkan et al. 2001).

#### 1.4 Einfluss der inneren Uhr auf die Genexpression

Da bekannt ist, dass die circadianen Regulator Proteine der aktivierenden Rückkopplungsschleife als Transkriptionsfaktor für die Expression einer Vielzahl von Genen verantwortlich sind, sollten diese CCGs in Transkriptionsstudien identifiziert werden. Hierfür wurden in *Drosophila* vier Micro-Array basierte Transkriptomstudien durchgeführt, bei denen eine Vielzahl an rhythmisch exprimierten Genen in *Drosophilaköpfen* detektiert wurden (Claridge-Chang et al. 2001; McDonald und Rosbash 2001; Lin et al. 2002; Ueda et al. 2002; Ceriani et al. 2002). Allerdings gab es nur eine geringe Übereinstimmung der rhythmisch exprimierten Gene zwischen diesen Studien.

Wie die anschließende Analyse in einer Metastudie zeigte, lagen die Ursachen der geringen Übereinstimmung der rhythmischen Transkripte primär in den sich unterscheidenden Algorithmen, die zur Detektion rhythmischer Expression herangezogen wurden und an der unterschiedlichen Produktion der Datensätze (Keegan et al. 2007). Die erneute Analyse der Daten im Rahmen derselben Metastudie bestätigte die rhythmische Expression von 81 Genen. Zusätzlich wurden dabei 133 bis dato nicht detektierte, rhythmisch exprimierte Transkripte entdeckt (Keegan et al. 2007). Der Großteil der hierbei detektierten rhythmischen Gene wurde in einer weiteren Transkriptomstudie als oszillierend detektiert (Rodriguez et al. 2013). Zusätzlich wurde bei einer Gene-Ontology-Analyse dieser Transkripte gezeigt, dass diese vermehrt mit bekannten circadianen Prozessen, dem Paarungsverhalten aber auch mit Glycosyltransferase-Aktivität und dem Gluthathionmetabolismus in Zusammenhang steht (Rodriguez et al. 2013).

In weiteren Studien konnte bei organspezifischen Untersuchungen des Fettkörpers, der der Leber und dem Fettgewebe im Säugersystem entspricht, gezeigt werden, dass neben den Uhr-Genen weitere Gene in diesem Gewebe rhythmisch exprimiert werden. Diese ließen sich verschiedenen physiologischen Funktionen zuordnen, zu denen der Lipidmetabolismus, der Steroidhormonmetabolismus aber auch die Immunfunktion und die Entgiftung zählen (Xu et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse erhielt man bei der Analyse oszillierender Transkripte in der Leber im Säugersystem (Akhtar et al. 2002; Kita et al. 2002; Panda et al. 2002a). Auch konnte von Green et al. nachgewiesen werden, dass die oszillierenden Transkripte eine bedeutende Rolle für metabolische Prozesse, wie den Cholesteroll- und Fettstoffwechsel, die Glykolyse und Glukoneogenese, die oxidative Phosphorylierung und die Entgiftung haben (Green et al. 2008). Im Detail weisen diese Studien darauf hin, dass die zeitliche Koordination des Lipidmetabolismus,

bestehend aus Lipidaufnahme, Lipidsynthese und Lipidabbau von hoher Bedeutung zu sein scheint, um eine optimale Energiehomöostase zu gewährleisten. Dafür spricht, dass die Expression von Genen die für bedeutende Enzyme im Lipidmetabolismus codieren, wie der Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase, der Adipozyten-Triglycerid-Lipase, der Diacylglycerol-O-Acyltransferase, der Hormonsensitiven Lipase und der Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT1), in verschiedenen Geweben circadian reguliert sind (Filiano et al. 2013; Alenghat et al. 2008b; Shostak et al. 2013; Tsai et al. 2010). Auch wenn sich in *Drosophila* Homologe für diese Enzyme finden lassen, bzw. bekannt ist, dass beispielsweise ein Zusammenspiel aus Brummer Lipase (BMM) und dem adipokinetischem Hormon die Rolle der Adipozyten-Triglycerid-Lipase übernehmen (Grönke et al. 2007), konnte im Gegensatz zum Säugersystem in *Drosophila* bisher keine eindeutige circadiane Regulation der entscheidenden, dem Lipidmetabolismus zugrunde liegenden Enzyme und deren Transkripte gezeigt werden.

## 1.5 Einfluss der inneren Uhr auf den Metabolismus

Ein weiteres Indiz für die enge Verknüpfung der inneren Uhr mit dem Metabolismus ist der von der inneren Uhr abhängige Rhythmus des Fressverhaltens. Die Futteraufnahme findet sowohl in *Drosophila*, als auch im Säugersystem vermehrt zu Beginn der Aktivitätsphase statt und lässt sich sowohl unter Licht-Dunkel (LD) als auch unter Dauer-Dunkel (DD) Bedingungen beobachten (Xu et al. 2008; Seay und Thummel 2011; Eckel-Mahan und Sassone-Corsi 2013).

In *Drosophila* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Blaulichtsensor CRY einen entscheidenden Einfluss auf die zeitliche Koordination der Futteraufnahme hat. Dieser unterdrückt unter LD-Bedingungen eine zweite Spitze der Nahrungsaufnahme am Ende des Tages, die zum einen im WT unter DD-Bedingungen und zum anderen in der *cry<sup>01</sup>*-Mutante, die kein funktionelles CRY mehr herstellen kann, zu beobachten ist (Seay und Thummel 2011). Da TIM am Ende der Lichtphase nicht detektierbar ist und die zweite Spitze in der Nahrungsaufnahme in der *tim<sup>01</sup>*-Mutante unter LD-Bedingungen nicht beobachtet werden konnte, schlussfolgerten die Autoren, dass diese nicht auf den lichtinitiierten Abbau von TIM durch CRY zurückzuführen ist, sondern durch einen anderen, von der inneren Uhr unabhängigen aber dennoch durch CRY vermittelten Mechanismus, vonstattengeht (Seay und Thummel 2011; Hunter-Ensor et al. 1996).

Eine weitere Verbindung zwischen innerer Uhr und dem Metabolismus konnte in der Leber von Säugern gezeigt werden, als nachgewiesen wurde, dass sowohl Nicotinamid Adenin Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) als auch das, für dessen Synthese über den Salvage Pathway limitierend wirkende Enzym, die Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase circadian reguliert sind (Ramsey et al. 2009; Nakahata et al. 2009). Das NAD<sup>+</sup>/NADH-System fungiert neben seiner Rolle als Elektronendonator

bzw. -akzeptor in katabolen Prozessen auch als Substrat für Sirtuine, eine Proteinklasse, die mono-ADP-Ribotransferase- oder Deacylase-Aktivität besitzen. Dabei ist die Rolle von NAD<sup>+</sup> als Substrat für Sirtuin-1 besonders hervorzuheben, da Sirt-1 in der Lage ist, die Funktion der Uhr durch Interaktion und Deacetylierung der Oszillatorproteine zu modulieren (Asher et al. 2008; Ramsey et al. 2009; Nakahata et al. 2009). Da die NAMP-abhängige NAD-Synthese durch den CLOCK:BMAL1-Komplex reguliert wird und NAD für die enzymatische Aktivität der Sirtuine unabdingbar ist, welche als Repressor auf den CLOCK:BMAL1-Komplex einwirken, kann dies als weitere circadianer Rückkopplungsschleife betrachtet werden, in der NAD als metabolischer Oszillator fungiert, der abhängig vom metabolischen Status der Zelle ist (Imai 2010).

Außerdem sind Sirtuine für die nährstoffabhängige Regulation des Metabolismus von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird ihnen eine mögliche Funktion bei der Verlängerung der Lebenserwartung hervorgerufen durch Kalorienrestriktion zugeschrieben. Diese und weitere Funktionen von Sirtuinen wurden bereits in mehreren Artikeln zusammengefasst und detailliert diskutiert, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen werden soll (Dali-Youcef et al. 2007; Schwer und Verdin 2008; Bordone und Guarente 2005; Milne und Denu 2008; Imai und Kiess 2009).

Interessanterweise konnte auch für NADPH, dem Redoxäquivalent, das im Gegensatz zu NAD an anabolen Reaktionen beteiligt ist, eine Bedeutung für die Funktionsweise der inneren Uhr nachgewiesen werden. Dabei wurde der Pentose-Phosphat-Pathway, eine Hauptquelle für NADPH, als bedeutender Regulator für Redox- und transkriptionelle Rhythmen ausgemacht. Wurde dieser pharmakologisch inhibiert, konnte eine verlängerte Periode von circadianen Rhythmen sowohl in Säugern als auch in *Drosophila* nachgewiesen werden (Rey et al. 2016).

#### 1.5.1 Einfluss von PER auf Metabolitpiegel

Bei Untersuchungen, die das Fressverhalten von *Drosophila* im Detail untersuchten, wurde nicht nur gezeigt, dass sich eine in ihrer Funktion gestörte Fettkörperuhr neben der zeitlichen Regulation der Futteraufnahme, auch auf die Menge an aufgenommenem Futter und letztendlich auf die Energiespeichermoleküle auswirkt (Xu et al. 2008). Fliegen ohne funktionelle Fettkörperuhr fressen zwar mehr als Kontrollfliegen, haben aber dennoch niedrigere Glykogenspiegel, welches die Speicherform der Kohlenhydrate darstellt. Außerdem weisen sie niedrigere Triacylglycerid- (TAG) Spiegel, die der Fliege als Lipidspeicher dienen, auf (Xu et al. 2008). Das ist besonders interessant, da berichtet wurde, dass Fliegen, deren Uhren im ganzen Organismus ausgeknockt sind, keinen offensichtlichen, diese Stoffklasse betreffenden, metabolischen Phänotyp zeigen (Sehgal 2016). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Zentrale und die Fettkörper-Uhr einen gegenteiligen Effekt auf die Anlage der Energiespeicher

aufweisen, welcher zur Folge hat, dass sich die Gesamtspiegel auf dem Level des Organismus nicht ändern (Xu et al. 2008; Xu et al. 2011; DiAngelo et al. 2011). Allerdings scheint dieser Effekt davon abzuhängen, wie die Uhr in ihrer Funktion gestört ist, da Seay und Thummel zeigen konnten, dass Fliegen deren innere Uhr im ganzen Organismus durch die Mutation des Uhr Gens *tim* gestört ist, signifikant niedrigere TAG-Spiegel und niedrigere Glykogenspiegel aufweisen als der verwendete Wildtyp (Seay und Thummel 2011).

Auch im Mausmodell konnten Auswirkungen einer im ganzen Organismus gestörten Uhr auf die TAG Spiegel gezeigt werden. Mäuse bei denen die Expression von *per2* (*per2*<sup>-/-</sup>) ausgeknockt ist, wiesen signifikant niedrigere Plasma-TAG-Spiegel auf (Adamovich et al. 2014) und Mäuse, bei denen neben dem *per2* gen auch das *per1* (*per1/2*<sup>-/-</sup>) Gen ausgeknockt ist, haben signifikant niedrigere TAG- Spiegel in der Leber (Grimaldi et al. 2010).

Die Erkenntnisse aus diesen Studien zeigen auf, dass Störungen der inneren Uhr auf diverse Arten Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege haben. Allerdings gibt es bisher kaum Studien, die Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt haben, ungerichtet Metaboliten und die dazugehörige Stoffwechselwege zu identifizieren, die durch die innere Uhr reguliert werden. So könnten neben dem Energiestoffwechsel andere Stoffwechselwege betroffen sein, die aufgrund der bisherigen, auf wenige Stoffklassen begrenzten, Analysen, nicht entdeckt werden konnten. Des Weiteren fehlen bisher Untersuchungen, die neben den Gesamtspiegeln der unterschiedlichen Lipidklassen die einzelnen Lipidspezies in den jeweiligen Klassen betrachten und quantifizieren. Dies ist notwendig, um beispielsweise im Fall von und DiAngelo *et al.*, die keinen Unterschied in den Gesamt-TAG-Spiegeln feststellen konnten, ausschließen zu können, dass es zu einem sogenannten Lipidremodelling kommt. So könnte es beispielsweise, trotz vergleichbarer gesamt TAG-Spiegel, zu einer Verschiebung von primär gesättigten, kurzkettigen TAGs, hin zu mehrfach ungesättigten, langkettigen TAGs kommen, wie es in *Drosophila* beispielsweise bei einer gestörten beta-Oxidation in den Peroxisomen der Fall ist (Faust et al. 2014).

### 1.5.2 Tageszeitabhängige Rhythmen in Metabolitspiegeln

Neben dem Vergleich von Uhr-Mutanten mit Wildtypfliegen auf dem Metabolomlevel ist eine weitere Möglichkeit den Einfluss der inneren Uhr auf den Metabolismus zu untersuchen, Metaboliten bzw. Metabolitklassen zu identifizieren, die wiederkehrende, tageszeitabhängige Schwankungen in ihren Spiegeln aufweisen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Glukosespiegel im Säugersystem derartige Rhythmen aufweisen. Da diese Rhythmen sowohl unter „ad libitum“ Fütterungsbedingungen als auch dann beobachtet werden konnten, wenn die

Tiere zum Fasten gezwungen wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine bloße Reaktion auf die Nahrungsaufnahme handelt (La Fleur et al. 1999; Bizot-Espiard et al. 1998). Dass diese tageszeitabhängigen Schwankungen von der Uhr abhängen, konnte anschließend dadurch bestätigt werden, dass diese nicht mehr beobachtet werden konnten, sobald die Verbindung zur zentralen Uhr – in Säugern im suprachiasmatischen Nucleus lokalisiert – unterbrochen wurde (La Fleur et al. 1999). Ähnlich verhielt es sich bei Untersuchungen die Glykogenspiegel betreffend. Auch hierbei konnte gezeigt werden, dass diese wiederkehrende Rhythmen aufweisen, die unabhängig von der Nahrungsaufnahme sind (Ishikawa und Shimazu 1976). Anschließende Arbeiten in *Drosophila* zeigten, dass diese Rhythmen nicht nur auf das Säugersystem begrenzt sind. So konnten Seay und Thummel beobachten, dass sowohl die Glykogen- als auch die Trehalosespiegel – *Drosophilas* Transportform des Zuckers in der Hämolymphe – wiederkehrende Rhythmen aufweisen (Seay und Thummel 2011).

Um ein umfassenderes Bild davon zu erhalten, welche Metaboliten neben den Kohlenhydraten oszillieren, wurden im Humansystem mehrere Studien durchgeführt, die sich auf die ungerichtete Analyse von rhythmischen Metaboliten im Plasma konzentrierten (Dallmann et al. 2012; Kasukawa et al. 2012; Ang et al. 2012; Chua et al. 2013). Hierbei wurden die Spiegel aller detektierbaren Metaboliten zu verschiedenen Zeitpunkten über den Tag gemessen und anschließend mittels statistischer Verfahren überprüft, welche Metaboliten einen wiederkehrenden täglichen Rhythmus aufweisen. Da sich die Studien in ihrem Aufbau unterschieden, ist es nicht verwunderlich, dass es deutliche Unterschiede bei den identifizierten, rhythmischen Metaboliten gab. Cortison und Cortisol, deren circadiane Rhythmik im Menschen zusammen mit der von Melatonin bereits seit den ersten Untersuchungen der inneren Uhr bekannt sind, waren die einzigen Metaboliten die in drei von vier Studien als rhythmisch identifiziert werden konnten. Dennoch ließen sich Metabolitklassen ausmachen, deren Spiegel in mehreren Experimenten als rhythmisch angesehen werden konnten. So wurden beispielsweise verschiedene Aminosäuren (engl.: amino acids; AAs) in allen drei Studien als rhythmisch detektiert, in denen hydrophile Komponenten analysiert wurden. Dies stimmt mit älteren Untersuchungen überein, in denen gezeigt werden konnte, dass im menschlichen Plasma AAs Konzentrationsunterschiede im Verlauf des Tages aufweisen (Wurtman et al. 1968). Am ausgeprägtesten waren diese Unterschiede für Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp), Phenylalanin (Phe), Methionin (Met), Cystein (Cys) und Isoleucin (Ile)(Wurtman et al. 1968). Dabei konnte damals schon gezeigt werden, dass es sich hierbei, ähnlich wie bei Glukose, nicht nur um eine direkte Reaktion auf die Nahrungsaufnahme handelt, da sich diese Rhythmen auch dann noch beobachten ließen, wenn die Probanden proteinfreie Nahrung zu sich nahmen. Allerdings konnte hierbei gezeigt werden, dass die Menge an aufgenommenem Protein durchaus einen Effekt auf

die unterschiedlichen Konzentrationen einiger AAs hat (Fernstrom et al. 1979). Nimmt man die beiden älteren und die drei neueren Studien zusammen, so ist die Gruppe der verzweigtkettigen AAs (engl.: branched-chain amino acids; BCAAs), bei denen es sich um Leucin (Leu), Isoleucin und Valin (Val) handelt, besonders auffällig. Variationen für Vertreter dieser Gruppe ließen sich sowohl in zwei der drei aktuellen Studien finden, die hydrophile Komponenten untersuchten, als auch in den vorher durchgeführten Studien. Des Weiteren lassen sich auch in Mäusen 24h-Rhythmen in den BCAA Spiegeln beobachten (Jeyaraj et al. 2012). Dies ist besonders interessant, da deren Katabolismus Substrate für die Gluconeogenese während Fastenperioden liefert und somit dazu beiträgt, die Versorgung des Organismus mit Glukose sicher zu stellen (Brosnan und Brosnan 2006; Fan et al. 2018).

Neben den AAs fällt bei näherer Betrachtung der vier Studien auf, dass sich in allen vier Studien Lipide finden lassen, die tageszeitabhängige Schwankungen aufweisen. Diese reichen von Strukturlipiden wie den Phosphatidylcholinen (PC), Phosphatidylethanolaminen (PE) und Sphingolipiden (SL), über Speicherlipide wie Triacylglyceride (TAG) und Diacylglyceride (DAG) bis hin zu Acylcarnitinen (AC) und freien Fettsäuren (FA) (siehe Übersicht von J Gooley 2014). Die tageszeitabhängigen Änderungen Letzterer stimmen mit Untersuchungen überein, die zeigten, dass sowohl im Menschen als auch in Nagern höhere Spiegel an freien FAs während der inaktiven Phase im Organismus vorhanden sind (Shostak et al. 2013; Stavinoha et al. 2004; Schlierf und Dorow 1973; Dallmann et al. 2012). Aber nicht nur für die tageszeitabhängigen Spiegel der FAs lassen sich weitere Studien finden, die diese Befunde bestätigen. Auch für die TAGs konnte beispielsweise in der Mausleber gezeigt werden, dass die Spiegel zahlreicher TAG-Spezies wiederkehrende tageszeitliche Rhythmen unter Freilaufbedingungen, mit einer Spitze in ihren Spiegeln um CT 8 (engl.: circadian time; CT) aufweisen (Adamovich et al. 2014). Dies ist besonders interessant, da im Fettkörper von *Drosophila*, dem Insektenanalogon zur Leber, bei ähnlichen Untersuchungen keine Rhythmen in den TAG-Spiegeln nachgewiesen werden konnten. Allerdings wurde in dieser Studie nur die Gesamtheit der TAGs betrachtet (DiAngelo et al. 2011). In einer anderen Studie von Katewa et al. ließen sich bei Anwendung einer speziellen Diät, durch die es zu einer Steigerung der Amplitude rhythmischer Oszillationen kommt, auf Ebene des Organismus in weiblichen Fliegen wiederkehrende Rhythmen in TAG-Spiegeln für einige TAG-Spezies beobachten. Allerdings zeigte sich hierbei, dass es bei den rhythmischen TAGs zwei Gruppen gab, die sich in ihrer Phase unterschieden (Katewa et al. 2016).

Ähnlich verhält es sich mit den ACs, die die Transportform aktivierter Fettsäuren über die Mitochondriale Membran darstellen, für die bereits vorher in humanen Serumproben tägliche Rhythmen festgestellt werden konnten (Thompson et al. 2012). Zusätzlich konnte dies in einer Studie von Rhoades et al., die darauf abzielte, circadian regulierte Metaboliten in

Drosophilakörpern zu detektieren, für einige AC-Spezies gezeigt werden (Rhoades et al. 2018). Bei dieser Studie handelt es sich, neben der von Gogna *et al.*, um die einzige, die, ähnlich wie in den vorgestellten Humanstudien, in *Drosophila* ungerichtet nach Metaboliten gesucht hat, die wiederkehrende, tageszeitabhängige Rhythmen aufweisen (Rhoades et al. 2018; Gogna et al. 2015). Im Gegensatz zu den Humanstudien, in denen tageszeitabhängige Änderungen in den Metabolitspiegeln organspezifisch untersucht wurden, fanden die Untersuchungen von Gogna *et al.* und Rhoades et al. auf dem Level des Organismus statt. So verwendete Gogna *et al.* ganze Fliegen und Rhoades et al. die Körper der Fliegen, bestehend aus Thorax und Abdomen. Erstere verwendeten 40 Fliegen pro Probe und 5 Replikate pro Zeitpunkt, wohingegen letztere zwölf Fliegen pro Probe bei zwei biologischen Replikaten verwendeten. Die Probennahme erfolgte in beiden Studien alle 2h (Gogna et al. 2015; Rhoades et al. 2018). Gogna et al. verwendeten neben dem Zeitgeber Licht zusätzlich Temperaturzyklen, führten - anders als Rhoades et al. - allerdings keine Versuche unter DD-Bedingungen durch. Trotz der Unterschiede im Aufbau des Experiments konnten beide Studien, ähnlich wie bei den humanen Plasmastudien, die Spiegel von AAs als rhythmisch ausgemacht werden. Allerdings unterschieden sich die rhythmischen Spezies zwischen beiden Studien. Des Weiteren fanden sich in beiden Studien Monosaccharide und Nucleotide unter den rhythmischen Metaboliten, sowie Metabolite, die mit dem Fettsäurestoffwechsel in Verbindung gebracht werden (FAs bei Gogna et al und ACs bei Rhoades et al.). Insgesamt fanden Gogna et al. für 14 Metabolite tageszeitabhängige Rhythmen in den Metabolitspiegeln, Rhoades et al. hingegen 34, von denen Fruktose, 3-Hydroxybutyrat, ein acetylierter Aminozucker, ein nicht näher identifiziertes Monosaccharid, Gluconsäure, Ribitol/Xylitol sowie Riboflavin ihre Rhythmik auch unter DD-Bedingungen aufrechterhielten.

## 1.6 Zielsetzung

Obwohl es sich bei *Drosophila* um den Organismus handelt, dessen innere Uhr auf molekularer Ebene wahrscheinlich mit am besten untersucht ist, ist bisher nur wenig über Stoffklassen bekannt, deren Metabolismus durch die innere Uhr kontrolliert wird.

Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine gestörte innere Uhr auf die Anlage der Energiespeicher auswirkt, inwiefern dies allerdings einen Einfluss auf dem intermediären Stoffwechsel hat, blieb bisher weitgehend unerforscht. Um diese Frage zu beantworten, sollten zunächst die globalen Metabolit-Profile von Fliegen mit einer auf molekularer Ebene gestörten inneren Uhr (*per<sup>01</sup>*) mit Fliegen, die über eine funktionale Uhr verfügen (CantonS), zu zwei Zeitpunkten verglichen werden. Hierfür sollten zunächst die Köpfe von den Körpern der Fliegen getrennt werden, um die Anzahl der zeitgleich untersuchten Gewebe und somit die Komplexität der Probe zu reduzieren. Beide Körperteile sollten sowohl auf kleine hydrophile als auch auf hydrophobe Metaboliten hin mittels UPLC-ESI-qTOF-MS untersucht werden. Metaboliten, deren Spiegel signifikante Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp aufweisen, sollen anschließend identifiziert und Stoffwechselwegen zugeordnet werden.

In den bisher bereits durchgeführten Studien, die sich auf die Unterschiede in der Anlage der Energiespeicher konzentrierten, wurden bei der Analyse der TAGs lediglich die Gesamtspiegel zwischen Mutante und Wildtyp verglichen. Um zu untersuchen, ob es im Zuge einer fehlenden zeitlichen Koordination des Lipidstoffwechsels zu einer Verschiebung in den Konzentrationen der einzelnen TAG-Spezies kommt, die sich nicht zwangsläufig in der Gesamtmenge an TAGs widerspiegeln muss, bedarf es allerdings einer gezielten Identifikation und Quantifizierung aller detektierbaren Spezies, was als Lipidprofiling bezeichnet wird. Im Zuge dieser Arbeit sollte dieses Lipidprofiling nicht nur für die Speicherform der Lipide, die TAGs, sondern zusätzlich auch für die Transportformen, die DAGs und ACs sowie für die Phospholipide, PEs und PCs, die primär als Strukturlipide fungieren, durchgeführt werden.

Neben dem Vergleich von gesunden Fliegen mit solchen, deren innere Uhr in ihrer Funktion gestört ist, ist eine weitere Möglichkeit den Einfluss der inneren Uhr auf den Stoffwechsel zu untersuchen, die Identifikation von Metaboliten, die tageszeitliche Schwankungen in ihren Spiegeln aufweisen. Aus bereits durchgeführten Studien weiß man, dass sich solche rhythmischen Metaboliten auf der Ebene des Organismus, also durch die Analyse ganzer Fliegen bzw. ganzer Körperteile, in *Drosophila* detektieren lassen (Rhoades et al. 2018; Gogna et al. 2015). Allerdings unterschieden sich diese Studien stark in ihrer Durchführung und konnten jeweils nur eine geringe Anzahl an eindeutig rhythmischen Metaboliten identifizieren. Deshalb sollten in dieser Arbeit unter Zuhilfenahme einer ungerichteten Metabolomanalyse rhythmische

Metaboliten sowohl in Kopf- als auch in Körperproben herausgefiltert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Metaboliten bzw. die Metabolitklassen, die sich zwischen der Uhr-Mutante und dem Wildtyp unterscheiden, solche tageszeitabhängigen Rhythmen aufweisen. Mit dieser Vorgehensweise soll für die entsprechenden Metabolitklassen, eine Abhängigkeit der zugrundeliegenden Stoffwechselwege von der inneren Uhr gezeigt werden.

Abschließend sollte, für die Metabolitklasse bei der diese Abhängigkeit am stärksten ausgeprägt erscheint, untersucht werden, ob die detektierten Rhythmen auch unter Freilaufbedingungen aufrecht erhalten bleiben und wie sich diese Rhythmen in der Uhr-Mutante *per<sup>01</sup>* verhalten.

Dies soll schließlich Rückschlüsse darauf zulassen, welche weiteren Metabolitklassen und Stoffwechselwege in *Drosophila* durch die innere Uhr beeinflusst werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Fliegenstämme und Aufzucht

#### 2.1.1 Stämme

Bei den für diese Arbeit verwendeten *Drosophila melanogaster* Stämmen wurden Wildtyp Canton-S (WT<sub>CS</sub>) und *w<sup>+</sup> per<sup>01</sup>* (*per<sup>01</sup>*) Fliegen (Greenacre et al. 1993; Vanin et al. 2012) verwendet. Bei *per<sup>01</sup>* handelt es sich um eine Uhr-Mutante, die aufgrund einer Nonsense-Mutation kein funktionstüchtiges PER Protein bilden kann. Diese Uhr-Mutante wurde gewählt, da die Folgen dieser Mutation bereits ausgiebig auf der Verhaltens- und Physiologischen-Ebene untersucht und beschrieben wurden (Peschel und Helfrich-Förster 2011).

Die Aufzucht der Fliegen erfolgte unter 12h:12h LD-Bedingungen (Lichtintensität während der Lichtphase: 100 Lux) in Klimakammern bei einer Temperatur von 25°C ± 0.2°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% ± 5% unter *ad-libidum* Fütterungsbedingungen. Dabei stand den Fliegen Standardmedium zur Verfügung, das sich aus den folgenden Bestandteilen zusammensetzt: 8.0% Malzextrakt, 8.0% Maismehl, 2.2% Zuckerrübensirup, 1.8% Hefe, 1.0% Sojamehl, 0.8% Agar-Agar und 0.3% Hydroxybenzoesäure in ddH<sub>2</sub>O.

#### 2.1.2 Entrainment-Bedingungen und Probennahme

Um das Alter der verwendeten Fliegen genau bestimmen zu können, wurden Fliegen zur Eiablage für 24h auf frisches Medium transferiert. Nach 12 Tagen wurden alle, bis dahin bereits geschlüpften, Fliegen entfernt, sodass am dreizehnten Tag alle frisch geschlüpften Fliegen dasselbe Alter besaßen. Anschließend wurden jeweils 20 männliche Fliegen in frischen Aufzuchtbehältern in Licht/Dunkel-Kammern (12:12h Licht/Dunkel-Rhythmus) überführt, in denen sie für drei Tage an den LD Rhythmus gewöhnt wurden (20 °C; 60 % rLF; 100 Lux). Anschließend wurden die Fliegen i) unter LD Bedingungen zum Zeitpunkt ZT6 und ZT18, ii) unter LD Bedingungen in 2h Intervallen über drei Tage jeweils vom Zeitpunkt ZT0 bis ZT22 oder iii) unter DD Bedingungen in 2h Intervallen für zwei Tage in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C eingelagert.

### 2.2 Bestimmung grundlegender Eigenschaften

#### 2.2.1 Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts

Die Bestimmung des Frischgewichtes erfolgte durch Einwaage von 250 Fliegen mittels einer Feinwaage (XPE 205 Delta Range, Mettler Toledo). Anschließend wurden die Proben für 72h lyophilisiert (Alpha 1-4 LSC, Christ) bevor das Trockengewicht durch Einwaage erneut bestimmt wurde.

## 2.2.2 Gesamtprotein

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte unter Verwendung des Bradford-Tests. Hierbei wurden fünf Fliegen pro Probe vereint und zunächst mit 400 µl Wasser in der Schwingmühle (23 Hz für 5 min) aufgeschlossen, bevor die Extraktion im Ultraschallbad (10 min) durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet unter identischen Bedingungen mit 400 µl 0.1 M NaOH re-extrahiert. 10 µl der so erhaltenen Proben wurden anschließend mit dem Bradford-Reagenz versetzt und der Proteingehalt bestimmt, indem die Extinktion bei 595 nm bestimmt und mit einer BSA- Kalibriergerade abgeglichen wurde.

## 2.3 Probenvorbereitung LC-MS

Vor den anschließend aufgeführten Extraktionsmethoden wurden die tiefgefrorenen Fliegen unter Zuhilfenahme eines Vortex Genie2 in Köpfe und Körper geteilt. Die Trennung beruhte hierbei auf dem, durch die Rotationskraft herbeigeführtem, Bruch des Zervix. Anschließend wurden, auf einem Edelstahlblock der auf ca. -60 °C herabgekühlt wurde, jeweils fünf Köpfe/Körper pro Probe vereinigt und in ein vorgekühltes Mikroschraubdeckelgefäß überführt. Daraus resultierte eine Anzahl von fünf Replikaten pro Zeitpunkt und Körperteil.

### 2.3.1 Ungerichtete Analyse der hydrophilen und lipophilen Metaboliten

Für das Vorexperiment (E1), bei dem das Hauptaugenmerk auf der Analyse kleiner hydrophiler Metaboliten lag, die sich zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen in ihren Spiegeln unterscheiden, wurde eine methanolische Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde zu den fünf Köpfen/Körpern 200/400µl eiskaltes Methanol und zwei Zirkoniumdioxid-Mahlkugeln (Ø 3 mm) gegeben, bevor der Probenaufschluss in der Schwingmühle stattfand (23 Hz, 5 min). Nach der anschließenden Extraktion der Metaboliten im Ultraschallbad (10 min) wurden die Proben zunächst für 10 min auf Eis inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu fällen und im Anschluss zentrifugiert, um die unlöslichen Fliegenbestandteile und die gefällten Proteine zu pelletieren (10 min, 11,363 g). Abschließend wurden 75 µl in ein Messgefäß für die anschließende Analyse überführt.

Die Bestätigung (E2) der hierbei gefundenen *per*-Metaboliten erfolgte unter Zuhilfenahme einer methyl-*tert*-butyl-Ether basierten, flüssig-flüssig-Extraktion, die von Matyash et al. übernommen und angepasst wurde (Matyash et al. 2008). Diese ermöglichte neben der Analyse kleiner hydrophiler Metabolite auch die Analyse hydrophober Metaboliten. Hierfür wurden zunächst ebenfalls zwei Zirkoniumdioxid-Mahlkugeln (Ø 3 mm) und 200/400 µl eiskaltes Methanol, welches die verwendeten internen Standards enthielt (TAG(30:0), PE(34:0), PC(34:0) (Larodan), <sup>13</sup>C<sub>1</sub>D<sub>4</sub>-Arginin, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Phenylalanin, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Tyrosin, D<sub>3</sub>-Glutaminsäure, D<sub>3</sub>-Methionin, D<sub>8</sub>-Valin (Cambridge

Isotope Laboratories)), zu den Kopf-/Körperproben gegeben. Nach dem Probenaufschluss in der Schwingmühle (23 Hz, 5 min) und der anschließenden Metabolitextraktion im Ultraschallbad (10 min) wurden zusätzlich 1 ml methyl-*tert*-butyl-Ether und 250 µl Wasser zu den Proben gegeben bevor diese für 1 h in einem überkopf-drehenden Reagenzglas-Rotator bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben für weiter 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Phasentrennung mittels Zentrifugation vorgenommen wurde (11,363 g, 10 min; 5424, Eppendorf). Abschließend wurde die komplette organische Phase (1000 µl) und 600 µl der wässrigen Phase, jeweils in neue Reaktionsgefäße überführt und in einem Vakuumrotationsverdampfer (RVC 2-18, Christ) über Nacht bis zur Trockene eingeeengt (40 °C). Für die Analyse wurden die Kopf- und Körperproben der organischen Phase in 100 µl Isopropanol wiedergelöst. Die Kopfproben der wässrigen Phase wurden in 75 µl, die Körperproben in 150 µl, 80% Methanol mit 0.1% Ameisensäure wiedergelöst. Die Endkonzentration der verwendeten internen Standards betrug für TAG(30:0) 1ng/µl, PE(34:0) 10ng/µl, PC (34:0) 10ng/µl, <sup>13</sup>C<sub>1</sub>D<sub>4</sub>-Arginin 5µM, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Phenylalanin 5µM, <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Tyrosin 5µM, D<sub>3</sub>-Glutaminsäure 5µM, D<sub>3</sub>-Methionin 5µM, D<sub>8</sub>-Valin 5µM. Die wiedergelösten Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt und erst unmittelbar vor der Analyse in Messgefäße überführt.

### 2.3.2 Gerichtete Carnitin- und Acylcarnitinanalyse

Für die gerichtete Analyse der Carnitine wurde eine methanolische Probenextraktion durchgeführt, da bei der Zwei-Phasen-Extraktion besonders die langkettigen ACs aufgrund ihres amphiphilen Charakters in beiden Phasen zu finden waren. Der Ablauf war hierbei gleich der in 2.3.1 beschriebenen Aufarbeitung von E1. Allerdings enthielt das Methanol, das als Extraktionslösemittel verwendet wurde, neben den internen Standards (vgl. 2.4.4) zusätzlich 10 mM Ammoniumacetat und 0.3% Ameisensäure. Zusätzlich wurden die Proben nach der Aufarbeitung in einem Vakuumrotationsverdampfer über Nacht bis zur Trockene eingeeengt (40 °C) und in 95% Acetonitril das ebenfalls 10mM Ammoniumacetate und 0.3% Ameisensäure enthielt, im gleichen Volumen wiedergelöst.

## 2.4 LC-MS Analyse

### 2.4.1 Allgemeine Probeneingabe

Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde ausschließlich im positiven Ionisationsmodus durchgeführt (ESI +) und die Kopf- und Körperproben wurden in getrennten Chargen vermessen. Für den ungerichteten Vergleich zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> wurden alle Replikate der beiden Genotypen und der beiden Zeitpunkte vor dem Messen randomisiert. Zusätzlich wurde eine Qualitätskontrolle (engl.: quality control), für welche 5 µl aller Kopf- bzw.

Körperproben vereinigt wurden, nach jeder siebten Probe gemessen, um die Geräteperformance überwachen zu können.

Bei der Analyse der tageszeitabhängigen Spiegel wurden die Proben nach Replikaten getrennt, semi-randomisiert und vermessen. Eine Charge bestand folglich aus einem Replikat der 36 Kopf-/Körperproben (12 Zeitpunkt/Tag; 3 Tage). Zusätzlich wurden erneut QC-Proben nach jeder siebten Probe vermessen.

## 2.4.2 Chromatographische Bedingungen

### 2.4.2.1 Ungerichtete Analyse

Für die ungerichtete Metabolomanalyse wurden die Proben im Gerät bei einer Temperatur von 5 °C aufbewahrt. Pro Analyse wurden jeweils 5 µl der entsprechenden Probe auf die jeweilige Säule injiziert und mittels einer Aquity™ Ultra performance LC (Waters) getrennt bevor die massenspektrometrische Analyse mittels eines Synapt G2 HDMS qTOF-Massenspektrometers (Waters) durchgeführt wurde.

#### 2.4.2.1.1 Organische Phase

Die in der organischen Phase gelösten Metaboliten wurden auf einer UPLC® BEH C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, USA) Säule unter Zuhilfenahme eines binären Gradienten getrennt (Mueller et al. 2015). Die Flussrate betrug hierbei 0.3 ml/min der prozentuale Anteil von Eluent B an der mobilen Phase wurde über 10 min von 30 auf 100% erhöht. Die Säulentemperatur betrug 60 °C. Eluent A bestand aus 10 mM Ammoniumacetat gelöst in einer Wasser/Acetonitril-Mischung (40:60, v/v), Eluent B aus 10 mM Ammoniumacetat gelöst in einer Isopropanol/Acetonitril-Mischung (90:10, v/v).

#### 2.4.2.1.2 Wässrige Phase

Die in der wässrigen Phase gelösten Metaboliten wurden mit einer Methode, die in leicht abgeänderter Form von Zhang et al. übernommen wurde, chromatographisch getrennt (Zhang et al. 2014). Bei der stationären Phase handelte es sich hierbei um eine SeQuant® ZIC®-HILIC Säule (2.1 mm x 150 mm, 3.5 µm, 100Å, Merck, Darmstadt, Germany) und für die mobile Phase wurde erneut ein binärer Gradient verwendet. Dabei wurde der prozentuale Anteil an Eluent B über 15 min von 80 auf 20% reduziert. Die Säulentemperatur betrug 30 °C und die Flussrate lag ebenfalls bei 0.3 ml/min. Bei Eluent A handelte es sich um 0.1% Ameisensäure in Wasser, bei Eluent B um 0.08% Ameisensäure in Acetonitril.

#### 2.4.2.2 Gerichtete Analyse der Carnitine

Für die chromatographische Trennung von Carnitin und den Acylcarnitinen wurden jeweils 2.5 µl pro Kopf- und 0.5 µl pro Körperprobe auf eine UPLC® BEH Amide (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, USA) Säule injiziert, die auf 30 °C beheizt wurde. Bei der verwendeten LC handelte es sich ebenfalls um eine Aquity™ Ultra performance LC. Der binäre Lösemittelgradient begann mit 95 % Eluent B und endete nach 5 min bei 50 % Eluent B. Eluent A bestand aus 10 mM Ammoniumacetat und 0.3% Ameisensäure in Wasser, Eluent B aus 10 mM Ammoniumacetat und 0.3% Ameisensäure in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch (5:95, v/v) (adaptiert von Kivilompolo *et al.* 2013). Die Analyse der Proben erfolgte an einem 6500+ „triple Quadrupol“- (QQQ) Massenspektrometer (AB Sciex).

#### 2.4.3 MS -Bedingungen

##### 2.4.3.1 MS-Bedingungen der qualitativen Untersuchung am LC-qTOF-MS

Nach der chromatographischen Auftrennung der Metaboliten erfolgte die Ionisation der Metaboliten mittels einer Elektronenspray-Quelle und anschließend die massenspektrometrische Analyse mittels eines Flugzeitmassenanalysators (engl.: time of flight detector; TOF). Hierbei an die Elektronenspray-Quelle eine Kapillarspannung von 0.8/1.5 kV für die organische/wässrige Phase angelegt, die Spannung am Probenkonus betrug 25/30 (organisch/wässrig) und die am Extraktionskonus 4 V. Die Temperatur der Quelle betrug 120 °C und Stickstoff wurde als Desolvatisierungsgas eingesetzt (800 L/h; 350 °C). Die Daten wurden im „centroid“-Modus für den Massenbereich von 50 – 1200 Da aufgenommen. Zur Identifizierung wurden QC-Proben zusätzlich im MS<sup>E</sup>- Modus gemessen.

Vor jeder Messsequenz wurde das Gerät mit Natriumformiat (20 mM in Acetonitril/H<sub>2</sub>O 50:50, v/v) kalibriert. Zusätzlich wurde eine interne Kalibration während der Messungen mittels Leucin-Enkephalin durchgeführt.

##### 2.4.3.2 MS-Bedingungen der semi-quantitativen Untersuchung von Carnitine und Acylcarnitinen am LC-QQQ-MS

Nach der Auftrennung der Carnitine wurden diese ebenfalls mittels einer Elektronenspray-Quelle ionisiert. Die anschließende massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem Sciex 6500+ QQQ Massenspektrometer, das über drei in Folge geschaltete Quadrupol Massenanalysatoren verfügt. Das Verfahren, das bei dieser Arbeit angewandt wurde, wird als „multi reaction monitoring“ (MRM) bezeichnet. Bei einem MRM-Experiment wird im ersten Quadrupol das Masse zu Ladung (m/z) Verhältnis selektiert, das dem Molekülion entspricht, bevor es im zweiten Quadrupol mit einem Kollisionsgas interagiert, was zur Bildung von molekülspezifischen Fragmenten führt (engl.:

collision induced fragmentation; CID). Im dritten Quadrupol wird anschließend das m/z- Verhältnis des spezifischen Fragmentes isoliert, welches anschließend auf den Detektor trifft und das zur Quantifizierung herangezogene Signal erzeugt. Aufgrund dessen, dass nur die spezifisch, von dem Molekül selbst gebildeten Ionen, auf den Detektor auftreffen wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis optimiert und somit die Sensitivität gesteigert. Die Massenübergänge, bestehend aus dem m/z-Verhältnis des Molekülions und des, zur Quantifizierung herangezogenen Fragmentes, sowie die spezifische Kollisionsenergie (CE) und des „declustering potential“ (DP) sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Analytspezifische Massenübergänge und verwendete Spannungen für die AC-Analyse**

| Analyt                                     | m/z-Verhältnis Molekülion | m/z-Verhältnis Fragmention | DP [V] | CE [eV] |
|--|---------------------------|----------------------------|--------|---------|
| [Carnitin+H] <sup>+</sup>                  | 162.1                     | 85.2                       | 61     | 27      |
| [AC(2:0)+H] <sup>+</sup>                   | 204.1                     | 85.2                       | 41     | 25      |
| [AC(3:0)+H] <sup>+</sup>                   | 218.1                     | 85.2                       | 56     | 23      |
| [AC(4:0)+H] <sup>+</sup>                   | 232.1                     | 85.2                       | 61     | 25      |
| [AC(12:0)+H] <sup>+</sup>                  | 344.3                     | 85.2                       | 81     | 27      |
| [AC(14:1)+H] <sup>+</sup>                  | 370.3                     | 85.2                       | 62     | 25      |
| [AC(14:0)+H] <sup>+</sup>                  | 372.3                     | 85.2                       | 62     | 25      |
| [AC(16:1)+H] <sup>+</sup>                  | 398.3                     | 85.2                       | 62     | 25      |
| [AC(16:0)+H] <sup>+</sup>                  | 400.3                     | 85.2                       | 71     | 31      |
| [AC(18:2)+H] <sup>+</sup>                  | 424.3                     | 85.2                       | 62     | 25      |
| [AC(18:1)+H] <sup>+</sup>                  | 426.4                     | 85.2                       | 62     | 25      |
| [AC(18:0)+H] <sup>+</sup>                  | 428.4                     | 85.2                       | 62     | 25      |
| [D <sub>9</sub> -carnitine+H] <sup>+</sup> | 171.1                     | 85.2                       | 61     | 21      |
| [D <sub>3</sub> -AC(4:0)+H] <sup>+</sup>   | 235.1                     | 85.2                       | 56     | 25      |
| [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 403.3                     | 85.2                       | 76     | 29      |

Die Kapilarspannung an der Elektronenspray-Quelle betrug 2 kV und sowohl die Eingangsspannung am Konus (engl.: entrance potential) als auch die Ausgangsspannung an der Kollisionszelle (engl.: collision cell exit potential) betrug 10 V. Die Quelltemperatur lag bei 700

°C und Stickstoff wurde als Gas in der Ionenquelle (70 L/h sowohl für Gas 1 als auch Gas 2, engl.: ion source gas) und als Gegenstromgas (30 L/h, engl.: curtain gas) verwendet.

## 2.4.4 Datenpräprozessierung

### 2.4.4.1 Feature-Erkennung und Retentionszeitkorrektur

Von besonderer Bedeutung für die Auswertung ungerichteter Metabolomanalysen ist das Präprozessieren der Messungen, dessen Ziel das zuverlässige Erkennen von Peaks und deren Gruppierung als features ist. Wird ein m/z-Verhältnis in aufeinanderfolgenden Scans jeweils mit einer bestimmten Intensität detektiert, so spricht man von einem Peak. Da jedoch auch bei hochauflösenden Massenspektrometern in aufeinanderfolgenden Scans meist nicht das exakte selbe m/z-Verhältnis gemessen wird, muss vorher ein gerätespezifischer, erlaubter Massenfehler definiert werden. Des Weiteren muss die Anzahl der aufeinanderfolgenden Scans in denen das m/z detektiert und die Intensität, die es dabei aufweisen muss, um als Peak angesehen zu werden, vor dem Präprozessieren festgelegt werden. Wird ein Peak nicht nur in einem Replikat, sondern in mehreren Replikaten einer Probengruppe (z.B. WT<sub>CS</sub> Kopf ZT6) zur selben Retentionszeit (Rt) detektiert, wird in dieser Arbeit von einem feature gesprochen. Auch hier muss vorher definiert werden, in wie vielen, der gemessenen Replikate der Peak detektiert werden muss und wie groß die Abweichung der Rt sein darf, damit ein Peak in die finale Featuretabelle aufgenommen wird. Ein Feature ist folglich eindeutig durch sein m/z und seine Rt definiert. Da es aufgrund minimal wechselnder chromatographischer Bedingungen zu Verschiebungen in der Rt kommen kann, wurde zusätzlich eine Rt-Korrektur durchgeführt. Die Wahl geeigneter Parameter bei der Präprozessierung ist essentiell, um qualitativ hochwertige Daten zu erhalten, die eine aussagekräftige statistische Analyse zulassen. Neben der Herstellerspezifischen Präprozessierungssoftware gibt es eine Vielzahl frei erhältlicher, meist R oder Python basierte Pakete, die für diesen Zweck entwickelt wurden. In dieser Arbeit wurde das R (Version: 3.4.3 (2017-11-30)) Paket „xcms“ (Version: 1.44.0) verwendet. „xcms“ besitzt gegenüber herstellerspezifischer Software, wie z.B. Progenesis Qi von Waters, unter anderem den Vorteil, dass es über ein breites Spektrum an Einstellungsmöglichkeiten verfügt, was ein uneingeschränktes Anpassen und optimieren der entscheidenden Parameter an die Analysebedingungen ermöglicht. Die Wahl geeigneter Parameter ist hierbei vom Aufbau des Experiments, der Probenmatrix und gerätespezifischen Faktoren abhängig. Die verwendeten Präprozessierungsparameter für die HILIC – Methode (vgl. 2.4.2.1.2) wurden bereits im Rahmen vorausgehender Arbeiten optimiert (Schaebler 2014) und für die vorliegende Arbeit dahingehend angepasst, dass die maximale Peakbreite auf 60 s verlängert und das Signal zu Rausch Verhältnis auf 10 reduziert wurde. Für die Präprozessierung der organischen Phase, die mit Hilfe der Lipid-

Methode (vgl. 2.4.2.1.1) analysiert wurde, wurde das Signal zu Rausch Verhältnis bei 25 belassen, die maximale Peakbreite allerdings auf 15 s reduziert. Dies war nötig, da es sich bei der verwendeten C18 Säule, anders als bei der HILIC Säule, um eine UPLC Säule mit einem Partikelmaterial kleiner 2  $\mu\text{m}$  handelt, was eine höhere chromatographische Auflösung und somit schärfere Peaks zur Folge hat.

#### 2.4.4 .2 Annotation der detektierten features

Bei der ES – Ionisation kommt es neben der Ionisation des Moleküls häufig zusätzlich zur Bildung von Addukten und/oder „in-source“-Fragmenten. Somit wird ein Metabolit in der Regel durch mehrere features repräsentiert. Da diese allerdings für die statistische Auswertung nicht von Bedeutung sind, ist eine Gruppierung der detektierten features in sogenannte feature- Gruppen notwendig. Hierbei werden jene features zusammengefasst, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von ein- und demselben Metaboliten abstammen. Diese Gruppierung und eine zusätzliche Annotation der gruppierten features wurde in der vorliegenden Arbeit durch das R-Paket „CAMERA“ (Version: 1.24.0) durchgeführt (vgl. Angehängte Tabelle 1). Die Gruppierung beruht hierbei auf einem Abgleich der Elutionsprofile – repräsentiert durch Peakform, Peakbreite und  $R_t$  – der detektierten features. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass Addukte, Fragmente oder Isotopenpeaks nur dann gebildet werden bzw. vorliegen können, wenn auch das Molekül-Ion vorliegt, da Fragmente und Addukte bei der ES-Ionisation ausgehend vom Molekül-Ion gebildet werden. Ebenso verhält es sich mit den Isotopenpeaks, bei denen ein oder mehrere C12 Kohlenstoffatom/e, durch ein oder mehrere C13 Kohlenstoffatom/e ausgetauscht ist. Da diese Isotopenpeaks für die Analyse nicht von Relevanz sind wurde zusätzlich eine Deisotopierung durchgeführt.

#### 2.4.4.3 Identifizierung der ausgemachten per Metaboliten

Für die Identifizierung wurden jene feature – Gruppen herausgefiltert, deren Peakfläche sich signifikant (Signifikanzniveau:  $p < 0.05$ ) zwischen  $per^{01}$  und  $WT_{CS}$  unterschieden. Hierfür wurde die in „CAMERA“ implementierte Wrapper-Funktion verwendet, die es ermöglicht eine univariate statistische Analyse mit der Annotierung der features in einem Prozessierungsschritt zu kombinieren. Zur statistischen Analyse dient hierbei die „xcms“ Funktion „diffreport“, welcher eine Welch's zwei Stichproben t-Statistik zugrunde liegt. Hierdurch wurden jene features herausgefiltert, bei denen ein körperteilabhängiger, zeitpunktspezifischer, statistisch signifikanter Unterschied zwischen  $per^{01}$  und  $WT_{CS}$  bestand. Die so gefilterten features werden im weiteren Verlauf als *per*-Metaboliten, die bis dato lediglich durch ihr  $m/z$ -Verhältnis und ihre  $R_t$  beschrieben sind, bezeichnet. Da die Identifikation von Molekülen mittels LC-MS ein zeitaufwendiger und arbeitsintensiver Prozess ist, wurden nur jene *per*-Metaboliten als biologisch relevant betrachtet und anschließend identifiziert, die sich in beiden Experimenten (E1 und E2) signifikant zwischen

Uhr-Mutante und dem WT<sub>CS</sub> unterschieden. Hierdurch sollte vermieden werden, dass feature Gruppen für die Identifizierung in Betracht gezogen werden, deren Unterschiede möglicherweise experimentell und nicht biologisch bedingt sind. Um die Qualität der zu identifizierenden *per*-Metaboliten weiter zu erhöhen, wurden die bis dato automatisch integrierten Peaks manuell mittels der quantitativen Analysesoftware von Waters – Quanlynx (V4.1) – nachintegriert und nur jene *per*-Metaboliten die sich auch nach der manuellen Inspektion als signifikant unterschiedlich erwiesen, abschließend identifiziert.

Damit ein Metabolit als zweifelsfrei identifiziert gilt, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Diese Voraussetzungen wurden 2007 von der „The Metabolomics Standards Initiative (MSI)“ definiert, um einen Mindeststandard bei der Identifizierung von Metaboliten zu gewährleisten. Da eine zweifelsfreie Identifikation nicht immer möglich ist, wurden vier unterschiedliche Identifikationslevel definiert. Eine Identifikation auf Level 1 Basis beschreibt eine identifizierte Komponente. Hierfür muss eine Übereinstimmung von mindestens zwei orthogonalen Parametern, wie beispielsweise der *Rt* und dem Fragmentationsmuster, zwischen einer authentischen Standardkomponente und dem gemessenen feature bestehen. Die Standardkomponente muss hierfür im selben Labor unter identischen analytischen Bedingungen gemessen werden. Für eine zweifelsfreie Identifikation wird empfohlen weitere orthogonale Parameter, wie eine, für den Metaboliten spezifische Probenaufarbeitung oder das Spektrum eines Photodiodenarray-Detektors heranzuziehen. Der Abgleich der gemessenen Fragmentspektren eines features mit in der Literatur veröffentlichten oder in Datenbanken hinterlegten Fragmentspektren und ein zusätzlicher Abgleich des exakten *m/z*- Verhältnis führt zu einer Identifikation nach Level 2. Wird ein feature aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften (z.B. *Rt*) oder dem Vorhandensein spezifischer Fragmente oder neutraler Verluste einer Substanzklasse zugeordnet, so liegt eine Level 3 Identifikation vor. Lässt sich ein feature lediglich aufgrund seines *m/z*- Verhältnis und seines Spektrums quantifizieren und eindeutig von anderen features unterscheiden, spricht man von einer Level 4 Identifikation (Sumner et al. 2007).

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Datenbanksuche ist, dass das *m/z*- Verhältnis des Molekülions und nicht das eines Addukts/Fragments verwendet wird. Um dies sicher zu stellen, wurde vor der Datenbanksuche die automatische feature-annotation durch CAMERA manuell überprüft, indem zunächst untersucht wurde, ob es sich beim *m/z*- Verhältnis des *per*-Metaboliten um das Molekülion oder einem Addukt bzw. Fragment handelt. Anschließend wurde eine Suche mit dem exakten *m/z* Verhältnis in der METLIN Datenbank durchgeführt (Smith et al. 2005). Als Massentoleranz wurden 10 ppm gewählt. Die gefundenen Treffer wurden anschließend dokumentiert und falls vorhanden wurde ein Abgleich des in der Datenbank hinterlegten

Fragmentationsmusters bei 10 eV mit dem gemessenem Fragmentationsmuster vorgenommen. Für die somit Level 2 identifizierten Metaboliten, wurde anschließend, falls verfügbar, ein Abgleich mit Referenzmaterial durchgeführt, um eine Level 1 Identifikation zu erreichen. Wurde kein Treffer in METLIN gefunden, wurde zusätzlich die „Human Metabolome Database“ (HMDB) durchsucht (Wishart et al. 2013).

Für die Identifikation der Phospholipide (PE und PC) lagen in der Metlin Datenbank überwiegend *in silico* berechnete Fragmentationsmuster vor. Diese sind für eine Level 2 Identifikation allerdings nicht ausreichen. Deshalb wurden für die Identifikation der Phospholipide spezifische Fragmente verwendet, welche bei der Entwicklung der Software Lipid-Pro am Lehrstuhl bereits bestimmt wurden (Ahmed et al. 2015). Dabei handelte es sich für die PCs um das spezifische Fragment  $184.0739 \pm 0.003$  Da, was der Kopfgruppe der PCs entspricht. Ähnlich wie die PCs, verlieren die PEs ihre Kopfgruppe. Da diese jedoch zwitterionisch ist, lässt diese sich unter den verwendeten Bedingungen nicht detektieren. Dennoch lässt sich der spezifische, neutrale Abgang der Kopfgruppe ( $141.0191 \pm 0.003$  Da) für die Identifizierung verwenden, indem dieser vom Gesamtmolekülgewicht abgezogen wird ( $[M+H^+ - 141.0191]^+$ ). Auf diese Weise ließ sich eine Level 2 Identifikation für die Phospholipide erreichen.

Bei den Glycerolipiden (DAGs und TAGs) wurde lediglich eine Level 3 Identifikation durchgeführt. Hierzu wurde das exakte m/z- Verhältnis und die Addukt Bildung herangezogen. Anders als die DAGs liegen die TAGs nur in der Adduktform vor. Beide weisen sowohl ein Natrium als auch ein Ammoniumaddukt auf ( $[M+Na]^+$  und  $[M+NH_4]^+$ ). Zusätzlich wurde die Rt als Kriterium für die Identifikation genutzt. Die Rt unterscheidet sich sowohl zwischen den unterschiedlichen Lipidklassen als auch innerhalb einer Lipidklasse (Ahmed et al. 2015).

#### 2.4.4.4 Metabolit-Profilung

Ausgehend von den identifizierten Metaboliten wurde anschließend ein sogenanntes Metabolite-Profilung durchgeführt. Hierbei wird im Datensatz nach allen bekannten Mitgliedern einer bestimmten Metabolitklasse oder eines bestimmten Stoffwechselweges gesucht, deren Peakfläche/Stoffmenge bestimmt und dann erneut zwischen Mutante und WT<sub>CS</sub> verglichen. Alle dabei betrachteten Metaboliten und deren Peakfläche/Stoffmenge wurde in beiden Körperteilen bzw. Zeitpunkte bestimmt und zwischen *per*<sup>01</sup> und dem WT<sub>CS</sub> verglichen. Bei den untersuchten Metabolitklassen handelte es sich die Gesamtheit der kanonischen AAs, die sich aus dem Aminosäurestoffwechsel ableitenden Kynurenine, die Pterinaten, die sich aus dem Purinmetabolismus ableiten lassen sowie die detektierbaren Mitglieder des Transsulfunierungs-Stoffwechselweges. Außerdem wurde ein Metabolit-Profilung für die Lipidklasse PE, PC, TAG,

DAG und AC durchgeführt. Alle detektierbaren Mitglieder dieser Lipidklassen wurden semi-quantifiziert, die kanonischen AAs quantifiziert. Für die semi-quantifizierung der Glycero(phospho)lipiden wurde ein interner Standard pro Lipidklasse mit einem Responsefaktor von 1 verwendet. Für die TAGs und DAGs wurde hierzu TAG(30:0), für die PEs PE(34:0) und für die PCs PE(34:0) verwendet. Alle detektierten Lipid- Spezies sind in Angehängte Tabelle 2 aufgeführt. Da es sich bei diesen, anders als bei den AAs und Carnitinen, nicht um stabil isotoopenmarkierte Standards handelte, wurde vor der Analyse der Proben in einem Vorexperiment sichergestellt, dass die Verwendeten internen Standards nicht endogen in den Proben vorkommen. Die Semi-Quantifizierung von Carnitin und den ACs erfolgte unter Verwendung von drei stabil isotoopenmarkierten internen Standards (D<sub>9</sub>-Carnitine, D<sub>3</sub>-AC(4:0), D<sub>3</sub>-AC(16:1)). Als Responsefaktor wurde für alle Lipid-Spezies 1 verwendet. Die Analysierten Carnitinespezies sowie die zur Quantifizierung herangezogenen internen Standards und deren Konzentration sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: analysierte Carnitine, mit den zur Quantifizierung herangezogenen, internen Standards sowie deren Konzentration**

|   | Interner Standard                          | Eingesetzte Konzentration interner Standard in Kopfproben [ng/μl] | Eingesetzte Konzentration interner Standard in Körperproben [ng/μl] |
|---|--|---|---|
| [Carnitine+H] <sup>+</sup>                | [D <sub>9</sub> -Carnitine+H] <sup>+</sup> | 0.05  | 0.5   |
| [AC(2:0)+H] <sup>+</sup>                  | [D <sub>9</sub> -Carnitine+H] <sup>+</sup> | 0.05  | 0.5   |
| [AC(3:0)+H] <sup>+</sup>                  | [D <sub>3</sub> -AC(4:0)+H] <sup>+</sup>   | 0.002   | 0.01  |
| [AC(4:0)+H] <sup>+</sup>                  | [D <sub>3</sub> -AC(4:0)+H] <sup>+</sup>   | 0.002   | 0.01  |
| [AC(12:0)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [AC(14:1)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [AC(14:0)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [AC(16:1)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [AC(16:0)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [AC(18:2)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [AC(18:1)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [AC(18:0)+H] <sup>+</sup>                 | [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup>  | 0.01  | 0.02  |
| [D <sub>9</sub> -Carnitin+H] <sup>+</sup> |  |   |   |
| [D <sub>3</sub> -AC(4:0)+H] <sup>+</sup>  |  |   |   |
| [D <sub>3</sub> -AC(16:1)+H] <sup>+</sup> |  |   |   |

Die Quantifizierung der AAs erfolgte unter Verwendung einer Quantifizierungsmethode, die am Lehrstuhl entwickelt und validiert wurde (Hoell 2015). Die für die Quantifizierung herangezogenen, AA spezifischen, internen Standards, deren Konzentration sowie die jeweiligen Responsefaktoren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: analysierte Aminosäuren mit den zur Quantifizierung herangezogenen, internen Standards, deren Konzentration sowie dem verwendeten Responsefaktor

|  | Interner Standard<br>(eingesetzte Konzentration: 5<br>µM) | Responsefaktor |
|--|---|----------------|
| [Alanin+H] <sup>+</sup>                              | D <sub>8</sub> - Valin                                    | 0.1            |
| [Arginin+H] <sup>+</sup>                             | <sup>13</sup> C <sub>1</sub> D <sub>4</sub> - Arginin     | 0.9            |
| [Asparagin+H] <sup>+</sup>                           | D <sub>8</sub> - Valin                                    | 1              |
| [Asparaginsäure+H] <sup>+</sup>                      | D <sub>8</sub> - Valin                                    | 0.3            |
| [Glutaminsäure+H] <sup>+</sup>                       | D <sub>3</sub> - Glutaminsäure                            | 1.1            |
| [Glutamin+H] <sup>+</sup>                            | D <sub>3</sub> - Glutaminsäure                            | 1.4            |
| [Histidin+H] <sup>+</sup>                            | <sup>13</sup> C <sub>1</sub> D <sub>4</sub> - Arginin     | 0.6            |
| [Leucin/Isokeucin+H] <sup>+</sup>                    | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> - Tyrosin                    | 0.8            |
| [Lysin+H] <sup>+</sup>                               | D <sub>8</sub> - Valin                                    | 0.1            |
| [Methionin+H] <sup>+</sup>                           | D <sub>3</sub> - Methionin                                | 0.9            |
| [Phenylalanin+H] <sup>+</sup>                        | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> - Phenylalanin               | 0.9            |
| [Prolin+H] <sup>+</sup>                              | D <sub>3</sub> - Methionin                                | 1.1            |
| [Serin+H] <sup>+</sup>                               | D <sub>8</sub> - Valin                                    | 0.1            |
| [Threonin+H] <sup>+</sup>                            | D <sub>8</sub> - Valin                                    | 0.3            |
| [Tryptophan+H] <sup>+</sup>                          | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> - Phenylalanin               | 1              |
| [Tyrosin+H] <sup>+</sup>                             | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> - Tyrosin                    | 0.8            |
| [Valin+H] <sup>+</sup>                               | D <sub>8</sub> - Valin                                    | 0.7            |
| <sup>13</sup> C <sub>1</sub> D <sub>4</sub> -Arginin |   |                |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Phenylalanin           |   |                |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Tyrosin                |   |                |
| D <sub>3</sub> -Glutaminsäure                        |   |                |
| D <sub>3</sub> -Methionin                            |   |                |

## 2.5 JTK\_CYCLE Analyse

Um Rhythmen in den Metabolitspiegeln zu identifizieren, wurden über drei Tage hinweg alle zwei Stunden Proben von WT<sub>CS</sub> Fliegen genommen (vgl. 2.1.2) und mittels einer nicht parametrischen Analyse (JTK\_CYCLE, Version: 3, Hughes et al. 2010) auf ihre Rhythmik hin untersucht. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Detektion diurnal oszillierender features lag und die Fliegen synchronisiert und unter 12:12 LD Bedingungen gehalten wurden, wurde die Periodenlänge für diese Analyse auf 24 h festgelegt. Als rhythmisch wurde eine Verbindung dann betrachtet, wenn neben dem Bonferroni korrigierten Wahrscheinlichkeitswert (ADJ.P) auch die Falscherkennungsrate, ausgedrückt durch den Benjamini Höchberg Quotient (BH.Q), einen Wert kleiner 0.05 aufwies. Neben dem Test, ob es sich bei tageszeitabhängigen Schwankungen um statistisch signifikante, wiederkehrende Rhythmen handelt, wird bei der JTK\_CYCLE Analyse die Amplitude (AMP) und Phase (LAG) der oszillierenden features berechnet. Hierbei beschreibt die Phase den Zeitpunkt, zu dem die Oszillation ein Maximum aufweist; die Amplitude, die Differenz aus Maximum und Ruhelage. Da letztere ein absoluter Wert ist, lässt diese keinen direkten Vergleich der Oszillationsstärke zwischen rhythmischen features zu. Um diesen Vergleich durchführen zu können, wurde zusätzlich die relative Amplitude (rel.AMP) berechnet, die die prozentuale Abweichung der Oszillation vom Mittelwert beschreibt.

## 3 Ergebnisse

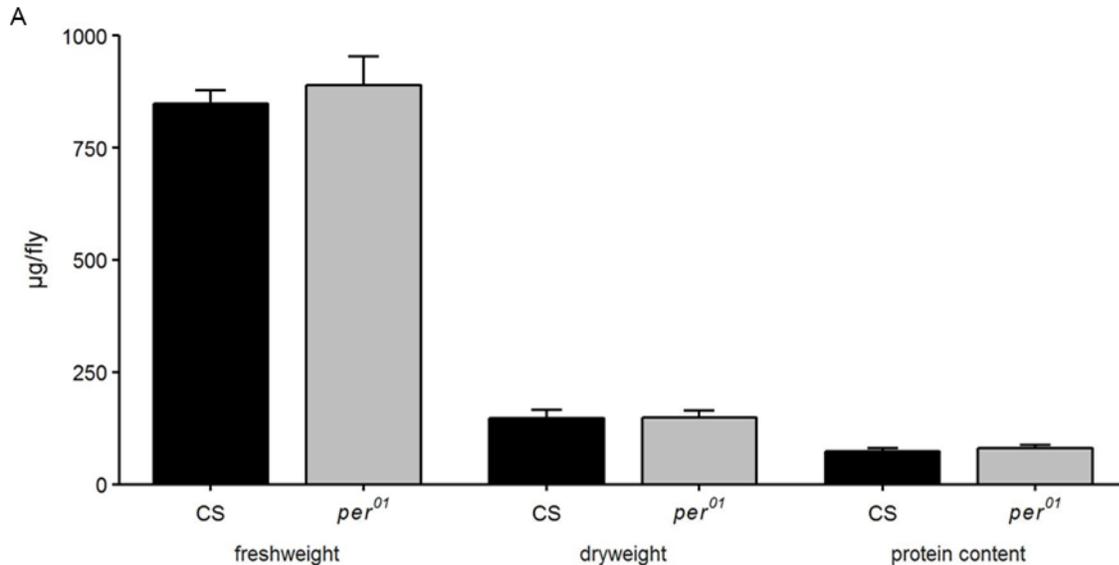
### 3.1 Globales Metabotyping

Um zu untersuchen, auf welche Stoffwechselwege sich eine in ihrer Funktion gestörte innere Uhr auswirkt, wurden zunächst Fliegen, bei der die Funktionsweise der inneren Uhr aufgrund einer Punktmutation im ganzen Organismus gestört ist – die Uhr-Mutante *per<sup>01</sup>* – dem Wildtyp, CantonS (WT<sub>CS</sub>) zu zwei Zeitpunkten (ZT6 und ZT18) gegenübergestellt. Sich unterscheidende Signale wurden identifiziert, Stoffwechselwegen zugeordnet, bevor abschließend alle weiteren Mitglieder der ausgemachten Stoffwechselwege – falls detektierbar –herausgefiltert und gezielt untersucht wurden.

#### 3.1.1 Generelle Eigenschaften der untersuchten Fliegenstämme

Für die durchgeführten metabolischen Untersuchungen wurden jeweils fünf Köpfe bzw. Körper pro Probe zusammengenommen und aufgearbeitet, bevor der Vergleich zwischen den beiden Genotypen durchgeführt wurde. Nach den Analysen wurde dann auf die Menge an Substanz pro Kopf/Körper zurückgerechnet. Eine Normalisierung über das Gewicht wurde nicht durchgeführt, da eine exakte Bestimmung für die Kopfproben aufgrund des geringen Gewichtes nicht möglich war. Um dennoch sicherzustellen, dass die gefundenen Unterschiede in den Metabolitspiegeln nicht durch genotypspezifische Unterschiede im Gewicht und somit der eingesetzten Probenmenge oder durch Unterschiede in den Proteinspeichern, die bei *Drosophila* primär während des Larvalstadiums angelegt werden, hervorgerufen werden, sollte zunächst das Gewicht der Fliegen und die Menge an Gesamtprotein bestimmt und verglichen werden (vgl. 2.2.1, 2.2.2).

Dabei zeigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede im Frisch- sowie Trockengewicht und der Gesamtproteinmenge zwischen den beiden Fliegenlinien gab (vgl. Abbildung 1). Diese Beobachtungen bilden die Grundlage für den direkten Vergleich der gemessenen Metabolitspiegel zwischen den beiden Genotypen.



**Abbildung 1: Vergleich relevanter Größen (Gewicht, Proteingehalt) zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>CS</sub> (schwarz). Vergleich von Frischgewicht (linkes Diagramm, engl. 'freshweight'; n=3), Trockengewicht (mittleres Diagramm, engl. 'dryweight'; n=3) und Proteingehalt (rechtes Diagramm, engl. 'protein content'; n=10) pro Fliege zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub>.**

### 3.1.2 Ungerichtete, vergleichende Metabolomanalyse von *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen

Da es sich bei der Uhr Mutante *per*<sup>01</sup> um Fliegen handelt, die eine globale Mutation des *per* Gens aufweisen, ist die Uhr auf molekularer Basis sowohl in den Uhr-Neuronen, als auch in den zellautonomen peripheren Uhren gestört. Um die Komplexität der Proben und die Anzahl zeitgleich analysierter Organe zu reduzieren, wurden die Köpfe der Fliegen vom Körper, bestehend aus Thorax und Abdomen, getrennt (vgl. 2.3). Die Probennahme erfolgte zum einen in der Mitte des Tages (ZT6) und zum anderen in der Mitte der Nacht (ZT18), da die Spiegel der *per* mRNA zur Mitte des Tages ein Minimum und zur Mitte der Nacht ein Maximum in WT<sub>CS</sub> Fliegen aufweisen (Hao et al. 1997). Anschließend wurden die Proben unter Zuhilfenahme von Extraktionsmethoden, die es ermöglichen ein breites Metabolitspektrum abzudecken, extrahiert (vgl. 2.3.1) und mittels UPLC-ESI-TOF-MS analysiert. Die chromatographische Trennung der hydrophilen Metaboliten erfolgte hierbei unter Zuhilfenahme einer HILIC Säule (vgl. 2.4.2.1.1), die der hydrophoben Metaboliten mittels einer C18 Säule (vgl. 2.4.2.1.2). Die Ionisation der aufgetrennten Metaboliten wurde ausschließlich im positiven Ionenmodus durchgeführt und für die anschließende Massenspektrometrische-Analyse wurde ein Massenbereich von 50-1200 Da gewählt (vgl. 2.4.3.1). Um Marker zu vermeiden, die beispielsweise aufgrund technischer Fehler als solche ausgemacht wurden, wurde das Experiment zwei Mal unabhängig voneinander

durchgeführt und nur jene Marker als relevant betrachtet, die in beiden Experimenten signifikante Unterschiede in den Spiegeln aufwiesen.

### 3.1.2.1 Datenpräprozessierung und statistische Auswertung

Um Metaboliten auszumachen, die sich zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub>-Fliegen unterscheiden, mussten die aufgenommenen Daten zunächst präprozessiert werden. Hierbei wurden zunächst ungerichtet alle features in den chromatographischen Läufen ausgemacht und integriert. Hierfür wurde, wie in Kapitel 2.4.4.1 beschrieben, vorgegangen.

Bei der durchgeführten Präprozessierung konnten im methanolischen Extrakt (E1) insgesamt 1717 verschiedene features detektiert werden. Von diesen waren 298 features spezifisch für die analysierten Kopf- und 1006 spezifisch für die Körperproben. Rund ein Viertel der detektierten features konnte sowohl im Kopf, als auch im Körper detektiert werden (413). Bei der Wiederholung des Experiments (E2) unter Verwendung der zwei Phasen Extraktion ergab sich eine Gesamtzahl an features für die wässrige Phase von 2080. Von diesen waren rund 40% kopfspezifisch, 24% körperspezifisch und weiter 36% ließen sich in beiden Körperteilen finden. In der organischen Phase wurden insgesamt 4446 features detektiert, wobei ungefähr die Hälfte (47%) aller detektierten features sowohl im Kopf als auch im Körper detektiert wurden. Die Anzahl der kopf – bzw. körperspezifischen features war in etwa vergleichbar (1187 bzw. 899). Bei der Wiederholung dieses Experiments wurde ebenfalls ungefähr die Hälfte (45%) der detektierten features sowohl im Kopf als auch im Körper detektiert. Allerdings wurden in diesem Experiment ungefähr viermal mehr spezifische features in den Körperproben (1241) als in den Kopfproben (319) detektiert. Des Weiteren belief sich die Gesamtzahl der detektierten features nur auf 2934. Zusammenfassend sind diese Ergebnisse in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Anzahl detektierter /annotierter features in den untersuchten Körperteilen für die wässrige und organische Phase, sowie für die jeweiligen Experimenten. „detektierte features“: alle detektierten Peaks in den Körperteilen; „feature Gruppen“detektierte und noch nicht identifizierte Metaboliten.**

|           |         | detektierte features |               |        |             | feature-Gruppen |               |        |             |
|-----------|---------|----------------------|---------------|--------|-------------|-----------------|---------------|--------|-------------|
|           |         | Kopf                 | Kopf & Körper | Körper | gesamt      | Kopf            | Kopf & Körper | Körper | gesamt      |
| aqueous   | E1      | 298                  | 413           | 1006   | <b>1717</b> | 155             | 208           | 477    | <b>840</b>  |
|           | E2      | 827                  | 747           | 506    | <b>2080</b> | 350             | 329           | 239    | <b>918</b>  |
| organic   | E2      | 1187                 | 2360          | 899    | <b>4446</b> | 316             | 756           | 240    | <b>1312</b> |
|           | E3      | 319                  | 1374          | 1241   | <b>2934</b> | 67              | 490           | 332    | <b>889</b>  |
| aqu & org | E1 & E2 | 394                  | 1040          | 876    | <b>2310</b> | 139             | 303           | 224    | <b>666</b>  |

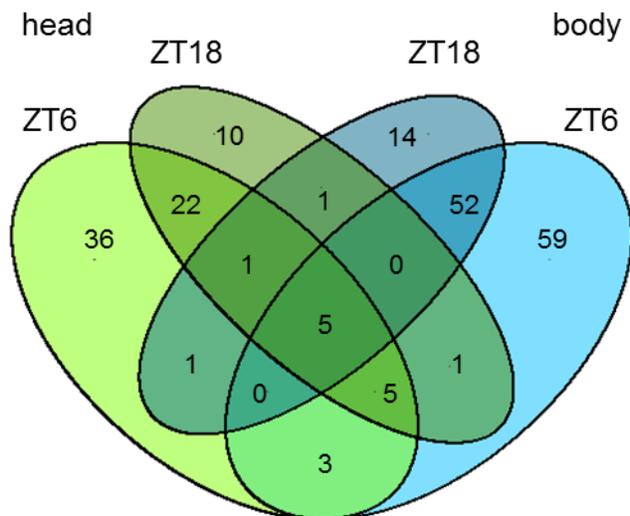
Um die Aussagekraft der statistischen Analyse zu erhöhen wurden nur jene features für die weitere Analyse herangezogen die sowohl im ursprünglichen als auch in der Wiederholung des Experiments detektiert werden konnten. Wässrige und organische Phase zusammengenommen ergab sich dabei eine Gesamtzahl an detektierten features von 2310. Von diesen 2310 features wurden 1040 (45%) sowohl in den Kopf- als auch den Körperproben detektiert. Die Anzahl der körperspezifischen features (876) war ungefähr doppelt so hoch wie die der kopfspezifischen (394) (vgl. Tabelle 4).

Ein Metabolit wird bei der ES-Ionisation meist nicht ausschließlich durch das Moleküllion repräsentiert. Oftmals lassen sich weitere features, wie Isotopenpeaks, Addukte und in-source Fragmente detektieren. Für die statistische Analyse müssen diese zu feature-Gruppen zusammengefasst werden. Dies erfolgte mittels des R-Paketes CAMERA und ist im Detail in Kapitel 2.4.4.2 beschrieben. Die durchgeführte Analyse resultierte in einer gesamten Anzahl an feature – Gruppen für die wässrigen Extrakte von 840 bzw. 918 (vgl. Tabelle 4). Dies entspricht ca. der Hälfte der detektierten features. Bei der organischen Phase wurden in E2 1312 und in E3 889 feature – Gruppen erkannt. Die Anzahl reduzierte sich somit etwa auf ein Drittel im Vergleich zu den detektierten features.

Organische und wässrige Phase zusammengenommen und nur jene feature-Gruppen betrachtet, die sowohl im ersten als auch im Folgeexperiment gefunden wurden, ergab eine Gesamtzahl an feature- Gruppen von 666. Von diesen wurden 303 (46%) sowohl in den Kopf- als auch in den Körperproben gefunden, 139 (21%) waren kopf-, 224(34%) körperspezifisch (vgl. Tabelle 4).

### 3.1.2.3 Identifizierung der ausgemachten *per* Metaboliten

Zusätzlich zu der Gruppierung führt CAMERA eine Annotation der features innerhalb einer feature Gruppe durch. Die Information, ob es sich bei einem feature innerhalb einer feature-Gruppe beispielsweise um ein Addukt oder einen Isotopenpeak handelt, wurde anschließend für die Identifikation der *per*-Metaboliten genutzt. Wie in Kapitel 2.4.4.3 beschrieben, wurde eine feature-Gruppe dann als *per*-Metabolit bezeichnet, wenn in zwei unabhängigen Experimenten ein statistisch signifikanter Unterschied dafür ausgemacht werden konnte. Insgesamt konnten mit dieser Vorgehensweise 210 feature Gruppen (*per*-Metaboliten) herausgefiltert werden. Die Anzahl der *per*-Metaboliten, die zu den untersuchten Zeitpunkten bzw. in den untersuchten Körperteilen ausgemacht werden konnten, ist in Abbildung 2 dargestellt. Alle ausgemachten *per*-Metaboliten sind im Anhang aufgeführt (vgl. Angehängte Tabelle 3)



**Abbildung 2: Anzahl körperteil- bzw. zeitpunktspezifischer *per*-Metaboliten (Welchs t- test;  $p < 0.05$  in zwei unabhängigen Experimenten). Die blauen Ellipsen repräsentieren *per*-Metaboliten, die im Körper (hellbau: ZT6; blau: ZT18) ausgemacht wurden, die grünen Ellipsen (hellgrün: ZT6; grün: ZT18) jene die im Kopf gefundenen wurden. Überlappende Bereiche repräsentieren *per*-Metaboliten, die zu beiden Zeitpunkten und bzw. oder in beiden Körperteilen gefunden wurden.**

Von diesen 210 *per*-Metaboliten waren 68 kopf- und 125 körperspezifisch. Lediglich 17 *per*-Metaboliten (8%) zeigten in beiden Körperteilen signifikant unterschiedliche Spiegel. Auffallend war, dass fünf dieser 17 *per*-Metaboliten (29%) zusätzlich zu beiden Zeitpunkten signifikant unterschiedlich waren.

Für die anschließende Identifikation der *per*-Metaboliten wurden, neben dem exaktem  $m/z$ , der  $R_t$  sowie dem Fragmentationsmuster ( $MS^E$  und/oder  $MS/MS$ ), die Informationen der Annotation genutzt. Diese Informationen sind nützlich, da einige Stoffklassen spezifische Addukte bilden oder schon unter den sanften Ionisationsbedingungen des ES zur Bildung von spezifischen in source Fragmenten neigen. Wie bereits in Kapitel 2.4.4.3 erwähnt, müssen zusätzlich mehrere Voraussetzungen erfüllt sein, damit ein Metabolit als zweifelsfrei identifiziert gilt. Die von der „The Metabolomics Standards Initiative (MSI)“ definierten Regeln befolgend, konnten in der vorliegenden Arbeit 76 von den 210 *per*-Metaboliten zweifelsfrei identifiziert werden (mindestens Level 3; vgl. Angehängte Tabelle 4). Unter den identifizierten Komponenten fanden sich acht Metaboliten aus dem Aminosäuremetabolismus oder konnten von diesem abgeleitet werden (Val, Leucin (Leu), Ile, Phe, Trp, Carnitine (Car), Kynurenin, Hydroxykynurenin, Xanthurensäure). Da, mit der verwendeten Methode, keine ausreichende chromatographische Trennung von Leu und Ile erreicht werden konnte und sich auch die Massen der beiden Moleküle nicht unterscheiden,

wurden diese als eine Komponente angesehen, weshalb im weiteren Verlauf nur von Leu/Ile gesprochen wird.

Bei fünf Metaboliten handelte es sich um Metaboliten, die Teil des Purinmetabolismus sind oder sich aus diesem ableiten lassen (Xanthin, Methylthioadenosin, Pterin, Sepiapterin, Biopterin). Den Großteil der identifizierten Metaboliten (83%) machten allerdings Lipide aus. Unter den 63, sich signifikant unterscheidenden Lipiden waren 79% Glycero(phospho)lipide und 16% Fettsäureester. Zusätzlich konnte das Co-Enzym Q9 als *per*-Metaboliten identifiziert werden und möglicherweise das GangliosidGD3 (d18:1/14:0). Letzteres ist besonders interessant, da es, anders als im WT<sub>CS</sub>, unter der Detektionsgrenze in den Körperproben von *per*<sup>01</sup> war. Interessanter Weise wurde die Mehrheit der identifizierten TAGs (21 von 25) und DAGs (8 von 10) spezifisch im Kopf als signifikant unterschiedlich gefunden (vgl. Angehängte Tabelle 4). Die langkettigen ACs hingegen wurden ausschließlich in den Körperproben mit signifikant unterschiedlichen Leveln gefunden. Das Trägermolekül für die aktivierten freien Fettsäuren -Car - und das kurzkettige Acetylcarnitine (ACAR) sowie Propionylcarnitine hingegen, wurden sowohl im Kopf als auch im Körper und zusätzlich zu beiden Zeitpunkten mit signifikant niedrigeren Spiegeln in *per*<sup>01</sup> gemessen.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung, die das *per* Gen für den Metabolismus hat. Nahezu ein Drittel aller detektierten feature- Gruppen unterschied sich signifikant zwischen Mutante und WT<sub>CS</sub>. Davon wiesen rund 80% niedrigere Spiegel in der Uhr-Mutante auf. Der Großteil der identifizierten *per*-Metaboliten ließ sich der Speicher- bzw. Transportform der Lipide (TAGs, DAGs & ACs) oder dem Aminosäurestoffwechsel zuordnen. Das ist besonders interessant, da sowohl die Menge an aufgenommenem Futter (Schaebler et al. 2020), der Proteingehalt als auch das Gesamtgewicht sich nicht zwischen Uhr-Mutante und WT<sub>CS</sub> unterschieden.

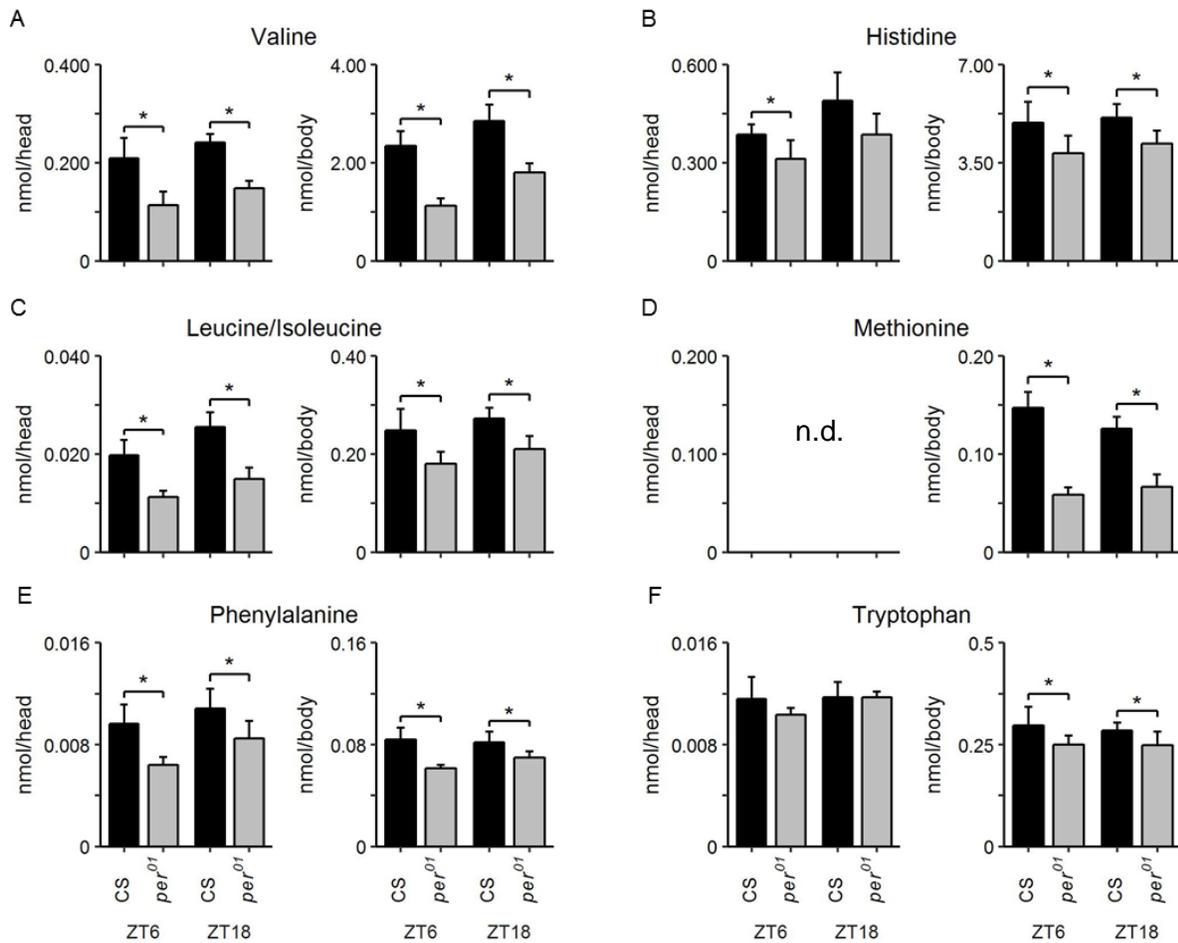
### 3.1.3 Metabolit-Profilung

Ausgehend von den in Kapitel 3.1.2 identifizierten Metaboliten sollte anschließend ein Metabolit-Profilung durchgeführt werden. Hierbei werden, wie bereits in Kapitel 2.4.4.4 beschrieben, die Spiegel aller Metaboliten einer Metabolitklasse oder eines Stoffwechselweges, bestimmt und dahingehend untersucht, ob sich diese statistisch signifikant zwischen den beiden Genotypen unterscheiden.

#### 3.1.3.1 Aminosäure profiling

Da bereits im methanolischen Extrakt signifikante Unterschiede in den AA-Spiegeln zwischen der *per*<sup>01</sup> Mutante und dem WT<sub>CS</sub> festgestellt wurden (vgl. Angehängte Abbildung 1), wurde für die Analyse der 20 kanonischen AAs auf eine am Lehrstuhl validierte Quantifizierungsmethode für die

verwendete HILIC Säule zurückgegriffen (vgl. 2.4.4.4). Unter Zuhilfenahme stabil isotopenmarkierter interner Standards (vgl. Tabelle 3), lies sich so die Stoffmenge der detektierten AAs in den Proben bestimmen. In den Kopfproben konnten zwölf, in den Körperproben 16 der 20 kanionischen AAs auf diese Art und Weise quantifiziert werden.



**Abbildung 3: Darstellung der sich signifikant zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und dem WT<sub>CS</sub> (schwarz) unterscheidenden AAs. Ermittelte Stoffmenge zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'head') bzw. Körperproben (rechtes Diagramm, engl. 'body'). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung für Val (A), His (B), Leu/Ile (C), Met (D), Phe (E) und Trp (F); n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen, und Sterne signalisieren statistisch signifikante (t-Test;  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 7$ ).**

Die durchgeführte Analyse zeigte, dass sechs der zehn essentiellen AAs (EAAs) sich wiederholt signifikant zwischen der *per*<sup>01</sup> und dem WT<sub>CS</sub> unterschieden (Abbildung 3; Angehängte Abbildung 1).

Die verzweigt-kettigen AAs Leu/Ile und Val wiesen zu beiden Zeitpunkten und sowohl in den Kopf- als auch in den Körperproben signifikant unterschiedliche Mengen auf (Abbildung 3 A, C). Die quantifizierte Menge an Val betrug in der Mutante sowohl in den Kopf- als auch in den Körperproben ca. die Hälfte der im WT<sub>CS</sub> detektierten Menge. Die quantifizierte Menge an Leu/Ile wies lediglich in den Kopfproben eine um ca. 50% reduzierte Menge auf. In den Körperproben wurden ca. 30% niedrigere Mengen in der Mutante gemessen. Met, dessen Intensität in den Kopfproben unter dem Detektionslimit lag, wies in den Körperproben ebenfalls zu beiden Zeitpunkten signifikant niedrigere Spiegel auf (Abbildung 3 C). Zum Zeitpunkt ZT6 konnte in *per*<sup>01</sup> Fliegen nur etwa ein Drittel, zum Zeitpunkt ZT18 etwa die Hälfte, der im WT<sub>CS</sub> detektierten Menge, gemessen werden. Die Mengen an Phe, Trp und Histidin (His) waren in den Körperproben zu beiden Zeitpunkten signifikant niedriger in der Mutante (Abbildung 3 B, E, F). In den Kopfproben wiesen Phe und His zum Zeitpunkt ZT6 signifikant niedriger Spiegel auf, wohingegen sich die Trp Spiegel sich im Kopf nicht zwischen Mutante und WT<sub>CS</sub> unterschieden. Wie die aromatischen AAs Trp und Phe, waren die Spiegel von Tyr im Körper vergleichbar zwischen *per*<sup>01</sup> und dem WT<sub>CS</sub>. In den Kopfproben unterscheiden die aromatischen AAs sich jedoch. Während kein Unterschied zwischen WT<sub>CS</sub> und Mutante bei Trp vorliegt sind die Spiegel von Phe am Tag (ZT6) und die von Tyr in der Nacht (ZT18) signifikant niedriger in der Mutante.

Die EAAs Threonin (Thr) und Lysine (Lys), die lediglich in den Körperproben über dem Detektionslimit lagen, wiesen zum Zeitpunkt ZT6 in den Körperproben ebenfalls signifikant niedrigere Level auf. Dieser Trend konnte jedoch nicht mit Hilfe des Vorexperiments bestätigt werden. Lediglich die EAA, Arginine (Arg), wies weder im Kopf noch im Körper zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede auf (vgl. Angehängte Abbildung 3).

Bei den AAs Glutaminsäure (Glu) und Glutamin (Gln) konnten in den Körperproben signifikante Unterschiede ausgemacht werden (vgl. Angehängte Abbildung 3). Glu wies am Tag (ZT6) und Gln in der Nacht (ZT18) signifikant niedrigere Spiegel auf. Allerdings konnte dies bei beiden AAs nicht in den Vorexperimenten gezeigt werden und zusätzlich war die Effektgröße vergleichsweise gering. Gln wies des Weiteren im Kopf signifikant höhere Spiegel zum Zeitpunkt ZT18 auf. Ebenfalls höhere Spiegel als im WT<sub>CS</sub> wies Serin (Ser) auf. Allerdings zeichneten sich diese, anders als in den Körperproben, wo zu beiden Zeitpunkten signifikant höhere Mengen vorlagen, in den Kopfproben nur als Trend ab.

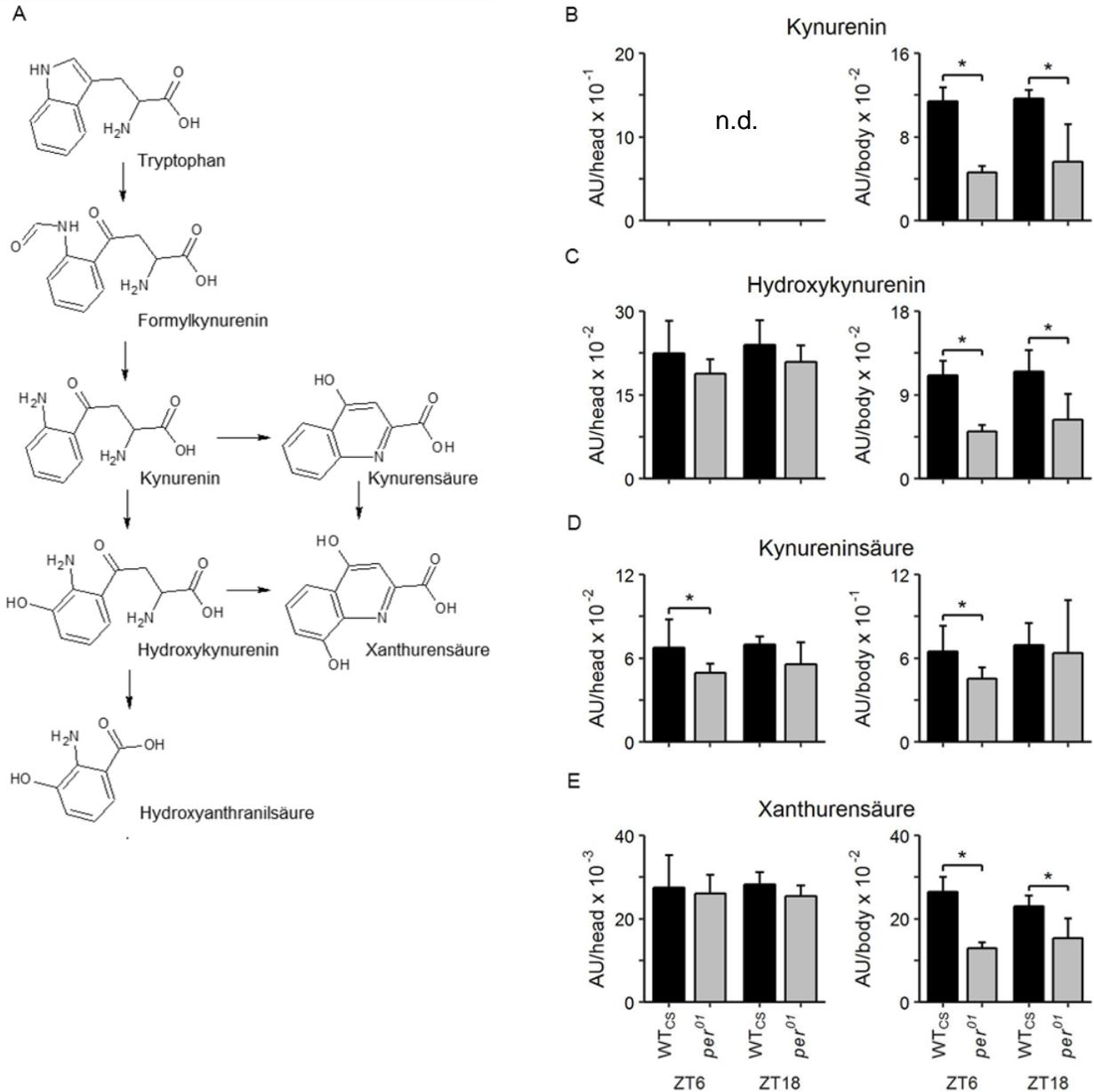
Die Aminosäure Asparaginsäure (Asp) wies weder im Kopf- noch in den Körperproben Unterschiede auf. Bei Asparagin (Asn) und Alanin (Ala), deren Spiegel in den Kopfproben unter dem Detektionslimit lagen, waren ebenfalls keine Unterschiede in den Körperproben

auszumachen. Glycin (Gly) und Cys konnten bei den durchgeführten Experimenten weder im Kopf noch im Körper detektiert werden. Die in E1 und E2 gemessenen Spiegel aller EAAs sowie der nicht essentiellen AAs (NEAAs) sind im Anhang aufgeführt (vgl. Angehängte Abbildung 2 und Angehängte Abbildung 3)

Diese Ergebnisse bestätigten größtenteils die im ungerichteten Experiment gefundenen Unterschiede. Besonders ausgeprägt sind die Unterschiede zwischen Uhr Mutante und WT<sub>CS</sub> für die EAAs, allen voran die BCAAs, Leu/Ile und Val. Bei den NEAAs lassen sich zwar auch Unterschiede finden, allerdings waren diese oft nicht mit dem Vorexperiment vergleichbar oder die Effektgröße gering.

### 3.1.3.2 Metabolit-Profilung der Mitglieder des Kynurenine-Stoffwechselweges

Da Trp als Edukt für die Synthese von Kynurinen dienen kann und einige Mitglieder des Kynureninstoffwechsels im ungerichteten Experiment als *per*-Metaboliten identifiziert werden konnten, wurde der Datensatz auf weitere Mitglieder des Kynureninstoffwechsels hin untersucht und die Peakflächen all dieser Metaboliten in WT<sub>CS</sub> und *per*<sup>01</sup> Fliegen zu beiden Zeitpunkten und in beiden Körperteilen bestimmt. Bei der hier durchgeführten Untersuchung konnte neben Kynurenin, Hydroxykynurenin und Xanthurensäure zusätzlich die Kynureninsäure aus diesem Stoffwechselweg detektiert werden. Der Kynureninstoffwechselweg und die ermittelten Peakflächen dieser Komponenten sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Darstellung des Kynureninstoffwechselweges (A) und Vergleich der detektierten Metaboliten dieses Stoffwechselweges zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>cs</sub> (schwarz). Ermittelte Spiegel (willkürliche Einheit; AU) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'head') bzw. Körperproben (rechtes Diagramm, engl. body). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung für Kynurenin (B), Hydroxykynurenin (C), Kynurensäure (D) und Xanthurensäure (E); n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen und Sterne signalisieren statistisch signifikante (T-Test;  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 7$ ).

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass Kynurenin, Hydroxykynurenin, und Xanthurensäure zu beiden Zeitpunkten in den Körperproben signifikant niedrigere Spiegel in *per<sup>01</sup>* aufweisen. Die Spiegel in den Kopfproben unterscheiden sich hingegen nicht signifikant bzw. lassen sich mit der durchgeführten Analyse nicht detektieren (Kynurenin). Allerdings ist für Hydroxykynurenin ebenfalls ein Trend hin zu niedrigeren Spiegeln in den Kopfproben von *per<sup>01</sup>* erkennbar. Dieser Trend lässt sich ebenfalls für die Kynureninsäure beobachten, für die lediglich zur Mitte des Tages in den Körperproben signifikant niedriger Spiegel gemessen wurden. Alle dargestellten signifikanten Unterschiede ließen sich ebenfalls im Vorexperiment ausmachen (Angehängte Abbildung 4). In diesem waren zusätzlich die Spiegel von Hydroxykynurenin und Kynurenin im Kopf, sowie von Kynureninsäure zu beiden Zeitpunkten in den Körperproben signifikant niedriger in *per<sup>01</sup>*. Allerdings waren die detektierten Peakflächen von Kynurenin im Kopf und Kynureninsäure im Körper nahe dem Detektionslimit. Betrachtet man in den Kopfproben das Verhältnis von Hydroxykynurenin zu Kynureninsäure so ist dieses zu beiden Zeitpunkten zwischen *per<sup>01</sup>* und WT<sub>CS</sub> vergleichbar. Auch für Xanthommatin wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet (vgl. Angehängte Abbildung 5). Selbiges gilt für NAD<sup>+</sup>, ebenfalls ein Produkt des Kynureninstoffwechsels (vgl. Angehängte Abbildung 5).

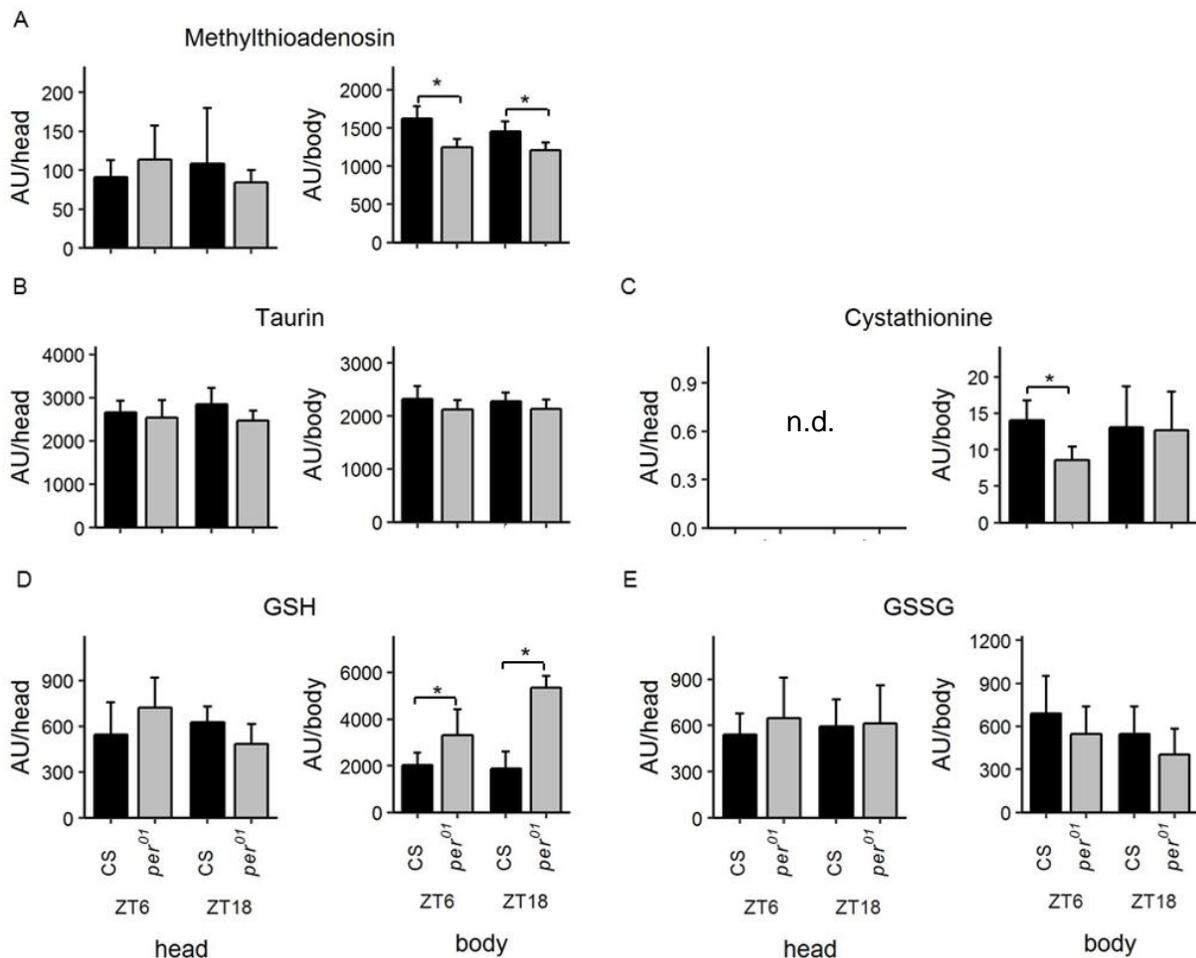
So lässt sich letztendlich festhalten, dass der Kynureninstoffwechsel durch eine gestörte innere Uhr betroffen zu sein scheint. Allerdings bedarf es, um verlässliche Aussagen treffen zu können, ob dies und wenn ja welche physiologischen Auswirkungen dies nach sich zieht, weiterer Analysen, die gezielt alle Metaboliten dieses Stoffwechselweges, also auch Formylkynurenin, Hydroxyanthranilsäure und die Quinolinsäure untersuchen.

### 3.1.3.3 Metabolit-Profilierung der Mitglieder des Transsulfurierungs-Stoffwechselweg

Wie bereits erwähnt, wurden sowohl für Met (vgl. Abbildung 3 D) als auch für Methylthioadenosin, das Ausgangsprodukt des Methionin-Salvage-Stoffwechselweges, zu beiden untersuchten Zeitpunkten signifikant niedrigeren Spiegel in den Körperproben von *per<sup>01</sup>* detektiert. Da des Weiteren bekannt ist, dass die „*de novo*“ Synthese von Gluthation (GSH), das eines der wichtigsten Antioxydanzien darstellt und maßgeblich an der Regulation der Zellulären RedOx Homöostase beteiligt ist, in *Drosophila* unter der Kontrolle der inneren Uhr steht, wurde der Transsulfuration Stoffwechselweg genauer untersucht (Beaver et al. 2012).

Hierbei handelt es sich um einen Stoffwechselweg, der AAs betrifft, die Schwefelatome enthalten (Met und Cys). Bei diesem resultiert aus dem Abbau von Met Homocystein, welches über Cystathionin zu Cys metabolisiert wird. Aus Cys, Glu und Gly kann schließlich GSH synthetisiert

werden. Neben GSH wurde der Datensatz auf Glutathiondisulfid (GSSG) untersucht. Dieses wird bei der Neutralisation von beispielsweise reaktiven Sauerstoffspezies durch Oxidation aus GSH gebildet. Neben GSH kann Cys über Cysteinsulfat und Hipotaurin zu Taurin verstoffwechselt werden. Cys selbst konnte im Datensatz nicht detektiert werden, weil es ohne entsprechende Schutzmaßnahmen während der Probenaufarbeitung oxidiert. Deshalb wurden lediglich die Spiegel von Cystathionin, Taurin, GSH und GSSG sowie die des Methylthioadenosins zu beiden Zeitpunkten und in beiden Körperteilen bestimmt (vgl. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Vergleich der Metaboliten des Transsulfurierungs-Stoffwechselweges zwischen *per<sup>01</sup>* (grau) und *WT<sub>CS</sub>* (schwarz). Ermittelte Spiegel (willkürliche Einheit; AU) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'head') bzw. Körperproben (rechtes Diagramm, engl. 'body'). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung für Methylthioadenosin (A), Taurin (B), Cystathion (C), GSH (D) und GSSG (E); n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen, und Sterne signalisieren statistisch signifikante (t-Test, p < 0.05) Unterschiede (n = 7).**

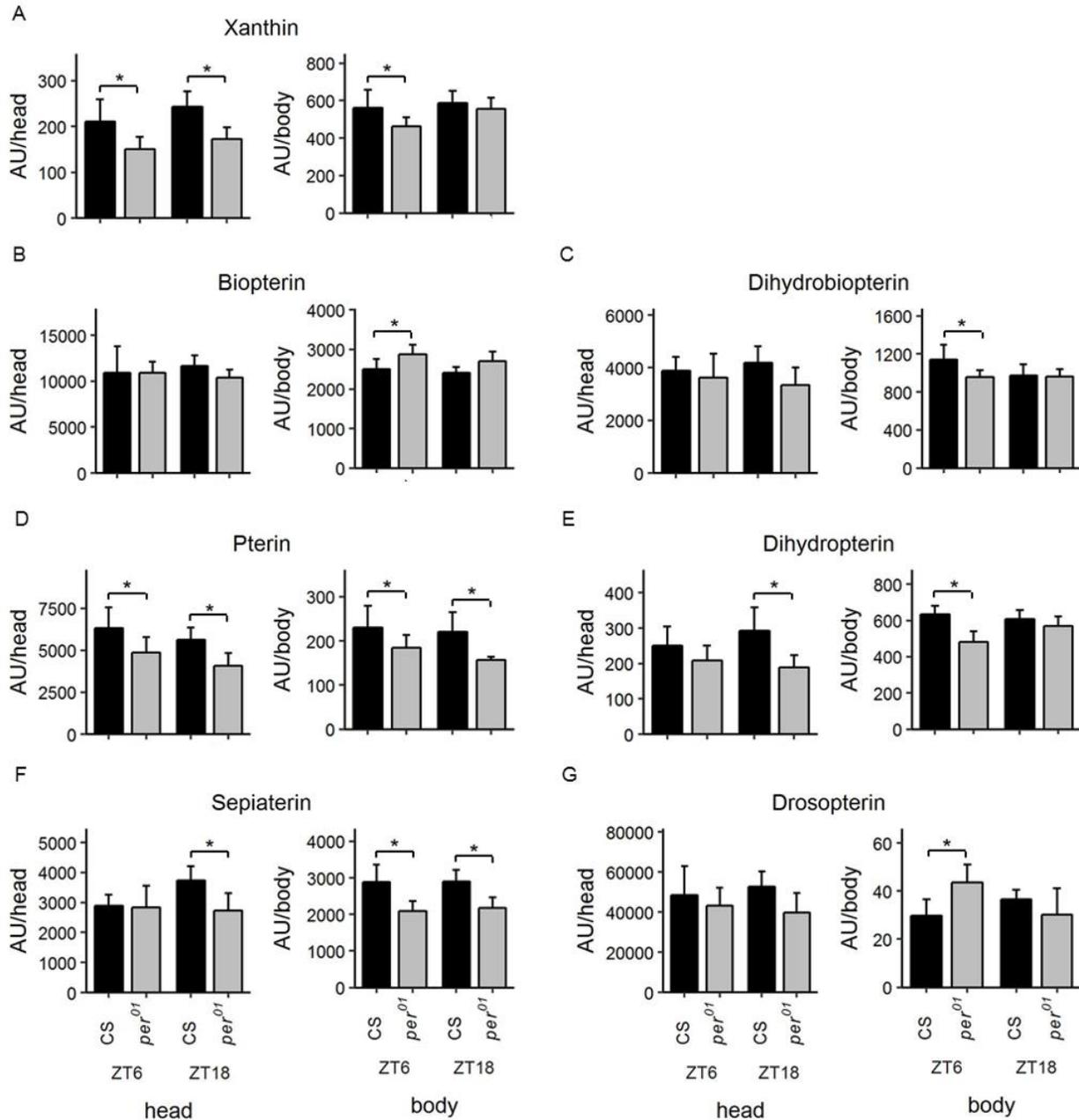
Ähnlich wie bei den ermittelten Spiegeln von Met wurden auch für das Ausgangsprodukt dessen Salvage-Stoffwechselweges, Methylthioadenosin, im Körper reproduzierbar zu beiden Zeitpunkten signifikant niedrigere Spiegel in *per<sup>01</sup>* gemessen (Abbildung 5 A, Angehängte Abbildung 6). In den Kopfproben ließen sich hingegen kein reproduzierbarer Unterschied ausmachen. Für das Ausgangsprodukt für die Synthese von Cys, Cystathionin, konnte lediglich im Körper und auch hier nur mit einer Intensität, die nahe am Detektionslimit lag, detektiert werden (Abbildung 5 C). Dennoch ließen sich signifikant niedrigere Spiegel in der Mitte des Tages, nicht jedoch in der Mitte der Nacht, beobachten. Auch dies deutete sich als Trend bereits im Vorexperiment ab (vgl. Angehängte Abbildung 6).

Für das Abbauprodukt von Cys, Taurin, ließ sich lediglich ein reproduzierbarer Trend in Richtung niedriger Spiegel in der Mutante beobachten (Abbildung 5 B, Angehängte Abbildung 6). Allerdings ist dieser aufgrund der niedrigen Effektgröße vernachlässigbar. Anders verhält es sich mit GSH, welches in den Körperproben signifikant höhere Spiegel in *per<sup>01</sup>* aufweist (Abbildung 5 D). Auch hierbei zeichnete sich der beobachtete Effekt bereits als Trend im Vorexperiment ab (vgl. Angehängte Abbildung 6). Die erwarteten, sich Gegenteilig verhaltenden GSSG Spiegel, bestätigen, dass es in der Uhr-Mutante zu einer Verschiebung des GSH-GSSG Gleichgewichts hin zu GSH kommt. Dieser Effekt lässt sich jedoch lediglich in den Körperproben, nicht aber in den Kopfproben beobachten. Um den Einfluss der inneren Uhr auf diesen Stoffwechselweg besser verstehen zu können, würde es allerdings auch hier weiterer Untersuchungen bedürfen, die darauf ausgelegt sind, auch die weiteren Zwischenprodukte und allen voran Cys in unterschiedlichen Uhr-Mutanten zu detektieren und zu charakterisieren.

#### 3.1.3.4 Metabolit-Profilung der Mitglieder des Purinmetabolismus

Ein weiterer Stoffwechselweg, von dem mehrere Mitglieder unterschiedliche Spiegel in der *per<sup>01</sup>* Mutante als im WT<sub>CS</sub> aufwiesen, ist der Pteridin Stoffwechsel, der seinen Ursprung im Purin Metabolismus hat. Hierbei kommt es ausgehend von Guanosintriphosphat zur Bildung von 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin. Letzteres kann anschließend zu Tetrahydrobiopterin (BH4) oder über Sepiapterin zu Dihydropterin und von dort aus weiter zu Drosopterin oder über Pterin zu Xanthopterin weiterreagieren. Während es sich bei Drosopterin und Xanthopterin um Farbpigmente handelt, fungiert BH4 als Cofaktor für Hydroxylasen, die die aromatischen AAs Phe, Tyr und Trp hydroxylieren (Werner et al. 2011). Somit hat die Verfügbarkeit von BH4 ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den AA- Metabolismus und zusätzlich auch auf die Bildung von Neurotransmittern, wie Dopamin und Serotonin (Werner et al. 2011). In seiner Rolle als Cofaktor wird BH4 zu Dihydrobiopterin (BH2) oxidiert. Da es sich bei BH4 jedoch um ein gutes Reduktionsmittel handelt reagiert dieses bei Raumtemperatur über BH2 zu Biopterin und ist

deshalb in unserem Datensatz nicht als solches detektierbar (Kim et al. 2012). Daher wurden nur Sepiapterin, Dihydropterin, Drosoppterin, Pterin, BH2 und Biopterin, sowie Xanthin, welches bei der Deaminierung von Guanin entsteht, detektiert und in den beiden Körperteilen genauer betrachtet. Auffallend war hierbei, dass die beiden Metaboliten, die direkt mit BH4 in Verbindung stehen, BH2 und Biopterin, im Körper reproduzierbar gegenteilige Effekte aufwiesen (vgl. Abbildung 6 B, C). Während die Spiegel von Biopterin zur Mitte des Tages höher in der Uhr Mutante waren, waren die von BH2 zu diesem Zeitpunkt niedriger. In der Mitte der Nacht ließ sich lediglich ein Trend in Richtung höherer Biopterin Spiegel feststellen, die Spiegel von BH2 waren zu diesem Zeitpunkt hingegen nicht unterschiedlich. Für die Kopfproben konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede für diese Komponenten festgestellt werden. In wie fern diese Ergebnisse allerdings eine physiologische Relevanz haben bleibt aufgrund der Tatsache, dass lediglich die oxidierten Verbindungen und nicht BH4 gemessen werden konnten, fraglich.



**Abbildung 6: Vergleich der Metaboliten des Purinmetabolismus zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>CS</sub> (schwarz). Ermittelte Spiegel (willkürliche Einheit; AU) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'head') bzw. Körperproben (rechtes Diagramm, engl. 'body'). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung für Xanthin (A), Biopterin (B), Dihydrobiopterin (C), Pterin (D), Dihydropterin (E), Sepiapterin (F) und Drosopterin (G); Sterne signalisieren statistisch signifikante (t-Test,  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 7$ ).**

Sepiapterin, das neben seiner Funktion als Ausgangspunkt für die Synthese von Dihydropterin ebenfalls für die Synthese von Biopterin genutzt werden kann, wies in den Körperproben zu

beiden Zeitpunkten signifikant niedrigere Spiegel in der Mutante auf. Allerdings ist auch hierbei fraglich, ob dies als Erklärung für die beobachteten, höheren Biopterin Spiegel in *per*<sup>01</sup> darstellt (vgl. Abbildung 6 F).

Für Xanthin, Pterin, Dihydropterin und Drosoppterin konnten ebenfalls reproduzierbare, signifikante Unterschiede ausgemacht werden (vgl. Abbildung 6 A, D, E, G). Diese waren mit Ausnahme von Drosoppterin besonders in den Kopfproben zu beobachten, wenngleich sich durchaus auch Unterschiede in den Körperproben ausmachen ließen. Diese verfügten allerdings meist über eine geringe Effektgröße oder waren nicht reproduzierbar (vgl. Angehängte Abbildung 7).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die durchgeführten Analysen herangezogen werden können, um Stoffwechselwege zu identifizieren, die möglicherweise durch die innere Uhr reguliert werden. Dies wurde dadurch deutlich, dass bei den untersuchten Stoffwechselwegen immer mehrere Vertreter signifikant andere Spiegel im WT als in der Mutante aufwiesen. Allerdings zeigen diese auch auf, dass ungerichtete Analysen allein meist nicht ausreichend sind und anschließend, auf die Substanzklassen optimierte, gerichtete Analysen notwendig sind, um die Ergebnisse zu validieren und physiologisch relevante Rückschlüsse ziehen zu können. Dies zeigt sich bereits bei den Ergebnissen des Metabolit-Profilings, bei denen auffiel, dass einige *per* Metaboliten auch in den Körperteilen, die im ungerichteten Vergleich nicht als signifikant unterschiedlich ausgemacht wurden, sich unterscheidende Spiegel in *per*<sup>01</sup> aufwiesen.

#### 3.1.4 Lipid Profiling

Aus der ungerichteten Untersuchung ging hervor, dass der Effekt des mutierten *per* Gens auf die Spiegel der hydrophoben Metaboliten ausgeprägter war als für die hydrophilen Metaboliten, die nur einen geringen Anteil an der Gesamtzahl differentieller Metaboliten ausmachten (vgl. Angehängte Tabelle 2). Signifikante Unterschiede ließen sich besonders für Glycero(phospho)lipide aber auch für ACs ausmachen. Letztere unterscheiden sich hierbei von den Glycero(phospho)lipiden dadurch, dass die Fettsäure nicht mit einer Hydroxylgruppe des Glycerins sondern mit der des CAR verestert ist. Da CAR nur über eine Hydroxylgruppe verfügt, kann maximal eine Fettsäure an dieses gebunden werden. Anders verhält es sich bei den Glycerolipiden, die über drei freie Hydroxylgruppen verfügt und somit bis zu drei Fettsäureester ausbilden können. Ist dies der Fall, so spricht man von TAGs, die die Speicherform der Lipide in *Drosophila* darstellen. Sind hingegen nur zwei Hydroxylgruppen verestert und die dritte Hydroxylgruppe liegt frei vor, so handelt es sich um DAGs, welche die Transportform darstellen. Ist an eine Hydroxylgruppe des Glycerins eine Phosphatgruppe gebunden so spricht man von Glycerophospholipide. Die Phosphatgruppe kann wiederum mit der Hydroxylgruppe

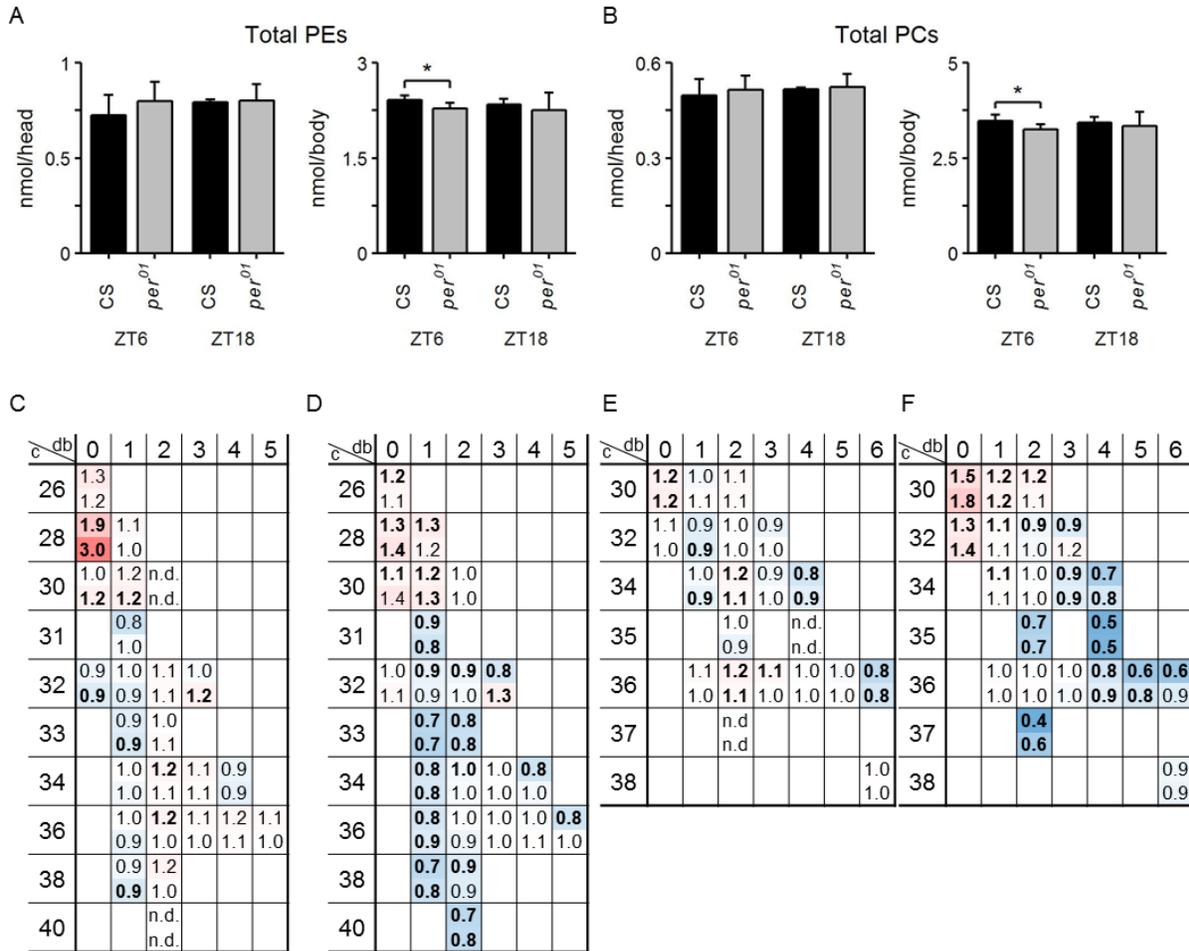
verschiedener Alkohole verestert werden. Bei den Alkoholen, die in adulten *Drosophila* hauptsächlich als Strukturlipide für die Bildung von Membranen verwendet werden, handelt es sich um Cholin und Ethanolamin. Weitere Phosphorlipide, die allerdings in deutlich geringeren Konzentrationen in adulten *Drosophila* vorliegen, werden mit der Hydroxylgruppe des Serins, Inositols oder einem weiteren Glycerinmoleküls ausgebildet (Carvalho et al. 2012). Ist lediglich die Phosphatgruppe an das Glycerinmolekül gebunden so handelt es sich um Phosphatidsäuren.

Da neben den Glycerolipiden und den ACs lediglich für die Phospholipide PC und PE vermehrt unterschiedliche Spiegel zwischen *per*<sup>01</sup> und dem WT<sub>CS</sub> festgestellt wurden, wurden im Folgendem alle detektierbaren Spezies der TAGs, DAGs, ACs, PCs und PEs zu beiden Zeitpunkten und in beiden Körperteilen semiquantifiziert und mit dem WT<sub>CS</sub> verglichen. Neben der lipidspeziespezifischen Analyse wurde zusätzlich die Gesamtmenge der untersuchten Lipidklassen bestimmt und verglichen.

#### 3.1.4.1 Strukturlipide

Bei der Analyse der PEs konnten 23 bzw. 25 Spezies in den Kopf bzw. Körperproben detektiert werden (Abbildung 7). Diese wiesen eine Gesamtkettenlänge – zusammengesetzt aus den beiden veresterten Fettsäuren – von 26 bis 36 Kohlenstoffatomen auf. Bei den Hauptspezies handelte es sich sowohl im Kopf als auch im Körper um PE 34:(1/2) bzw. 36:(2/3/4) die zusammengenommen knapp zwei Drittel der Gesamtmenge an PEs ausmachten. Der Vergleich dieser Spezies zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> ergab eine leichte Erhöhung dieser Spezies in den Kopfproben zum Zeitpunkt ZT6, der sowohl im Vorexperiment als auch im Hauptexperiment beobachtet werden konnte. Zum Zeitpunkt ZT18 ließ sich hingegen kein Unterschied für diese Spezies beobachten. Selbiges gilt für die Körperproben in denen sich zu keinem der beiden untersuchten Zeitpunkte ein systematischer Unterschied für die Hauptspezies ausmachen ließ. Neben diesen Beobachtungen, konnten reproduzierbar, signifikant höhere oder gleiche Werte für die PEs mit einer Gesamtkettenlänge kleiner 31 Kohlenstoffatomen in den Kopf sowie Körperproben zu beiden Zeitpunkten ausgemacht werden (vgl. Abbildung 7 C, D). Da es sich bei diesen jedoch um Spezies handelt, die lediglich in geringen Konzentrationen vorliegen, hatte dies lediglich einen geringen Einfluss auf die Gesamtspiegel, für welche keine signifikanten Unterschiede in den Kopfproben ausgemacht werden konnten (vgl. Abbildung 7 A). In den Körperproben konnte für die Gesamtspiegel zum Zeitpunkt ZT6 zwar eine signifikant niedrigere Stoffmenge ausgemacht werden, dies ließ sich jedoch nicht wiederholen (vgl. Angehängte Abbildung 8). Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass es zwar Unterschiede in der Stoffmenge der PEs gibt, diese allerdings gering sind und Unterschiede zumeist Spezies betreffen, die lediglich in geringen Mengen vorliegen.

Ähnlich verhält es sich bei den PCs (vgl. Abbildung 7 E, F). Für diese Lipidklasse konnten insgesamt 19 Spezies in den Kopf- und 21 Spezies in den Körperproben detektiert werden. Diese wiesen eine Gesamtkettenlänge von 30 – 38 Kohlenstoffatomen auf wobei die Spezies 32:(1/2), 34:(2/3) bzw. 36:4 sowohl in den Kopf als auch in den Körperproben zwei Drittel ausmachten und somit die Hauptspezies repräsentierten. Bei der zeitpunkt- und körperteilspezifischen Untersuchung dieser Hauptspezies ließ sich kein systematischer, reproduzierbarer Unterschied zwischen Mutante und WT<sub>CS</sub> ausmachen. Lediglich für die Spezies 30:(0/1/2) und 32:0 ließen sich in den Körperproben reproduzierbar leicht erhöhte Stoffmengen messen (vgl. Angehängte Abbildung 8). Allerdings handelt es sich auch hierbei um Spezies, die nur in geringer Konzentration vorliegen. In den Kopfproben konnten keine Unterschiede ausgemacht werden. Dies spiegelt sich auch in der Gesamtmenge wider (vgl. Abbildung 7 A, B). Während in den Kopfproben keine Unterschiede auszumachen sind, lassen sich in den Körperproben zwar zum Zeitpunkt ZT6 signifikant niedriger Spiegel messen, dies steht allerdings im Widerspruch mit den im ersten Experiment ermittelten Gesamtmengen, die zu diesem Zeitpunkt, wie bereits bei den PEs, leicht erhöht waren (Angehängte Abbildung 8).



**Abbildung 7: Vergleich der PE- und PC-Stoffmenge zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>CS</sub> (schwarz). A, B: Summe aller quantifizierter PEs- (A) bzw. PCs- (B) Spezies zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'he) bzw. Körperproben (rechtes Diagramm). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung; Sterne signalisieren statistisch signifikante (t-Test,  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 7$ ). C, D, E, F: Lipidspeziespezifisches (charakterisiert durch die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen der veresterten Fettsäuren (c) und die Anzahl an Doppelbindungen (db)) Verhältnis aus in *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> ermittelten Stoffmengen für PEs (C, D) bzw. PCs (E, F), für die Kopf- (C, E) und Körperproben (D, F). Das obere, dargestellte Verhältnis entspricht hierbei ZT6, das untere ZT18. Fett dargestellte Zahlen symbolisieren statistisch signifikante ( $p < 0.05$ ) Unterschiede. Blaue Werte repräsentieren niedrigere (min.: 0), rote Werte (max.: 5) höhere Mengen in *per*<sup>01</sup> als in WT<sub>CS</sub> ( $n = 7$ )**

Abschließend kann für die untersuchten Struktur lipide festgehalten werden, dass diese sich nicht systematisch zwischen *per*<sup>01</sup>- und WT<sub>CS</sub>-Fliegen unterscheiden, da die ausgemachten Unterschiede entweder nicht reproduzierbar waren oder lediglich eine geringe Effektgröße aufwies.

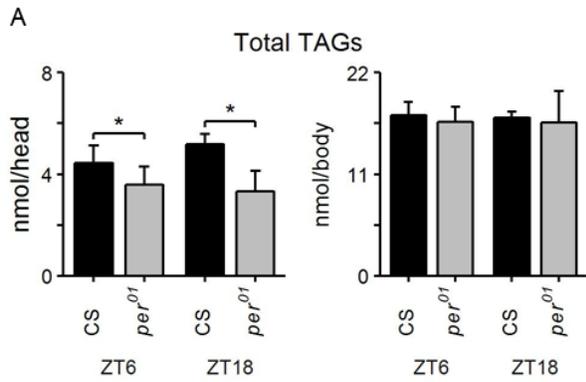
### 3.1.4.2 Lipide des Energiestoffwechsels

Neben den Strukturlipiden wurden die Lipidklassen untersucht, die bei der Energiebereitstellung durch  $\beta$ -Oxidation eine bedeutende Rolle spielen. Bei diesen handelt es sich um die Speicherform der Lipide, die TAGs, die Transportform der Lipide in der Hämolymphe, die DAGs, sowie die Transportform der aktivierten Fettsäuren, die den Transport in die Mitochondrien ermöglicht, die ACs. Hierfür wurde deren Stoffmenge zu beiden Zeitpunkten und in beiden Körperteilen bestimmt.

#### 3.1.4.2.1 Speicherlipide

Die TAGs machten dabei die Metabolitklasse aus, die im ungerichteten Experiment am häufigsten als signifikant unterschiedlich zwischen Mutante und WT<sub>CS</sub> identifiziert wurde (25/76). Mit Hilfe des durchgeführten Lipid Profiling ließen sich insgesamt 70 TAG Spezies in den Kopf- und 72 Spezies in den Körperproben identifizieren (vgl. Abbildung 8 B, C). Diese hatten eine Gesamtkettenlänge – in diesem Fall zusammengesetzt aus den drei veresterten Fettsäuren – von 34 – 58 Kohlenstoffatomen. Die Hauptspezies waren die beiden gesättigten TAGs, 38:0 und 40:0, sowie um die ungesättigten Spezies 40:1, 42:1, 44:(1/2), 46:(1/2), 48:(1/2). Zusätzlich wurden TAGs mit ungeraden Fettsäuren detektiert, deren Identifikation mittels MS/MS bestätigt wurde (vgl. Angehängte Tabelle 5).

Während sich von diesen im Körper nur einige Spezies zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> unterschieden, ließen sich in den Kopfproben für diese Spezies signifikant niedrigere Spiegel mindestens zu einem der beiden untersuchten Zeitpunkte feststellen. Ein ähnlicher Trend zeichnete sich auch für die übrigen untersuchten TAGs in den Kopfproben ab (vgl. Abbildung 8 B).



**B**

| c \ db | 0          | 1          | 2          | 3            | 4          | 5          |
|--------|------------|------------|------------|--------------|------------|------------|
| 34     | 0.6<br>0.4 |            |            |              |            |            |
| 36     | 0.6<br>0.4 |            |            |              |            |            |
| 37     | 0.5<br>0.3 |            |            |              |            |            |
| 38     | 0.6<br>0.5 | 0.6<br>0.4 |            |              |            |            |
| 39     | 0.5<br>0.4 | 0.6<br>0.4 |            |              |            |            |
| 40     | 0.8<br>0.7 | 0.7<br>0.5 | 0.8<br>0.6 |              |            |            |
| 41     | 0.7<br>0.5 | 0.7<br>0.5 | 0.7<br>0.4 |              |            |            |
| 42     | 0.9<br>0.7 | 0.9<br>0.7 | 0.6<br>0.6 | 1.0<br>0.7   |            |            |
| 43     | 0.7<br>0.6 | 0.7<br>0.6 | 0.8<br>0.5 | n.d.<br>n.d. |            |            |
| 44     | 0.7<br>0.4 | 0.9<br>0.8 | 0.7<br>0.6 | 0.5<br>0.4   | 0.7<br>0.5 |            |
| 45     |            | 0.7<br>0.6 | 0.8<br>0.6 | 0.8<br>0.6   |            |            |
| 46     | 0.8<br>0.8 | 0.8<br>0.6 | 1.0<br>0.7 | 0.7<br>0.6   | 0.9<br>0.7 |            |
| 47     |            | 0.7<br>0.6 | 0.8<br>0.6 | 0.9<br>0.6   |            |            |
| 48     |            | 0.8<br>0.6 | 1.0<br>0.7 | 0.7<br>0.5   | 0.9<br>0.6 |            |
| 49     |            | 0.9<br>0.6 | 0.9<br>0.6 | 0.9<br>0.6   |            |            |
| 50     |            | 0.7<br>0.7 | 0.6<br>0.4 | 1.0<br>0.6   | 1.3<br>0.9 | 1.6<br>1.2 |
| 51     |            | 0.9<br>0.6 | 1.1<br>0.7 | 1.0<br>0.6   |            |            |
| 52     |            |            | 0.8<br>0.5 | 1.3<br>0.9   | 1.1<br>0.8 | 1.4<br>0.9 |
| 53     |            | 0.7<br>0.5 | 1.0<br>0.7 | 1.2<br>0.8   |            |            |
| 54     |            |            |            |              |            |            |
| 55     |            | 0.8<br>0.6 | 1.0<br>0.9 | 1.3<br>1.1   |            |            |
| 56     |            | 1.0<br>0.6 |            | 1.1<br>0.6   |            |            |
| 57     |            | 1.1<br>0.8 | 1.2<br>1.0 | 1.3<br>1.1   |            |            |
| 58     |            | 1.1<br>0.6 | 1.2<br>0.5 | 1.1<br>0.5   | 1.0<br>0.5 |            |

**C**

| c \ db | 0            | 1          | 2          | 3          | 4          | 5          |
|--------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 34     | n.d.<br>n.d. |            |            |            |            |            |
| 36     | 1.1<br>1.1   |            |            |            |            |            |
| 37     | 1.0<br>1.1   |            |            |            |            |            |
| 38     | 1.0<br>1.1   | 1.0<br>1.0 |            |            |            |            |
| 39     | 1.0<br>1.2   | 0.9<br>0.9 |            |            |            |            |
| 40     | 1.0<br>1.0   | 1.0<br>1.0 | 0.8<br>0.8 |            |            |            |
| 41     | 1.1<br>1.3   | 1.0<br>1.1 | 0.9<br>0.9 |            |            |            |
| 42     | 1.0<br>1.0   | 0.9<br>1.0 | 0.7<br>0.9 | 0.9<br>0.8 |            |            |
| 43     | 1.1<br>1.3   | 1.0<br>1.2 | 1.0<br>1.1 | 1.5<br>1.5 |            |            |
| 44     | 1.0<br>0.9   | 0.9<br>0.9 | 0.8<br>0.9 | 0.6<br>0.8 | 0.9<br>0.8 |            |
| 45     |              | 0.9<br>1.0 | 0.9<br>1.1 | 0.9<br>1.1 |            |            |
| 46     | 1.0<br>1.1   | 0.9<br>0.9 | 1.0<br>0.9 | 0.7<br>0.7 | 0.9<br>0.9 |            |
| 47     |              | 0.9<br>1.0 | 0.9<br>1.0 | 0.9<br>1.1 |            |            |
| 48     |              | 1.0<br>1.0 | 0.9<br>0.8 | 0.8<br>0.7 | 0.6<br>0.5 |            |
| 49     |              | 1.0<br>1.1 | 1.0<br>0.9 | 1.0<br>1.0 |            |            |
| 50     |              | 0.9<br>1.0 | 0.8<br>0.7 | 1.1<br>0.9 | 1.2<br>1.0 | 0.9<br>1.0 |
| 51     |              | 0.9<br>1.0 | 0.9<br>0.9 | 0.9<br>0.8 |            |            |
| 52     |              | 0.9<br>0.9 | 1.0<br>0.8 | 1.2<br>1.1 | 1.0<br>0.9 | 0.9<br>1.0 |
| 53     |              | 0.7<br>0.7 | 0.9<br>1.0 | 0.7<br>0.7 |            |            |
| 54     |              |            | 0.8<br>0.8 | 0.8<br>1.0 |            |            |
| 55     |              | 0.7<br>0.8 | 1.1<br>1.3 | 1.0<br>1.4 |            |            |
| 56     |              | 0.9<br>0.9 |            | 0.9<br>0.8 |            |            |
| 57     |              | 0.6<br>0.8 | 1.1<br>1.3 | 1.3<br>1.6 |            |            |
| 58     |              | 0.9<br>0.9 | 1.0<br>0.9 | 1.1<br>1.0 | 1.1<br>1.0 |            |

**Abbildung 8: Vergleich der TAG-Stoffmenge zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>CS</sub> (schwarz). A: Summe aller quantifizierter TAG-Spezies zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm; engl. head) bzw. Körperproben (rechtes Diagramm; engl. body). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung; Sterne signalisieren statistisch signifikante (T-Test;  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 7$ ). B, C: Lipidspeziespezifisches (charakterisiert durch die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen der veresterten Fettsäuren (c) und die Anzahl an Doppelbindungen (db)) Verhältnis aus in *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> ermittelten Stoffmengen für TAGs, für die Kopf- (B) und Körperproben (C). Das obere, dargestellte Verhältnis entspricht hierbei ZT6, das untere ZT18. Fett dargestellte Zahlen symbolisieren statistisch signifikante (T-Test;  $p < 0.05$ ) Unterschiede. Blaue Werte repräsentieren niedrigere (min.: 0), rote Werte (max.: 5) höhere Mengen in *per*<sup>01</sup> als in WT<sub>CS</sub> ( $n = 7$ )**

Besonders die gesättigten TAG Spezies wiesen signifikant um bis zu 70% niedrigere Spiegel in *per*<sup>01</sup> auf. Im ersten Experiment konnten zusätzlich besonders in den Kopf- aber auch in den Körperproben neben den niedrigeren Spiegeln für die gesättigten oder einfach ungesättigten TAGs höhere Spiegel für die langkettigen, mehrfach ungesättigten TAGs beobachtet werden. Dieser Effekt zeigte sich im Folgeexperiment in den Kopfproben zwar auch als Trend, war allerdings deutlich schwächer ausgeprägt (vgl. Angehängte Abbildung 10). Im Körper konnten hingegen so gut wie keine Unterschiede ausgemacht werden. Dies spiegelt sich auch in den Gesamt-TAG-Spiegeln wider. Während diese in den Körperproben keine Unterschiede aufwiesen, konnten in den Kopfproben signifikant niedrigere Gesamt-TAG-Spiegel ausgemacht werden (vgl. Abbildung 8 A). Dieser Trend zeichnete sich auch schon im Vorexperiment ab (vgl. Angehängte Abbildung 10).

Dies deutet darauf hin, dass die Anlage der TAG-Speicher unter *ad libitum* Fütterung mit Vollmedium im Körper nicht von der Mutation des *per* Gens betroffen sind.

#### 3.1.4.2.2 Transportlipide (DAGs)

Während die TAGs besonders dadurch hervorstachen, dass sie den Großteil der unterschiedlichen *per*-Metaboliten ausmachten fielen die DAGs dadurch auf, dass die Unterschiede vor allem in den Kopfproben, bei dieser Lipidklasse besonders ausgeprägt und für alle Spezies in der Mutante reproduzierbar niedriger als im WT<sub>CS</sub> waren. Durchschnittlich betragen diese nur um die 40% in der *per* Mutante (vgl. Abbildung 9 A, Angehängte Abbildung 9).

Bei dem durchgeführten DAG-Profilung konnten sowohl in den Kopf- als auch in den Körperproben elf DAG Spezies detektiert werden (vgl. Abbildung 9 B, C). Bei den Hauptspezies handelte es sich hierbei um DAG 32:1 bzw. 34:1. Interessanterweise konnten – anders als bei den TAGs – keine DAG- Spezies mit ungeraden Fettsäuren detektiert werden. Während in den Kopfproben für alle detektierten Spezies reproduzierbar niedrigere Spiegel gemessen wurden, was sich folglich auch

in signifikant niedrigeren Gesamt-DAG-Spiegeln abzeichnete, war die Stoffmenge des Haupt-DAGs, 32:1, das beinahe die doppelte Menge des zweithäufigsten DAGs, 34:1, aufweist, in den Körperproben nicht unterschiedlich bzw. in der Mitte der Nacht sogar leicht erhöht in *per*<sup>01</sup>. Ähnliches ließ sich bereits im Vorexperiment beobachten (vgl. Angehängte Abbildung 9 A). In diesem war die Konzentration von DAG 32:1 um ca. 50% in den Körperproben der Mutante gegenüber dem WT<sub>CS</sub> erhöht. Dementsprechend war auch die Gesamtkonzentration in diesem Experiment zu beiden Zeitpunkten in den Körperproben signifikant höher.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mobilisation der Speicherlipide und/oder der DAG-Metabolismus möglicherweise unter der Kontrolle der PER- abhängigen Uhr steht. Die drastischen Unterschiede in den Gesamt-DAG-Spiegeln, die in den Kopfproben beobachtet werden konnten, stimmt mit den Beobachtungen in den TAG-Spiegeln über ein, für welche bereits ein ähnlicher, wenn auch deutlich schwächerer Effekt gezeigt werden konnte.

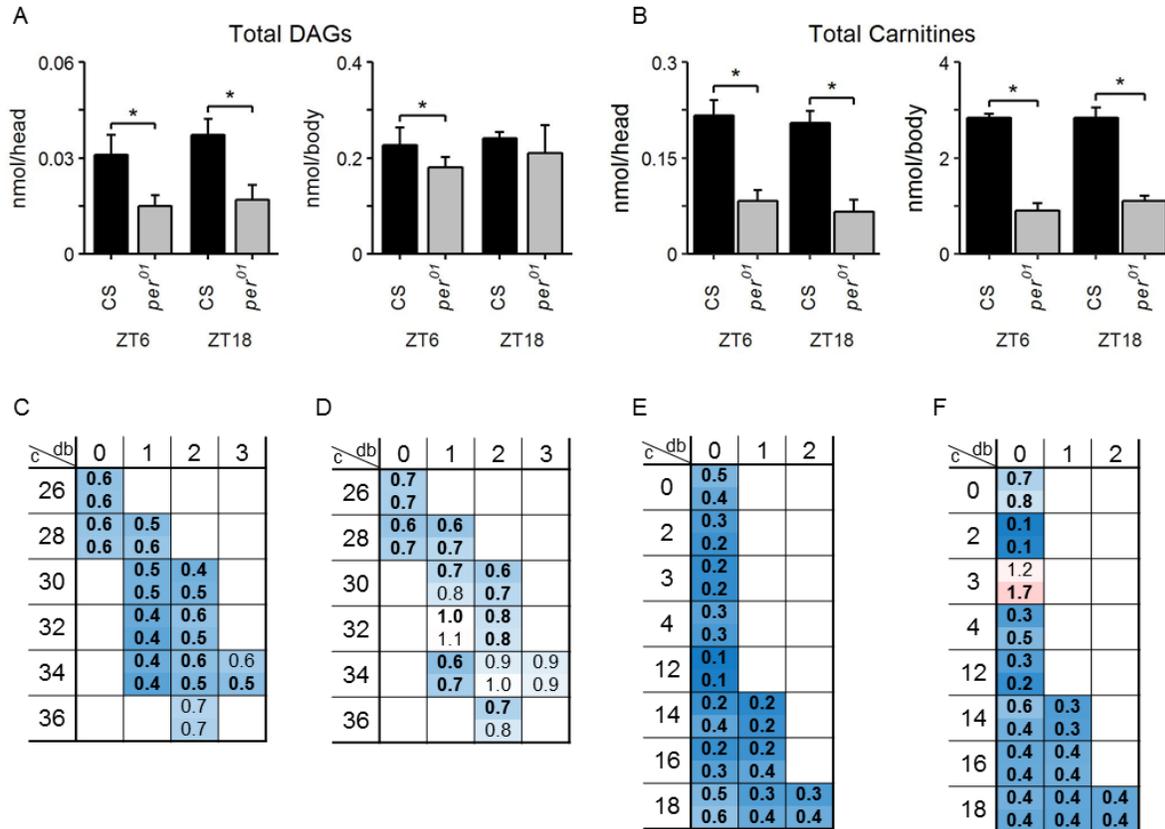
#### 3.1.4.2.3 Carnitin und Acetylcarnitine

Die Stoffgruppe der AC, von der Vertreter aufgrund ihres amphiphilen Charakters im ungerichteten Vergleich sowohl in der wässrigen als auch in der organischen Phase als sich signifikant unterscheidend ausgemacht wurden, hat bei der Energiebereitstellung aus der Oxidation von Fetten einen bedeutenden Rolle inne. Für das Trägermolekül, CAR, an das die aktivierten freien Fettsäuren gebunden werden, um anschließend über die mitochondriale Membran transportiert werden zu können, konnten zu beiden Zeitpunkten und in beiden Körperteilen in *per*<sup>01</sup> signifikant niedrigere Spiegel gezeigt werden (vgl. Abbildung 9 E, F). Der Transport der aktivierten Fettsäuren in die Mitochondrien ist die Grundlage dafür, dass diese in den Mitochondrien mittels  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden können. Das hierbei entstehende Acetyl-CoA kann anschließend im Citratzyklus durch Abspaltung des Acetylrest schrittweise zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut werden. Die dabei gebildeten Reduktionsmittel NADH und FADH<sub>2</sub> werden anschließend in der Atmungskette genutzt, um den universellen Energieträger ATP, mittels des Elektronentransfers von den Reduktionsmitteln auf ADP, zu regenerieren. Neben der  $\beta$ -Oxidation stellt der Pyruvatdehydrogenase-Komplex, der bei der Glycolyse entstehendes Pyruvat in den Mitochondrien decarboxyliert wird, eine weitere Quelle für Acetyl-CoA dar. Die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplex hängt dabei von der Verfügbarkeit von freiem CoA ab. Steigt die Konzentration von Acetyl-CoA schneller an als dessen Verbrauch und somit die Regeneration von freiem CoA im Citratzyklus, so besitzt CAR eine weitere wichtige Funktion als Puffer. Indem es als Substrat für die Carnitinacetyltransferase fungiert ermöglicht es die Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf CAR, was zur Bildung von ACAR und freiem CoA führt. Die Verfügbarkeit von freiem CoA stellt in Folge dessen sicher, dass die Aktivität des

Pyruvatdehydrogenase- Komplexes aufrechterhalten werden kann. Ein weiterer positiver Effekt dieser Reaktion ist die Speicherung von Acetylgruppen in Form von ACAR, welche im weiteren Verlauf wieder in Form von Acetyl-CoA dem Citratzyklus zugeführt werden können (Stephens et al. 2007). Somit besitzt CAR eine entscheidende Rolle für die Regulation der Energiegewinnung sowohl aus der Oxidation von Fettsäure als auch von Glukose.

Um den möglichen Einfluss des *per* Gens auf den mitochondrialen Energiemetabolismus zu untersuchen wurden neben CAR deshalb ACAR, sowie alle weiteren detektierbaren AC Spezies analysiert. Neben CAR und ACAR konnten zehn weitere AC Spezies identifiziert werden. Während die Stoffmengen von CAR und ACAR um ein Vielfaches höher waren als die der übrigen ACs, handelte es sich bei AC C16:0 um das abundanteste AC. Zusammen mit AC C12:0 und AC C14:0 machten diese den Hauptanteil der ACs, sowohl im Kopf als auch im Körper aus.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich wird, wiesen mit Ausnahme von Propionylcarnitine in den Körperproben, alle detektierbaren Carnitin Spezies signifikant niedrigere Spiegel sowohl in den Kopf als auch in den Körperproben in *per*<sup>01</sup> auf. Der beobachtete Effekt war hierbei unabhängig von den untersuchten Zeitpunkten speziesunspezifisch ausgeprägt. Die Spiegel der AC waren mindestens 40%, für einige Spezies sogar bis zu 90% niedriger in der Uhr-Mutante. Dies zeichnete sich auch in der Menge an gesamt Carnitin ab, das in der Uhr-Mutante sowohl im Kopf als auch im Körper um ungefähr 75% reduzierte Spiegel aufwies.



**Abbildung 9: Vergleich der DAG- und Carnitine-Stoffmenge zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>CS</sub>. (schwarz) A, B: Summe aller quantifizierter DAG- (A) bzw. Carnitine- (B) Spezies zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm; engl. head ) bzw. Körperproben (rechtes Diagramm; engl. body). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung; Sterne signalisieren statistisch signifikante (T-Test; p<0.05) Unterschiede (n = 7). C, D, E, F: Lipidspeziespezifisches (charakterisiert durch die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen der veresterten Fettsäuren (c) und die Anzahl an Doppelbindungen (db)) Verhältnis aus in *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> ermittelten Stoffmengen für DAGs (C, D) bzw. Carnitine (E, F), für die Kopf- (C, E) und Körperproben (D, F). Das obere, dargestellte Verhältnis entspricht hierbei ZT6, das untere ZT18. Fett dargestellte Zahlen symbolisieren statistisch signifikante (T-Test; p < 0.05) Unterschiede. Blaue Werte repräsentieren niedrigere (min.: 0), rote Werte (max.: 5) höhere Mengen in *per*<sup>01</sup> als in WT<sub>CS</sub> (n = 7)**

Betrachtet man die Summe der quantifizierten ACs und setzt diese ins Verhältnis zum Gesamtcarnitin- Gehalt, so fällt ins Auge, dass in WT<sub>CS</sub> in den Körperproben ca. 60%, in den Kopfproben ca. 50% des Gesamtcarnitins als Acylcarnitin vorliegen (vgl. Abbildung 9 B). In *per*<sup>01</sup> sind es hingegen in den Körperproben nur ca. 22%, in den Kopfproben 40%. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass lediglich eine Semiquantifizierung durchgeführt wurde und die Quantifizierungsmethode nicht validiert wurde. Dies könnte beispielsweise dann zum Problem

werden, wenn die Stoffmenge an ACAR überschätzt wird, da der zur Quantifizierung herangezogene Standard, das stabil isotoopenmarkierte D9-CAR, schlechter ionisiert als ACAR. Wird dies nicht durch die Verwendung eines Responsefaktors ausgeglichen, würde dies das Gleichgewicht von AC zu gesamt Carnitin in Richtung des AC verschieben. Da dies allerdings sowohl in der Mutante als auch im WT<sub>CS</sub> zu beobachten wäre, lassen sich zumindest die ermittelten Verhältnisse zwischen den beiden Genotypen vergleichen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in *per*<sup>01</sup> die Energiegewinnung aus der Oxidation von Fettsäuren reduziert ist. Dies wird zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt, dass die Trehalose Spiegel in *per*<sup>01</sup> signifikant erhöht waren (vgl. Angehängte Abbildung 11) was zusätzlich auf eine vermehrte Energiegewinnung aus dem Abbau von Zuckern hindeutet. Dieser Effekt war in den Kopf- und Körperproben ähnlich ausgeprägt (ca. 25% erhöht) zu beobachten (vgl. Angehängte Abbildung 11). Allerdings basierten diese Ergebnisse lediglich auf MS Daten, bei denen nicht zweifelsfrei zwischen den unterschiedlichen Zuckerisomeren unterschieden werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Anlage der Strukturlipide zwischen Fliegen mit einer funktionierenden Uhr und Fliegen, deren Uhr gestört ist, nur geringe Unterschiede aufweist. Anders verhält es sich hingegen bei den Lipiden, die primär zur Bereitstellung von Energie verwendet werden. Während die Speicher Form der Lipide, die TAGs lediglich reduzierte Spiegel in den Kopfproben, nicht jedoch in den Körperproben aufwies, zeigen sich für die Intermediate des Lipidstoffwechsels, die DAGs und die ACs deutlich reduzierte Spiegel in *per*<sup>01</sup>. Während dies für die DAGs besonders in den Kopfproben zu beobachten ist, lässt sich dieser Effekt für die ACs in beiden Körperteilen beobachten. Da die ACs den letzten Schritt im Abbau der Lipide darstellen und zusätzlich eine Verschiebung des CAR/ACAR Gleichgewichtes beobachtet wurde, könnte es sich hierbei um ein Anzeichen dafür handeln, dass es in Folge einer gestörten inneren Uhr zu einer Verschiebung der Energiegewinnung von der Oxidation von Fettsäuren hin zur Glycolyse kommt.

### 3.2 Tageszeitabhängige Schwankungen in Metabolitspiegeln

Eine weitere Möglichkeit zu überprüfen, ob Metaboliten bzw. Stoffwechselwege in Verbindung mit der inneren Uhr stehen, ist die Untersuchung ihrer Spiegel über die Zeit. Zeigen diese Spiegel wiederkehrende tageszeitabhängige Schwankungen, werden diese Metaboliten als rhythmisch oder oszillierend bezeichnet, was ein Hinweis darauf ist, dass deren Auf- bzw. Abbau durch die innere Uhr kontrolliert wird. Anschließend sollen deshalb nun Proben alle zwei Stunden über drei aufeinander folgende Tage genommen werden und auf wiederkehrende, tageszeitspezifische

Schwankungen (Rhythmen) hin untersucht werden. Die Analyse auf das Vorhandensein von Rhythmen fand hierzu zunächst unter LD-Bedingungen in WT<sub>CS</sub> Fliegen statt. Hierzu wurden zunächst ungerichtet die Spiegel aller detektierbaren features betrachtet (vgl. 3.2.1), bevor gezielt die *per*-Metaboliten (vgl. 3.2.2) und anschließend die AAs (3.2.3) sowie die Lipidspiegel der TAGs (vgl. 3.2.4.1), DAGs (vgl. 3.2.4.2) und ACs (vgl. 3.2.4.3) sowohl in ihrer Gesamtheit als auch lipidspeziesspezifisch untersucht wurden. Abschließend wurde die Metabolitklasse, deren Mitglieder die ausgeprägtesten Rhythmen in ihren Spiegeln aufwiesen, zusätzlich in WT<sub>CS</sub> unter DD- Bedingungen und anschließend in *per*<sup>01</sup> Fliegen unter LD- Bedingungen untersucht.

### 3.2.1 Ungerichtete Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in Metabolitspiegeln

Für die Analyse wurden erneut Kopf- und Körperproben, sowie die darin enthaltenen hydrophilen bzw. hydrophoben Metaboliten getrennt voneinander betrachtet (vgl. 3.2.1). Die Anzahl der detektierten und rhythmischen features ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Analyse ergab, dass 20% aller detektierten features laut JTK\_CYCLE wiederkehrende tageszeitabhängige Schwankungen bei einer definierten Periodenlänge von 24h aufwiesen. Dabei war der Prozentsatz an rhythmischen features in der wässrigen Phase und der organischen Phase vergleichbar (18% bzw. 23%). Betrachtet man die Körperteilspezifität dieser Rhythmen so zeigte sich, dass 20% aller rhythmischen features sowohl im Kopf als auch im Körper oszillierende Spiegel aufwiesen. Der Anteil an rhythmischen features, die spezifisch in den Kopfproben oszillierten lag bei 45%, in den Körperproben lag dieser bei 34%. Zusätzlich zeigte sich, dass der Großteil der, in der wässrigen Phase detektierten, rhythmischen features körperspezifisch waren, wohingegen in der organischen Phase drei Mal so viele rhythmische features im Kopf wie im Körper detektiert werden konnten.

**Tabelle 5: Anzahl detektierter und laut JTK\_CYCLE rhythmischer features (ADJ.p & BHQ < 0.05) in Kopf und Körperproben. Es wurden alle zwei Stunden über drei aufeinander folgende Tage Proben (je fünf Köpfe/Körper) analysiert (n(ZT) = 4-7).**

|                     | detektierte features |        |        |             | rhythmische features |        |        |             |
|---------------------|----------------------|--------|--------|-------------|----------------------|--------|--------|-------------|
|                     | Kopf                 | Körper | Körper | gesamt      | Kopf                 | Körper | Körper | gesamt      |
| wässrig             | 1276                 | 1649   | 1511   | <b>4436</b> | 182                  | 127    | 438    | <b>747</b>  |
| organisch           | 1426                 | 2248   | 1377   | <b>5051</b> | 695                  | 259    | 228    | <b>1182</b> |
| wässrig & organisch | 2702                 | 3897   | 2888   | <b>9487</b> | 877                  | 386    | 666    | <b>1929</b> |

Um aus diesen Daten biologische Schlüsse ziehen zu können, müssen die als rhythmisch ausgemachten features zunächst identifiziert und anschließend den zugrundeliegenden Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Da die bereits identifizierten *per*-Metaboliten als interessante Kandidaten für ein rhythmisches Verhalten angesehen werden können, sollten in der vorliegenden Arbeit lediglich diese im Datensatz identifiziert und das Verhalten deren Spiegel über die Zeit genauer untersucht werden.

Hierbei zeigte sich, dass besonders ACs, DAGs und TAGs robuste (niedriger BHQ) und deutlich ausgeprägte (hohe AMP.rel) Rhythmen aufwiesen. Zusätzlich konnte bei den hydrophilen Metabolite beispielsweise für die AAs Val, Trp und Leu/Ile signifikante Rhythmen gezeigt werden (vgl.

Angehängte Tabelle 6). Anders verhielt es sich bei den Strukturlipiden, den PEs und PCs. Von den 32 untersuchten Spezies fand sich keines, das in beiden Körperteilen rhythmisch war. In den Körperproben ließ sich ohnehin nur ein rhythmisches Strukturlipid, PE(36:2), detektieren. Im Kopf zeigten hingegen insgesamt fünf Spezies oszillierende Spiegel (PE(30:1), PE(36:2/5) PE-O(36:1/2)) (

Angehängte Tabelle 6). Diese erste JTK\_CYCLE-Analyse wurde auf Grundlage der normalisierten, ermittelten Peakflächen durchgeführt. Allerdings führen bereits relativ kleine Änderungen in den Peakflächen – hervorgerufen beispielsweise durch minimale Unterschiede in der Probenaufarbeitung oder der allgemeinen Geräteperformance – zu einer größeren Varianz in den untersuchten Zeitpunkten, was sich in einer höheren Standardabweichung widerspiegelt und somit die Aussagekraft des statistischen Tests verringert. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde die JTK\_CYCLE Analyse für die AAs, TAGs, DAGs und ACs auf Grundlage der (semi-)quantifizierten Daten durchgeführt (vgl. 3.2.2). Diese sind robuster gegenüber diesen Unterschieden, da die zur Quantifizierung herangezogenen internen Standards ebenso von den beschriebenen Effekten betroffen sind wie die Analyten selbst. Dies führt zu niedrigeren Standardabweichungen und somit zu präziseren Daten, was wiederum die Aussagekraft der JTK\_CYCLE-Analyse erhöht.

### 3.2.2 Gerichtete Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in den Spiegeln der identifizierten *per*-Metaboliten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Spiegel der identifizierten *per*-Metaboliten, sowie die weiteren Vertreter der ausgemachten Stoffwechselwege bzw. Lipidklassen auf ihr Verhalten über die Zeit untersucht werden. Die beobachteten, signifikanten Unterschiede der *per*-Metaboliten können als Indiz dafür betrachtet werden, dass deren Synthese, Umsetzung und/oder Abbau in Verbindung

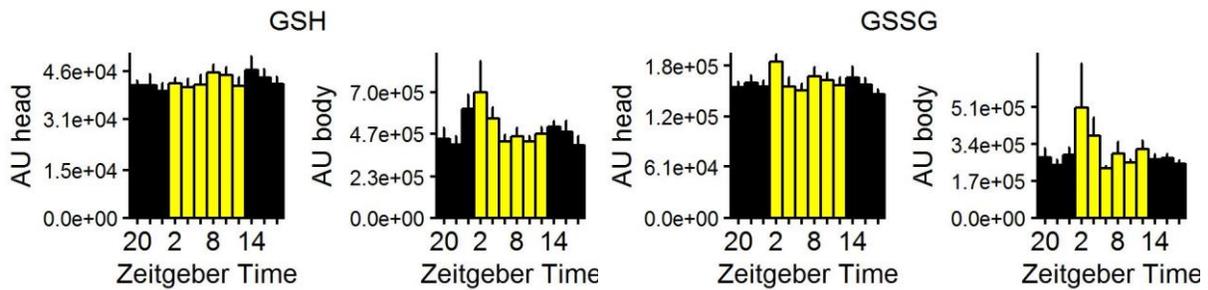
mit der inneren Uhr steht. Kommt es in Fliegen, deren PER- abhängige Uhr gestört ist, zum Verlust der zeitlichen Koordination der zugrundeliegenden Stoffwechselwege, so können abgeschwächte, verschobene oder der gänzliche Verlust tageszeitabhängiger Rhythmen die Folge sein. Somit könnte der Verlust der zeitlichen Koordination die Grundlage der beobachteten Unterschiede zwischen *per*<sup>01</sup> und dem WT<sub>CS</sub> sein. Voraussetzung hierfür ist, dass die Spiegel dieser Metaboliten im WT<sub>CS</sub> unter LD Bedingungen wiederkehrende Rhythmen mit klar definierten Maxima und Minima mit einer Periodenlänge von 24h aufweisen. Handelt es sich hingegen um konstitutive Unterschiede zwischen *per*<sup>01</sup> und dem WT<sub>CS</sub>, die sich nicht durch den Verlust bzw. die Verschiebung von etwaigen Rhythmen erklären lassen, sind diese möglicherweise Folge der sich unterscheidenden genetische Hintergründe, was somit gegen die Regulation dieser Stoffwechselwege durch die innere Uhr spricht.

#### 3.2.2.1 Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in den Spiegeln der hydrophilen per-Metaboliten

Da vor der Probenaufarbeitung kein Referenzmaterial für die später als *per*-Metaboliten ausgemachten Mitglieder des Kynurenin-, des Transsulfunierungs-, und des Purinstoffwechselweges, sowie für Trehalose zugegeben wurde, konnte die JTK\_CYCLE-Analyse für diese Metaboliten ausschließlich auf Grundlage der ermittelten Peakfläche durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich für den Kynureninstoffwechselweg, dass für das Ausgangsprodukt – Trp – zwar rhythmische Spiegel ausgemacht werden konnten, allerdings nicht für die weiteren untersuchten Mitglieder des Stoffwechselweges. Während die Spiegel von Kynurenin und Kynureninsäure in den Kopfproben unter dem Detektionslimit lagen und somit keine Auswertung möglich war, konnten auch für Hydroxykynurenin und Xanthurensäure in den Kopfproben keine statistisch signifikante Rhythmik ausgemacht werden. Auch in den Körperproben wies keine dieser Verbindungen wiederkehrende tageszeitabhängige Rhythmen auf (

Angehängte Tabelle 6). Dasselbe galt auch für die detektierbaren Mitglieder des Transsulfonierungsstoffwechselweges, Methylthioadenosin, Taurin, Cystathion, GSH und GSSG, bei denen laut der JTK\_CYCLE-Analyse lediglich Taurin in den Körperproben eine Rhythmik aufwies. Bei genauerer Betrachtung stach dennoch GSH hervor, für welches sowohl in den Kopf-, als auch in den Körperproben eine relative Amplitude größer fünf Prozent (vgl.

Angehängte Tabelle 6) ausgemacht werden konnte. Auch bei der Betrachtung der Spiegel über die Zeit, ließ sich für GSH in den Körperproben ein Maximum zu Beginn des Tages beobachten (vgl. Abbildung 10).



**Abbildung 10: Diurnale Rhythmik von GSH (A) & GSSG (B) Spiegel in WT<sub>CS</sub> Fliegen in Kopf (linker Plot) und Körper (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen (n = 12-21) + SE .**

Die Analyse der Pterine ergab, dass Pterin und Drosopterin, welche primär als Farbpigmente fungieren, keine Rhythmik aufwiesen. Biopterin hingegen war in den Kopfproben und Sepiapterin, was als Ausgangsprodukt für die Synthese von Biopterin dienen kann, in den Körperproben rhythmisch. Allerdings unterschieden sich die Maxima in den Spiegeln deutlich (Biopterin: ZT16; Sepiapterin: ZT22) und auch die relative Amplitude dieser Metaboliten war gering (<5%) (vgl. Angehängte Tabelle 6). Dihydrobiopterin wurde zwar detektiert, war allerdings weder in den Kopf- noch in den Körperproben rhythmisch.

Dies deutet darauf hin, dass die ausgemachten Unterschiede zwischen *per<sup>01</sup>*- und den WT<sub>CS</sub>-Fliegen, zumindest was den Purin- und den Kynurenin-Metabolismus betrifft, vermutlich auf Unterschiede im genetischen Hintergrund und nicht auf den Einfluss der inneren Uhr zurückzuführen sind. Bei den Mitgliedern des Transsurationsstoffwechsels hingegen könnte eine gerichtete Analyse – besonders von GSH und GSSG – durchaus lohnend sein, da sich für diese Verbindungen ein Zusammenhang zwischen der inneren Uhr und den Metabolitspiegeln ausgehend von den gezeigten Daten nicht vollständig ausschließen lässt.

Da es sich bei den AAs um die Stoffgruppe handelte, von der mehrere Vertreter sowohl unterschiedlich zwischen  $per^{01}$  und  $WT_{CS}$  und zusätzlich Val, Leu/Ile und Trp bei der Analyse der Peakflächen als rhythmisch im  $WT_{CS}$  ausgemacht wurden (vgl. Angehängte Tabelle 6), wurden alle detektierbaren AAs quantifiziert und mittels JTK\_CYCLE auf ihre Rhythmik hin untersucht. Die Ergebnisse hiervon sind in Tabelle 6 dargestellt. Zusätzlich wurden, um den rhythmischen Verlauf der Spiegel über die Zeit zu zeigen, die zwölf untersuchten Zeitpunkte pro Tag jeweils über die drei Tage gemittelt und als ein repräsentativer Tag dargestellt (vgl. Angehängte Abbildung 13).

**Tabelle 6: JTK\_CYCLE Ergebnisse der quantifizierten AAs. Eine AA wurde als rhythmisch angesehen (grün hervorgehoben), wenn sowohl BH.Q und ADJ.P bei einer Periodenlänge von 24h kleiner 0.05 war. BH.Q Benjamini-Hoechberg Falscherkennungsrate, ADJ.P korrigierter p-value, LAG Phase (Maximum) der Oszillation, AMP.rel relative Amplitude [%]**

|         | Kopf    |         |     |     |         | Körper  |         |     |     |         |
|---------|---------|---------|-----|-----|---------|---------|---------|-----|-----|---------|
|         | BH.Q    | ADJ.P   | PER | LAG | AMP.rel | BH.Q    | ADJ.P   | PER | LAG | AMP.rel |
| Tyr     | 4.2E-09 | 3.5E-10 | 24  | 16  | 42      | 7.5E-01 | 3.5E-01 | 24  | 19  | 4       |
| Asn     | 1.5E-03 | 2.5E-04 | 24  | 20  | 149     | 1.0E+00 | 7.7E-01 | 24  | 21  | 97      |
| Val     | 2.3E-03 | 5.6E-04 | 24  | 8   | 14      | 8.2E-05 | 6.3E-06 | 24  | 8   | 15      |
| Pro     | 1.1E-02 | 4.4E-03 | 24  | 16  | 2       | 1.4E-01 | 5.3E-02 | 24  | 18  | 2       |
| Gln     | 1.1E-02 | 4.4E-03 | 24  | 1   | 0       | 1.0E+00 | 8.4E-01 | 24  | 23  | 1       |
| Trp     | 2.3E-02 | 1.1E-02 | 24  | 0   | 11      | 7.7E-02 | 2.4E-02 | 24  | 3   | 2       |
| Glu     | 4.1E-01 | 2.4E-01 | 24  | 14  | 3       | 2.3E-03 | 3.5E-04 | 24  | 16  | 4       |
| Leu/Ile | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 12  | 26      | 5.2E-02 | 1.2E-02 | 24  | 8   | 5       |
| Asn     | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 14  | 6       | 1.0E+00 | 8.0E-01 | 24  | 6   | 142     |
| Arg     | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 18  | 6       | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 20  | 1       |
| His     | 1.0E+00 | 9.6E-01 | 24  | 18  | 6       | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 18  | 4       |
| Phe     | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 0   | 266     | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 18  | 18      |
| Met     | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d     | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 6   | 3       |

Die Analyse bestätigte die Rhythmik von Val in Kopf und Körper, welches mit einer relativen Amplitude von annähernd 15% die AA darstellte, deren tageszeitabhängige Schwankungen am stärksten ausgeprägt war. Leu/Ile wies im Körper zwar einen ADJ.P Werte kleiner 0.05 auf, allerdings war der BHQ-Wert knapp über dem festgesetzten Limit (<0.05) für rhythmische Metaboliten. Nichts desto trotz konnte ein Maximum ausgemacht werden, welches wie auch für Val, in beiden Körperteilen, zur Mitte des Tages vorlag (ZT8) und auch die relative Amplitude von 5.4% in den Körperproben deutet auf ein rhythmisches Verhalten hin.

Zusätzlich konnte für Glu im Körper, sowie für Gln, Asn, Tyr, Prolin (Pro) und Trp im Kopf rhythmische Spiegel ausgemacht werden. Während die Spiegel von Val ein Maximum zur Mitte

des Tages aufwiesen, war für Tyr und Pro im Kopf sowie Glu im Körper ein Maximum in der Mitte der Nacht (ZT16) erkennbar. Trp, Gln und Asn hatten ihr Maximum hingegen in der späten Nacht bzw. am frühen Morgen. Bei der Betrachtung der relativen Amplitude fiel in den Kopfproben auf, dass sowohl Tyr als auch Asp ungewöhnlich hohe Werte aufwiesen (42 bzw. 149%). Dies ist vermutlich auf eine fehlerhafte Berechnung der AMP durch JTK\_CYCLE zurückzuführen, da die Intensität dieser AAs in den Kopfproben nur knapp über der Detektionsgrenze lag, was eine zuverlässige Quantifizierung unmöglich macht. Mit Ausnahme der AAs Val und Trp in Kopfproben (>10%), zeichneten sich die übrigen, als rhythmisch ausgemachten AAs durch niedrige relative Amplituden aus (<5%). Zusammengenommen mit den Ergebnissen aus dem Vergleich zwischen *per*<sup>01</sup>- und WT<sub>CS</sub>-Fliegen, wo ebenfalls Val, Leu/Ile und Trp hervorstechen, deutet dies auf einen Einfluss der Uhr auf den Metabolismus dieser AAs hin.

#### 3.2.2.2 Analyse von tageszeitabhängigen Schwankungen in den Lipidspiegeln

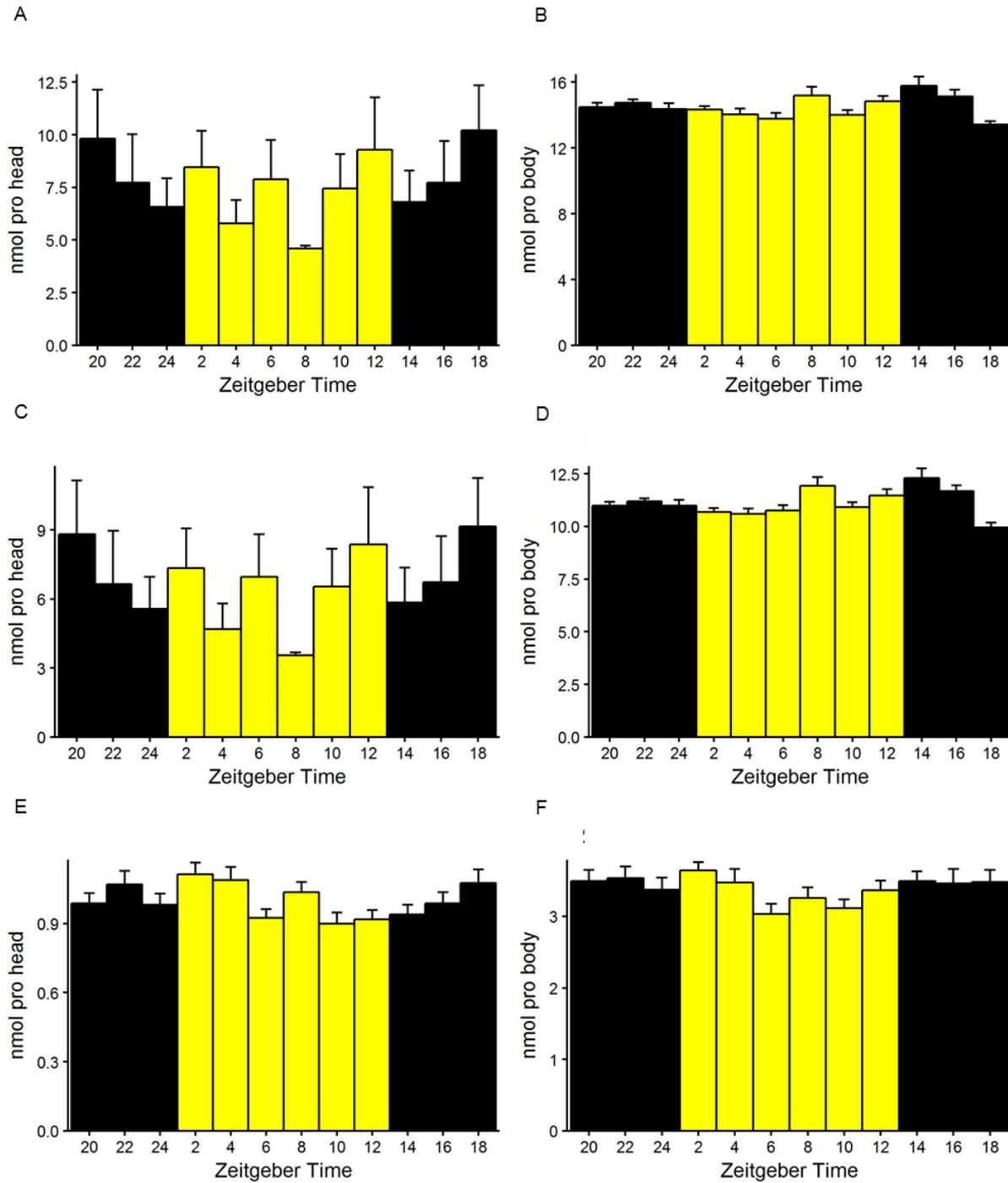
Unter den *per*-Metaboliten stachen besonders die TAGs, DAGs und ACs bei der tageszeitabhängigen Analyse basierend auf der Peakfläche hervor (vgl. Angehängte Tabelle 6). Ein Großteil dieser war rhythmisch und zusätzlich zeigten diese, Klassen übergreifend, ein vergleichbares Maximum. Um die mögliche zeitliche Koordination des Energiemetabolismus genauer zu untersuchen, wurden alle detektierbaren TAG, DAG und AC Spezies semiquantifiziert und erneut auf ihre Rhythmik hin untersucht. Hierfür wurde für CAR und die ACs das gesamte Experiment wiederholt und die Extraktionsmethode sowie die Analysemethode für diese Stoffgruppe optimiert (vgl. 2.3.2), da sich besonders die langkettigen ACs aufgrund ihres amphiphilen Charakters sowohl in der hydrophilen als auch der hydrophoben Phasen finden ließen. Zusätzlich zur speziesspezifischen Betrachtung wurde auch das Verhalten der Lipidklassen analysiert. Hierfür wurde die Stoffmenge aller detektierten Lipidspezies der einzelnen Klassen aufsummiert und mittels JTK\_CYCLE analysiert.

##### 3.2.2.2.1 Verhalten der gesamt- bzw. speziesspezifischen TAG-Spiegel über die Zeit

Die gezielte Analyse der TAGs in den Körperproben ergab, dass nahezu die Hälfte (28/59) aller detektierten Spezies rhythmisch waren (vgl. Angehängte Tabelle 7). Von diesen wiesen zwei Drittel eine relative Amplitude von mehr als 5% auf. In den Kopfproben waren hingegen nur rund 20% (10/53) der quantifizierten Spezies rhythmisch. Diese wiesen jedoch durchweg eine relative Amplitude größer 5% auf. Zusätzlich waren alle im Kopf als rhythmisch identifizierten TAGs ebenfalls im Körper rhythmisch. Bei der Betrachtung der Phase zeigte sich, dass die TAGs anhand ihres Oszillationsmaximums in zwei Gruppen unterteilt werden können (vgl. Abbildung 11). Während die eine Gruppe (Gruppe 1) ein Maximum zu Beginn der Nacht aufwies (ZT 14), hatte die andere (Gruppe 2) eins am Übergang von Nacht zu Tag (ZT2 - 4). Bei der Gruppe 1 handelte

es sich primär um Spezies (n=32), die ungeradzahlige Fettsäuren enthielten und solche die eine Gesamtkettenlänge von weniger als 48 Kohlenstoffatomen hatten und zusätzlich maximal zweifach ungesättigt waren. In der zweiten Gruppe fanden sich hingegen TAGs (n=29) mit einer Gesamtkettenlänge von 48 oder mehr Kohlenstoffatomen oder aber solche, die mehrfach (>2) ungesättigt waren.

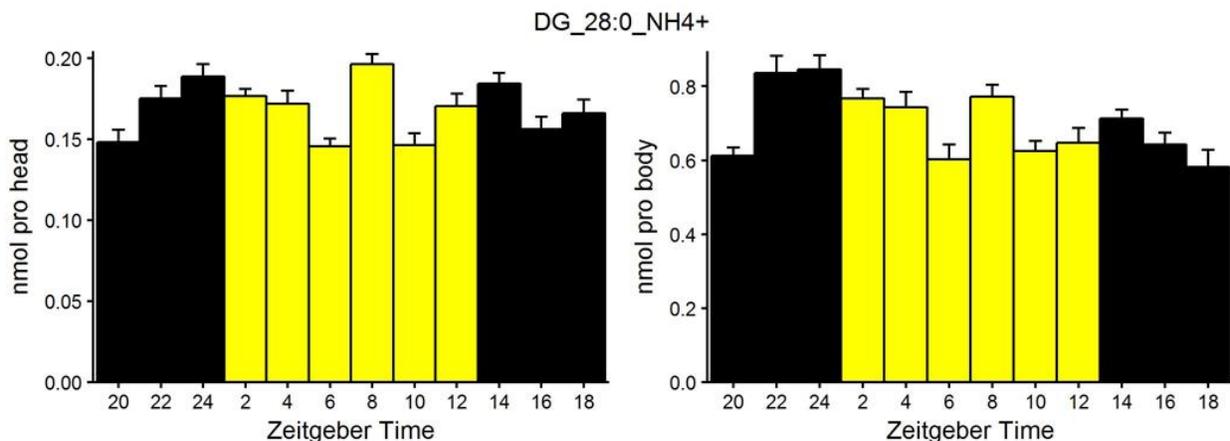
Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Betrachtung der Gesamtheit aller TAGs wider, die weder in den Kopf- noch in den Körperproben ein oszillierendes Profil aufweisen (vgl. Abbildung 11), möglicherweise hervorgerufen durch die Phasenlöschung der beiden Profile. Gruppiert man die Spezies anhand ihrer Gesamtkettenlänge bzw. dem Grad ihrer Ungesättigtheit, so weist die Gruppe, die aus den kurzkettigen TAGs besteht (Gruppe 1), in den Körperproben signifikante Rhythmen auf. Für die andere Gruppe (Gruppe 2) liegt der p-Wert sowohl im Kopf als auch im Körper knapp über dem festgelegten Grenzwert für statistisch signifikante Rhythmen (vgl. Angehängte Tabelle 8). Das Verhalten der Gesamt-TAGs sowie der beiden Gruppen ist für die zwölf untersuchten Zeitpunkte pro Tag jeweils über die drei Tage gemittelt und als ein repräsentativer Tag dargestellt in Abbildung 11 zu sehen. Interessanterweise lässt sich in beiden Gruppen ein zusätzlicher Peak zur Mitte des Tages (ZT8) beobachten. Nichtsdestotrotz sind die beobachteten Rhythmen nur gering ausgeprägt, was nicht verwunderlich ist, da es sich bei den TAGs um die Speicherform der Lipide handelt. Somit verfügen die Fliegen über einen großen, konstitutiven Gehalt an TAGs, was dazu führt, dass die tageszeitabhängigen Schwankungen relativ betrachtet, gering ausfallen.



**Abbildung 11: Diurnale Rhythmik der TAG Spiegel in WT<sub>CS</sub> Fliegen in Kopf (A, C, E) und Körper (B, D, F). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte an der Summe aller TAGs (A, B), Gruppe 1 (C, D) und Gruppe 2 (E, F) aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE (n = 12-21).**

### 3.2.2.2 Verhalten der gesamt- bzw. speziesspezifischen DAG-Spiegel über die Zeit

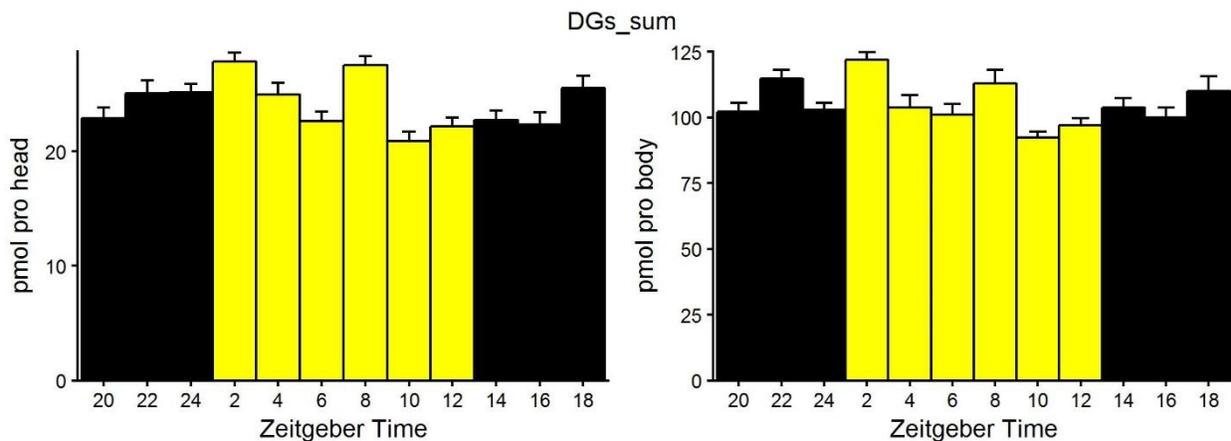
Anders als bei der Speicherform der Lipide, den TAGs, verhält es sich mit der Transportform, den DAGs. Ihre Analyse ergab, dass 70% (7/10) der untersuchten Spezies zumindest in einem Körperteil rhythmisch waren (vgl. Angehängte Tabelle 7). Besonders auffällig war, dass es sich bei den beiden Hauptspezies, DAG(32/34:1), um die einzigen handelte, die sowohl im Kopf als auch im Körper oszillierten (vgl. Angehängte Tabelle 7, Angehängte Abbildung 15). Bei genauerer Betrachtung der Oszillation zeigte sich, dass die Spiegel der beiden Spezies durch ein Maximum zu Beginn des Tages geprägt sind, welches über den Verlauf der Lichtphase hinweg abnimmt. Zusätzlich konnte ein weiteres, weniger stark ausgeprägtes Maximum in der Mitte der Nacht (ZT18) beobachtet werden. Während in den Kopfproben keine DAG Spezies, die eine Gesamtkettenlänge kleiner 32 Kohlenstoffatome aufwiesen, mit einer Periodenlänge von 24h oszillierte, zeigten im Körper auch die Spezies 28:0 sowie 30:(1/2) rhythmische Spiegel mit einer Periodenlänge von 24h. Die visuelle Inspektion dieser Spezies in den Kopfproben ergab, dass diese womöglich auch in den Kopfproben rhythmisch sind, allerdings mit einer Periodenlänge die weniger als 24h beträgt. Somit würde es sich bei diesen Rhythmen um ultradiane Rhythmen handeln, auf welche der Datensatz nicht untersucht wurde (vgl. Abbildung 12).



**Abbildung 12: Diurnale Rhythmik von DAG(28:0) in WT<sup>cs</sup> Fliegen in Kopf (linker Plot) und Körper (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte an den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE (n = 12-21).**

Um zu überprüfen ob es sich hierbei tatsächlich um ultradiane Rhythmen handelt und diese statistisch signifikant sind, müsste die JTK\_CYCLE Analyse erneut durchgeführt werden und dabei die zu untersuchenden Periodenlängen so gewählt werden, dass diese auch Periodenlängen ungleich 24h annehmen können. Unabhängig von dieser Beobachtung, war allen DAG-Spezies gemein, dass sie sowohl im Kopf als auch im Körper ein Maximum zu Beginn der

Lichtphase, sowie ein weiteres zur Mitte der Nacht aufwiesen. Dies wurde bei der statistischen Analyse der Gesamtmenge an DAGs bestätigt. Hierbei konnten in beiden Körperteilen, anders als für die TAGs, schwache aber signifikante Oszillationen gezeigt werden (vgl. Abbildung 13, Angehängte Tabelle 8). Diese zeichneten sich durch das vorherig beschriebene Maximum zu Beginn der Lichtphase aus. Des Weiteren konnte, besonders in den Kopfproben, das bereits bei den TAGs erkennbare, zusätzliche Maximum bei ZT8 beobachtet werden (vgl. Abbildung 13). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Mobilisation der TAGs und somit die Bildung der DAGs zeitlich koordiniert werden.

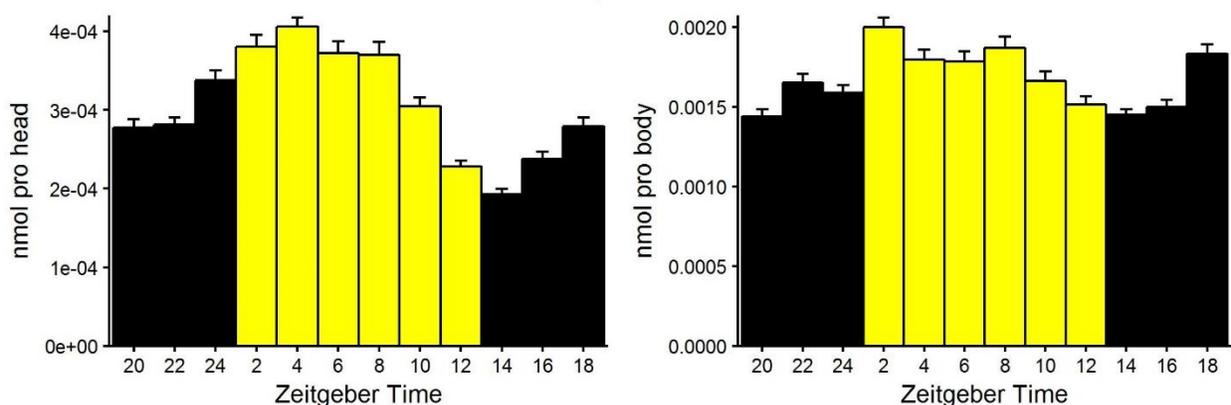


**Abbildung 13: Diurnale Rhythmik der der Summe aller detektierten DAG-Spezies in WT<sup>cs</sup> Fliegen in Kopf (linker Plot) und Körper (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte an den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE (n = 12-21).**

### 3.2.2.2.3 Verhalten der gesamt- bzw. speziesspezifischen AC-Spiegel über die Zeit

Die rhythmischen Änderungen in den Spiegel der AC über die Zeit, die bei der Analyse der *per*-Metaboliten in WT<sup>cs</sup> festgestellt wurde (vgl. Angehängte Tabelle 6), ließ sich unter Verwendung der Carnitin-Methode (vgl. 2.4.2.1.2) bestätigen (vgl. Angehängte Tabelle 9). Alle elf detektierten AC-Spezies, sowie CAR selbst, wiesen in den Kopfproben rhythmische Spiegel auf (vgl. Angehängte Abbildung 16 und Angehängte Tabelle 9). Bei der Analyse der Maxima fiel auf, dass diese sich zwischen den mittel- bzw. langkettigen (C12-18) und den kurzkettigen ACs (C2-4) unterschieden. Während erstere ihr Maximum in den Morgenstunden aufwiesen (ZT4), war das Maximum für Propionyl- und Butyrylcarnitin sowie für CAR selbst am Ende der Nacht beobachtbar (ZT22). Eine Ausnahme bildete ACAR, dessen Maximum gleich dem der langkettigen ACs war. Ähnliche Ergebnisse konnten für die Körperproben beobachtet werden, in denen primär die langkettigen ACs (C16:(0/1); C18:(0/1/2)) rhythmische Spiegel aufwiesen. Die Analyse der

kurzkettigen Spezies ergab, dass lediglich Butyrylcarnitin in den Körperproben rhythmisch war. Die Lage der Maxima verhielt sich für die rhythmischen Spezies in den Körperproben wie in den Kopfproben. Allerdings waren die Oszillationen in den Körperproben schwächer ausgeprägt als in den Kopfproben. Während in letzteren die relative AMP für die ACs zwischen 15 und 33% lagen, war die höchste relative AMP in den Körperproben bei knapp 13% (Octadecadienylcarnitine(C18:2)). Betrachtet man die Summe der mittel- und langkettigen ACs so fällt besonders in den Kopfproben die Rhythmik der Spiegel, die sich durch höhere Spiegel in der Lichtphase als in der Dunkelphase und ein Maximum in der ersten Hälfte des Tages auszeichnen, auf (vgl. Abbildung 16 A). Dem gegenüber steht die Summe der mittel- und langkettigen ACs in den Körperproben, die keinerlei Rhythmik aufwiesen (vgl. Abbildung 16 B und Angehängte Tabelle 8). Eine genauere Betrachtung dieser Ergebnisse brachte hervor, dass die Ursache hierfür in den Spiegeln der AC Spezies C12:0 und C14:0 liegt. Betrachtet man im Körper nur die Spiegel der langkettigen ACs, deren Kettenlänge mindesten 16 Kohlenstoffatome aufweist, so sind diese ebenso wie im Kopf rhythmisch, wenn auch mit niedrigerer relativer AMP (Abbildung 14 und Angehängte Tabelle 8). Zusätzlich spiegeln diese das Profil der Oszillation der DAGs mit einem Peak zu Beginn der Lichtphase und zur Mitte der Nacht, sowie einem leichten Anstieg der Spiegel zum Zeitpunkt ZT8 wider. Diese Ergebnisse verhärten den Verdacht auf eine zeitliche Koordination des Lipidstoffwechsels, der sich bereits bei den DAGs abgezeichnet hat. Dafür spricht neben der Tatsache, dass sich lipidklassenübergreifend Maxima zu Beginn des Tages besonders in den Kopfproben ausmachen lassen, auch, dass die Zunahme der relativen Amplitude mit zunehmender Spezialisierung der jeweiligen Lipidklassen beobachtet werden kann.



**Abbildung 14: Diurnale Rhythmik der langkettigen AC-Spezies (C > 14) in WT<sub>CS</sub> Fliegen in *head* (linker Plot) und *body* (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte an den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE (n = 18-21).**

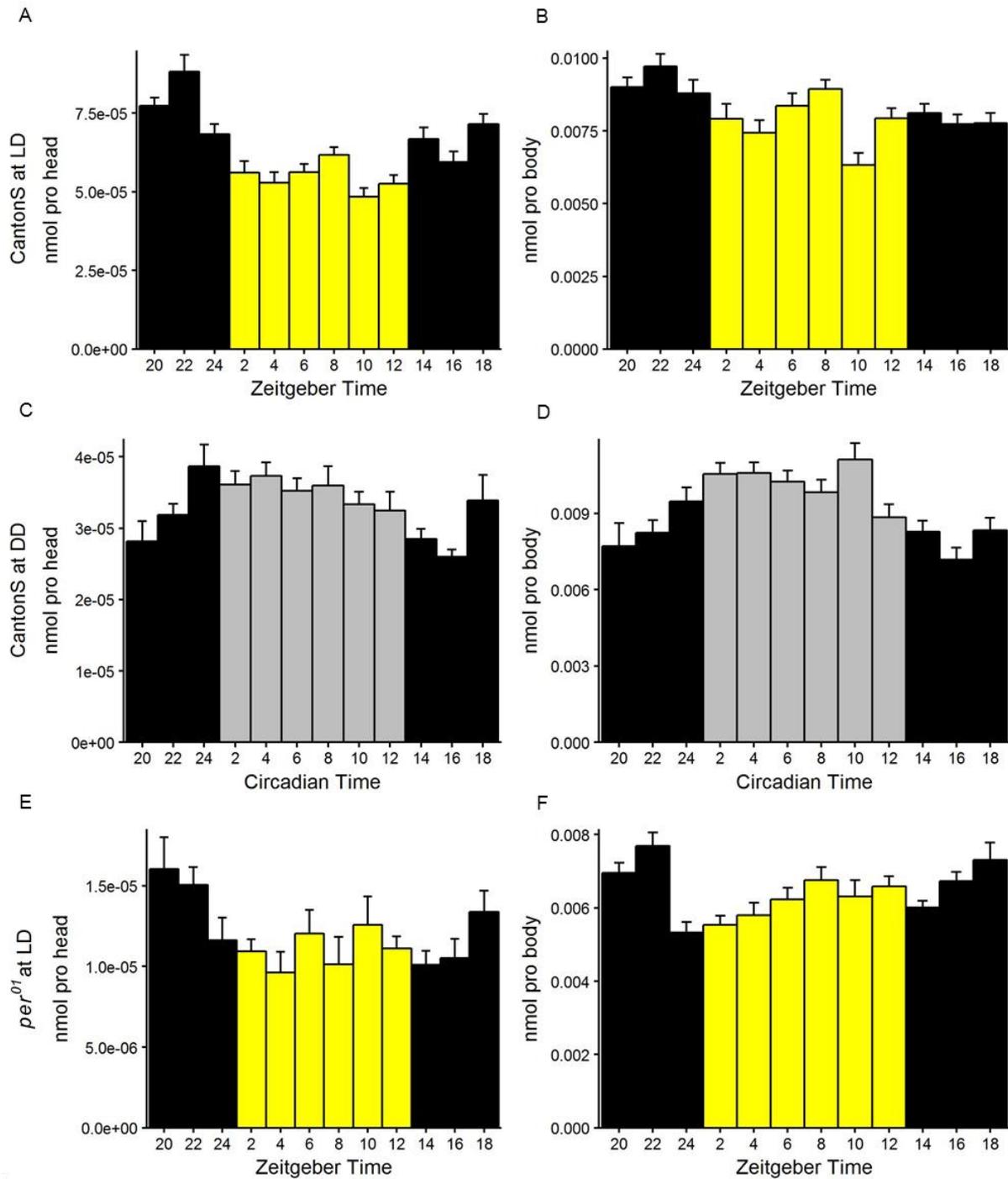
#### 3.2.2.2.4 Ist rhythmisches Verhalten der Carnitin Spiegel auch in WTCS Fliegen unter DD- bzw. *per*<sup>01</sup> Fliegen unter LD-Bedingungen beobachtbar?

Da es sich bei den ACs um das letzte, im Datensatz detektierbare Intermediat in der Lipiddegradation handelt und die bisherig vorgestellten Ergebnisse darauf hindeuten, dass die PER- abhängige Uhr einen Einfluss auf deren Synthese und/oder Metabolismus zu haben scheint, wurde der zeitliche Verlauf der Spiegel der ACs nun zusätzlich unter Freilaufbedingungen (DD) in WT<sub>CS</sub> und unter LD Bedingungen in *per*<sup>01</sup> untersucht. Unter Freilaufbedingungen erfolgte die Probennahme alle zwei Stunden über zwei, in *per*<sup>01</sup> unter LD Bedingungen über drei Tage. Die Acylcarnitinspiegel wurden sowohl im Kopf als auch im Körper bestimmt und mittels JTK\_CYCLE auf ihre Rhythmik hin untersucht.

Während in den Kopfproben der WT<sub>CS</sub> Fliegen unter LD Bedingungen alle untersuchten Spezies wiederkehrende Rhythmen aufwiesen, ließen sich diese in Kopfproben des WT<sub>CS</sub> unter DD-Bedingungen, sowie in *per*<sup>01</sup> Köpfen unter LD-Bedingungen nur für einige Spezies beobachten (vgl. Angehängte Tabelle 9 und Angehängte Abbildung 16). So konnten lediglich für die kurzkettigen ACs Propionyl- und Butyrylcarnitin, sowie das AC Tetradecanoylcarnitin(C14:0), mit einer mittleren Kettenlänge, statistisch signifikante Oszillationen in allen drei Experimenten gezeigt werden. Dabei war die relative AMP in den WT<sub>CS</sub> Fliege unter LD- sowie DD- Bedingungen und in *per*<sup>01</sup> Fliegen für die beiden kurzkettigen ACs vergleichbar. Während auch die Lage des Maximums dieser im WT<sub>CS</sub> LD und *per*<sup>01</sup> LD gleich war (ZT21/22), zeigte sich ein komplett gegenteiliger Verlauf für WT<sub>CS</sub> DD. Unter DD Bedingungen ähnelte deren Profil dem der langkettigen ACs unter LD Bedingungen, das sich durch ein Maximum der Spiegel in der ersten Tageshälfte (ZT2 – ZT4) auszeichnet. Die Oszillation von Tetradecanoylcarnitin(C14:0) wies hingegen sowohl im WT<sub>CS</sub> DD als auch in *per*<sup>01</sup> eine geringere relative AMP (WT<sub>CS</sub> DD 13%; *per*<sup>01</sup> 15%) als im WT<sub>CS</sub> LD (28%) auf und zusätzlich war das Profil der Oszillation unter diesen Bedingungen verschoben (Maximum in der Nacht (ZT14-ZT18) anstatt am Tag (ZT5)).

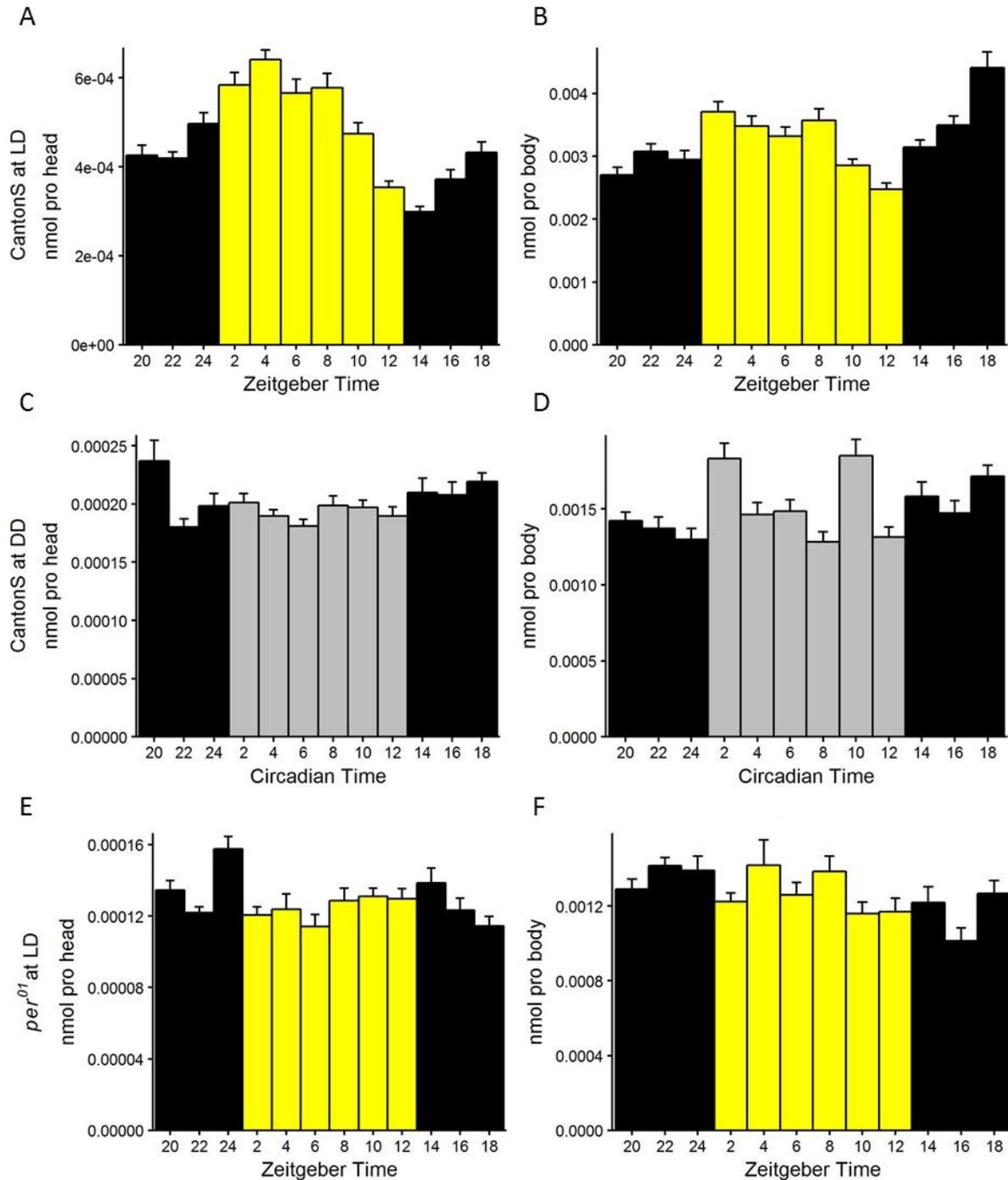
CAR und ACAR zeigten zwar in allen drei Experimenten in den Kopfproben dasselbe Maximum, allerdings war die Oszillation nur in WT<sub>CS</sub> LD und *per*<sup>01</sup> Fliegen statistisch signifikant (vgl. Angehängte Tabelle 9 und Angehängte Abbildung 16). Zusätzlich zeigte sich, dass die, über alle Zeitpunkte gemittelte Stoffmenge dieser Substanzen in den verschiedenen Experimenten unterschiedlich war. Während die Menge an CAR zwischen WT<sub>CS</sub> LD und DD vergleichbar war, belief sich die ACAR Menge im WT<sub>CS</sub> DD nur auf ca. 50% der unter LD Bedingungen bestimmten Menge. In *per*<sup>01</sup> machten sowohl die CAR als auch die ACAR Spiegel nur rund ein Drittel der im WT<sub>CS</sub> LD gemessenen Menge aus, was eine Bestätigung der Ergebnisse aus dem vorangegangenen Vergleich von *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub>-Fliegen darstellt. Bei der Betrachtung der

langkettigen ACs in den Kopfproben konnte ein nahezu vollständiger Verlust der unter LD Bedingungen beobachteten Rhythmen sowohl in WT<sub>CS</sub> DD-Fliegen als auch in *per<sup>01</sup>*-Fliegen beobachtet werden. Während sich in der *per<sup>01</sup>* Mutante für die langkettigen ACs zwar ein schwach ausgeprägtes Maximum zum Ende der Nacht zeigte, konnten in WT<sub>CS</sub> Fliegen unter DD Bedingungen nahezu keine Änderung der Spiegel über die Zeit beobachtet werden. Dies zeichnete sich auch bei der Analyse der Menge der aufsummierten kurz bzw. mittel- und langkettigen Carnitinspezies ab, bei der lediglich für die kurzkettigen Spezies (vgl. Abbildung 15: A, C, E) in allen drei Bedingungen wiederkehrende Rhythmen, nicht aber für die langkettigen Spezies (vgl. Abbildung 16: A, C, E), Rhythmen detektiert werden konnten.



**Abbildung 15: Diurnale Rhythmik der kurzketigen ( $C < 5$ ) AC-Spiegel in  $WT_{cs}$  (A, B, C, D) und  $per^{01}$  Fliegen (E, F) in *head* (A, C, E) und *body* (B, D, F). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte an der Summe der kurzketigen ACs unter LD- (A, B), DD-Bedingungen (C, D) und unter LD-Bedingungen in  $per^{01}$  (E, F) aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE ( $n = 18-21$ ).**

Bei Betrachtung der Körperproben in *per<sup>01</sup>* Fliegen zeigte sich, dass bis auf zwei Spezies (C16/18:1), die Spiegel aller Carnitine rhythmisch waren. Betrachtet man die Maxima der langkettigen ACs mit einer Kettenlänge von mindestens 16 Kohlenstoffatomen (vgl. Angehängte Tabelle 9) so fanden sich diese sowohl in *per<sup>01</sup>* als auch in WT<sub>CS</sub> Fliegen unter LD Bedingungen in der ersten Tageshälfte (ZT2 -ZT8). Allerdings war in der *per*-Mutante die rel.AMP für diese schwächer (durchschnittlich 7.5% anstatt 9.5%) und die Varianz in den analysierten Zeitpunkten höher, was sich auch in den Kenngrößen zur Ermittlung der statistischen Signifikanz widerspiegelte. Besonders deutlich zeigte sich dies bei der Analyse der Summe der langkettigen ACs (C>16). Während der BH.Q Wert von 0.05 in den *per<sup>01</sup>* Proben nur knapp unterschritten (4.47E-02) wurde, war er in WT<sub>CS</sub> Fliegen unter LD Bedingungen hoch signifikant (1.36E-08). In WT<sub>CS</sub> Fliegen unter DD Bedingungen konnte für kein langkettiges AC eine signifikante Oszillation festgestellt werden. Allerdings fiel bei der visuellen Betrachtung auf, dass all diesen Spezies ein Maximum zum Beginn des Tages (ZT2) und zum Ende des Tages (ZT10) gemein ist.



**Abbildung 16: Diurnale Rhythmik der mittel- und langkettigen ( $C > 4$ ) AC-Spiegel in  $WT_{cs}$  (A, B, C, D) und  $per^{01}$  (E, F) Fliegen in *head* (A, C, E) und *body* (B, D, F). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte an der Summe der kurzkettigen ACs unter LD- (A,B), DD-Bedingungen (C, D) und unter LD-Bedingungen in  $per^{01}$  (E, F) aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE ( $n = 18-21$ ).**

In den Körperproben waren unter DD Bedingungen lediglich die kurzkettigen ACs, Acetyl-, Propionyl- und Butyrylcarnitin rhythmisch. Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen in WT<sub>CS</sub> Fliegen unter LD Bedingungen, wo lediglich Butyrylcarnitin statistisch signifikante Rhythmen aufwies. Zusätzlich zeigte sich, dass die Profile der Oszillationen unterschiedlich waren. Während unter LD Bedingungen die Spiegel für ACAR während der Lichtphase, die von Propionyl- bzw. Butyrylcarnitine in der Nachtphase höher waren, konnte zumindest für die letzteren das Gegenteil für die WT<sub>CS</sub> Fliegen unter DD Bedingungen beobachtet werden. Die Spiegel in *per<sup>01</sup>* verhielten sich für Propionyl- bzw. Butyrylcarnitin vergleichbar zum WT<sub>CS</sub> unter LD, jedoch war die rel.AMP in *per<sup>01</sup>* deutlich größer (8% anstatt 1,5% für Propionylcarnitin bzw. 19% anstatt 8% für Butyrylcarnitin). Dies ist besonders interessant, da letztere neben CAR und ACAR in den Körperproben die Hauptspezies ausmachen.

Zusammengenommen bestätigen diese Ergebnisse, was sich bereits beim gentotypischen Vergleich zwischen *per<sup>01</sup>* und WT<sub>CS</sub> abgezeichnet hat. Während die Speicher- und Struktur lipide nur eine schwache bzw. keine tageszeitabhängige Rythmik in den Spiegeln aufweisen, ist diese für die Intermediate des Lipidmetabolismus – die DAGs und ACs – erkennbar und deutlich stärker ausgeprägt. Die Analyse der Carnitinspiegel im WT unter Freilaufbedingungen sowie in *per<sup>01</sup>* unter LD-Bedingungen deuten jedoch darauf hin, dass der Abbau der Fettsäuren nicht nur durch der PER- abhängigen Uhr, sondern auch vom Zeitgeber Licht beeinflusst wird. Um ein besseres Verständnis dafür zu erlangen, wie dieses Zusammenspiel konkret von statten geht, bedarf es allerdings weiterer Studien, die sich dieser Fragestellung gezielt widmen.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, heraus zu finden, welche Metabolitklassen und Stoffwechselwege direkt oder indirekt durch die PER- abhängige Uhr in *Drosophila* beeinflusst werden. Bei der ungerichteten Analyse der globalen Metabolitprofile zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen zeigte sich, dass sich die Spiegel von rund einem Drittel aller annotierten features signifikant zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> in mindestens einem der beiden Körperteile und zu einem der beiden Zeitpunkte unterschieden. Von den 210 annotierten features konnten anschließend 76 identifiziert werden (mindestens Level 3 nach MSI-Kriterien), von denen ca. 75% der *per*-Metaboliten niedrigere Spiegel in der Uhr-Mutante aufwiesen.

Um auszuschließen, dass die überwiegend niedrigeren Spiegel in der Uhr-Mutante auf einen Unterschied im Gesamtgewicht der Fliegen zurückzuführen sind, wurde zunächst das Nass- und Trockengewicht der beiden Genotypen ermittelt und verglichen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. Somit sind die überwiegend niedrigeren Spiegel keine Folge von Unterschieden im eingesetzten Probengewicht und ein direkter Vergleich der ermittelten Metabolitpiegel zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> ist zulässig.

Da die verwendeten Fliegenstämme vor der Analyse allerdings nicht isogenisiert wurden (vgl. 2.1.1) kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Unterschiede Folge der verschiedenen genetischen Hintergründe sind. Deshalb wurde zusätzlich das Verhalten der Metabolitpiegel über die Zeit betrachtet. Weisen diese, wiederkehrende, tageszeitabhängige Schwankungen in WT<sub>CS</sub>-Fliegen auf, so kann dies als weiteres Indiz dafür angesehen werden, dass es sich tatsächlich um durch die Uhr regulierte Metaboliten handelt und die beobachteten Unterschiede möglicherweise im Zusammenhang mit dem Fehlen des PER-Proteins stehen.

### 4.1 Auswirkung der *per*-Mutation auf Anlage der Speichermoleküle

Für die Speichermoleküle des Kohlenhydratmetabolismus, das Glycogen, konnten bereits von Xu et al. gezeigt werden, dass keine biologisch relevanten Unterschiede zwischen Uhr-Mutanten, deren Uhr im ganzen Organismus gestört ist und dem korrespondierendem WT bestehen (Xu et al. 2008).

Für die Speichermoleküle des Lipidmetabolismus, die TAGs, konnten in dieser Arbeit ebenfalls keine biologisch relevanten Unterschiede zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> ausgemacht werden. So konnte für die TAGs in den Kopfproben zwar ein reproduzierbarer Trend hin zu niedrigeren Spiegel gezeigt werden, in den Körperproben, in denen die Gesamtmenge an TAGs ungefähr drei Mal so hoch ist wie im Kopf, war allerdings kein Unterschied zwischen der Uhr- Mutante und WT

auszumachen. Zusätzlich war die Effektgröße in den Kopfproben gering. Auch hierfür lassen sich vergleichbare Ergebnisse in der Literatur finden. So wurde gezeigt, dass die TAG- Spiegel der globalen Uhr- Mutanten *per*<sup>01</sup>, *cyc*<sup>01</sup> und *tim*<sup>01</sup> sich nicht vom korrespondierendem WT unterscheiden (DiAngelo et al. 2011). Allerdings wurden für diese Untersuchung weibliche Fliegen verwendet und die TAGs gezielt im Fettkörper, der vor der Analyse aus dem Abdomen der Fliegen isoliert wurde, bestimmt (DiAngelo et al. 2011). In einer weiteren Studie, in der männliche *tim*<sup>01</sup> und *cyc*<sup>01</sup> Fliegen untersucht wurden, wurde hingegen gezeigt, dass die TAG-Spiegel, gemessen in der ganzen Fliege, in den beiden Uhr-Mutanten signifikant niedriger sind als im WT (Seay und Thummel 2011). Zusätzlich unterschied sich neben Geschlecht und Art der Probe auch die Zusammensetzung des Futters, auf dem die Fliegen aufgezogen wurden. Während DiAngelo et al. Standardmedium (bestehend aus Maismehl, Melasse und Hefe) verwendeten, wurde von Seay und Thummel Hefepaste mit 1% Dextrose als Nährmedium verwendet, welches eine niedrigere Nährstoffdichte als das Standardmedium aufweist. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Nährstoffaufnahme bzw. -verwertung in den Uhr-Mutanten zwar grundsätzlich beeinträchtigt ist, sich dies allerdings nur unter Stressbedingungen, wie der Gabe von Futter mit reduziertem Nährstoffgehalt, auf die Anlage der TAG-Speicher auswirkt. Die in der vorliegenden Studie gefundenen niedrigeren TAG-Spiegel in den Kopfproben der *per*<sup>01</sup> Fliegen können als Indiz für diese Theorie angesehen werden. So kann spekuliert werden, dass die Uhr-Mutante aufgrund der kontinuierlichen Nahrungsverfügbarkeit zwar in der Lage ist, die TAG-Spiegel im Körper auf demselben Level zu halten wie im WT, allerdings möglicherweise auf Kosten niedrigerer Spiegel in den Kopfproben. Diese könnten demnach Folge eines verringerten bzw. gestörten Lipidtransports aus dem Körper in den Kopf sein. Für die Hypothese spricht weiter, dass *per*<sup>01</sup> Fliegen bei optimaler Nährstoffversorgung in der Lage sind, ihren Energiebedarf ausreichend zu decken. So konnte in Überlebensexperimenten gezeigt werden, dass sich weder die mittlere noch die maximale Lebenserwartung zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen signifikant unterscheiden, wenn diese auf Standardmedium gehalten werden. Stand den Fliegen hingegen nur Diätmedium zu Verfügung, das aus Agar und 5% Saccharose bestand, war sowohl die mittlere als auch die maximale Lebenserwartung in *per*<sup>01</sup> signifikant reduziert (vgl. Angehängte Abbildung 12). Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um hierzu belastbare Aussagen treffen zu können. Zunächst müsste in Folgeexperimenten gezeigt werden, dass die ausgemachten Unterschiede auch in isogenen Fliegenlinien ausgemacht werden können. Ist dies der Fall, wäre es zunächst interessant zu wissen, wie sich die TAG Spiegel in *per*<sup>01</sup> und im WT<sub>CS</sub> verhalten, wenn diese auf Diätmedium gehalten werden. Auch der Transport der Lipide in der Hämolymphe in Form von DAGs, könnte hierfür untersucht werden. Neben der Analyse der Metaboliten würde es sich

zusätzlich anbieten, die Expressionsrate der Gene, die an der Umwandlung von TAGs zu DAGs und zurück beteiligt sind, genauer zu betrachten.

#### 4.2 Wiederkehrende, tageszeitabhängige Schwankungen in Metabolitspiegeln

Während im humanen System ein Zusammenhang zwischen der inneren Uhr und dem Metabolismus bereits für unterschiedliche Metaboliten und Metabolitklassen gezeigt werden konnte (Dallmann et al. 2012; Chua et al. 2013), stellt in *Drosophila* die Analyse rhythmischer Metaboliten immer noch eine große Herausforderung dar. Dies liegt unter anderem daran, dass mehrfaches Testen eines einzelnen Individuums – wie es beispielsweise bei der Analyse von Plasma- oder Urinproben im Humansystem durchgeführt wird – nicht möglich ist. Aus dem Säugersystem ist bekannt, dass Unterschiede in Metabolitspiegeln zwischen Individuen häufig größer sind als die Änderung der Metabolitspiegel über die Zeit. Dies wurde beispielsweise für AAs und ACs in human Serumproben gezeigt (Thompson et al. 2012). Um dennoch Rhythmen in *Drosophila* detektieren zu können, muss folglich eine große Anzahl an Replikaten pro Zeitpunkt untersucht werden, um globale Trends erkennen zu können. Zusätzlich hängt die Qualität der automatischen Detektion rhythmischer Metaboliten unter Zuhilfenahme von Algorithmen wie JTK\_CYCLE oder ARSER stark von der Häufigkeit der Probennahme pro Tag und der Anzahl der untersuchten Tage ab. Es konnte gezeigt werden, dass hierbei eine Probennahme alle zwei Stunden oder häufiger über mindestens zwei Tage zu robusten Ergebnissen führt und das Risiko falsch-positiver Treffer reduziert (Wu et al. 2014). Das macht eine ungerichtete, organspezifische Analyse von rhythmischen Metaboliten aufgrund des hohen präparativen Aufwands in *Drosophila* nahezu unmöglich. Dem zu Folge ist es nicht verwunderlich, dass die ungerichtete Analyse rhythmischer Metaboliten in *Drosophila* bisher nur auf der Organismusebene vorgenommen wurde und Metabolitspiegel somit entweder in ganzen Fliegen (Gogna et al. 2015) oder in Körperproben der Fliegen untersucht wurden (Rhoades et al. 2018). Diese Analyse ermöglicht es, Metaboliten oder Metabolitklassen herauszufiltern, für die eine anschließende, organspezifische Analyse, unter Verwendung gerichteter Methoden, erfolgsversprechend ist. Allerdings konnten in Studien, die auf der Ebene des Organismus durchgeführt wurden, bisher nur wenige Metaboliten als eindeutig rhythmisch identifiziert werden. Gogna et al. fanden unter LD-Bedingungen und unter Verwendung von Temperaturzyklen (25 °C in der Licht-; 18 °C in der Dunkelphase) Rhythmen in den Spiegeln von 12 hydrophilen Metaboliten, sowie in den Spiegeln von Fettsäuren und Sterinen. Unter den hydrophilen Metaboliten waren primär AAs (Leu, Ile, Val, Ala, Lys, His, Trp) aber auch NAD, AMP, Kreatin, Milchsäure sowie Glukose (Gogna et al. 2015). Auch wenn die Maxima in den Oszillationen der AAs zwischen den in dieser Studie beobachteten und den von Gogna et al. ausgemachten, sich deutlich unterschieden, ist es dennoch auffällig, dass mehrere Mitglieder

dieser Substanzklasse studienübergreifend als rhythmisch ausgemacht wurden. Während Ala und Lys in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht detektiert werden konnten, konnte für die Spiegel von Trp und Val statistisch signifikante Rhythmen nachgewiesen werden. Diese Rhythmen konnten auch für Leu/Ile gezeigt werden, wiesen allerdings keine statistische Signifikanz auf. Ursache hierfür kann sein, dass anders als bei Gogna et al., die Spiegel nicht für Leu und Ile einzeln, sondern nur für beide zusammen betrachtet werden konnten. Die deutlichen Unterschiede in den Maxima lassen sich möglicherweise auf die Temperaturzyklen zurückführen, die von Gogna et al. angewandt wurden. Interessanterweise konnte Rhoades et al. in Körperproben unter LD-Bedingungen für keine dieser AAs Rhythmen in Fliegenkörpern nachweisen (Rhoades et al. 2018). Dafür zeigten andere AAs Oszillationen in ihren Spiegeln (Thr, Cys, Asn, Glu). Während Thr und Cys in der vorliegenden Studie unterhalb des Detektionslimits lagen bzw. nicht detektiert werden konnten, konnten rhythmische Änderungen für Glu in Körperproben bestätigt werden. Für die Asn-Spiegel wurden ebenfalls rhythmische Spiegel beobachtet, allerdings wiesen diese lediglich in den Kopfproben statistische Signifikanz auf. Zusammengenommen unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung der inneren Uhr für den AA-Metabolismus, machen aber auch deutlich, dass sich bereits kleine Unterschiede im Aufbau des Experiments und der Art der Analyse einen Einfluss darauf haben, ob Metaboliten als rhythmisch ausgemacht werden oder nicht und wie sich deren Verlauf über die Zeit darstellt. So konnte Rhoades et al. beispielsweise zusätzlich zeigen, dass CAR und ACAR in Körperproben rhythmisch sind (Rhoades et al. 2018), was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte. Allerdings wurden eindeutige Rhythmen in den Spiegeln von CAR und ACAR in den Kopfproben festgestellt. Somit lassen sich trotz der Unterschiede in den Körperteilen und/oder den Maxima in den Oszillationen Übereinstimmungen in den betroffenen Stoffwechselwegen ausmachen. Ein weiteres Beispiel für den Einfluss der Uhr auf den Metabolismus sind die Spiegel der freien Fettsäuren, die laut Gogna et al. über den Verlauf der Nacht akkumulieren, bis sie ein Maximum zu Beginn des Übergangs von Nacht zu Tag erreichen (Gogna et al. 2015). Diese wurden zwar weder von Rhoades et al. noch in dieser Arbeit direkt analysiert, dennoch gibt es Hinweise dafür, dass es sich hierbei um ein studienübergreifendes, robustes Phänomen handelt. Hierfür spricht, dass die von Gogna et al. ausgemachten, rhythmischen Fettsäuren das Substrat für langkettige AC darstellen. Letztere zählten sowohl bei Rhoades et al. als auch in dieser Studie zu den Metaboliten, deren Oszillation am deutlichsten und robustesten ausgeprägt war (Rhoades et al. 2018).

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass die Analyse tageszeitabhängiger Rhythmen in  $WT_{CS}$ -Fliegen dafür herangezogen werden kann, um zu bekräftigen, dass die

Unterschiede in den *per*-Metaboliten tatsächlich Folge der gestörten Uhr sind. Allerdings handelt es sich aufgrund der angesprochenen Herausforderungen und Unterschiede zwischen den bereits durchgeführten Studien auch nur um einen weiteren Hinweisgeber und nicht um ein absolutes Ausschluss- oder Bestätigungskriterium.

### 4.3 Einfluss der PER- abhängigen Uhr auf ausgemachte Stoffwechselwege

#### 4.3.1 Methionin Metabolismus

Bei der Untersuchung der Aminosäurespiegel fielen besonders die signifikant niedrigeren Spiegel der EAAs in *per*<sup>01</sup> auf. Die Gesamtproteinmenge unterschied sich hingegen nicht zwischen Uhr-Mutante und WT. Besonders ausgeprägt waren die niedrigeren Spiegel für Met, das ausschließlich in den Körperproben detektiert werden konnte. Interessanterweise fanden sich auch signifikant niedrigere 5'Methythioadenosin-Spiegel in *per*<sup>01</sup>, das als Ausgangsprodukt für den Met-Salvage-Stoffwechselweg fungiert. Zusammengenommen deutet dies auf einen erhöhten Umsatz von Met in der Mutante hin.

Met ist mit einer Vielzahl biochemischer Reaktionen assoziiert und fungiert unter anderem als Edukt für die *de-novo*-Synthese von Carnitin. Da Carnitin im verwendeten Futter nur in Spuren vorhanden ist, sind die Fliegen auf dessen Synthese angewiesen. Somit könnte die Ursache des ebenfalls beobachteten CAR-Defizits möglicherweise auf ein Problem in dessen Synthese zurückgeführt werden. Neben der *de-novo*-Synthese von Carnitin fungiert Met auch als Ausgangsprodukt für die Synthese von Cys und S-Methylthioadenosin. Bei S- Methylthioadenosin handelt es sich um einen wichtigen Methylgruppdonor, der unter anderem für DNA-Methylierungsprozesse benötigt wird und dessen circadiane Regulation in der Leber von Mäusen gezeigt werden konnte (Krishnaiah et al. 2017). Cys, welches ebenfalls ausgehend von Met gebildet wird, hat eine bedeutende Rolle für die Synthese von GSH. Die Untersuchung der GSH-Spiegel zeigte, dass diese in den Körperproben höher in *per*<sup>01</sup> als im WT<sub>CS</sub> waren. Dass es Unterschiede in den GSH-Spiegeln zwischen Uhr-Mutanten und dem WT gibt, konnte bereits durch Beaver et al. gezeigt werden (Beaver et al. 2012). In deren Arbeit wurden ebenfalls signifikant höhere Spiegel gemessen. Allerdings zeigten sie dies in Kopfproben, für die in dieser Arbeit keine Unterschiede ausgemacht werden konnten. Auch konnten die von Beaver et al. beschriebenen, wiederkehrenden tageszeitlichen Schwankungen in Drosophilaköpfen mit einem Maximum zu Beginn (ZT0) und einem Minimum zur Mitte der Lichtphase (ZT8) in den hier durchgeführten Experimenten in den Kopfproben nicht bestätigt werden. Interessanterweise konnte dieses Oszillationsprofil jedoch in den Körperproben beobachtet werden, wenngleich auch keine statistisch signifikante Rhythmik ausgemacht wurde (BHQ > 0.05).

Die signifikanten Unterschiede in den Metaboliten, die mit Met assoziiert sind, sowie die Rhythmik von GSH in den Körperproben, deuten auf eine Regulation dieser Metaboliten durch die innere Uhr hin. Diese Hypothese wird zusätzlich durch Ergebnisse aus dem Human- bzw. Murinensystem gestützt. So konnte gezeigt werden, dass Metaboliten die mit dem Cys- und Met- Metabolismus in Verbindung stehen, zu den rhythmischen Metaboliten zählen, die zell- und gewebeübergreifend sowohl im humanen als auch im Murinen System rhythmisch sind und nachweislich unter circadianer Kontrolle stehen (Krishnaiah et al. 2017, 2017). Eine mögliche Erklärung dafür, dass für diese Metaboliten in der vorliegenden Arbeit keine statistisch signifikanten Rhythmen gezeigt werden konnte, liegt darin, dass ganze Köpfe und Körper und somit mehrere Organe auf einmal analysiert wurden. Somit wäre es möglich, dass sich die Phasen der peripheren Uhren in den unterschiedlichen Geweben unterscheiden, was eine partielle Phasenlöschung zur Folge haben kann, die das Detektieren von statistisch signifikanten Rhythmen auf dem Level des Organismus verhindert. Zusätzlich wurde die JTK\_CYCLE-Analyse für GSH lediglich auf Basis der Peakflächen und nicht auf Basis quantifizierter Mengen durchgeführt. Die daraus resultierende, höhere, zeitpunktspezifische Varianz könnten die Erklärung dafür sein, dass trotz einer visuell erkennbaren Rhythmik keine statistische Signifikanz vorliegt. Folglich bedarf es, um den Einfluss der Uhr auf den Met-Metabolismus in Drosophila besser verstehen zu können, optimalerweise gewebespezifischer Analysen dieser Metaboliten unter Verwendung von Extraktions- und Analysemethoden, die speziell für diese Substanzen optimiert und validiert sind. Diese Untersuchungen sind allerdings nur dann lohnend, wenn sich die gefundenen Unterschiede auch in isogenen Fliegenlinien finden lassen.

#### 4.3.2 Trp und der Kynureninstoffwechsel

Ein weiterer Stoffwechselweg, dem mehrere *per*-Metaboliten zugeordnet werden konnten, ist der Kynureninstoffwechsel. Dieser ist im Säugersystem der Hauptabbauweg für Trp (>95%) (Thevandavakkam et al. 2010). Wie auch für Trp selbst, konnten für alle detektierten Mitglieder des Kynureninstoffwechsels zu mindestens einem Zeitpunkt in den Körperproben signifikant niedrigere Spiegel in *per*<sup>01</sup> detektiert werden. Störungen im Kynureninstoffwechsel werden im Säugersystem mit einer Vielzahl an Neurodegenerativen bzw. neurologischen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson Schlaganfällen und Epilepsie in Verbindung gebracht (Zusammengefasst von Nemeth et al. 2005). In Drosophila ist bekannt, dass das Verhältnis von Hydroxykynurenin zu Kynureninsäure eine bedeutende Rolle für die neurologische Gesundheit darstellt (Savvateeva-Popova et al. 2003). Während ersteres neurotoxisch wirkt, hat letzteres eine neuroprotektive Wirkung (Campesan et al. 2011). Eine weitere Funktion des von Trp ausgehenden Kynureninstoffwechsels in Drosophila ist die Synthese von Xanthommatin, einem Ommochrom,

das für die rote Augenfarbe von *Drosophila* verantwortlich ist. So konnte gezeigt werden, dass die Grundlage mehrerer Augenfarbenmutanten in *Drosophila* darin liegt, dass diese nicht in der Lage sind, Kynurenin in jene Zellen zu transportieren, die in der Lage sind Kynurenin zu Hydroxykynurenine zu hydroxylieren. Letzteres bildet das Edukt für die Synthese von Xanthommatin (Sullivan und Sullivan 1975). Zusätzlich konnte für mehrere Augenmutanten eine höhere Lebenserwartung als für WT Fliegen beobachtet werden. Im Folge dieser Untersuchungen wird nun diskutiert, ob dieser Effekt möglicherweise auf einen gehemmten Umsatz von Trp zu Kynurenin zurück zu führen ist (Oxenkrug 2009). Deshalb wurde untersucht, ob es in der Uhr Mutante zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes zwischen Hydroxykynurenin und Kynureninsäure kommt. Allerdings war dies nicht der Fall. Beide Metaboliten wiesen tendenziell niedrigere Spiegel in *per<sup>01</sup>* auf.

Zusätzlich spielt der Kynureninstoffwechsel eine bedeutende Rolle für die Synthese von NAD<sup>+</sup> (Schwarcz und Stone 2017). Für dieses konnte in dieser Arbeit allerdings kein eindeutiger Trend hin zu veränderten Spiegeln gezeigt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ähnlich wie bei den TAG Spiegeln beschrieben, unter *ad libitum* Futterbedingungen mit Vollmedium *per<sup>01</sup>* in der Lage ist, einen NAD<sup>+</sup> Spiegel, der gleich dem des WT ist, aufrechtzuerhalten.

Allerdings konnte, mit Ausnahme von Trp, für kein weiteres Mitglied des Kynureninstoffwechselweges ein oszillierendes Profil der Spiegel gezeigt werden. Auch in den Studien von Gogna et al. und Rhodes et al. konnten keine Hinweise auf eine Rhythmik dieser Metaboliten gefunden werden (Gogna et al. 2015; Rhoades et al. 2018). Somit sind die Unterschiede in den Kynureninspiegeln wahrscheinlich keine Folge der defekten Uhr, sondern Folge der sich unterscheidenden genetischen Hintergründe. Anders verhält es sich hingegen mit Trp selbst, für welches neben den signifikanten Unterschieden zwischen *per<sup>01</sup>* und WT<sub>CS</sub> Fliegen, neben der vorliegenden Arbeit auch in den beiden anderen Studien oszillierende Metabolitspiegel nachgewiesen werden konnten (Gogna et al. 2015; Rhoades et al. 2018).

#### 4.3.3 Synthese von Neurotransmittern

Sowohl Trp als auch Phe, deren Spiegel signifikant niedriger in *per<sup>01</sup>* waren, können als Substrat für die Synthese von Neurotransmittern dienen. Phe wird dabei zunächst von der Phenylalaninhydroxylase zu Tyr oxidiert, welches anschließend von der Tyrosinhydroxylase zu L-Dopa oxidiert wird. Dieses stellt schließlich den Ausgangsstoff für die Synthese der Katecholamine dar. Trp wird hingegen von der Tryptophanhydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan oxidiert, welches den Ausgangsstoff für die Synthese von Serotonin darstellt. Allen drei dieser Hydroxylasen ist

gemein, dass sie vom Co-Faktor BH4 abhängen, welcher bei der Reaktion zu BH2 oxidiert wird (Werner et al. 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Spiegel von BH2 und Biopterin weisen darauf hin, dass es zumindest in den Körperproben einen Einfluss der PER- abhängigen Uhr auf diese Stoffgruppen zu geben scheint. Sollten die veränderten Pterin-Spiegel jedoch einen Einfluss auf die Herstellung der Neurotransmitter haben, so würde man Unterschiede zwischen Mutante und WT in den Kopfproben erwarten. Am Lehrstuhl durchgeführte Vorexperimenten konnten gezeigt werden, dass dies für Dopamin tatsächlich der Fall ist. So wurden für Dopamin in den Kopfproben von *per<sup>01</sup>* Fliegen niedrigere Spiegel als im WT<sub>CS</sub> gemessen. Allerdings waren diese aufgrund einer hohen Varianz nicht statistisch signifikant und ließen sich bei einer weiteren Überprüfung nicht bestätigen. Die Serotonin Spiegel waren hingegen reproduzierbar unverändert zwischen der Uhr-Mutante und dem WT (Koestler 2014). Inwiefern sich die beobachteten niedrigeren Dopaminspiegel in den Kopfproben allerdings tatsächlich auf einen Mangel an Phe und/oder eine mögliche Störung in der BH4 abhängigen Hydroxylaseaktivität zurückführen lassen, kann mit den hier vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Allerdings konnte auch für die Tyr-Spiegel, zumindest zum Zeitpunkt ZT18 sowohl im Kopf als auch im Körper signifikant niedrigere Spiegel ausgemacht werden. Dafür, dass es sich bei der BH4 abhängigen Synthese von Neurotransmittern möglicherweise um einen durch die Uhr gesteuerten Prozess handelt, spricht, dass für Biopterin im Kopf signifikante Rhythmen ausgemacht werden konnten. In den Körperproben lässt sich ein ähnlicher Trend für Biopterin sowie für BH2 beobachten, dieser weist jedoch eine stark abgeschwächte Amplitude auf und ist nicht statistisch signifikant. Eine gezielte Analyse, bei der allen voran auch BH4 sowie die Neurotransmitter selbst analysiert werden und eine Quantifizierung der Stoffe durchgeführt wird, würde helfen, um in dieser Frage Klarheit zu bekommen.

Neben der Funktion als Neurotransmitter spielen Katecholamine zusätzlich eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung und Pigmentation der Cuticula (Hopkins und Kramer 1992). Da deren Synthese von L-Dopa ausgeht, für dessen Synthese die BH4 abhängigen Hydroxylasen eine entscheidende Rolle spielen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ausbildung der Cuticula direkt oder indirekt durch das Vorhandensein des PER-Proteins beeinflusst ist. Auch hierbei handelt es sich jedoch nur um eine Hypothese, die weiterer Untersuchungen bedarf.

## 4.4 Zusammenhang zwischen der inneren Uhr und dem Lipidmetabolismus

### 4.4.1 Auswirkungen auf die Intermediate der Lipidoxidation

In *Drosophila* ist bereits bekannt, dass der Lipidstoffwechsel durch die circadiane Uhr beeinflusst wird (Sehgal 2016). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Lipidspeicher, repräsentiert durch die TAGs, in *per<sup>01</sup>* Fliegen nahezu gleich wie in *WT<sub>CS</sub>* Fliegen waren. Für die Intermediate der Lipidoxidation, die DAGs und ACs, konnten hingegen deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen ausgemacht werden. Während es sich bei DAGs, um die Transportform der Lipide in der Hämolymphe handelt, sind ACs für die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation essenziell, da sie die Transportform der aktivierten Fettsäuren in die Mitochondrien darstellen.

Die Untersuchungen zeigten, dass die DAG Spiegel in der Uhr-Mutante niedriger waren als im WT, ein Phänomen, das man bei einer gestörten Lipidmobilisation erwarten würde. Dieser Effekt war in den Kopfproben besonders ausgeprägt (ca. 75%). In *Drosophila* ist ein Zusammenspiel aus Brummer Lipase und dem Adipokinetischem Hormon für die Mobilisation von TAGs zuständig (Grönke et al. 2007). Allerdings zeigen Fliegen, die in der TAG Mobilisation gestört sind, signifikant höhere TAG Spiegel, was im Widerspruch zu den hier beobachteten, zumindest in den Kopfproben ebenfalls niedrigeren, TAG Spiegeln steht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Menge an DAGs in Fliegen mit gestörter TAG-Mobilisation überraschenderweise unverändert ist (Grönke et al. 2007).

Noch ausgeprägter war der Effekt der gestörten PER- abhängigen Uhr auf die AC-Spiegel zu beobachten. Diese lagen, in beiden Körperteilen, mit reproduzierbar ca. 75% niedrigere Spiegel in *per<sup>01</sup>* vor. Die Tatsache, dass auch das freie CAR signifikant niedriger in *per<sup>01</sup>* war, deutet auf ein allgemeines CAR-Defizit hin. In den Körperproben wies CAR um ca. 25%, in den Kopfproben sogar um ca. 50% reduzierte Spiegel in der Mutante auf. Anders als im Humansystem sind die Ursachen und Folgen eines CAR Defizits in *Drosophila* bisher weitgehend unerforscht. Aus dem Humansystem ist bekannt, dass es ein primäres- und ein sekundäres Carnitin-Defizit gibt, dessen Folge jeweils ein verminderter Import von aktivierten Fettsäuren in die Mitochondrien und folglich eine verminderte Lipidoxidation ist (Pons und Vivo 2016). Zusätzlich ist aus dem Humansystem bekannt, dass das Verhältnis von AC zu CAR außerhalb der Mitochondrien das Verhältnis von freiem CoA zu Acyl-CoA innerhalb der Mitochondrien widerspiegelt (Pons und Vivo 2016; Brass und Hoppel 1980). Die Rolle von CAR beruht hierbei darauf, dass bei einem Mangel von freiem CoA in den Mitochondrien die Acylketten der Acyl-CoAs auf CAR übertragen werden, welches anschließend als AC aus den Mitochondrien transportiert wird. Dadurch wird innerhalb der Mitochondrien wieder freies CoA zur Verfügung gestellt. Da eine exakte, direkte Analyse von Acyl-

CoA bzw. CoA mittels LC-MS äußerst komplex ist, wird häufig das Verhältnis von CAR zu AC als Maß für freies bzw. gebundenes CoA herangezogen. So wird im Humansystem das Verhältnis von CAR zu AC beispielsweise im Neugeborenenenscreening bestimmt und als Biomarker für die Funktionalität der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation herangezogen (Naylor und Chace 1999; Wiley et al. 1999). Hierbei konnte im human System bereits gezeigt werden, dass das genau Verhältnis von AC zu CAR zwar gewebespezifisch ist aber gewebeübergreifend unter normalen Bedingungen CAR die Hauptspezies ausmacht und ACAR das abundanteste AC darstellt (zusammengefasst von Reuter und Evans 2012). Da die Methode, die zur Semiquantifizierung in dieser Arbeit herangezogen wurde, nicht validiert war, kann keine Aussage über das exakte Verhältnis von AC zu CAR getätigt werden. Allerdings fällt beim Vergleich zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> auf, dass zusätzlich zu den niedrigeren Spiegeln in *per*<sup>01</sup> auch das Verhältnis von AC zu CAR in diesen hin zu CAR verschoben ist. Dies war besonders ausgeprägt in den Körperproben zu beobachten und spricht gegen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation, bei der eine Verschiebung des Gleichgewichtes zu ACs zu beobachten ist.

Diese Ergebnisse können als Hinweis für Unterschiede in der Energiegewinnung in den *per*<sup>01</sup> Fliegen betrachtet werden. Hierfür spricht, dass neben dem CAR-Defizit, was für eine verringerte Aktivität der  $\beta$ -Oxidation spricht, auch gezeigt werden konnte, dass Dissacharide, wie beispielsweise die Trehalose, sowohl in den Kopf- als auch in den Körperproben einen reproduzierbaren Trend hin zu höheren Spiegeln zeigten. Dies könnte bedeuten, dass *per*<sup>01</sup> möglicherweise vermehrt auf Kohlenhydrate als Energiequelle zurückgreift. Dies könnte eine niedrigere Hungertoleranz zur Folge haben, was ausführlich unter Punkt 4.5 diskutiert wird. Um detaillierte Informationen darüber zu erhalten, ob sich die primäre Energiequelle zwischen Uhr-Mutanten und dem WT unterscheidet, müsste beispielsweise die Bestimmung des respiratorischen Quotienten herangezogen werden, womit sich bestimmen lässt, welche Energiequelle unter bestimmten Bedingungen bevorzugt verwendet wird.

#### 4.4.2 Tageszeitabhängige Koordination des Lipidstoffwechsels

Die tageszeitabhängige Analyse der *per*-Metaboliten in Köpfen und Körpern von *Drosophila* zeigte, dass besonders Glycerolipide und ACs unter den als rhythmisch identifizierten Metaboliten zu finden waren. Dabei wiesen die langkettigen ACs die robustesten tageszeitabhängigen Schwankungen auf. Dass ACs in *Drosophila* Rhythmen in ihren Spiegeln aufweisen, konnte bereits durch Rhoades et al. in Körperproben gezeigt werden (Rhoades et al. 2018). Mit dieser Arbeit konnte dieses Ergebnis nicht nur bestätigt, sondern zusätzlich gezeigt werden, dass sich robuste Rhythmen in den AC-Spiegeln auch in den Köpfen beobachten lassen. Aber nicht nur für die ACs, auch für die DAGs und für einige TAG Spezies konnten oszillierende Profile gezeigt

werden. Während für die DAGs bisher noch keine Oszillationen gezeigt wurden, gibt es eine Studie bei der unter Anwendung einer spezifischen Diät, bei der die Menge an Hefeextrakt von 4% auf 0.25% reduziert wurde, in weiblichen Fliegen zwei Gruppen an rhythmischen TAGs ausgemacht werden konnten. Gezeigt wurde dies auf der Ebene des gesamten Organismus (Katewa et al. 2016). Neben den Spezies, für die keine Rhythmen detektiert wurden (TAG 44/46:1), fanden die Autoren rhythmische TAGs mit einem Maximum in der Nacht (TAG 36:0, 38/39:1) und TAGs mit einem Maximum am Tag (TAG 42/44:0, 42:1, 46:2) (Katewa et al. 2016). Diese Ergebnisse standen zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen von DiAngelo et al., die keine Rhythmen in den TAG Spiegeln detektieren konnten (DiAngelo et al. 2011). Allerdings führte letzterer lediglich eine Messung der Gesamt-TAG Spiegel durch. Ähnlich wie in den hier erhaltenen Ergebnissen, zeigen TAGs keine Rhythmik in ihren Gesamtspiegeln. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die von Katewa et al. beschriebenen, rhythmischen Spezies, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit, gegensätzliche Phasen aufweisen. Allerdings wurden von Katewa et al. nur die Ergebnisse von insgesamt elf TAG Spezies gezeigt. Die hier durchgeführte Analyse ermöglichte eine Untersuchung von über 50 TAGs auf ihr Verhalten über die Zeit. Auch wenn sich die oszillierenden Spezies die von Katewa et al. detektiert wurden bis auf TAG(39:1) von denen unterschieden, die in dieser Arbeiten ausgemacht wurden, lässt sich dennoch ein vergleichbarer Trend beobachten. Während die TAGs, die primär aus Fettsäuren mit einer Kettenlänge kleiner 16 Kohlenstoffatomen zusammengesetzt waren, ihr Maximum in beiden Studien zu Beginn der Nacht inne hatten, zeigte bei Katewa einzig TAG(46:2), ein deutlich ausgeprägtes Maximum am Übergang von Dunkel zu Lichtphase. Dieses Phänomen ähnelt den hier beobachteten Rhythmen, bei denen die Gruppe, die ein Maximum zu Beginn des Tages aufwies, vor allem aus Spezies bestand, deren Gesamtkettenlänge 48 oder mehr Kohlenstoffatome aufwiesen und/oder aus solchen, die mehrfach ungesättigt waren. Dies liegt möglicherweise daran, dass in den beiden Zellorganellen, in denen  $\beta$ -Oxidation stattfindet, den Mitochondrien und den Peroxisomen, unterschiedlich lange Fettsäuren bevorzugt oxidiert werden. In einer Studie von Faust et al. konnte gezeigt werden, dass sich dies auch in den TAG Spiegeln widerspiegelt. So wurde in dieser Studie gezeigt, dass in Muskelzellen, deren peroxisomale  $\beta$ -Oxidation gestört ist primär TAGs mit einer Gesamtkettenlänge von 46 oder mehr Kohlenstoffatomen akkumulieren (Faust et al. 2014). Da diese Kettenlänge der Kettenlänge entsprach, die als Unterscheidungskriterium für die beiden beobachteten Oszillationsprofile herangezogen werden konnte, kann dies als ein erstes Indiz für Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Koordination der  $\beta$ -Oxidation angesehen werden.

Betrachtet man das Oszillationsprofil der DAGs, so wird deutlich, dass dieses dem der langkettigen TAGs sowohl im Kopf als auch im Körper gleicht und somit ein Maximum zu Beginn

der Lichtphase aufweist. Allerdings ist dieses ca. zwei Stunden später zu beobachten als für die TAGs. In Anbetracht dessen, dass auch die langkettigen ACs ihr Maximum während dem frühen Tag hatten (ZT2-8), könnte dies ein Anzeichen dafür sein, dass zu Beginn der Lichtphase die Lipidoxidation eine wichtige Rolle für die Deckung des Energiebedarfes spielt. Für diese Hypothese spricht, dass für die Trehalosespiegel gezeigt wurde, dass diese zu Beginn des Tages niedrig sind und ihr Maximum erst zur Mitte des Tages (ZT6-8) aufweisen (Seay und Thummel 2011). Dieses Profil konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden. Dieses Maximum in den Trehalosespiegeln folgt auf das Maximum in der Nahrungsaufnahme (Seay und Thummel 2011). Somit spielt die Uhr möglicherweise eine bedeutende Rolle dabei, dass die Substrate der  $\beta$ -Oxidation, die aktivierten Fettsäuren, mit Beginn der Aktivitätsphase zur Verfügung stehen. Für diese Hypothese spricht, dass die zeitliche Koordination des Lipidmetabolismus bereits aus dem Säugersystem bekannt ist. In diesem konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der Adipozyten-Triglycerid-Lipase, der Hormonsensitiven Lipase und der CPT1, die eine bedeutende Rolle bei der Lipidoxidation spielen, unter circadianer Kontrolle stehen (Shostak et al. 2013; Filiano et al. 2013; Alenghat et al. 2008a).

#### 4.4.3 Rhythmen in ACs als direkte Folge von Futteraufnahme oder Aktivität?

Um zu überprüfen, ob die Rhythmen in den langkettigen AC-Spiegeln möglicherweise nur eine indirekte Folge der Aktivität bzw. des Fressverhaltens sind oder direkt durch die Uhr reguliert werden, wurden die Spiegel der langkettigen ACs im WT<sub>CS</sub> unter Freilauf (DD) Bedingungen und in der *per<sup>01</sup>* Mutante untersucht. Dabei zeigte sich sowohl im WT unter DD-Bedingungen als auch in der Mutante, dass die Rhythmen in den langkettigen AC Spiegeln stark abgeschwächt waren und teilweise sogar gänzlich ausblieben. Da die Futteraufnahme in WT<sub>CS</sub> Fliegen unter DD- zwar etwas geringer ist als unter LD- Bedingungen, jedoch trotzdem dasselbe Profil mit einem Maximum zu Beginn der Lichtphase aufweist, spricht dies dafür, dass die beobachteten Rhythmen keine direkte Folge der Nahrungsaufnahme sind (vgl. Schaebler et al. 2020). Anders verhält es sich mit dem Aktivitätsprofil. Bei diesem ist in WT<sub>CS</sub> Fliegen unter DD Bedingungen ein abgeschwächtes Maximum zu Beginn des Tages zu erkennen, das Maximum am Übergang von Tag zu Nacht unterscheidet sich hingegen kaum zwischen LD und DD (Schäbler et al 2020). Da die Rhythmen der langkettigen ACs unter DD Bedingungen nicht verschoben, sondern nahezu verschwunden waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies eine direkte oder indirekte Folge der Aktivität ist. Allerdings deuten die in *per<sup>01</sup>* Fliegen beobachteten Ergebnisse darauf hin, dass Aktivität allein nicht ausreicht, um die Rhythmen in den langkettigen AC Spiegeln aufrecht zu erhalten. Dies zeigt sich dadurch, dass trotz eines vergleichbaren Aktivitätsprofils von *per<sup>01</sup>*

und dem WT<sub>CS</sub> unter LD Bedingungen, wenn überhaupt, nur deutlich abgeschwächte Rhythmen beobachtet werden konnten.

Der Verlust der Rhythmen in den Spiegeln der langkettigen ACs könnte möglicherweise darauf zurück gehen, dass diese nur eine indirekte Folge einer vorangegangenen, rhythmischen Lipidmobilisation sind. So könnte die CPT1 abhängige Bildung der ACs neben der Substratverfügbarkeit möglicherweise auch von weiteren Faktoren, wie der Perzeption von Licht durch CRY, abhängen. Dass CRY und somit die Lichtperzeption eine bedeutende Rolle für circadian regulierte Prozesse besitzt, konnte bereits für das Futterverhalten gezeigt werden. Hierbei zeigte sich, dass unter DD-Bedingungen ein zusätzliches Maximum in der Nacht zu sehen ist, welches in *cry<sup>01</sup>* Mutanten auch unter LD-Bedingungen vorliegt (Seay und Thummel 2011). Möglicherweise geht der Verlust der langkettigen AC Rhythmen unter DD-Bedingungen allerdings auch darauf zurück, dass die JTK\_CYCLE Kriterien ( $p < 0.05$ , BHQ  $< 0.05$ ) für die Detektion rhythmischer Spiegel unter diesen Bedingungen zu streng gewählt waren. Dafür würde sprechen, dass Rhoades et al. in ihrer Untersuchung zeigen konnten, dass Lauroyl (C12)-Hydroxytetradecanoyl (C14-OH)- und Stearoylcarnitin (C18) in Körperproben unter DD Bedingungen Rhythmen in ihren Spiegeln aufweisen (Rhoades et al. 2018). Anders als in der vorliegenden Arbeit verwendete Rhoades et al. den ARSER Algorithmus zur Detektion rhythmischer Metaboliten und wählte Kriterien, die weniger strikt waren ( $p < 0.05$ , BHQ  $< 0.3$ ). Nichts desto trotz wurden auch von Rhoades et al. keine ACs detektiert, die sowohl unter LD- als auch DD Bedingungen mit vergleichbaren Profilen in  $w^{117}$  rhythmisch waren (Rhoades et al. 2018). Dies liegt möglicherweise auch daran, dass nur wenige ACs bei Rhoades et al. unter LD-Bedingungen als rhythmisch ausgemacht wurden. Die Ursache hierfür könnte in den Unterschieden im Aufbau des Experiments und der Wahl der Methode liegen, die für die Analyse der ACs verwendet wurde. Während Rhoades et al. eine unspezifische Methode zur Aufarbeitung und Analyse verwendeten, wurde in dieser Arbeit eine gerichtete Extraktions- und Analyseverfahren angewendet, was eine robustere Analyse ermöglicht.

#### 4.5 Konstitutiv niedrigere AC-Spiegel als Folge von Hungerstress in *per<sup>01</sup>*?

Neben den deutlich ausgeprägten Rhythmen in den AC-Spiegeln in WT<sub>CS</sub> Fliegen konnten in *per<sup>01</sup>* Fliegen ebenfalls Rhythmen für diese ausgemacht werden. Jedoch waren diese weniger ausgeprägt und teilweise Phasenverschoben. Vor allem fiel aber auf, dass die Spiegel der ACs zu allen Zeitpunkten niedriger waren als im WT. Zusätzlich zu den konstitutiv niedrigeren AC-Spiegeln, wurde eine signifikant höhere Gesamtaktivität in *per<sup>01</sup>*-Fliegen beobachtet. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Hyperaktivität ein Zeichen für Hungerstress darstellen kann (Lee und Park 2004). Dies ist besonders interessant, da sich die Gesamtmenge des aufgenommenen

Futters, trotz der *ad libitum* Futterverfügbarkeit nicht zwischen den beiden Genotypen unterscheidet (Schaebler et al. 2020). Unterschiede im Fressverhalten werden erst deutlich, wenn die Zeit, zu der die Nahrungsaufnahme stattfindet, genauer betrachtet wird. Anders als im WT, bei dem die Futteraufnahme durch ein Maximum in den frühen Morgenstunden hervorsteht, weist *per<sup>01</sup>* ein Maximum zu Beginn der Dunkelphase auf (Schäbler et al. 2020). Zusätzlich ist in *per<sup>01</sup>* die Gesamtmenge an aufgenommenem Futter in der Dunkelphase gleich der in der Lichtphase. WT<sub>CS</sub> Fliegen fressen hingegen ca. doppelt so viel in der Licht- wie in der Dunkelphase. Das in *per<sup>01</sup>* beobachtete Maximum zu Beginn der Dunkelphase lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die Fliegen nicht genügend Nahrung während der Lichtphase aufgenommen haben und sich somit in einem akuten Hungerzustand befinden, wenn das Licht ausgeht. Das Maximum in der Futteraufnahme zu Beginn der Nacht würde folglich dem Versuch entsprechen, das Nährstoffdefizit auszugleichen. Für diese Hypothese würde sprechen, dass das Verhältnis von CAR zu ACAR in *per<sup>01</sup>* hin zum CAR verschoben war. Dies ist besonders interessant, da die Verfügbarkeit von Acetyl-CoA als Maß für den metabolischen Status der Zelle diskutiert wird (Shi und Tu 2015). In Zeiten von Nährstoffknappheit, stellt sich der Organismus, dieser Hypothese zur Folge, auf Überleben ein und transportiert Acetyl-CoA aus dem Cytosol in die Mitochondrien wo dieses zur Herstellung von ATP oder Ketonkörpern genutzt wird (Shi und Tu 2015). Da ACAR als Speicher für überschüssiges Acetyl-CoA fungieren (Schroeder et al. 2012) und somit als indirektes Maß für die Verfügbarkeit von Acetyl-CoA angesehen werden kann, könnte die Verschiebung des CAR/ACAR Gleichgewichts möglicherweise tatsächlich darauf hin deuten, dass sich *per<sup>01</sup>* in einem Hungerzustand befindet. Unterstützt wird diese These zusätzlich dadurch, dass der Pteridinmetabolismus – besonders betroffen sind hierbei Biopterin und BH2 – in der Uhr-Mutante gestört zu sein scheint. Dass dieser eine bedeutende Rolle bei der Nahrungsaufnahme spielt, konnte dadurch gezeigt werden, dass Fliegen, die nicht in der Lage sind BH4 im Fettkörper zu produzieren, eine erhöhte Nahrungsaufnahme besitzen (Kim et al. 2017). BH4 wird hierbei eine mögliche Rolle als Signalmolekül zugeschrieben, dass den vorliegenden Energiestatus im Fettkörper an das Gehirn weitergibt, welches letztendlich das Fressverhalten steuert (Kim et al. 2017). Auch wenn die Gesamtmenge an aufgenommenem Futter sich zwischen *per<sup>01</sup>* und WT<sub>CS</sub> in dieser Arbeit nicht unterschieden, könnte eine Störung in der zeitlichen Koordination der BH4 Synthese dennoch eine Erklärung für das abweichende Profil zwischen Uhr-Mutante und dem WT in der Nahrungsaufnahme sein. Allerdings handelt es sich hierbei nur um eine von vielen Hypothesen, die weiterer Experimente bedarf, die beispielsweise auf die organspezifische und gerichtete Analyse von BH4 abzielen.

## 4.6 Ausblick

Die vorliegende, bisher primär deskriptive Arbeit, bietet mehrere Punkte, an die man in weiteren Untersuchungen anknüpfen kann. So bedarf es weitere Experimente, die die ausgemachten Stoffwechselwege genauer betrachten. Hierfür sollten gerichtete Methoden, die auf die Analyse dieser Metaboliten optimiert und validiert sind, herangezogen werden. Zusätzlich muss im Rahmen solcher Experimente untersucht werden, ob die ausgemachten Unterschiede sich auch in isogenisierten Fliegenlinien bestätigen lassen. Sollte dies der Fall sein würden sich anschließend weitere Untersuchungen anbieten, die die biologische Relevanz dieser Unterschiede genauer ins Auge fassen. Hierfür kann man sich in *Drosophila* die Möglichkeit zu Nutze machen, dass gezielte Genommodifikationen, um beispielsweise die Funktionalität einzelner Enzyme zu stören, relativ einfach vorgenommen werden können.

Um zusätzlich ein besseres Verständnis darüber zu erhalten, wie es zu den tageszeitabhängigen Schwankungen in den DAG und AC- Spiegeln kommt, sollten molekularbiologische Methoden herangezogen werden, um die Aktivität der Enzyme gewebespezifisch überwachen zu können, die maßgeblich an der Mobilisierung der Lipide, sowie der Bildung und Aktivierung der freien Fettsäuren beteiligt sind. Auch würde sich eine Analyse der Enzyme, die an der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation beteiligt sind, anbieten.

Abschließend sollte der bestehende Datensatz zur Analyse von rhythmischen Metabolitspiegeln weiter ausgewertet werden. Die bisherige Analyse beruhte ausschließlich auf der Untersuchung der *per*-Metaboliten. Allerdings könnte eine ungerichtete Identifikation, der als rhythmisch ausgemachten features, möglicherweise weitere Stoffwechselwege aufzeigen, die im Zusammenhang mit der inneren Uhr stehen.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

|   |       |
|---|-------|
| Actetylcarnitine                                | ACAR  |
| Acylcarnitinen                                  | AC    |
| Alanin  | Ala   |
| amino acids                                     | AAs   |
| Amplitude                                       | AMP   |
| Arginine  | Arg   |
| Asparagin                                       | Asn   |
| Benjamini Höchberg Quotient                     | BH.Q  |
| Bestätigungsexperiment                          | E2    |
| Bonferroni korrigierter Wahrscheinlichkeitswert | ADJ.P |
| branched-chain amino acids                      | BCAAs |
| Canton-S  | WTCS  |
| Carnitine                                       | Car   |
| circadian time                                  | CT    |
| clock controlled genes                          | CCGs  |
| collision induced fragmentation                 | CID   |
| Cystein   | Cys   |
| Dauer-Dunkel                                    | DD    |
| declustering potential                          | DP    |
| Diacylglyceride                                 | DAG   |
| Dihydrobiopterin                                | BH2   |
| dorsalen lateralen Neuronen                     | LNds  |
| essentielle AAs                                 | EAA   |

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| freien Fettsäuren              | FA    |
| Glutamin                       | Gln   |
| Glutaminsäure                  | Glu   |
| Glutathiondisulfid             | GSSG  |
| Gluthation                     | GSH   |
| Glycin                         | Gly   |
| Histidin                       | His   |
| Isoleucin                      | Ile   |
| Kollisionsenergie              | CE    |
| Leucin                         | Leu   |
| Leucin                         | Leu   |
| Licht-Dunkel                   | LD    |
| Lysine                         | Lys   |
| Masse zu Ladung Verhältnis     | m/z   |
| Methionin                      | Met   |
| multi reaction monitoring      | MRM   |
| nicht essentielle AAs          | NEAAs |
| Nicotinamid Adenin Dinucleotid | NAD+  |
| of flight detector             | TOF   |
| Palmitoyltransferase           | CPT1  |
| Phase                          | LAG   |
| Phenylalanin                   | Phe   |
| Phosphatidylcholin             | PC    |
| Phosphatidylethanolaminen      | PE    |
| Prolin                         | Pro   |

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| relative Amplitude           | rel.AMP |
| Retentionszeit               | Rt      |
| Serin                        | Ser     |
| Social Jetlag                | SJL     |
| Sphingolipiden               | SL      |
| Tetrahydrobiopterin          | BH4     |
| Threonin                     | Thr     |
| Triacylglycerid-             | TAG     |
| Triacylglyceride             | TAG     |
| triple Quatrupol             | QQQ     |
| Tryptophan                   | Trp     |
| Tyrosin                      | Tyr     |
| Valin                        | Val     |
| ventralen lateralen Neuronen | LNvs    |
| Vorexperiment                | E1      |
| w+ per01                     | per01   |

## 6 Literaturverzeichnis

Adamovich, Yaarit; Rousso-Noori, Liat; Zwihaft, Ziv; Neufeld-Cohen, Adi; Golik, Marina; Kraut-Cohen, Judith et al. (2014): Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. In: *Cell metabolism* 19 (2), S. 319–330. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.12.016.

Akhtar, Ruth A.; Reddy, Akhilesh B.; Maywood, Elizabeth S.; Clayton, Jonathan D.; King, Verdun M.; Smith, Andrew G. et al. (2002): Circadian Cycling of the Mouse Liver Transcriptome, as Revealed by cDNA Microarray, Is Driven by the Suprachiasmatic Nucleus. In: *Current Biology* 12 (7), S. 540–550. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00759-5.

Alenghat, Theresa; Meyers, Katherine; Mullican, Shannon E.; Leitner, Kirstin; Adeniji-Adele, Adetoun; Avila, Jacqueline et al. (2008a): Nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 govern circadian metabolic physiology. In: *Nature* 456, 997 EP -. DOI: 10.1038/nature07541.

Alenghat, Theresa; Meyers, Katherine; Mullican, Shannon E.; Leitner, Kirstin; Adeniji-Adele, Adetoun; Avila, Jacqueline et al. (2008b): Nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 govern circadian metabolic physiology. In: *Nature* 456 (7224), S. 997. DOI: 10.1038/nature07541.

Allada, R.; White, N. E.; So, W. V.; Hall, J. C.; Rosbash, M. (1998): A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. In: *Cell* 93 (5), S. 791–804.

Allada, Ravi; Chung, Brian Y. (2010): Circadian Organization of Behavior and Physiology in *Drosophila*. In: *Annual review of physiology* 72, S. 605–624. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135815.

Ang, Joo Ern; Revell, Victoria; Mann, Anuska; Mäntele, Simone; Otway, Daniella T.; Johnston, Jonathan D. et al. (2012): Identification of human plasma metabolites exhibiting time-of-day variation using an untargeted liquid chromatography-mass spectrometry metabolomic approach. In: *Chronobiology international* 29 (7), S. 868–881. DOI: 10.3109/07420528.2012.699122.

Aschoff, Jürgen (1965): Circadian Rhythms in Man. In: *Science* 148 (3676), S. 1427–1432.

Asher, Gad; Gatfield, David; Stratmann, Markus; Reinke, Hans; Dibner, Charna; Kreppel, Florian et al. (2008): SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. In: *Cell* 134 (2), S. 317–328. DOI: 10.1016/j.cell.2008.06.050.

Beaver, Laura M.; Klichko, Vladimir I.; Chow, Eileen S.; Kotwica-Rolinska, Joanna; Williamson, Marisa; Orr, William C. et al. (2012): Circadian regulation of glutathione levels and biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. In: *PloS one* 7 (11), e50454. DOI: 10.1371/journal.pone.0050454.

Bizot-Espiard, J. G.; Doublé, A.; Guardiola-Lemaitre, B.; Delagrangé, P.; Ktorza, A.; Pénicaud, L. (1998): Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycaemic rats. In: *Diabetes & metabolism* 24 (3), S. 235–240.

Bordone, Laura; Guarente, Leonard (2005): Calorie restriction, SIRT1 and metabolism. Understanding longevity. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (4), S. 298–305. DOI: 10.1038/nrm1616.

Brass, Eric P.; Hoppel, Charles L. (1980): Relationship between acid-soluble carnitine and coenzyme A pools in vivo. In: *The Biochemical journal* 190 (3), S. 495–504. DOI: 10.1042/bj1900495.

Brosnan, John T.; Brosnan, Margaret E. (2006): Branched-chain amino acids. Enzyme and substrate regulation. In: *The Journal of nutrition* 136 (1 Suppl), 207S-11S. DOI: 10.1093/jn/136.1.207S.

Brown, Steven A. (2011): Circadian rhythms. A new histone code for clocks? In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6051), S. 1833–1834. DOI: 10.1126/science.1212842.

Brown, Steven A.; Kowalska, Elzbieta; Dallmann, Robert (2012): (Re)inventing the circadian feedback loop. In: *Developmental cell* 22 (3), S. 477–487. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.02.007.

Busza, Ania; Emery-Le, Myai; Rosbash, Michael; Emery, Patrick (2004): Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5676), S. 1503–1506. DOI: 10.1126/science.1096973.

Campesan, Susanna; Green, Edward W.; Breda, Carlo; Sathyaikumar, Korrapati V.; Muchowski, Paul J.; Schwarcz, Robert et al. (2011): The kynurenine pathway modulates neurodegeneration in a *Drosophila* model of Huntington's disease. In: *Current biology : CB* 21 (11), S. 961–966. DOI: 10.1016/j.cub.2011.04.028.

Carvalho, Maria; Sampaio, Julio L.; Palm, Wilhelm; Brankatschk, Marko; Eaton, Suzanne; Shevchenko, Andrej (2012): Effects of diet and development on the *Drosophila* lipidome. In: *Molecular Systems Biology* 8, S. 600. DOI: 10.1038/msb.2012.29.

Ceriani, M. Fernanda; Hogenesch, John B.; Yanovsky, Marcelo; Panda, Satchidananda; Straume, Martin; Kay, Steve A. (2002): Genome-Wide Expression Analysis in *Drosophila* Reveals Genes

Controlling Circadian Behavior. In: *J. Neurosci.* 22 (21), S. 9305–9319. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09305.2002.

Chua, Eric Chern-Pin; Shui, Guanghou; Lee, Ivan Tian-Guang; Lau, Pauline; Tan, Luuan-Chin; Yeo, Sing-Chen et al. (2013): Extensive diversity in circadian regulation of plasma lipids and evidence for different circadian metabolic phenotypes in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (35), S. 14468–14473. DOI: 10.1073/pnas.1222647110.

Claridge-Chang, Adam; Wijnen, Herman; Naef, Felix; Boothroyd, Catharine; Rajewsky, Nikolaus; Young, Michael W. (2001): Circadian Regulation of Gene Expression Systems in the Drosophila Head. In: *Neuron* 32 (4), S. 657–671. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)00515-3.

Curtin, Kathryn D.; Huang, Zuoshi J.; Rosbash, Michael (1995): Temporally regulated nuclear entry of the Drosophila period protein contributes to the circadian clock. In: *Neuron* 14 (2), S. 365–372. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90292-9.

Dali-Youcef, Nassim; Lagouge, Marie; Froelich, Sébastien; Koehl, Christian; Schoonjans, Kristina; Auwerx, Johan (2007): Sirtuins. The 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. In: *Annals of medicine* 39 (5), S. 335–345. DOI: 10.1080/07853890701408194.

Dallmann, Robert; Viola, Antoine U.; Tarokh, Leila; Cajochen, Christian; Brown, Steven A. (2012): The human circadian metabolome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (7), S. 2625–2629. DOI: 10.1073/pnas.1114410109.

Damiola, F. (2000): Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. In: *Genes & development* 14 (23), S. 2950–2961. DOI: 10.1101/gad.183500.

DiAngelo, Justin R.; Erion, Renske; Crocker, Amanda; Sehgal, Amita (2011): The central clock neurons regulate lipid storage in Drosophila. In: *PloS one* 6 (5), e19921. DOI: 10.1371/journal.pone.0019921.

Eckel-Mahan, Kristin; Sassone-Corsi, Paolo (2013): Metabolism and the circadian clock converge. In: *Physiological reviews* 93 (1), S. 107–135. DOI: 10.1152/physrev.00016.2012.

Fan, Liyan; Hsieh, Paishiun N.; Sweet, David R.; Jain, Mukesh K. (2018): Krüppel-like factor 15. Regulator of BCAA metabolism and circadian protein rhythmicity. In: *Pharmacological research* 130, S. 123–126. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.12.018.

Faust, Joseph E.; Manisundaram, Arvind; Ivanova, Pavlina T.; Milne, Stephen B.; Summerville, James B.; Brown, H. Alex et al. (2014): Peroxisomes are required for lipid metabolism and muscle function in *Drosophila melanogaster*. In: *PloS one* 9 (6), e100213. DOI: 10.1371/journal.pone.0100213.

Filiano, Ashley N.; Millender-Swain, Telisha; Jr, Russell Johnson; Young, Martin E.; Gamble, Karen L.; Bailey, Shannon M. (2013): Chronic Ethanol Consumption Disrupts the Core Molecular Clock and Diurnal Rhythms of Metabolic Genes in the Liver without Affecting the Suprachiasmatic Nucleus. In: *PLOS ONE* 8 (8), e71684. DOI: 10.1371/journal.pone.0071684.

Giebultowicz, J. M.; Hege, D. M. (1997): Circadian clock in Malpighian tubules. In: *Nature* 386 (6626), S. 664. DOI: 10.1038/386664a0.

Gogna, Navdeep; Singh, Viveka Jagdish; Sheeba, Vasu; Dorai, Kavita (2015): NMR-based investigation of the *Drosophila melanogaster* metabolome under the influence of daily cycles of light and temperature. In: *Molecular bioSystems* 11 (12), S. 3305–3315. DOI: 10.1039/c5mb00386e.

Green, Carla B.; Takahashi, Joseph S.; Bass, Joseph (2008): The meter of metabolism. In: *Cell* 134 (5), S. 728–742. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.022.

Greenacre, M. L.; Ritchie, M. G.; Byrne, B. C.; Kyriacou, C. P. (1993): Female song preference and the period gene in *Drosophila*. In: *Behavior genetics* 23 (1), S. 85–90. DOI: 10.1007/bf01067557.

Grima, Brigitte; Chélot, Elisabeth; Xia, Ruohan; Rouyer, François (2004): Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. In: *Nature* 431, 869 EP -. DOI: 10.1038/nature02935.

Grima, Brigitte; Lamouroux, Annie; Chélot, Elisabeth; Papin, Christian; Limbourg-Bouchon, Bernadette; Rouyer, François (2002): The F-box protein Slimb controls the levels of clock proteins Period and Timeless. In: *Nature* 420, 178 EP -. DOI: 10.1038/nature01122.

Grimaldi, Benedetto; Bellet, Marina Maria; Katada, Sayako; Astarita, Giuseppe; Hirayama, Jun; Amin, Rajesh H. et al. (2010): PER2 Controls Lipid Metabolism by Direct Regulation of PPAR $\gamma$ . In: *Cell Metabolism* 12 (5), S. 509–520. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.10.005.

Grönke, Sebastian; Müller, Günter; Hirsch, Jochen; Fellert, Sonja; Andreou, Alexandra; Haase, Tobias et al. (2007): Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. In: *PLoS biology* 5 (6), e137. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050137.

Hao, H., Allen, D. L., & Hardin, P. E. (1997). A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology*, 17(7), 3687-3693.

Hege, D. M.; Stanewsky, R.; Hall, J. C.; Giebultowicz, J. M. (1997): Rhythmic expression of a PER-reporter in the Malpighian tubules of decapitated *Drosophila*. Evidence for a brain-independent circadian clock. In: *Journal of biological rhythms* 12 (4), S. 300–308. DOI: 10.1177/074873049701200402.

Helfrich-Förster, C.; Yoshii, T.; Wülbeck, C.; Grieshaber, E.; Rieger, D.; Bachleitner, W. et al. (2007): The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*. New insights about their morphology and function. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 72, S. 517–525. DOI: 10.1101/sqb.2007.72.063.

Hoell, L. (2015): Regulatorischer Effekt des Uhr-Gens period auf freie Aminosäuren in *Drosophila melanogaster*, Bachelorarbeit im Fach Biologie angefertigt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Hopkins, T. L.; Kramer, K. J. (1992): Insect Cuticle Sclerotization. In: *Annual review of entomology* 37 (1), S. 273–302. DOI: 10.1146/annurev.en.37.010192.001421.

Hughes, Michael E.; Hogenesch, John B.; Kornacker, Karl (2010): JTK\_CYCLE. An efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. In: *Journal of biological rhythms* 25 (5), S. 372–380. DOI: 10.1177/0748730410379711.

Hunter-Ensor, Melissa; Ousley, Andrea; Sehgal, Amita (1996): Regulation of the *Drosophila* Protein Timeless Suggests a Mechanism for Resetting the Circadian Clock by Light. In: *Cell* 84 (5), S. 677–685. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81046-6.

Imai, Shin-Ichiro (2010): “Clocks” in the NAD World. NAD as a Metabolic Oscillator for the Regulation of Metabolism and Aging. In: *Biochimica et biophysica acta* 1804 (8), S. 1584–1590. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.10.024.

Imai, Shin-Ichiro; Kiess, Wieland (2009): Therapeutic potential of SIRT1 and NAMPT-mediated NAD biosynthesis in type 2 diabetes. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14, S. 2983–2995.

Ishikawa, K.; Shimazu, T. (1976): Daily rhythms of glycogen synthetase and phosphorylase activities in rat liver. Influence of food and light. In: *Life sciences* 19 (12), S. 1873–1878.

Jeyaraj, Darwin; Scheer, Frank A. J. L.; Ripperger, Jürgen A.; Haldar, Saptarsi M.; Lu, Yuan; Prosdocimo, Domenick A. et al. (2012): Klf15 orchestrates circadian nitrogen homeostasis. In: *Cell metabolism* 15 (3), S. 311–323. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.01.020.

Kasukawa, Takeya; Sugimoto, Masahiro; Hida, Akiko; Minami, Yoichi; Mori, Masayo; Honma, Sato et al. (2012): Human blood metabolite timetable indicates internal body time. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (37), S. 15036–15041. DOI: 10.1073/pnas.1207768109.

Katewa, Subhash D.; Akagi, Kazutaka; Bose, Neelanjan; Rakshit, Kuntol; Camarella, Timothy; Zheng, Xiangzhong et al. (2016): Peripheral Circadian Clocks Mediate Dietary Restriction-Dependent Changes in Lifespan and Fat Metabolism in *Drosophila*. In: *Cell metabolism* 23 (1), S. 143–154. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.10.014.

Keegan, Kevin P.; Pradhan, Suraj; Wang, Ji-Ping; Allada, Ravi (2007): Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. In: *PLoS computational biology* 3 (11), e208. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030208.

Kim, Do-Hyoung; Shin, Minjung; Jung, Sung-Hwan; Kim, Young-Joon; Jones, Walton D. (2017): A fat-derived metabolite regulates a peptidergic feeding circuit in *Drosophila*. In: *PLoS biology* 15 (3), e2000532. DOI: 10.1371/journal.pbio.2000532.

Kim, Hak Rim; Kim, Tae-Hyun; Hong, Sung-Hyun; Kim, Hyung-Gun (2012): Direct detection of tetrahydrobiopterin (BH4) and dopamine in rat brain using liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419 (4), S. 632–637. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.064.

Kita, Yasuhiro; Shiozawa, Masahide; Jin, Weihong; Majewski, Rebecca R.; Besharse, Joseph C.; Greene, Andrew S.; Jacob, Howard J. (2002): Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. In: *Pharmacogenetics* 12 (1), S. 55–65.

Kivilompolo, Maarit; Öhrnberg, Leena; Orešič, Matej; Hyötyläinen, Tuulia (2013): Rapid quantitative analysis of carnitine and acylcarnitines by ultra-high performance–hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* 1292, S. 189–194. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.073.

Kloss, B.; Price, J. L.; Saez, L.; Blau, J.; Rothenfluh, A.; Wesley, C. S.; Young, M. W. (1998): The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iε. In: *Cell* 94 (1), S. 97–107.

Knutsson, A. (2003): Health disorders of shift workers. In: *Occupational Medicine* 53 (2), S. 103–108. DOI: 10.1093/occmed/kqg048.

Koestler, F. (2014): Studying the circadian oscillation of neurotransmitters in *Drosophila melanogaster*, Masterarbeit im Fach Biologie angefertigt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Kojima, Shihoko; Shingle, Danielle L.; Green, Carla B. (2011): Post-transcriptional control of circadian rhythms. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 3), S. 311–320. DOI: 10.1242/jcs.065771.

Konopka, R. J.; Benzer, S. (1971): Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (9), S. 2112–2116.

Koopman, Anitra D. M.; Rauh, Simone P.; van 't Riet, Esther; Groeneveld, Lenka; van der Heijden, Amber A.; Elders, Petra J. et al. (2017): The Association between Social Jetlag, the Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes Mellitus in the General Population. The New Hoon Study. In: *Journal of biological rhythms* 32 (4), S. 359–368. DOI: 10.1177/0748730417713572.

Krishnaiah, Saikumari Y.; Wu, Gang; Altman, Brian J.; Growe, Jacqueline; Rhoades, Seth D.; Coldren, Faith et al. (2017): Clock Regulation of Metabolites Reveals Coupling between Transcription and Metabolism. In: *Cell metabolism* 25 (4), 961-974.e4. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.03.019.

Krupp, Joshua J.; Kent, Clement; Billeter, Jean-Christophe; Azanchi, Reza; So, Anthony K-C; Schonfeld, Julia A. et al. (2008): Social experience modifies pheromone expression and mating behavior in male *Drosophila melanogaster*. In: *Current biology : CB* 18 (18), S. 1373–1383. DOI: 10.1016/j.cub.2008.07.089.

La Fleur, S. E.; Kalsbeek, A.; Wortel, J.; Buijs, R. M. (1999): A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. In: *Journal of Neuroendocrinology* 11 (8), S. 643–652.

Lee, Gyunghee; Park, Jae H. (2004): Hemolymph Sugar Homeostasis and Starvation-Induced Hyperactivity Affected by Genetic Manipulations of the Adipokinetic Hormone-Encoding Gene in *Drosophila melanogaster*. In: *Genetics* 167 (1), S. 311–323. DOI: 10.1534/genetics.167.1.311.

Lin, Yiing; Han, Mei; Shimada, Brian; Wang, Lin; Gibler, Therese M.; Amarakone, Aloka et al. (2002): Influence of the period-dependent circadian clock on diurnal, circadian, and aperiodic gene expression in *Drosophila melanogaster*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (14), S. 9562–9567. DOI: 10.1073/pnas.132269699.

Liu, X.; Lorenz, L.; Yu, Q. N.; Hall, J. C.; Rosbash, M. (1988): Spatial and temporal expression of the period gene in *Drosophila melanogaster*. In: *Genes & development* 2 (2), S. 228–238.

Mairan, JJ D. de (1729): Observation botanique. In: *Histoire de l'Académie Royale des Sciences Paris*.

Martinek, S.; Inonog, S.; Manoukian, A. S.; Young, M. W. (2001): A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. In: *Cell* 105 (6), S. 769–779.

McDonald, Michael J.; Rosbash, Michael (2001): Microarray Analysis and Organization of Circadian Gene Expression in *Drosophila*. In: *Cell* 107 (5), S. 567–578. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00545-1.

Meyer, Pablo; Saez, Lino; Young, Michael W. (2006): PER-TIM interactions in living *Drosophila* cells. An interval timer for the circadian clock. In: *Science (New York, N.Y.)* 311 (5758), S. 226–229. DOI: 10.1126/science.1118126.

Milne, Jill C.; Denu, John M. (2008): The Sirtuin family. Therapeutic targets to treat diseases of aging. In: *Current opinion in chemical biology* 12 (1), S. 11–17. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.01.019.

Morris, Christopher J.; Yang, Jessica N.; Scheer, Frank A. J. L. (2012): The impact of the circadian timing system on cardiovascular and metabolic function. In: *Progress in brain research* 199, S. 337–358. DOI: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00019-8.

Myers, Edith M.; Yu, Jiujiu; Sehgal, Amita (2003): Circadian control of eclosion. Interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. In: *Current biology : CB* 13 (6), S. 526–533.

Nakahata, Yasukazu; Sahar, Saurabh; Astarita, Giuseppe; Kaluzova, Milota; Sassone-Corsi, Paolo (2009): Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5927), S. 654–657. DOI: 10.1126/science.1170803.

Naylor, E. W.; Chace, D. H. (1999): Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism. In: *J Child Neurol* 14 Suppl 1, S4-8. DOI: 10.1177/0883073899014001021.

Nemeth, Hajnalka; Toldi, Jozsef; Vecsei, Laszlo (2005): Role of Kynurenines in the Central and Peripheral Nervous Systems. In: *CNR* 2 (3), S. 249–260. DOI: 10.2174/1567202054368326.

Oxenkrug, Gregory F. (2009): The extended life span of *Drosophila melanogaster* eye-color (white and vermilion) mutants with impaired formation of kynurenine. In: *Journal of Neural Transmission* 117 (1), S. 23. DOI: 10.1007/s00702-009-0341-7.

Panda, Satchidananda; Antoch, Marina P.; Miller, Brooke H.; Su, Andrew I.; Schook, Andrew B.; Straume, Marty et al. (2002a): Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. In: *Cell* 109 (3), S. 307–320. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00722-5.

Panda, Satchidananda; Hogenesch, John B.; Kay, Steve A. (2002b): Circadian rhythms from flies to human. In: *Nature* 417, 329 EP -. DOI: 10.1038/417329a.

PITTENDRIGH, C. S. (1960): Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 25, S. 159–184.

Plautz, Jeffrey D.; Kaneko, Maki; Hall, Jeffrey C.; Kay, Steve A. (1997): Independent Photoreceptive Circadian Clocks Throughout Drosophila. In: *Science* 278 (5343), S. 1632–1635. DOI: 10.1126/science.278.5343.1632.

Pons, Roser; Vivo, Darryl C. de (2016): Primary and Secondary Carnitine Deficiency Syndromes. In: *J Child Neurol* 10 (2\_suppl), 2S8-2S24. DOI: 10.1177/0883073895010002S03.

Price, J. L.; Blau, J.; Rothenfluh, A.; Abodeely, M.; Kloss, B.; Young, M. W. (1998): double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. In: *Cell* 94 (1), S. 83–95.

Ramsey, Kathryn Moynihan; Yoshino, Jun; Brace, Cynthia S.; Abrassart, Dana; Kobayashi, Yumiko; Marcheva, Biliana et al. (2009): Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5927), S. 651–654. DOI: 10.1126/science.1171641.

Refinetti, Roberto (2010): The circadian rhythm of body temperature. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 15, S. 564–594.

Reuter, Stephanie E.; Evans, Allan M. (2012): Carnitine and Acylcarnitines. In: *Clinical Pharmacokinetics* 51 (9), S. 553–572. DOI: 10.1007/BF03261931.

Rey, Guillaume; Valekunja, Utham K.; Feeney, Kevin A.; Wulund, Lisa; Milev, Nikolay B.; Stangherlin, Alessandra et al. (2016): The Pentose Phosphate Pathway Regulates the Circadian Clock. In: *Cell metabolism* 24 (3), S. 462–473. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.07.024.

Rhoades, Seth D.; Nayak, Katrina; Zhang, Shirley L.; Sehgal, Amita; Weljie, Aalim M. (2018): Circadian- and Light-driven Metabolic Rhythms in Drosophila melanogaster. In: *Journal of biological rhythms* 33 (2), S. 126–136. DOI: 10.1177/0748730417753003.

Rodriguez, Joseph; Tang, Chih-Hang Anthony; Khodor, Yevgenia L.; Vodala, Sadanand; Menet, Jerome S.; Rosbash, Michael (2013): Nascent-Seq analysis of Drosophila cycling gene

expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4), E275-84. DOI: 10.1073/pnas.1219969110.

Roenneberg, Till; Allebrandt, Karla V.; Mellow, Martha; Vetter, Céline (2012): Social jetlag and obesity. In: *Current biology : CB* 22 (10), S. 939–943. DOI: 10.1016/j.cub.2012.03.038.

Rutila, J. E.; Suri, V.; Le, M.; So, W. V.; Rosbash, M.; Hall, J. C. (1998): CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. In: *Cell* 93 (5), S. 805–814.

Saez, L.; Young, M. W. (1988): In situ localization of the per clock protein during development of *Drosophila melanogaster*. In: *Molecular and cellular biology* 8 (12), S. 5378–5385.

Savvateeva-Popova, Elena V.; Popov, Andrey V.; Heinemann, Thoralf; Riederer, Peter (2003): *Drosophila* Mutants of the Kynurenine Pathway As A Model for Ageing Studies. In: Graziella Allegri, Carlo V. L. Costa, Eugenio Ragazzi, Hans Steinhart und Luigi Varesio (Hg.): *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism*. Boston, MA: Springer US, S. 713–722. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0\\_84](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0135-0_84).

Schaebler, S. (2014): Auf dem Weg zum circadianen *Drosophila* Metabolom: Charakterisierung der *Drosophila* Metabolite, Masterarbeit im Fach Biologie angefertigt an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Schäbler, S., Amatobi, K. M., Horn, M., Rieger, D., Helfrich-Förster, C., Mueller, M. J., Wegener C., Fekete, A. (2020). Loss of function in the *Drosophila* clock gene period results in altered intermediary lipid metabolism and increased susceptibility to starvation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-18.

Schernhammer, E. S.; Laden, F.; Speizer, F. E.; Willett, W. C.; Hunter, D. J.; Kawachi, I. et al. (2003): Night-Shift Work and Risk of Colorectal Cancer in the Nurses' Health Study. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 95 (11), S. 825–828. DOI: 10.1093/jnci/95.11.825.

Schlierf, G.; Dorow, E. (1973): Diurnal Patterns of Triglycerides, Free Fatty Acids, Blood Sugar, and Insulin during Carbohydrate-Induction in Man and Their Modification by Nocturnal Suppression of Lipolysis. In: *Journal of Clinical Investigation* 52 (3), S. 732–740.

Schroeder, Marie A.; Atherton, Helen J.; Dodd, Michael S.; Lee, Phillip; Cochlin, Lowri E.; Radda, George K. et al. (2012): The cycling of acetyl-coenzyme A through acetylcarnitine buffers cardiac substrate supply. A hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance study. In: *Circulation. Cardiovascular imaging* 5 (2), S. 201–209. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.111.969451.

Schwarcz, Robert; Stone, Trevor W. (2017): The kynurenine pathway and the brain. Challenges, controversies and promises. In: *Neuropharmacology* 112 (Pt B), S. 237–247. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.003.

Schwer, Bjoern; Verdin, Eric (2008): Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. In: *Cell metabolism* 7 (2), S. 104–112. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.11.006.

Seay, Daniel J.; Thummel, Carl S. (2011): The circadian clock, light, and cryptochrome regulate feeding and metabolism in *Drosophila*. In: *Journal of biological rhythms* 26 (6), S. 497–506. DOI: 10.1177/0748730411420080.

Sehgal, A.; Price, J.; Man, B.; Young, M. (1994): Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. In: *Science* 263 (5153), S. 1603–1606. DOI: 10.1126/science.8128246.

Sehgal, Amita (2016): Control of Metabolism by Central and Peripheral Clocks in *Drosophila*. In: Paolo Sassone-Corsi und Yves Christen (Hg.): *A Time for Metabolism and Hormones*. Cham: Springer International Publishing, S. 33–40.

Shi, Lei; Tu, Benjamin P. (2015): Acetyl-CoA and the Regulation of Metabolism. Mechanisms and Consequences. In: *Current opinion in cell biology* 33, S. 125–131. DOI: 10.1016/j.ceb.2015.02.003.

Shostak, Anton; Meyer-Kovac, Judit; Oster, Henrik (2013): Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues. In: *Diabetes* 62 (7), S. 2195–2203. DOI: 10.2337/db12-1449.

Sigurdardottir, Lara G.; Valdimarsdottir, Unnur A.; Fall, Katja; Rider, Jennifer R.; Lockley, Steven W.; Schernhammer, Eva; Mucci, Lorelei A. (2012): Circadian disruption, sleep loss, and prostate cancer risk. A systematic review of epidemiologic studies. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 21 (7), S. 1002–1011. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0116.

Stanewsky, Ralf; Kaneko, Maki; Emery, Patrick; Beretta, Bonnie; Wager-Smith, Karen; Kay, Steve A. et al. (1998): The cryb Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*. In: *Cell* 95 (5), S. 681–692. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81638-4.

Stavinoha, Melissa A.; Rayspellicy, Joseph W.; Hart-Sailors, Mary L.; Mersmann, Harry J.; Bray, Molly S.; Young, Martin E. (2004): Diurnal variations in the responsiveness of cardiac and skeletal muscle to fatty acids. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287 (5), E878-87. DOI: 10.1152/ajpendo.00189.2004.

- Stephens, Francis B.; Constantin-Teodosiu, Dumitru; Greenhaff, Paul L. (2007): New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. In: *The Journal of physiology* 581 (Pt 2), S. 431–444. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.125799.
- Stokkan, K. A.; Yamazaki, S.; Tei, H.; Sakaki, Y.; Menaker, M. (2001): Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5503), S. 490–493. DOI: 10.1126/science.291.5503.490.
- Stoleru, Dan; Peng, Ying; Agosto, José; Rosbash, Michael (2004): Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. In: *Nature* 431 (7010), S. 862–868. DOI: 10.1038/nature02926.
- Sullivan, David T.; Sullivan, Marie C. (1975): Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. In: *Biochemical Genetics* 13 (9), S. 603–613. DOI: 10.1007/BF00484918.
- Taylor, Pete; Hardin, Paul E. (2008): Rhythmic E-box binding by CLK-CYC controls daily cycles in *per* and *tim* transcription and chromatin modifications. In: *Molecular and cellular biology* 28 (14), S. 4642–4652. DOI: 10.1128/MCB.01612-07.
- Thevandavakkam, Mathuravani A.; Schwarcz, Robert; Muchowski, Paul J.; Giorgini, Flaviano (2010): Targeting kynurenine 3-monooxygenase (KMO). Implications for therapy in Huntington's disease. In: *CNS & neurological disorders drug targets* 9 (6), S. 791–800.
- Thompson, Dana K.; Sloane, Richard; Bain, James R.; Stevens, Robert D.; Newgard, Christopher B.; Pieper, Carl F.; Kraus, Virginia B. (2012): Daily variation of serum acylcarnitines and amino acids. In: *Metabolomics* 8 (4), S. 556–565. DOI: 10.1007/s11306-011-0345-9.
- Tsai, Ju-Yun; Kienesberger, Petra C.; Pulini, Thomas; Sailors, Mary H.; Durgan, David J.; Villegas-Montoya, Carolina et al. (2010): Direct regulation of myocardial triglyceride metabolism by the cardiomyocyte circadian clock. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (5), S. 2918–2929. DOI: 10.1074/jbc.M109.077800.
- Tsang, Anthony H.; Barclay, Johanna L.; Oster, Henrik (2014): Interactions between endocrine and circadian systems. In: *Journal of molecular endocrinology* 52 (1), R1-16. DOI: 10.1530/JME-13-0118.
- Tynes, Tore; Hannevik, Merete; Andersen, Aage; Vistnes, Arnt Inge; Haldorsen, Tor (1996): Incidence of breast cancer in Norwegian female radio and telegraph operators. In: *Cancer Causes & Control* 7 (2), S. 197–204. DOI: 10.1007/BF00051295.

Ueda, Hiroki R.; Matsumoto, Akira; Kawamura, Miho; Iino, Masamitsu; Tanimura, Teiichi; Hashimoto, Seiichi (2002): Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. In: *Journal of Biological Chemistry*.

Vanin, Stefano; Bhutani, Supriya; Montelli, Stefano; Menegazzi, Pamela; Green, Edward W.; Pegoraro, Mirko et al. (2012): Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. In: *Nature* 484 (7394), S. 371–375. DOI: 10.1038/nature10991.

Werner, Ernst R.; Blau, Nenad; Thöny, Beat (2011): Tetrahydrobiopterin. Biochemistry and pathophysiology. In: *The Biochemical journal* 438 (3), S. 397–414. DOI: 10.1042/BJ20110293.

Wiley, V.; Carpenter, K.; Wilcken, B. (1999): Newborn screening with tandem mass spectrometry. 12 months' experience in NSW Australia. In: *Acta Paediatrica* 88, S. 48–51. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1999.tb01157.x.

Wittmann, Marc; Dinich, Jenny; Merrow, Martha; Roenneberg, Till (2006): Social jetlag. Misalignment of biological and social time. In: *Chronobiology international* 23 (1-2), S. 497–509. DOI: 10.1080/07420520500545979.

Wu, Gang; Zhu, Jiang; Yu, Jun; Zhou, Lan; Huang, Jianhua Z.; Zhang, Zhang (2014): Evaluation of five methods for genome-wide circadian gene identification. In: *Journal of biological rhythms* 29 (4), S. 231–242. DOI: 10.1177/0748730414537788.

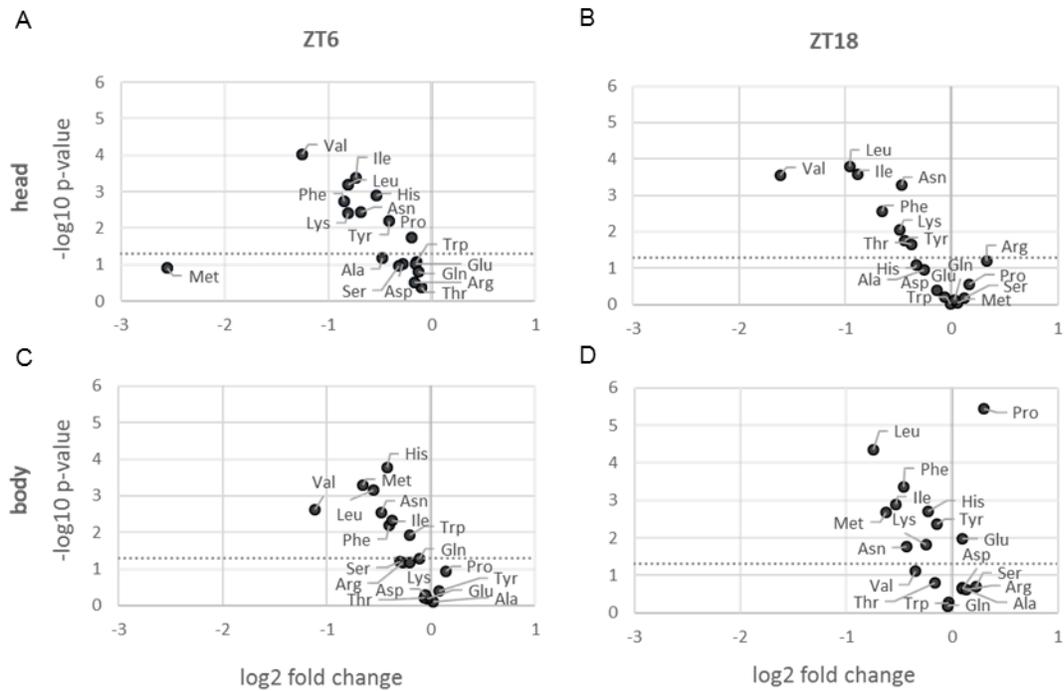
Wurtman, R. J.; Rose, C. M.; Chou, C.; Larin, F. F. (1968): Daily rhythms in the concentrations of various amino acids in human plasma. In: *The New England journal of medicine* 279 (4), S. 171–175. DOI: 10.1056/NEJM196807252790401.

Xu, Kanyan; DiAngelo, Justin R.; Hughes, Michael E.; Hogenesch, John B.; Sehgal, Amita (2011): The circadian clock interacts with metabolic physiology to influence reproductive fitness. In: *Cell metabolism* 13 (6), S. 639–654. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.05.001.

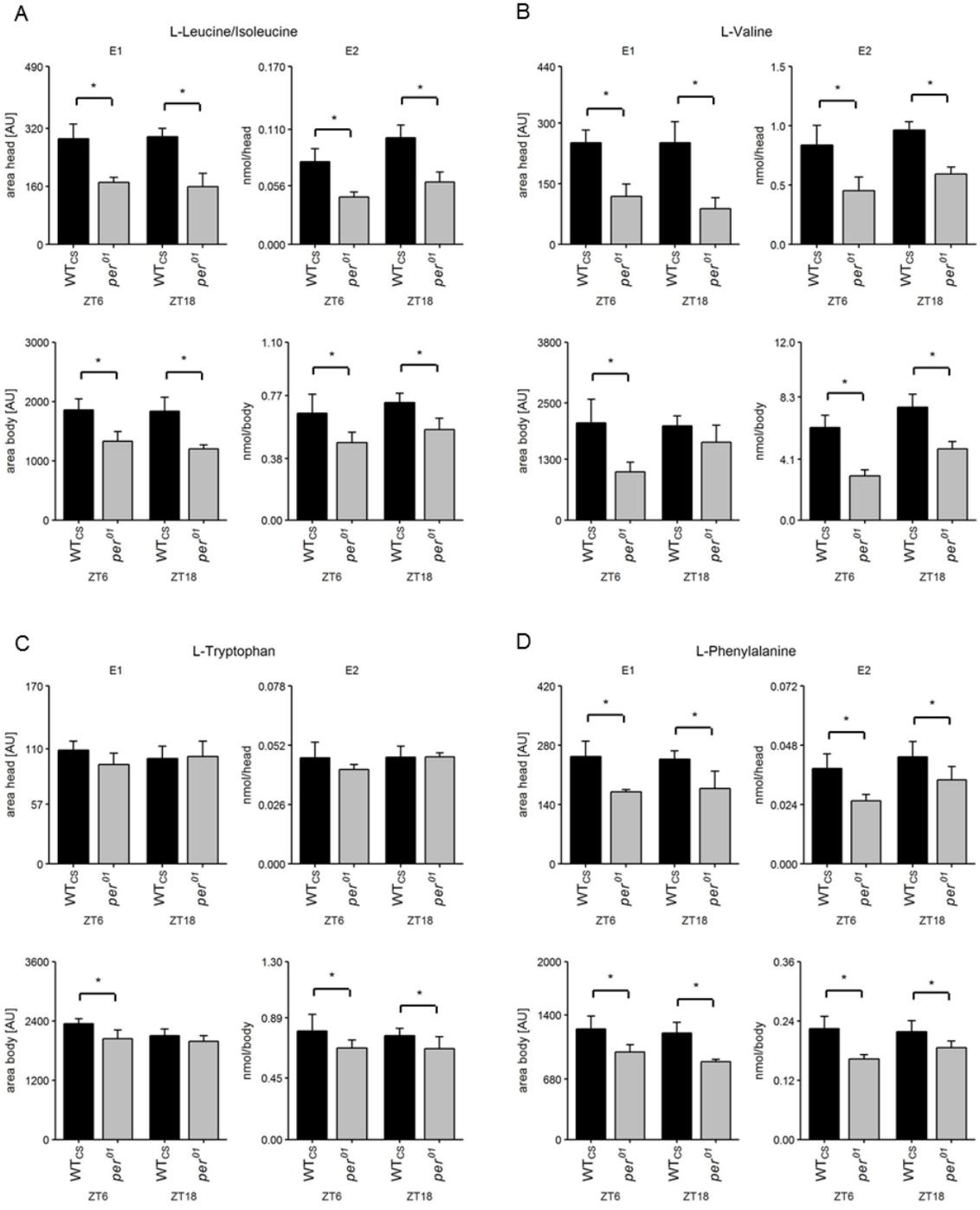
Xu, Kanyan; Zheng, Xiangzhong; Sehgal, Amita (2008): Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila*. In: *Cell metabolism* 8 (4), S. 289–300. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.09.006.

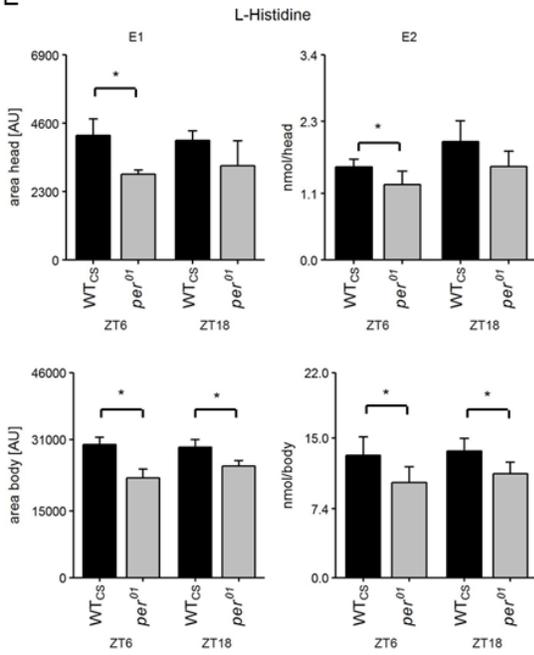
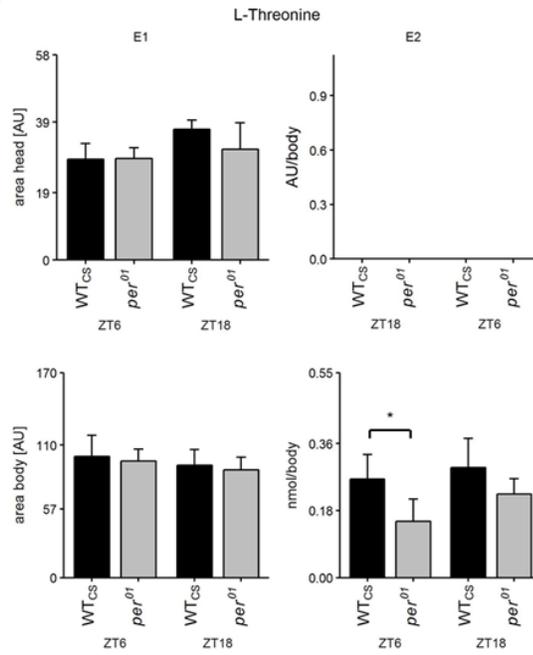
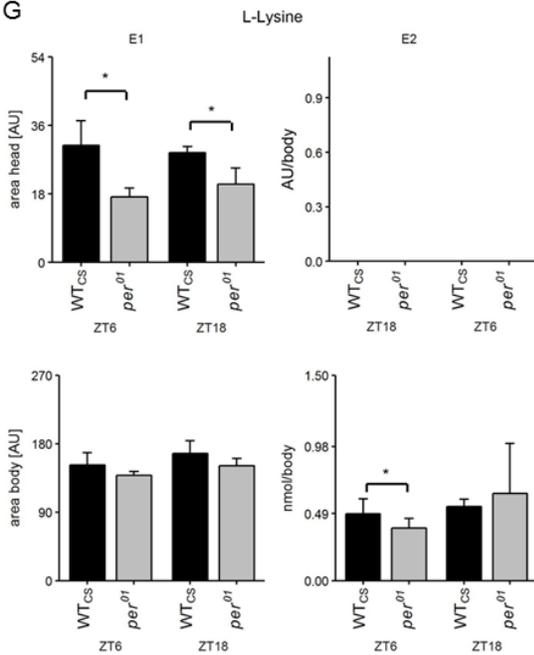
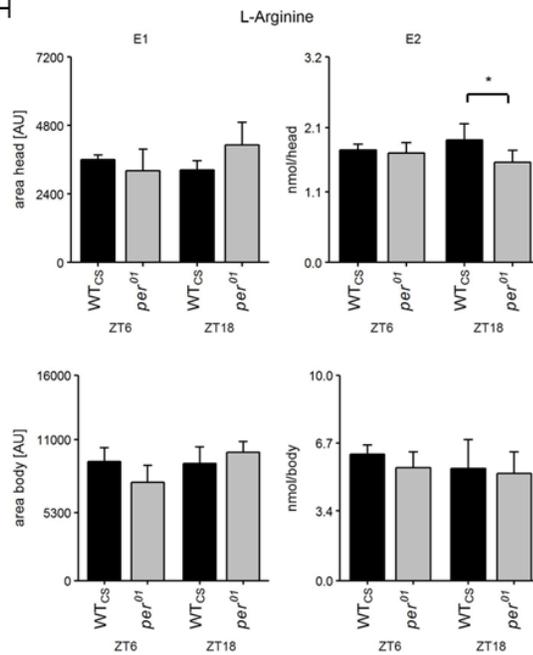
# 7 Anhang

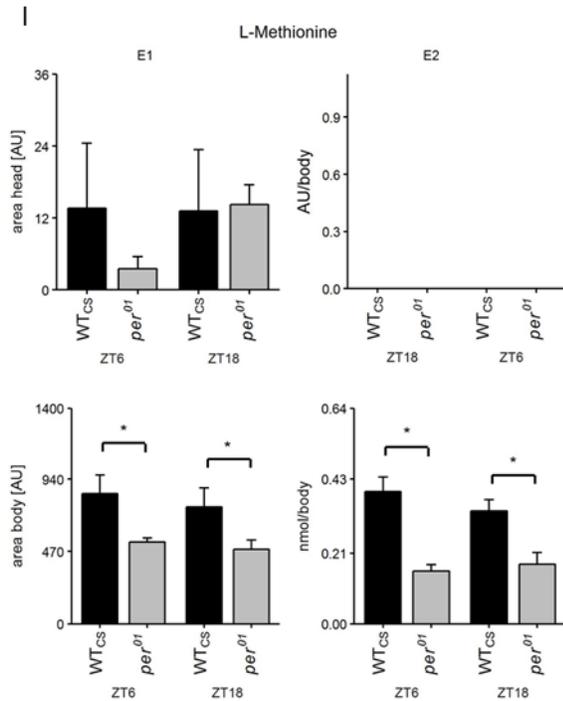
## 7.1 Angehängte Abbildungen



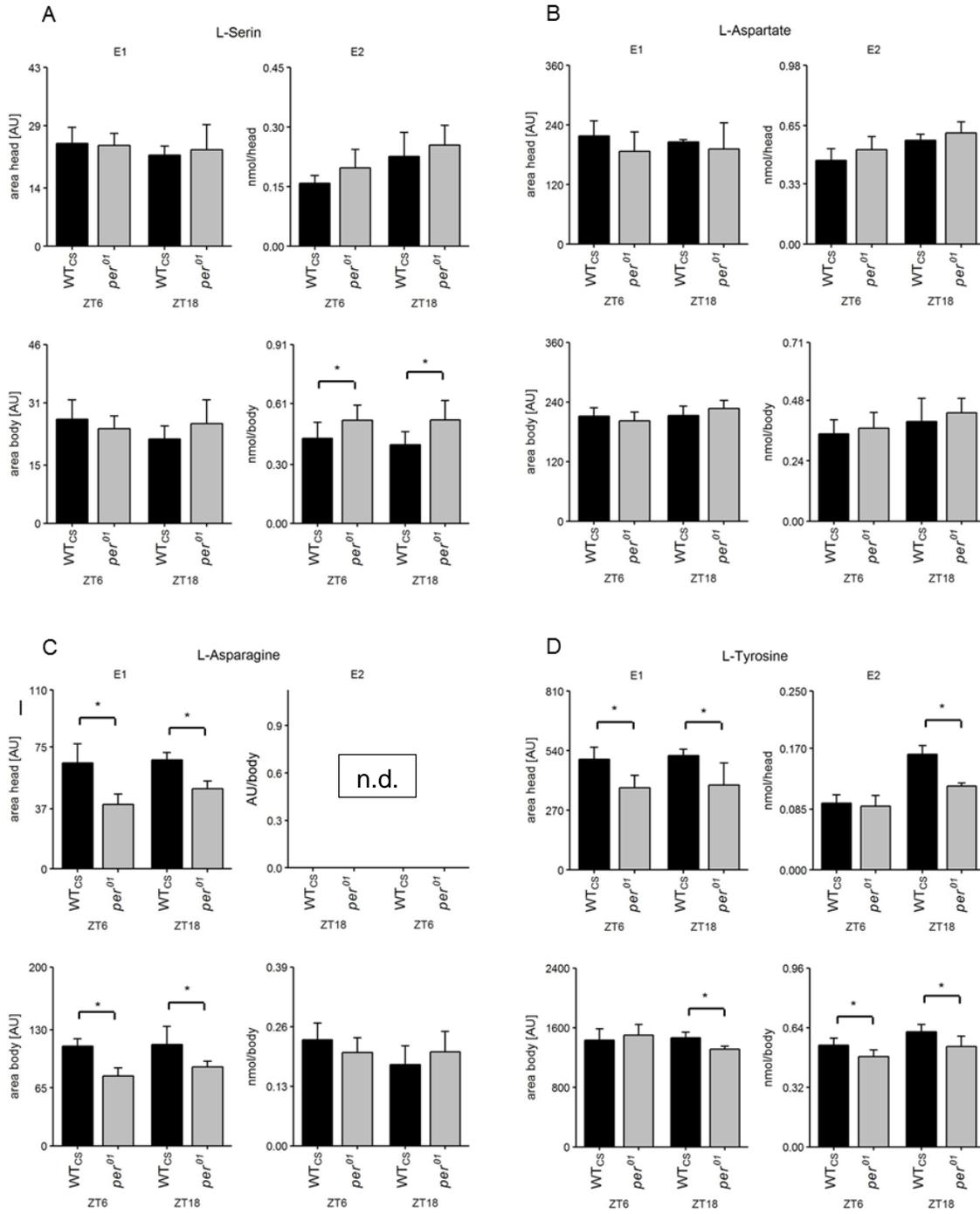
Angehängte Abbildung 1: Volcano-Plot für den Vergleich der AA-Spiegel zwischen *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen im Vorexperiment (E1), für die Kopf- (A, B) und Körperproben (C, D) zum Zeitpunkt ZT6 (A, C) und ZT18 (B, D). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) liegen überhalb der gestrichelten Linie ( $n=4$ )

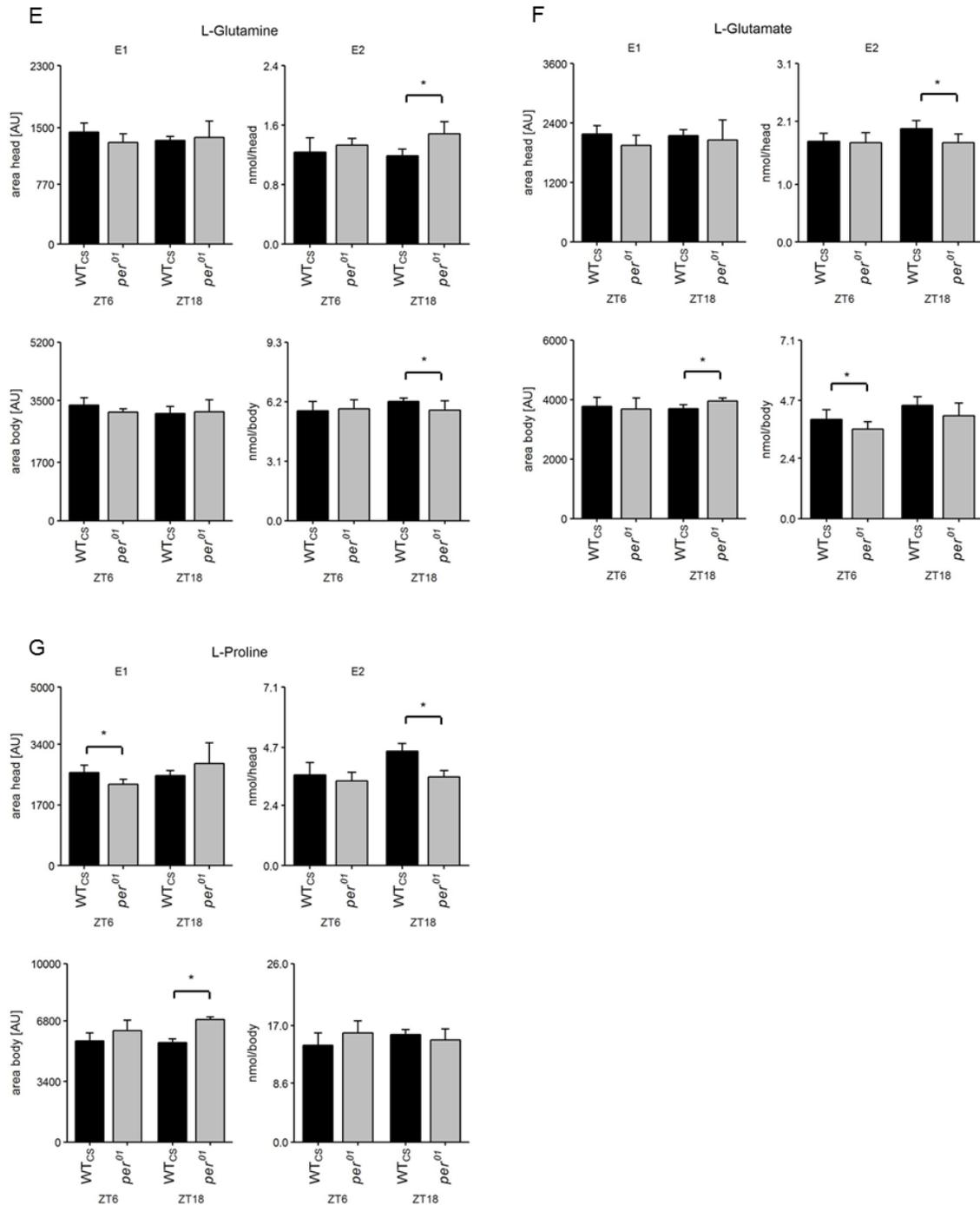


**E****F****G****H**

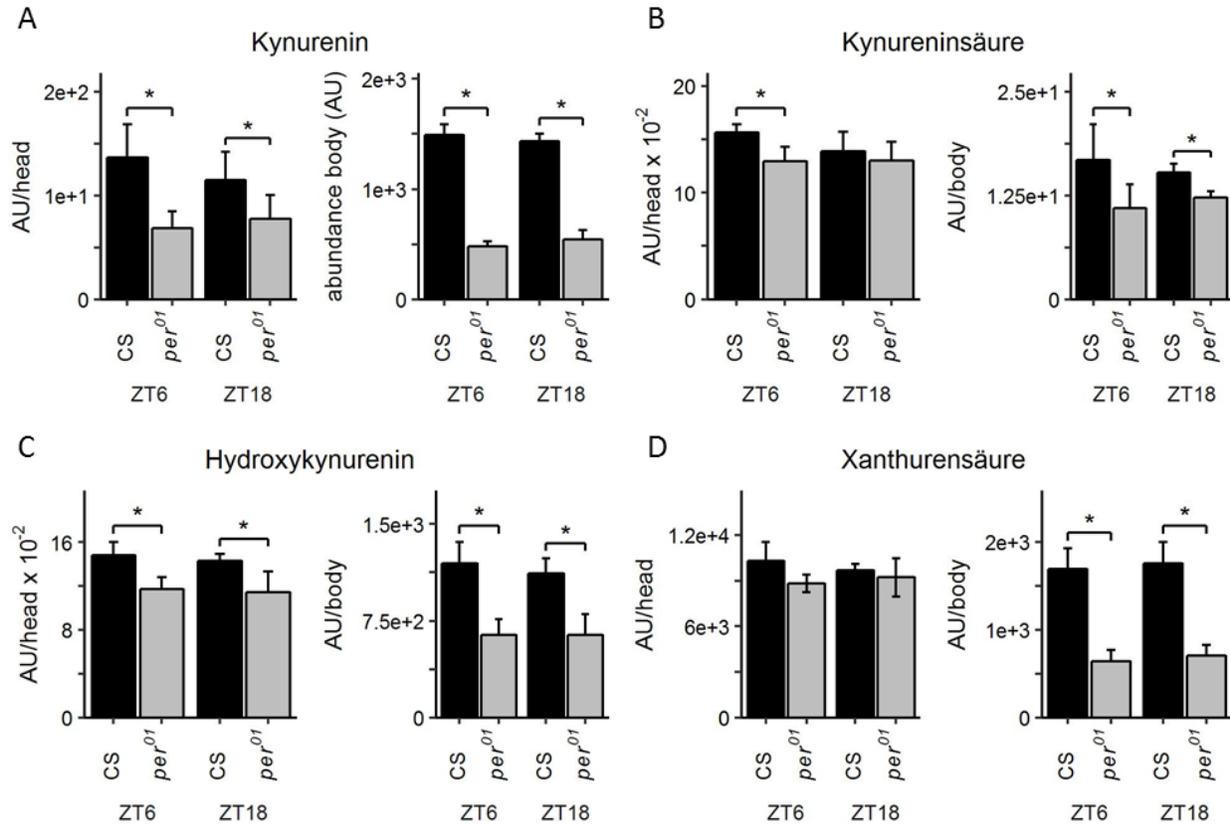


Angehängte Abbildung 2: Darstellung aller EAA-Spiegel in *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen in E1 (linke Spalte) und E2 (rechte Spalte). Ermittelte Peakfläche (E1) bzw. Stoffmenge (E2) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (obere Zeile) bzw. Körperproben (untere Zeile). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung für Leu/Ile (A), Val (B), Trp (C), Phe (D), His (E), Thr (F), Lys (G), Arg (H) und Met (I); n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen und Sterne signalisieren statistisch signifikante ( $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 4$  (E1);  $n = 7$  (E2)).

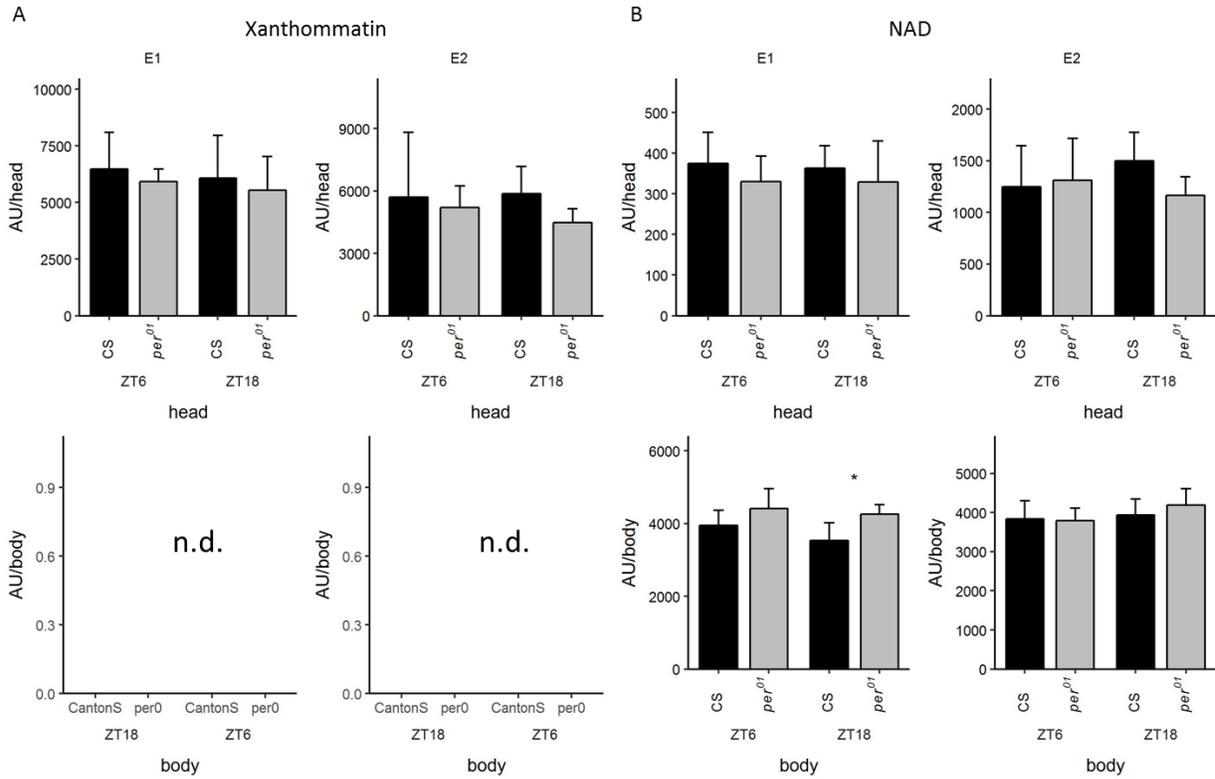




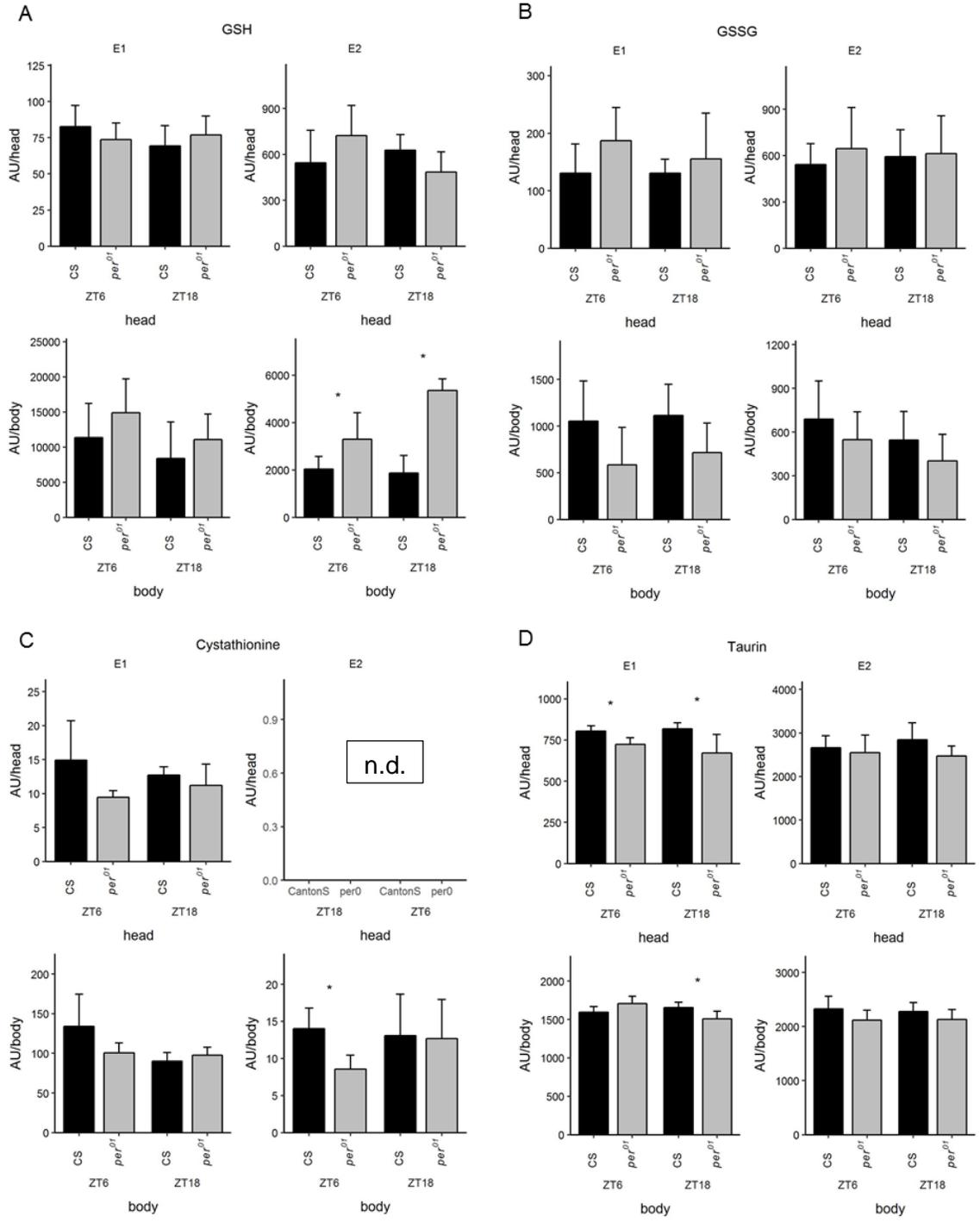
**Angehängte Abbildung 3: Darstellung aller NEAA-Spiegel in *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen in E1 (linke Spalte) und E2 (rechte Spalte). Ermittelte Peakfläche (E1) bzw. Stoffmenge (E2) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (obere Zeile) bzw. Körperproben (untere Zeile). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung für Ser (A), Asp (B), Asn (C), Tyr (D), Gln (E), Glu (F) und Pro (G); n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen und Sterne signalisieren statistisch signifikante (p<0.05) Unterschiede (n = 4 (E1); n = 7 (E2)).**

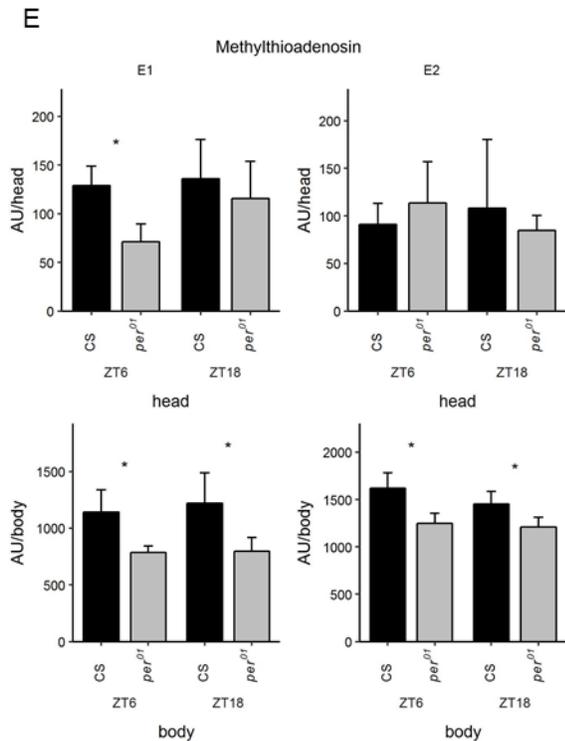


**Angehängte Abbildung 4: Vergleich der detektierten Metaboliten des Kynureninstoffwechselweges zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>CS</sub> (schwarz) im Vorexperiment (E1). Ermittelte Spiegel (willkürliche Einheit; AU) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'head') bzw. Körperproben (rechtes Diagramm, engl. body). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung für Kynurenin (A), Kynureninsäure (B), Hydroxykynurenin (C) und Xanthurensäure (D); Sterne signalisieren statistisch signifikante (T-Test;  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 4$ ).**

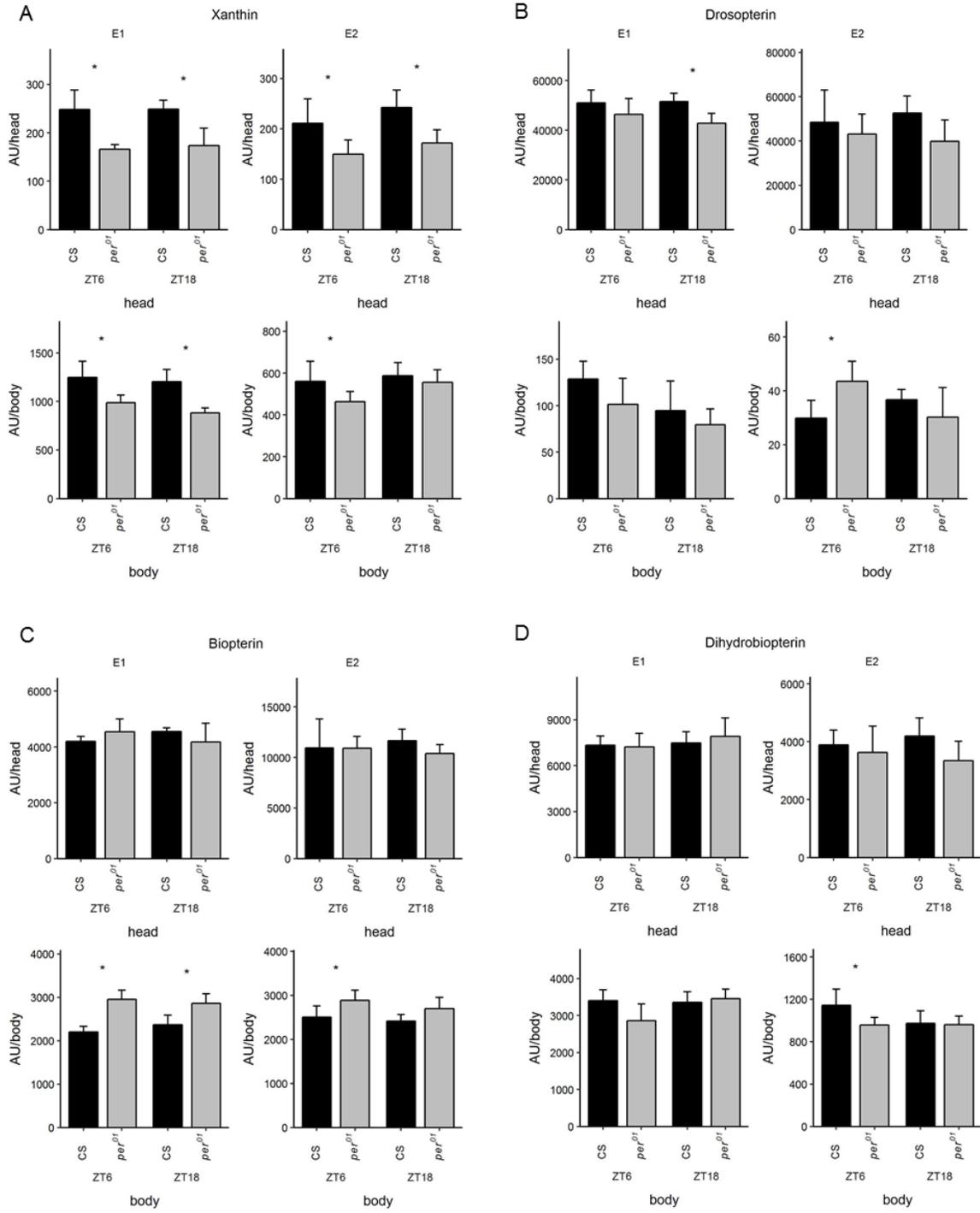


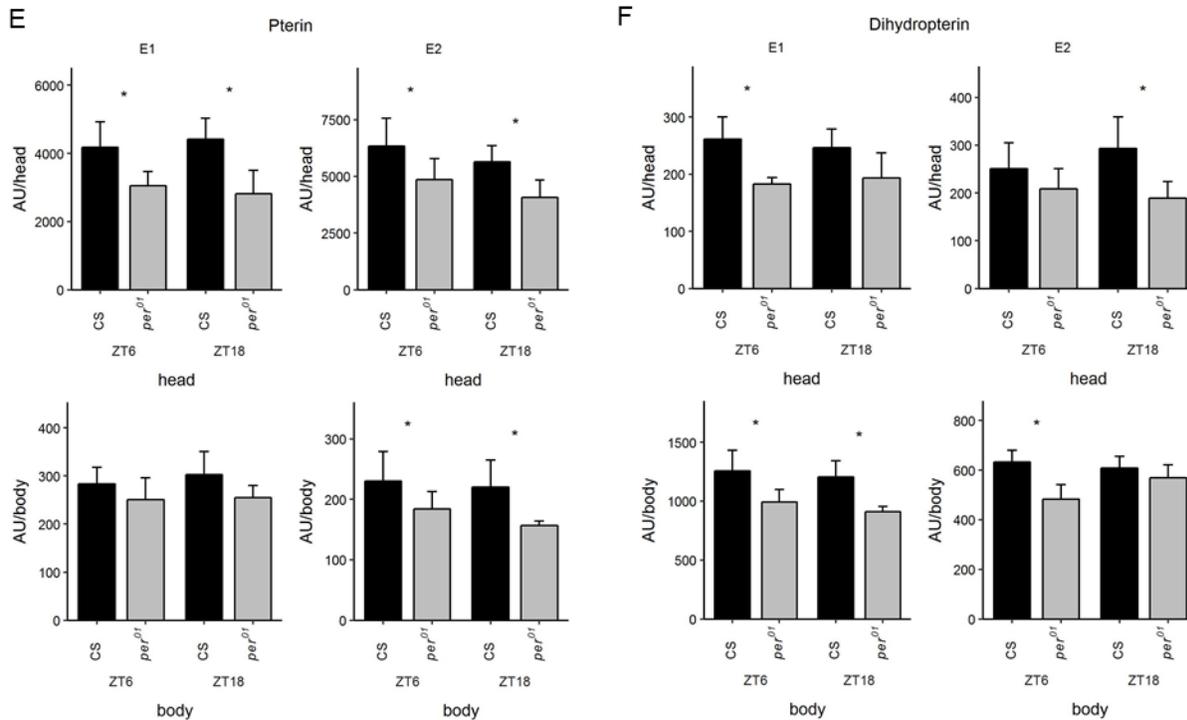
Angehängte Abbildung 5: Darstellung der Xanthommatin (A) und NAD (B)-Spiegel in *per<sup>01</sup>* und *WT<sub>CS</sub>* Fliegen zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen im Vorexperiment (E1, linker Plot) bzw. im Hauptexperiment (rechter Plot) in den Kopf- (obere Plots) bzw. Körperproben (untere Plots). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung; n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen und Sterne signalisieren statistisch signifikante (T-Test;  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 4$  (E1);  $7$  (E2)).



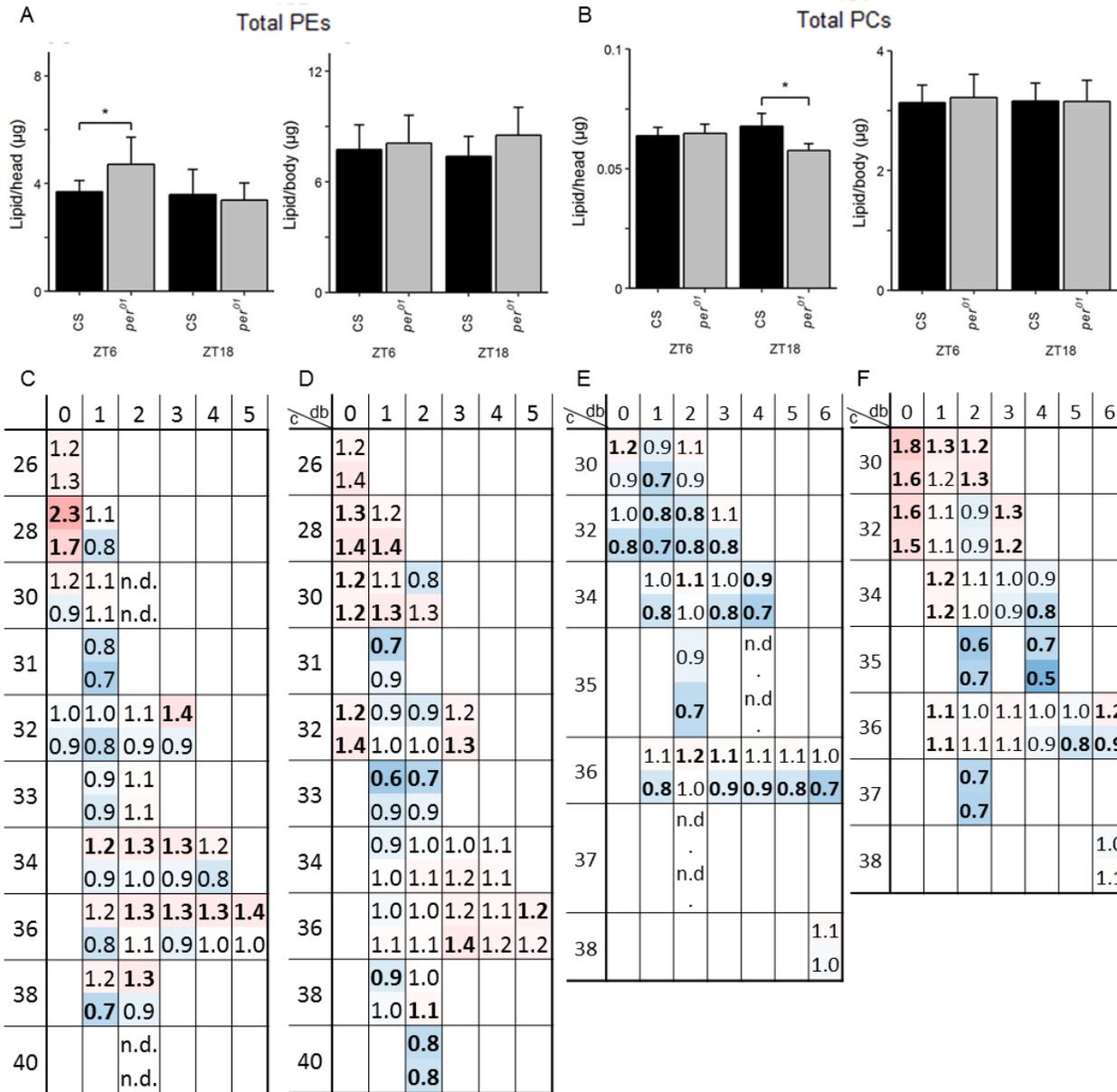


**Angehängte Abbildung 6: Darstellung der Spiegel aller detektierter Mitglieder des Transsulfurierungs-Stoffwechselwegs in *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> Fliegen in E1 (linke Spalte) und E2 (rechte Spalte). Ermittelte Peakfläche (E1) bzw. Stoffmenge (E2) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (obere Zeile) bzw. Körperproben (untere Zeile). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung für GSH (A), GSSG (B), Cystathionine (C), Taurin (D) und Methylthioadenosin (E); n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen und Sterne signalisieren statistisch signifikante ( $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 4$  (E1);  $n = 7$  (E2)).**

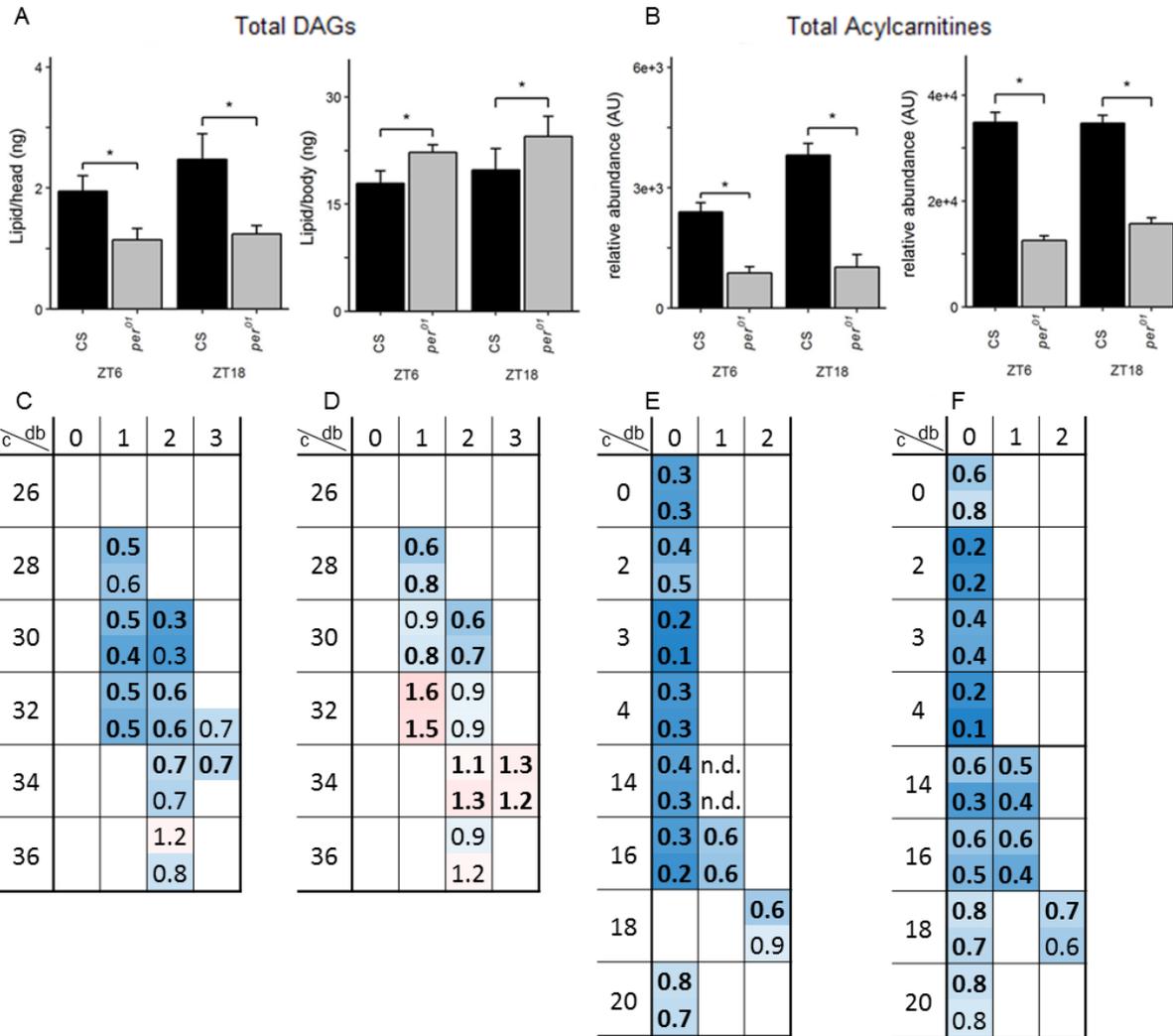




Angehängte Abbildung 7: Darstellung der Spiegel aller detektiert Mitglieder des Purinmetabolismus in *per<sup>01</sup>* und *WT<sub>CS</sub>* Fliegen in E1 (linke Spalte) und E2 (rechte Spalte). Ermittelte Peakfläche (E1) bzw. Stoffmenge (E2) zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (obere Zeile) bzw. Körperproben (untere Zeile). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung für Xanthin (A), Drosopterin (B), Biopterin (C), Dihydrobiopterin (D), Pterin (E) und Dihydropterin (F); n.d. kennzeichnet Spiegel, die unter dem Detektionslimit lagen und Sterne signalisieren statistisch signifikante ( $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 4$  (E1);  $n = 7$  (E2)).

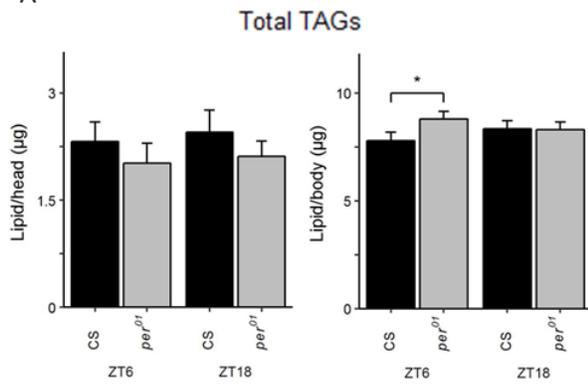


Angehängte Abbildung 8: Vergleich der PE- und PC-Stoffmenge zwischen *per*<sup>01</sup> (grau) und WT<sub>CS</sub> (schwarz) im Vorexperiment (E1). A, B: Summe aller quantifizierter PE- (A) bzw. PC- (B) Spezies zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'he) bzw. Körperproben (rechtes Diagramm). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung; Sterne signalisieren statistisch signifikante (t-Test, p<0.05) Unterschiede (n = 7). C, D, E, F: Lipidspeziespezifisches (charakterisiert durch die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen der veresterten Fettsäuren (c) und die Anzahl an Doppelbindungen (db)) Verhältnis aus in *per*<sup>01</sup> und WT<sub>CS</sub> ermittelten Stoffmengen für PEs (C, D) bzw. PCs (E, F), für die Kopf- (C, E) und Körperproben (D, F). Das obere, dargestellte Verhältnis entspricht hierbei ZT6, das untere ZT18. Fett dargestellte Zahlen symbolisieren statistisch signifikante (T-Test; p < 0.05) Unterschiede. Blaue Werte repräsentieren niedrigere (min.: 0), rote Werte (max.: 5) höhere Mengen in *per*<sup>01</sup> als in WT<sub>CS</sub> (n = 5)



Angehängte Abbildung 9: Vergleich der DAG- und CAR & AC-Stoffmenge zwischen *per<sup>01</sup>* (grau) und *WT<sub>CS</sub>* (schwarz) im Vorexperiment (E1). A, B: Summe aller quantifizierter DAGs - (A) bzw. ACs- (B) Spezies zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm, engl. 'he) bzw. Körperproben (rechtes Diagramm). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung; Sterne signalisieren statistisch signifikante (t-Test,  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 7$ ). C, D, E, F: Lipidspeziespezifisches (charakterisiert durch die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen der veresterten Fettsäuren (c) und die Anzahl an Doppelbindungen (db)) Verhältnis aus in *per<sup>01</sup>* und *WT<sub>CS</sub>* ermittelten Stoffmengen für DAGs (C, D) bzw. ACs (E, F), für die Kopf- (C, E) und Körperproben (D, F). Das obere, dargestellte Verhältnis entspricht hierbei ZT6, das untere ZT18. Fett dargestellte Zahlen symbolisieren statistisch signifikante (T-Test;  $p < 0.05$ ) Unterschiede. Blaue Werte repräsentieren niedrigere (min.: 0), rote Werte (max.: 5) höhere Mengen in *per<sup>01</sup>* als in *WT<sub>CS</sub>* ( $n = 5$ )

A



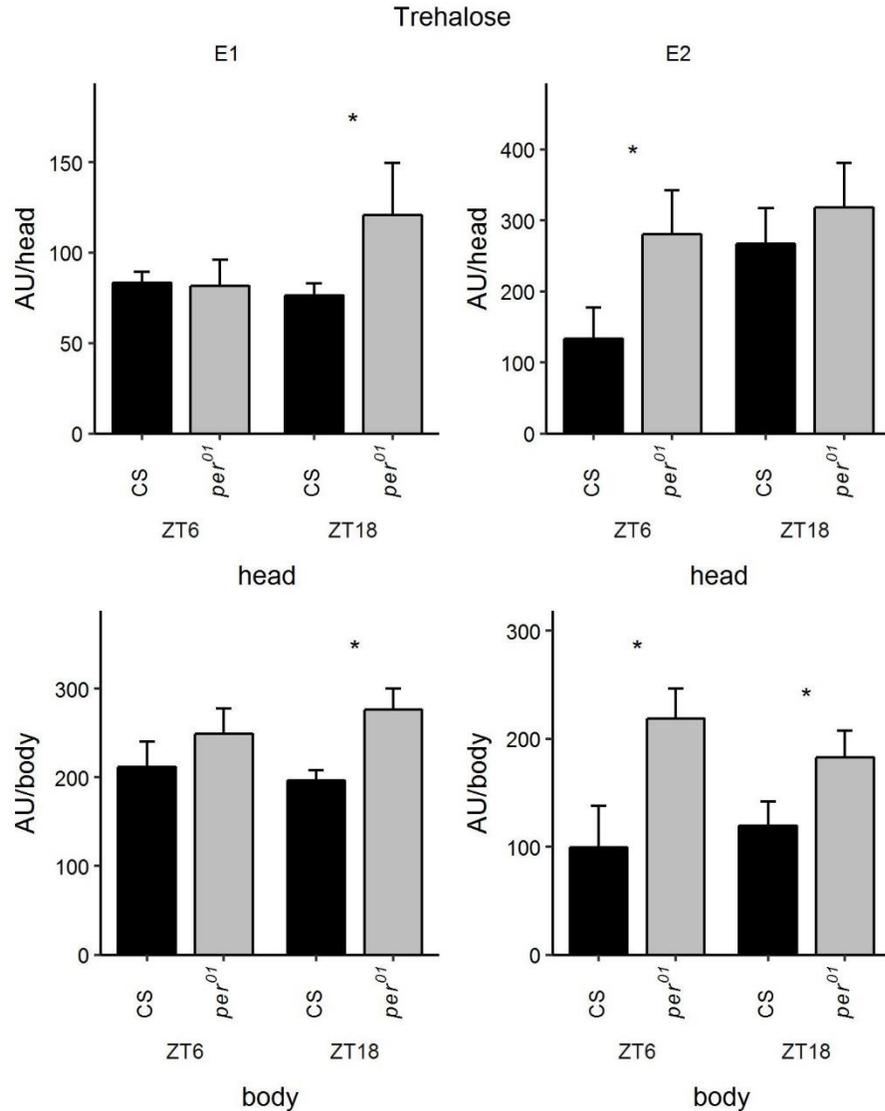
B

| c/db | 0    | 1   | 2   | 3    | 4   | 5 |
|------|------|-----|-----|------|-----|---|
| 34   | 0.7  |     |     |      |     |   |
| 36   | 0.6  |     |     |      |     |   |
| 37   | 0.5  |     |     |      |     |   |
| 38   | 0.7  | 0.7 |     |      |     |   |
| 39   | 0.6  | 0.6 |     |      |     |   |
| 40   | 0.8  | 0.8 | 0.9 |      |     |   |
| 41   | 0.6  | 0.8 | 0.9 |      |     |   |
| 42   | 0.8  | 0.9 | 0.9 | 1.2  |     |   |
| 43   | 0.6  | 0.7 | 0.9 | n.d. |     |   |
| 44   | 0.7  | 0.8 | 0.9 | 1.0  | 1.3 |   |
| 45   | 0.6  | 0.8 | 1.1 |      |     |   |
| 46   | 0.8  | 0.9 | 1.0 | 1.1  |     |   |
| 47   | 0.6  | 0.8 | 1.1 |      |     |   |
| 48   | 0.7  | 1.0 | 1.2 | 1.3  |     |   |
| 49   | 0.6  | 0.8 | 1.1 |      |     |   |
| 50   | 0.7  | 1.2 | 1.5 | 1.5  | 1.7 |   |
| 51   |      | 0.8 |     |      |     |   |
| 52   |      | 1.4 | 1.9 | 1.9  | 1.6 |   |
| 53   | 0.9  | 1.1 | 1.0 |      |     |   |
| 54   |      |     |     |      |     |   |
| 55   | 0.9  | 1.6 | 2.3 |      |     |   |
| 56   | 0.8  |     | 1.0 |      |     |   |
| 57   | 1.1  | 1.7 | 2.7 |      |     |   |
| 58   | n.d. | 0.9 | 1.0 | n.d. |     |   |

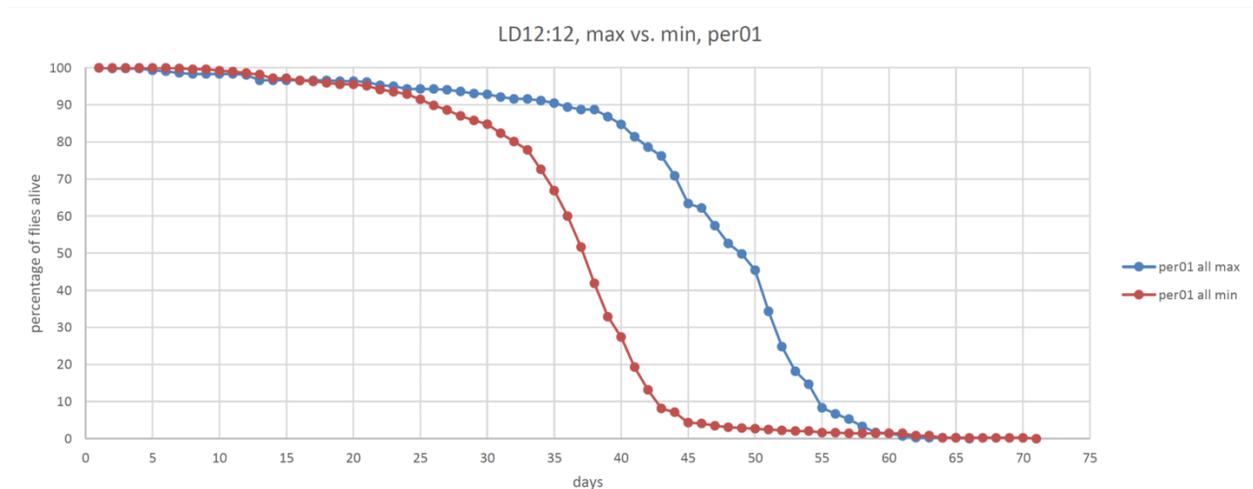
C

| c/db | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5 |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| 36   | 1.3 |     |     |     |     |   |
| 37   | 0.8 |     |     |     |     |   |
| 38   | 1.2 | 1.2 |     |     |     |   |
| 39   | 0.8 | 0.9 |     |     |     |   |
| 40   | 1.1 | 1.2 | 1.5 |     |     |   |
| 41   | 0.8 | 1.0 | 1.0 |     |     |   |
| 42   | 1.1 | 1.1 | 1.4 | 1.7 |     |   |
| 43   | 0.8 | 0.9 | 1.1 | 1.6 |     |   |
| 44   | 0.9 | 1.0 | 1.1 | 1.5 | 1.8 |   |
| 45   | 0.8 | 0.9 | 1.1 |     |     |   |
| 46   | 0.9 | 1.0 | 1.2 | 1.8 |     |   |
| 47   | 0.7 | 0.9 | 1.2 |     |     |   |
| 48   | 1.0 | 1.1 | 1.2 | 1.6 |     |   |
| 49   | 0.8 | 0.9 | 1.2 |     |     |   |
| 50   | 1.2 | 1.4 | 1.5 | 1.5 | 0.9 |   |
| 51   | 1.0 | 0.9 | 1.2 |     |     |   |
| 52   |     | 2.1 | 2.0 | 2.1 | 1.8 |   |
| 53   | 1.1 | 1.5 | 1.1 |     |     |   |
| 54   |     | 1.2 | 1.3 |     |     |   |
| 55   | 0.9 | 2.3 | 2.4 |     |     |   |
| 56   | 0.8 |     | 1.1 |     |     |   |
| 57   | 0.6 | 2.0 | 2.7 |     |     |   |
| 58   | 0.8 | 1.1 | 1.3 | 1.4 |     |   |

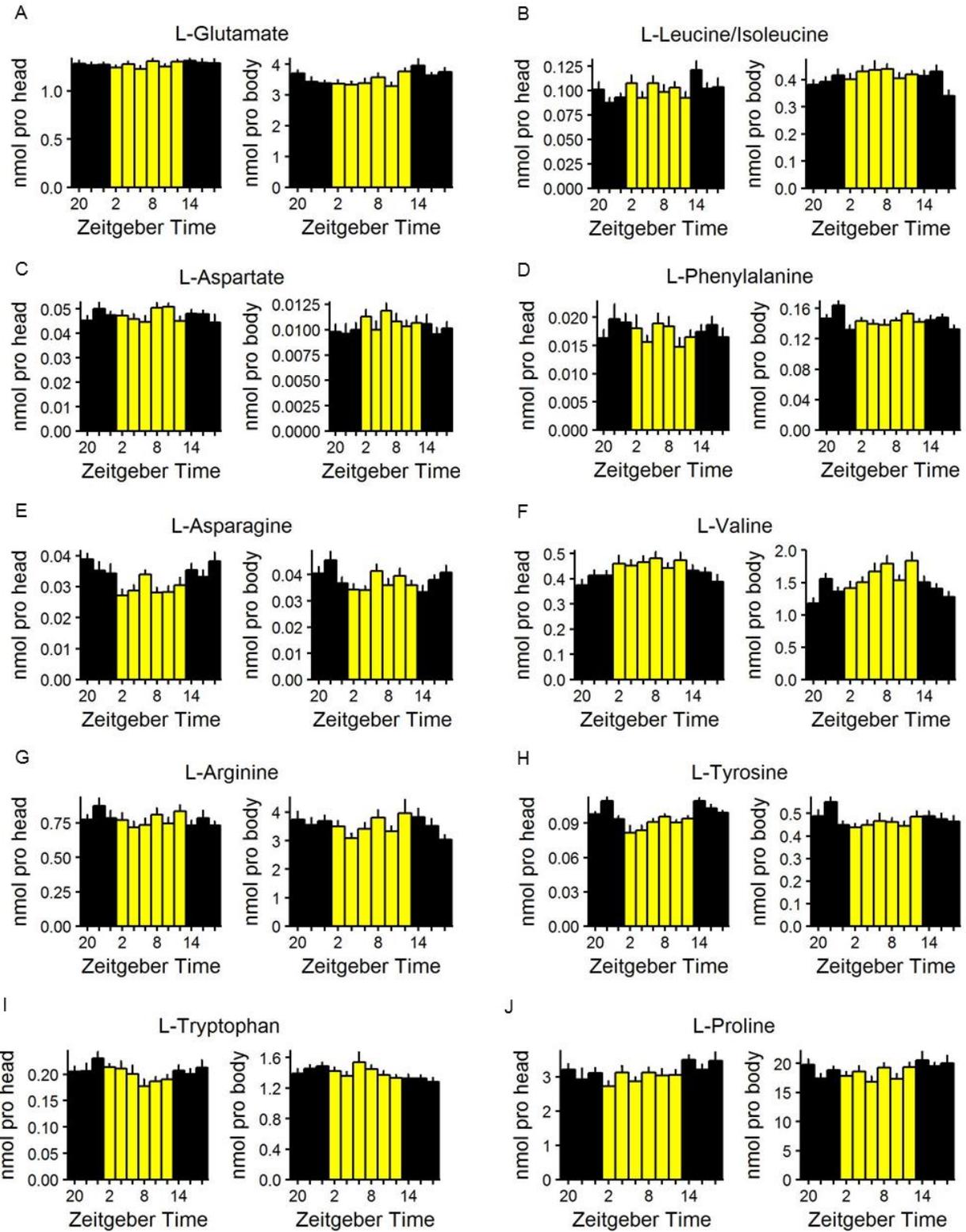
Angehängte Abbildung 10: Vergleich der TAG-Stoffmenge zwischen *per<sup>01</sup>* (grau) und *WT<sub>CS</sub>* (schwarz) im Vorexperiment (E1). A: Summe aller quantifizierter TAG-Spezies zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (linkes Diagramm; engl. head) bzw. Körperproben (rechtes Diagramm; engl. body). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung; Sterne signalisieren statistisch signifikante (T-Test  $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 7$ ). B, C: Lipidspeziespezifisches (charakterisiert durch die Gesamtzahl an Kohlenstoffatomen der veresterten Fettsäuren (c) und die Anzahl an Doppelbindungen (db)) Verhältnis aus in *per<sup>01</sup>* und *WT<sub>CS</sub>* ermittelten Stoffmengen für TAGs, für die Kopf- (B) und Körperproben (C). Das obere, dargestellte Verhältnis entspricht hierbei ZT6, das untere ZT18. Fett dargestellte Zahlen symbolisieren statistisch signifikante (T-Test  $p < 0.05$ ) Unterschiede. Blaue Werte repräsentieren niedrigere (min.: 0), rote Werte (max.: 5) höhere Mengen in *per<sup>01</sup>* als in *WT<sub>CS</sub>* ( $n = 7$ )

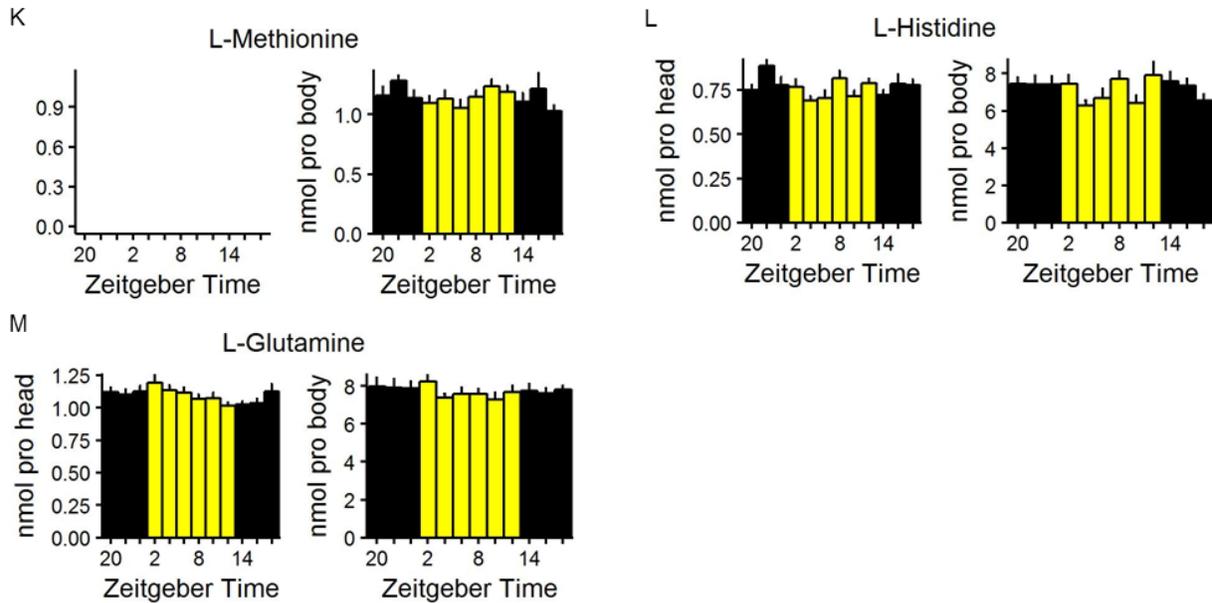


**Angehängte Abbildung 11: Darstellung der Trehalose-Spiegel in *per<sup>01</sup>* und WT<sub>CS</sub> Fliegen in E1 (linke Spalte) und E2 (rechte Spalte). Ermittelte Peakfläche zu den Zeitpunkten ZT6 und ZT18, gemessen in den Kopf- (obere Zeile) bzw. Körperproben (untere Zeile). Die Daten zeigen Mittelwert + Standardabweichung und Sterne signalisieren statistisch signifikante ( $p < 0.05$ ) Unterschiede ( $n = 4$  (E1);  $n = 7$  (E2)).**

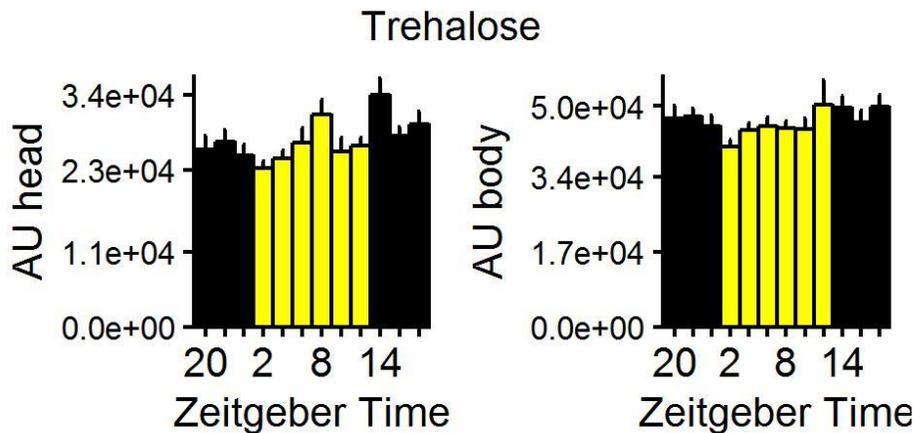


**Angehängte Abbildung 12: Überlebensrate von *per<sup>01</sup>* Fliegen auf Normal- (blaue Kurve) und Minimalmedium (rote Kurve) sowie von *per<sup>01</sup>* Fliegen unter LD Bedingungen (n=1). Die gezeigte Abbildung sowie das gesamte Experiment wurde von Melanie Horn am Lehrstuhl für Neurologie und Genetik an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Rahmen ihrer Promotion erstellt bzw. durchgeführt. per min vs max**

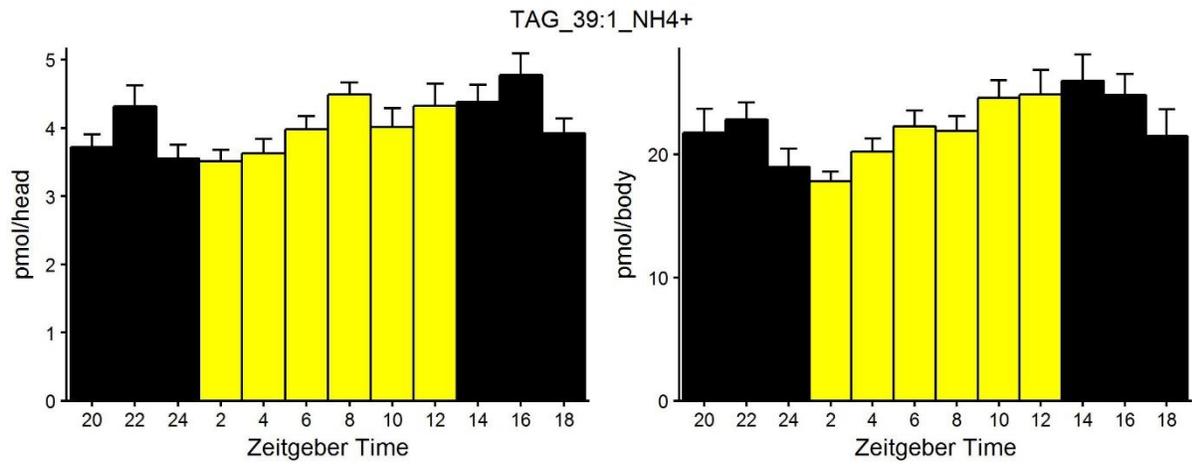
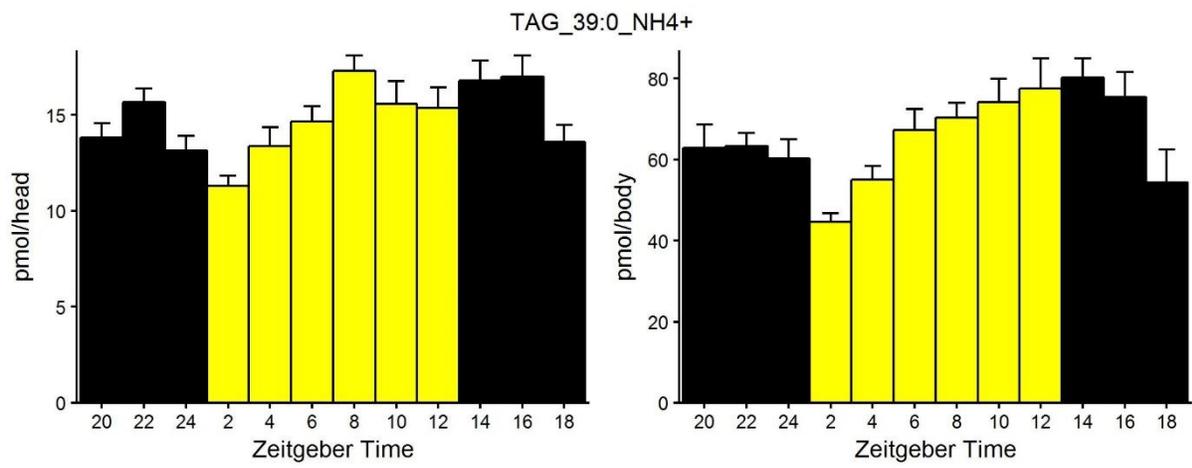
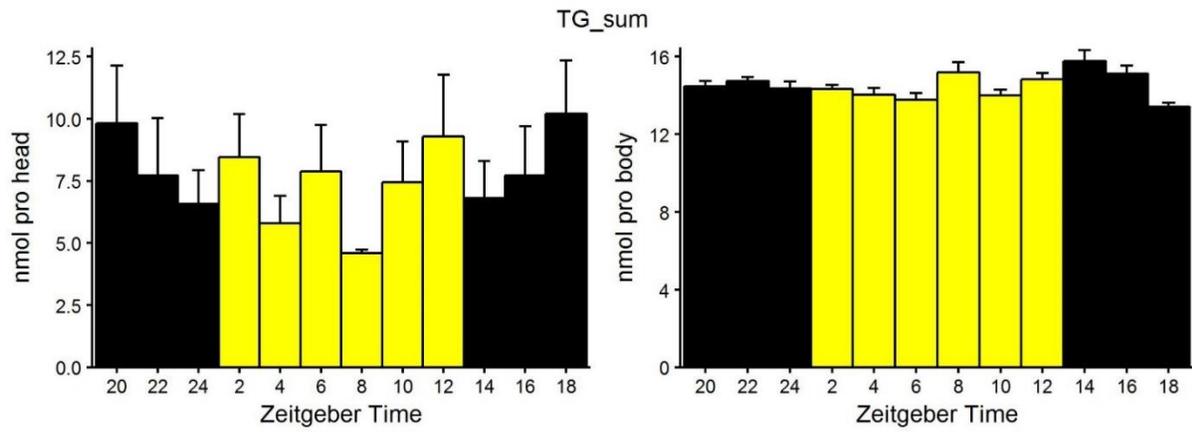


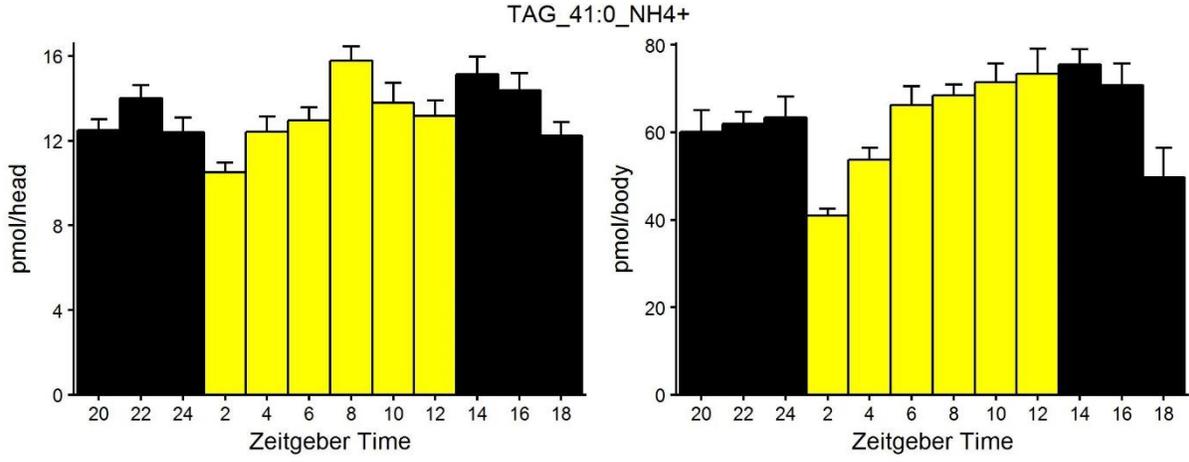
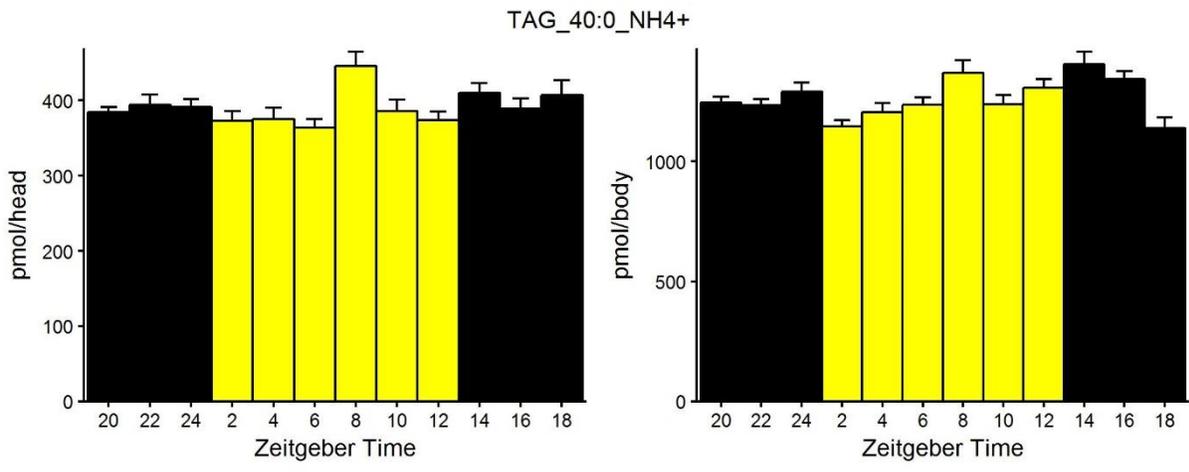
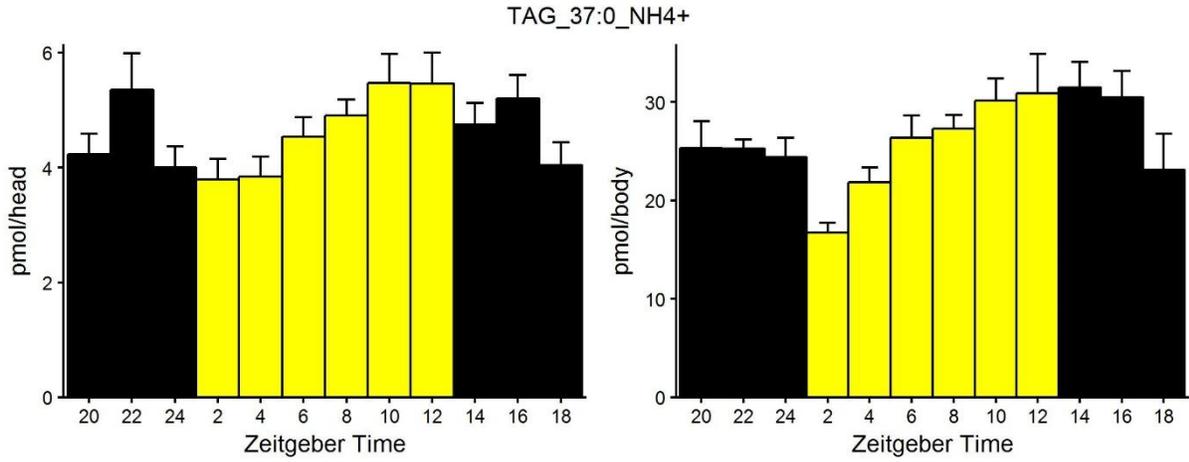


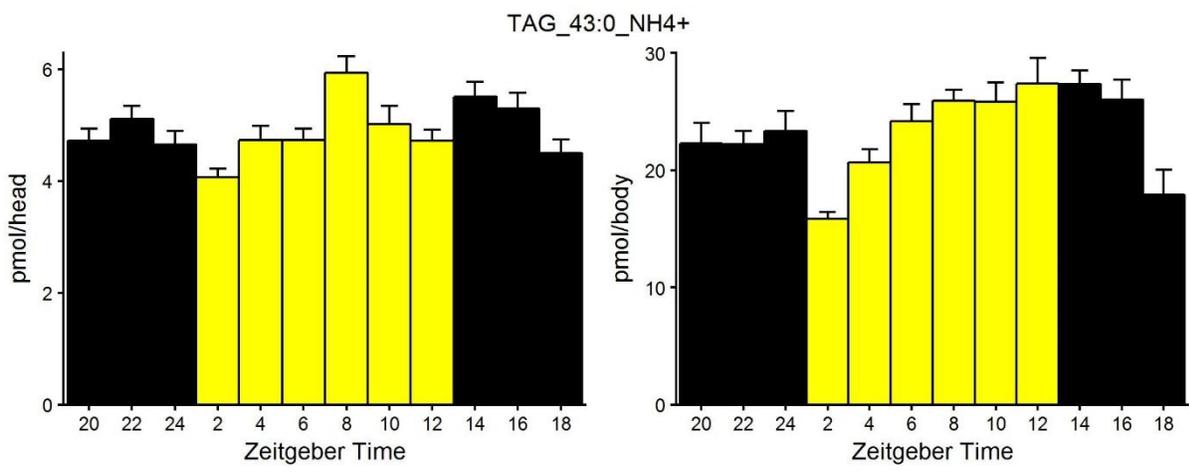
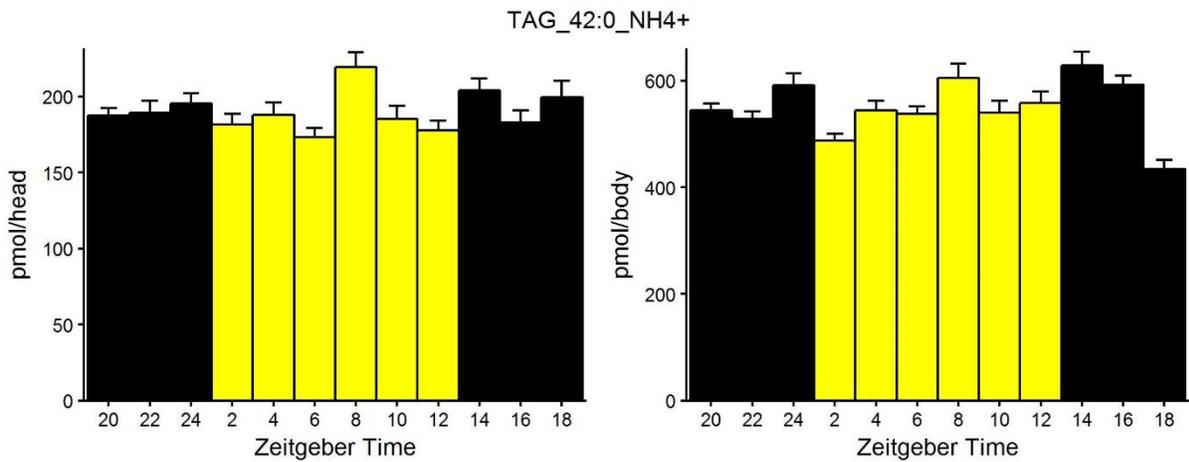
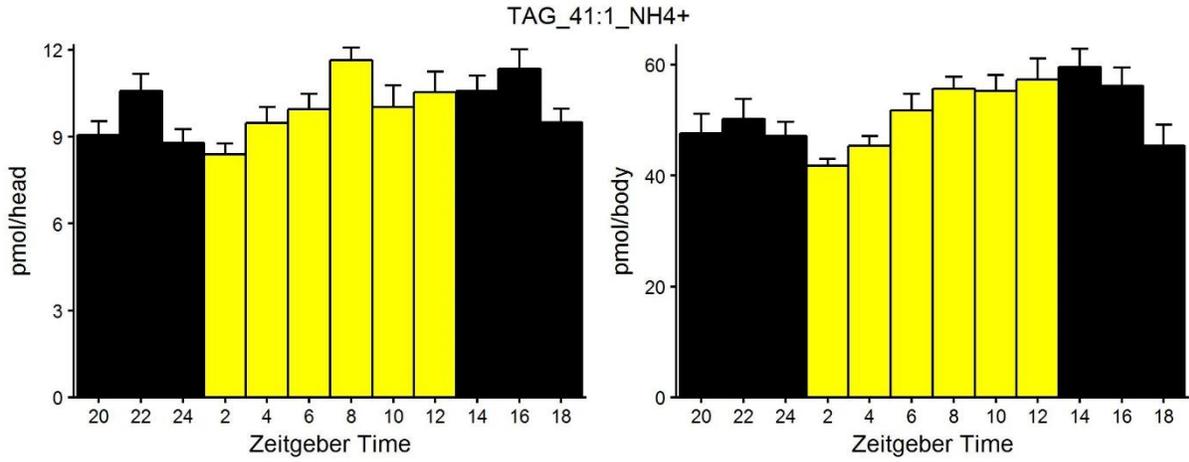
Angehängte Abbildung 13: Diurnale Rhythmik von der AA-Spiegeln in WT<sub>CS</sub> Fliegen in Kopf (linker Plot) und Körper (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen (n = 12-21) + SE .

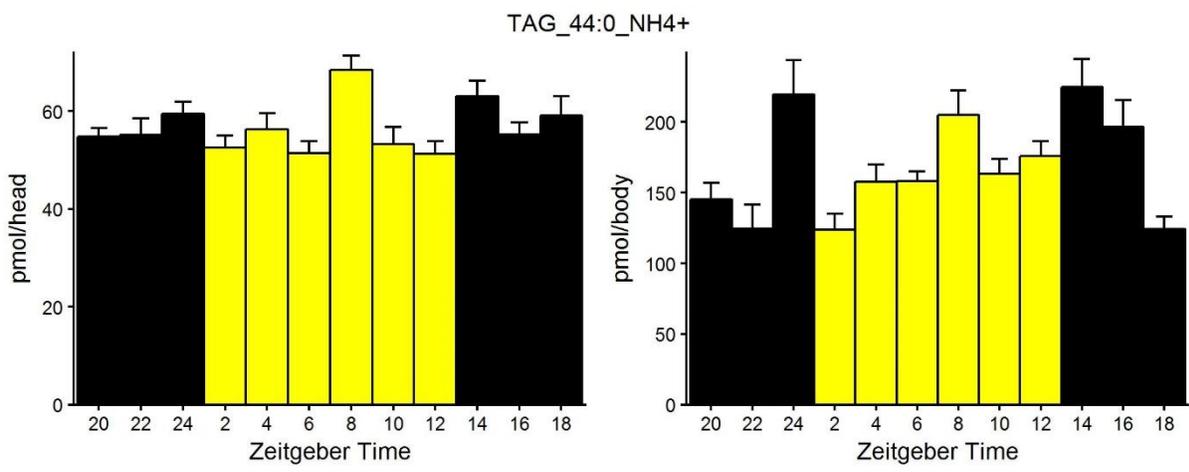
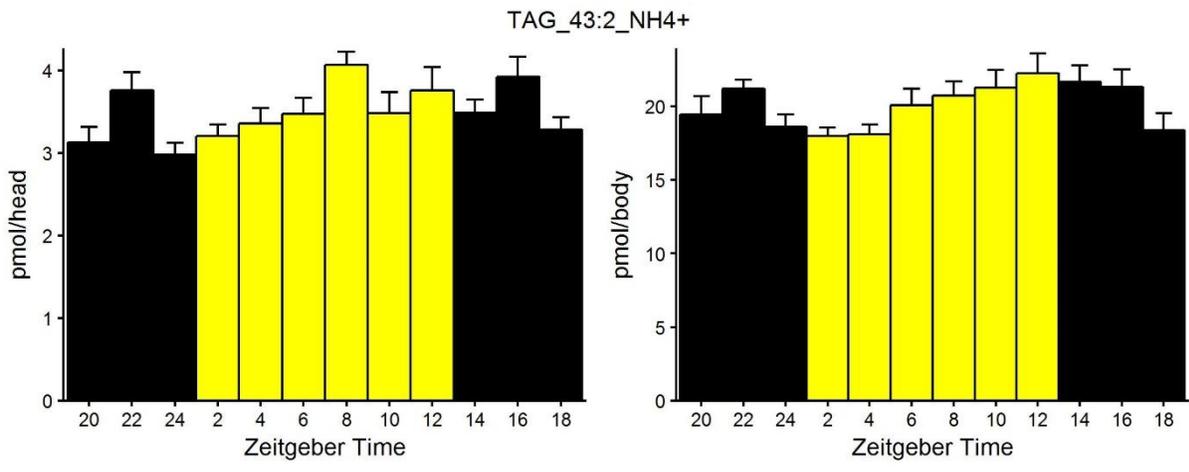
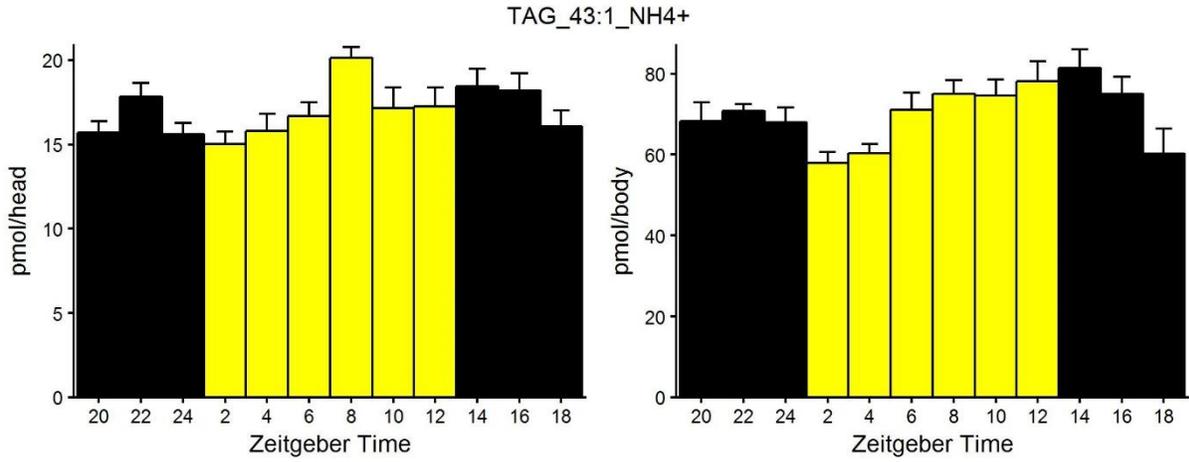


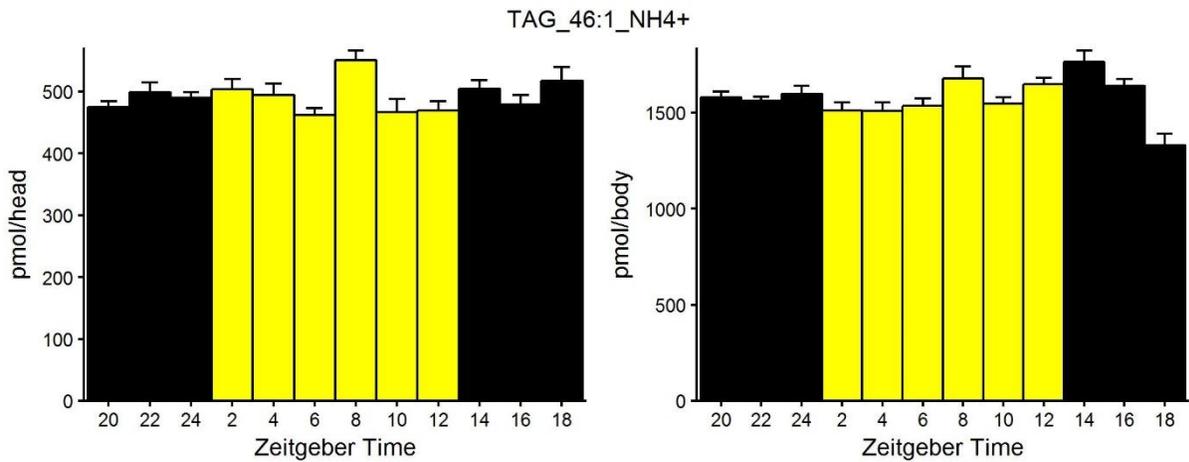
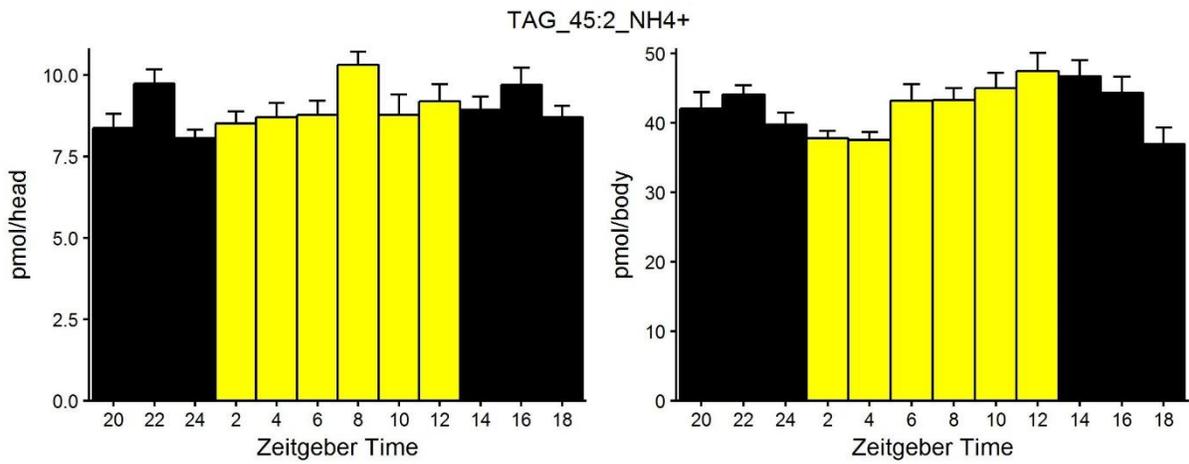
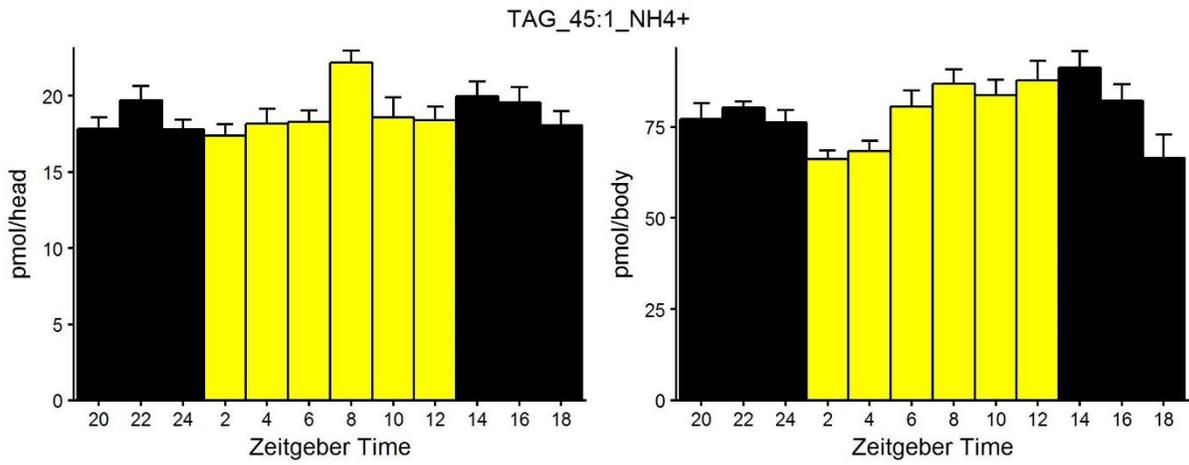
Angehängte Abbildung 14: Diurnale Rhythmik von Trehalose Spiegeln in WT<sub>CS</sub> Fliegen in Kopf (linker Plot) und Körper (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen (n = 12-21) + SE .

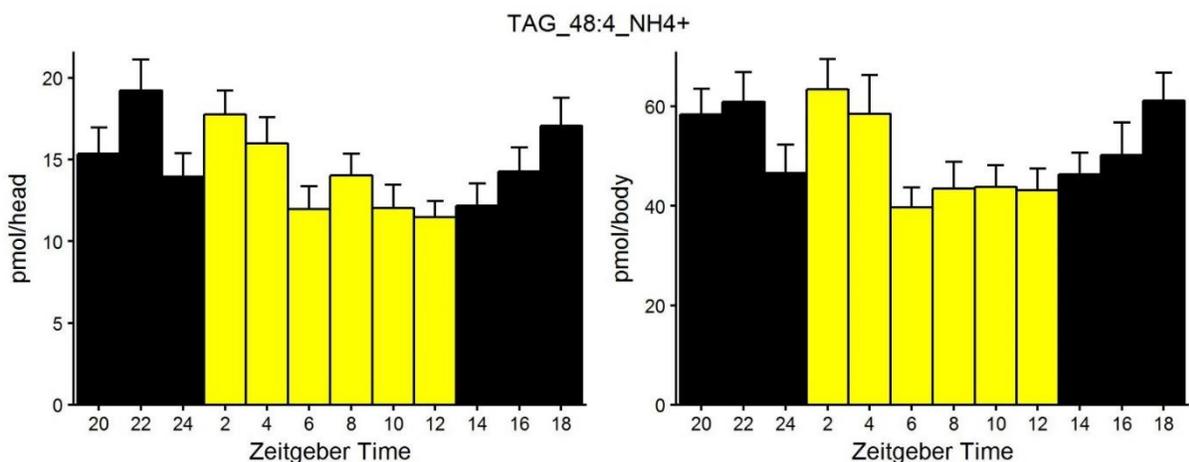
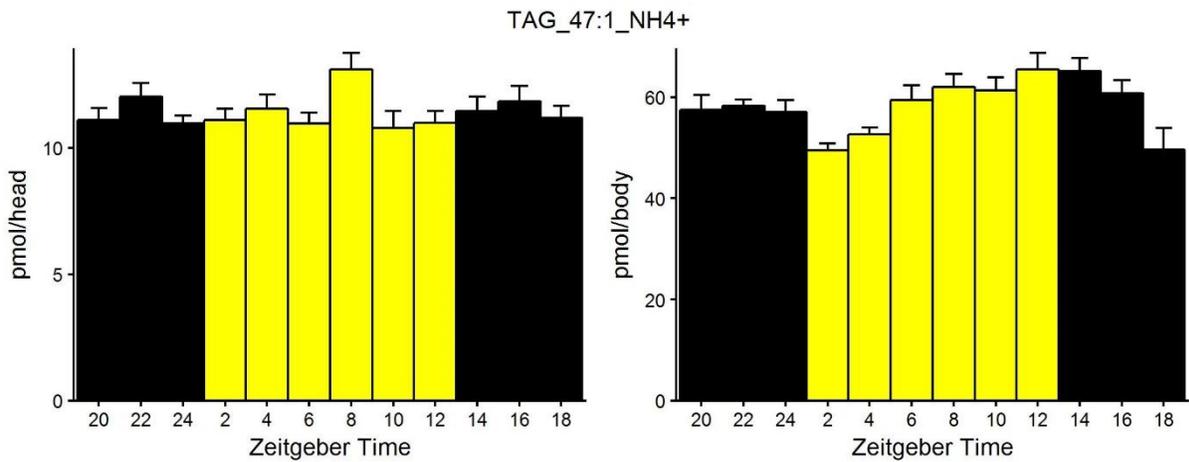
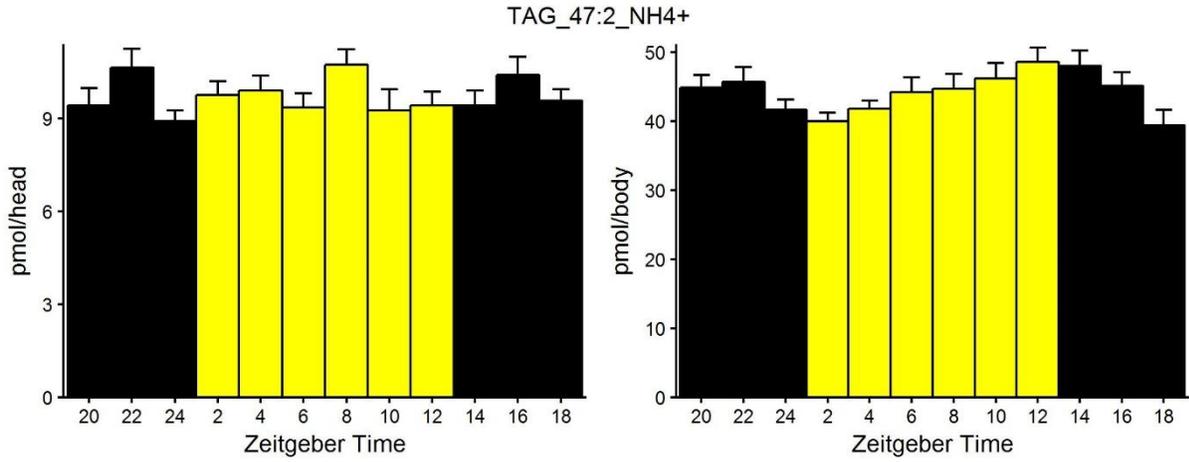


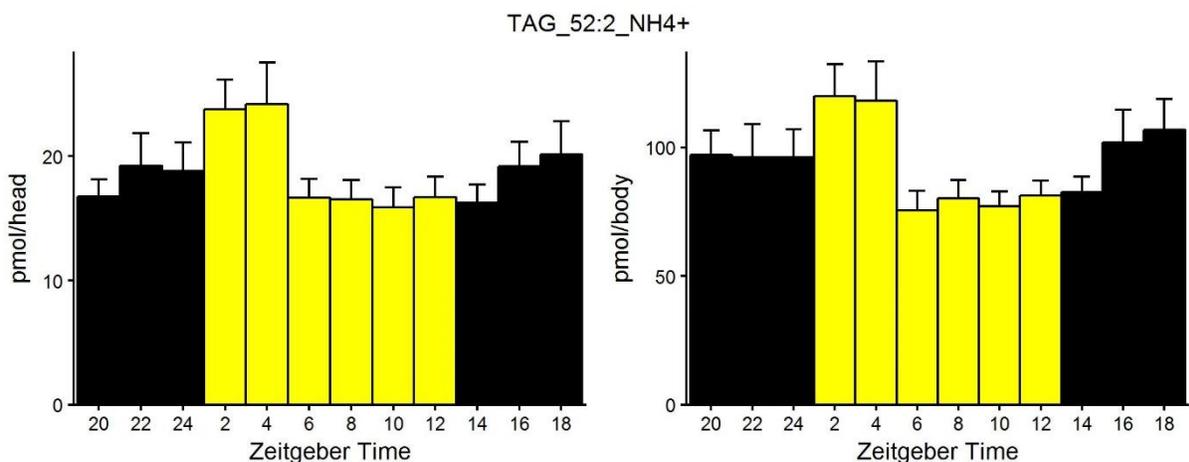
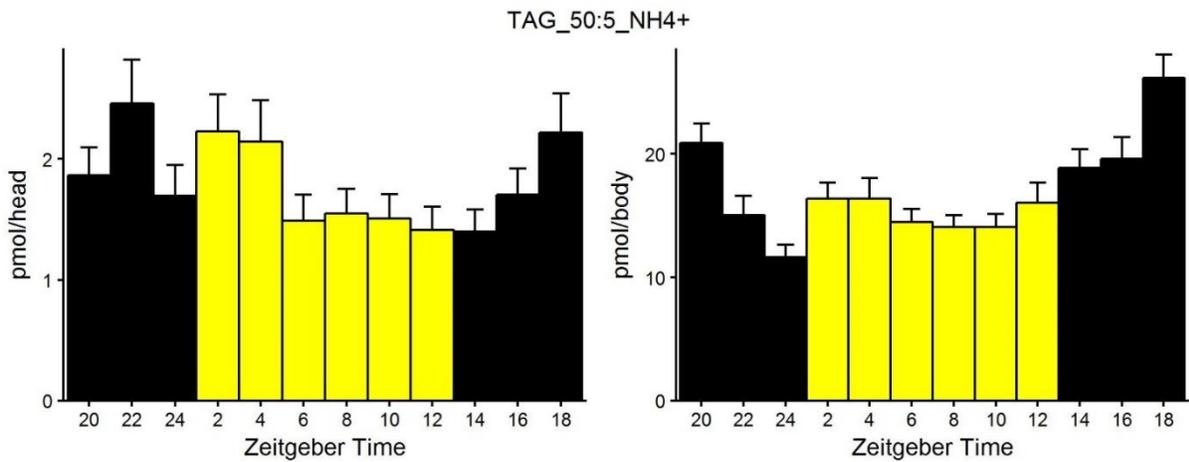
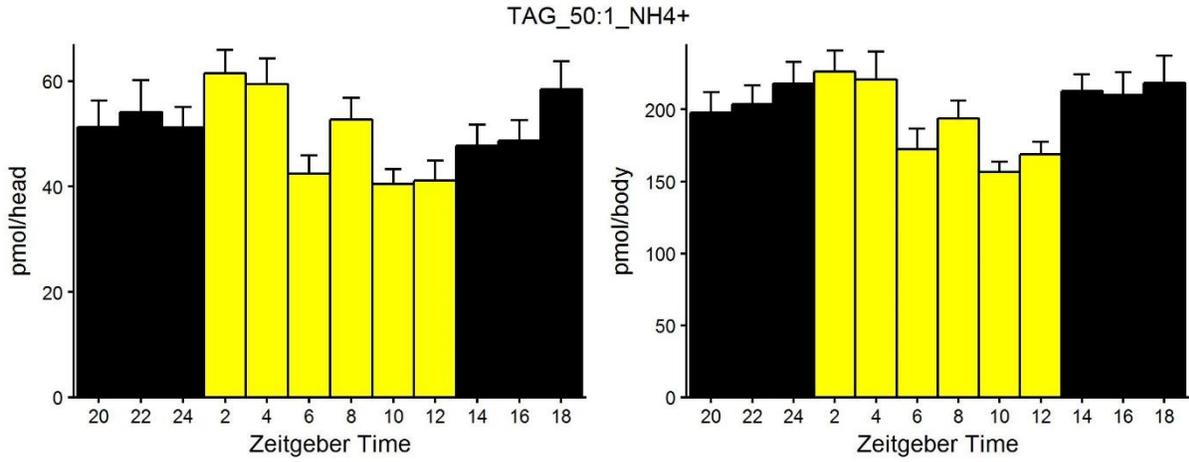




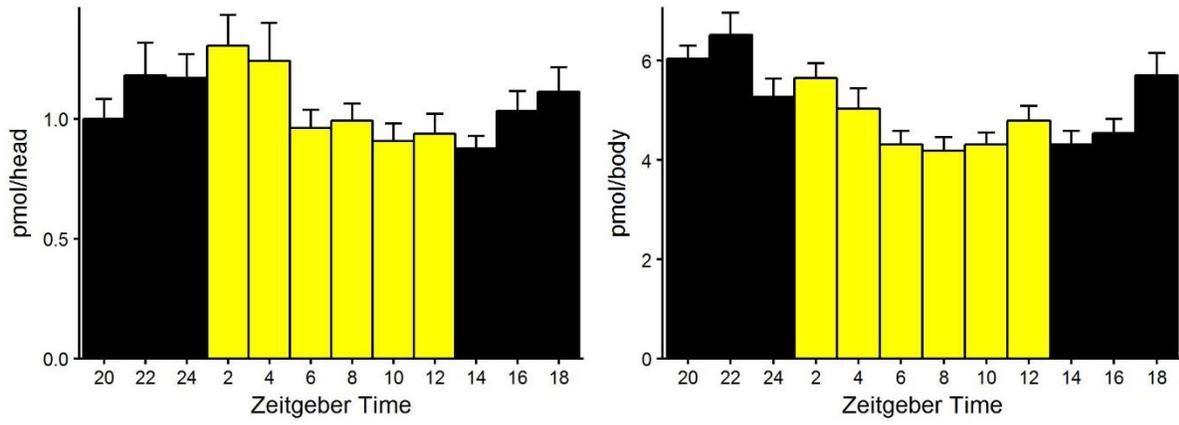




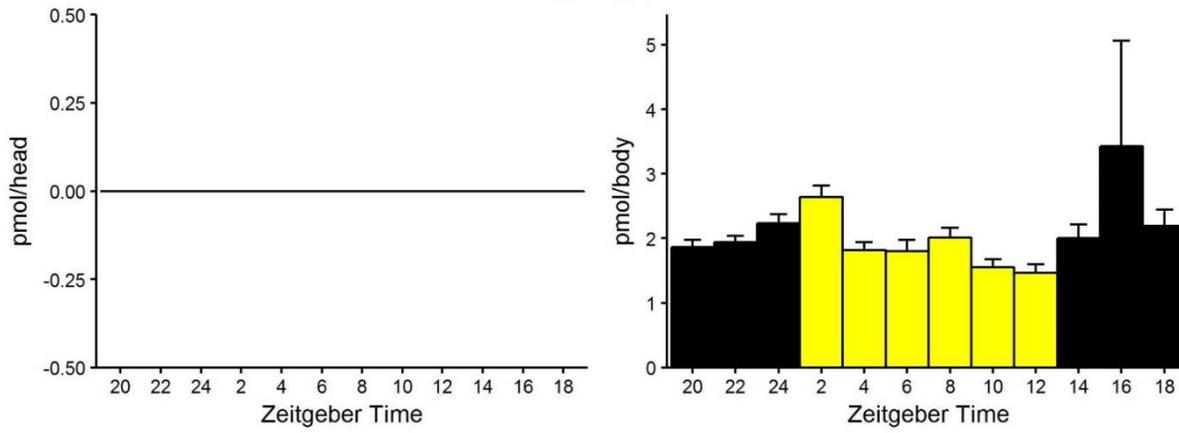




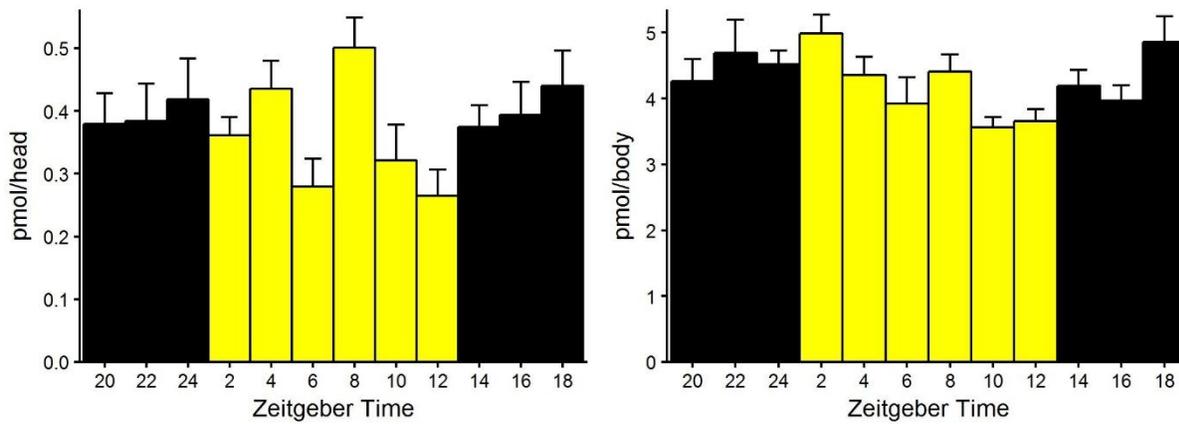
TAG\_52:5\_NH4+

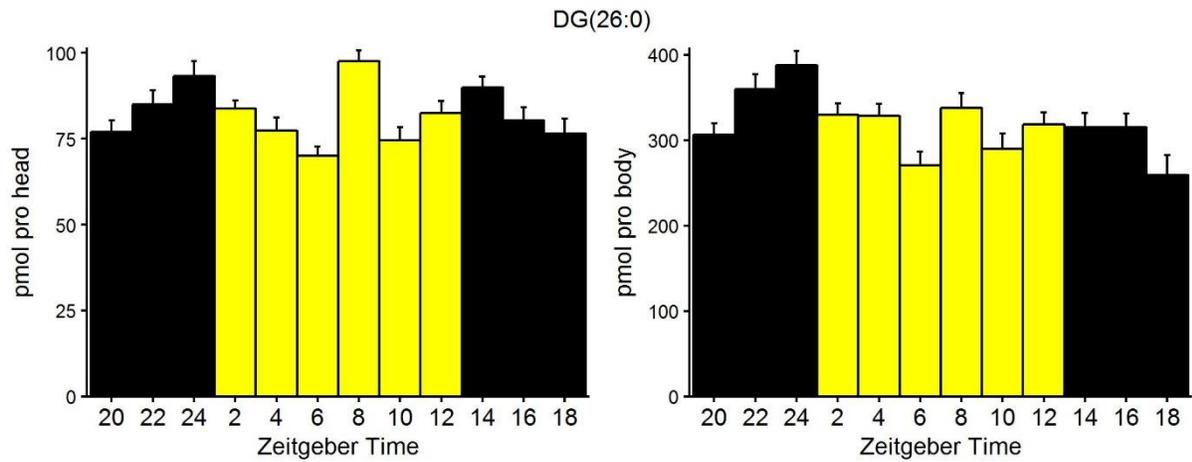
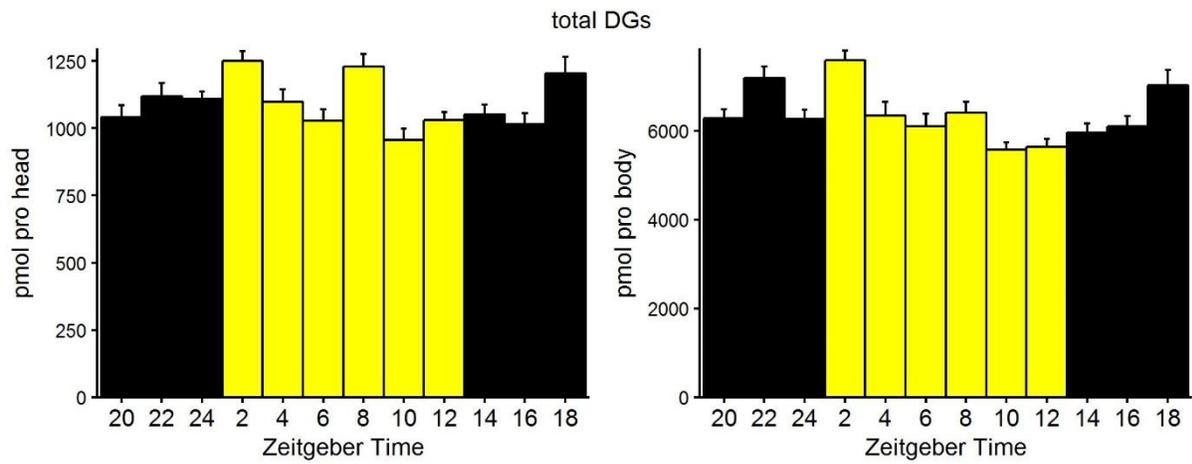
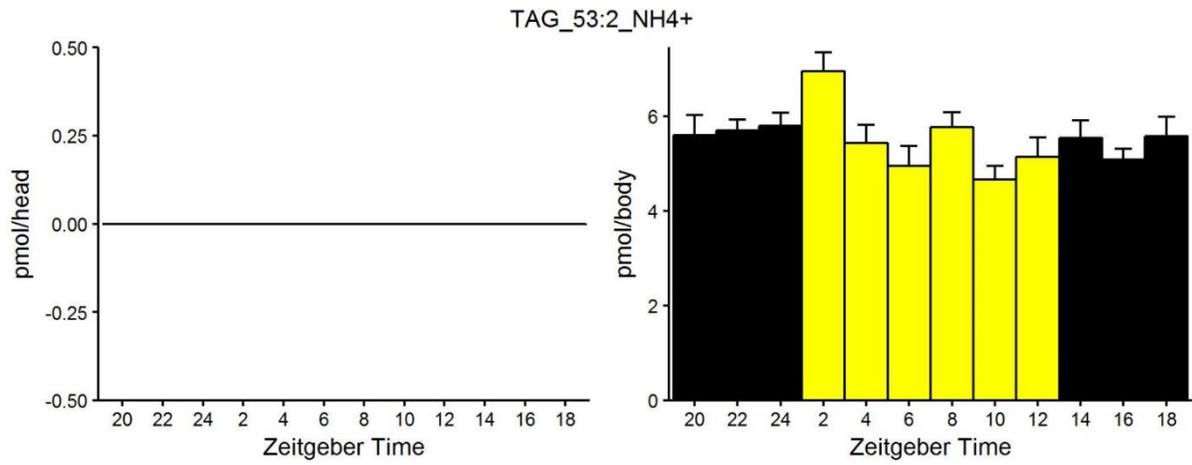


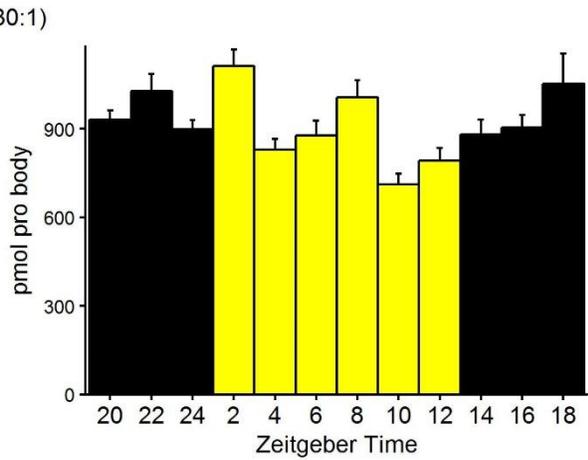
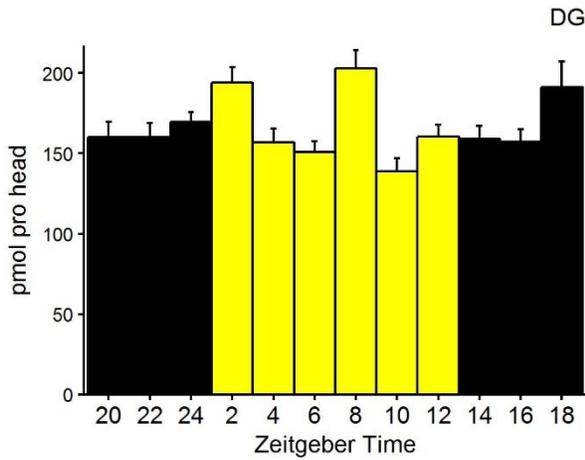
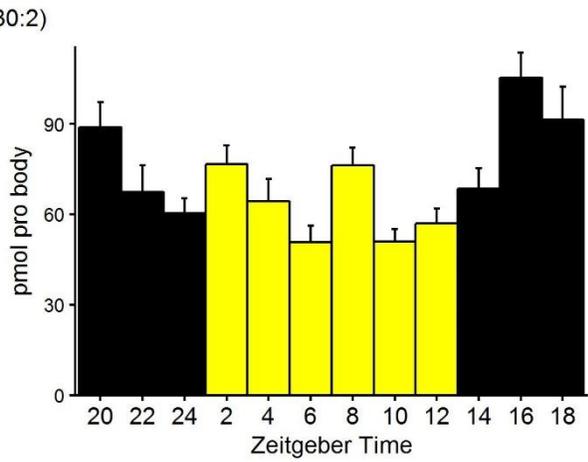
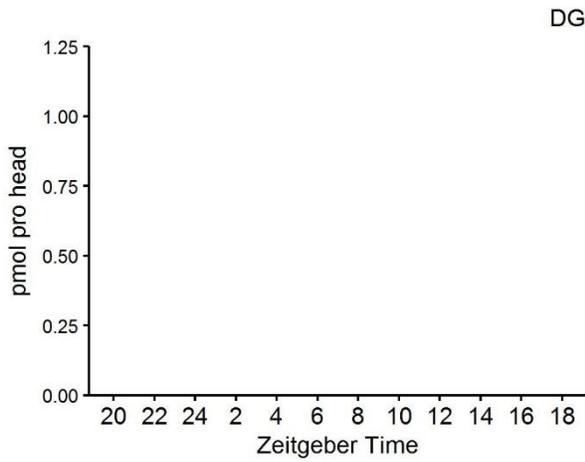
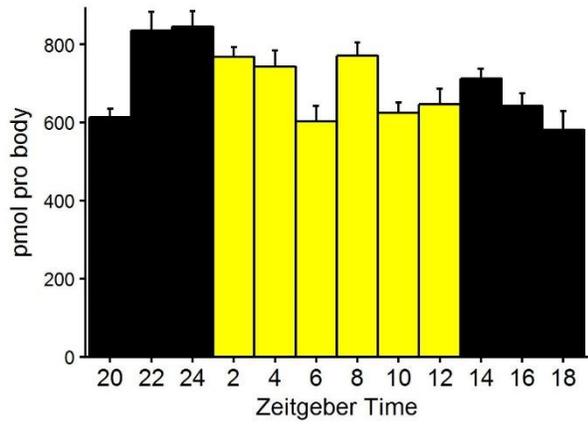
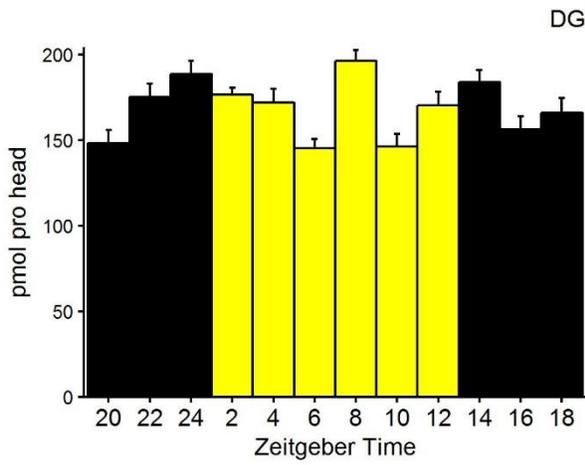
TAG\_53:1\_NH4+

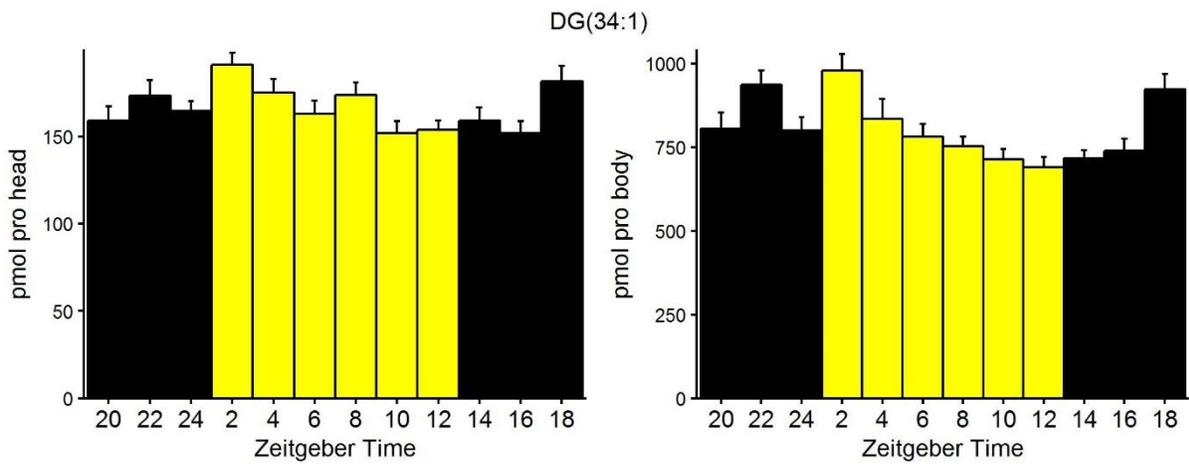
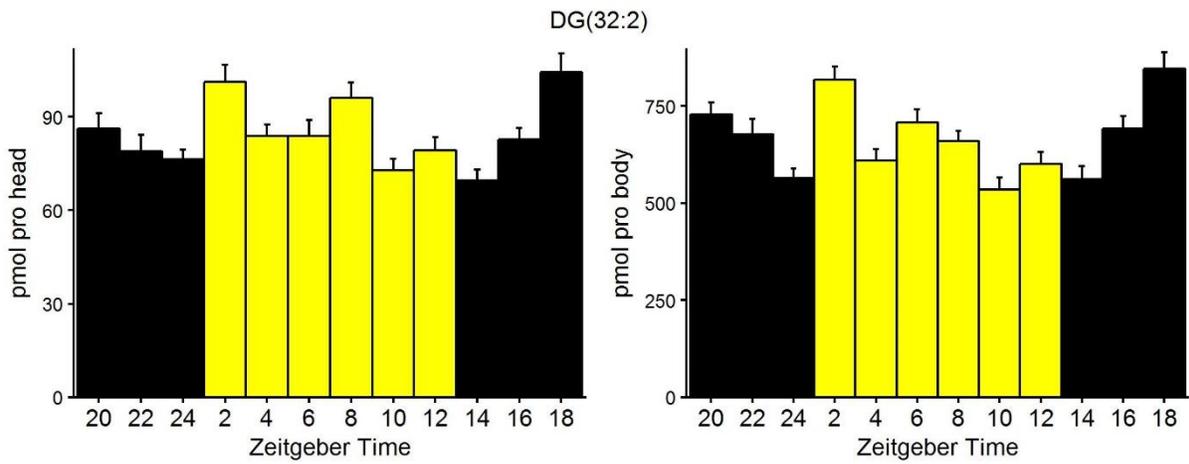
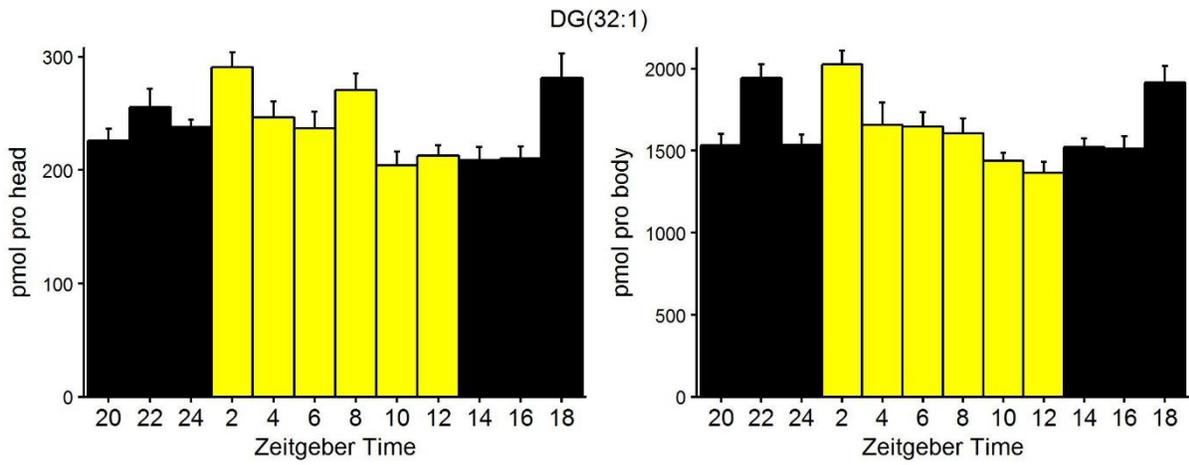


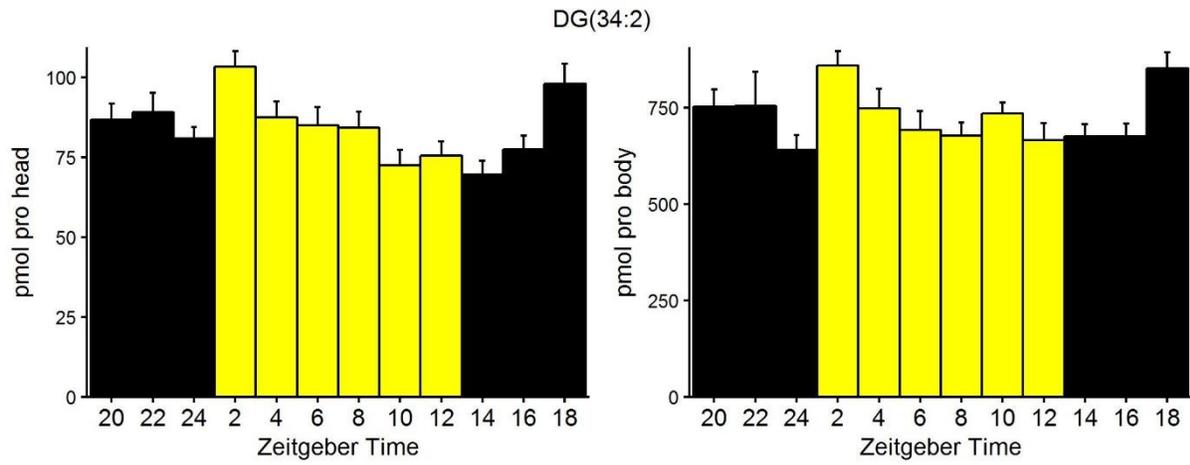
TAG\_56:3\_NH4+



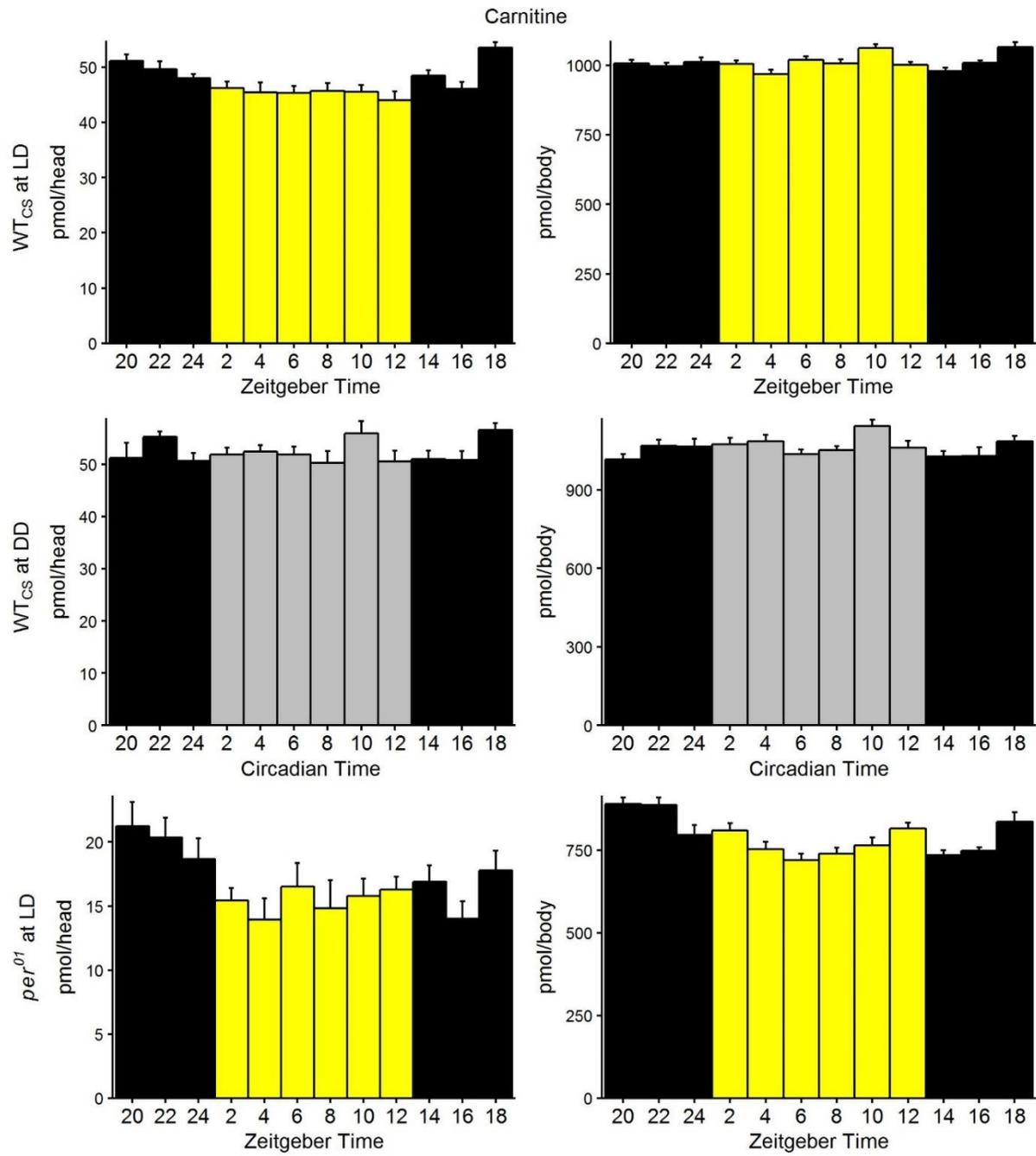




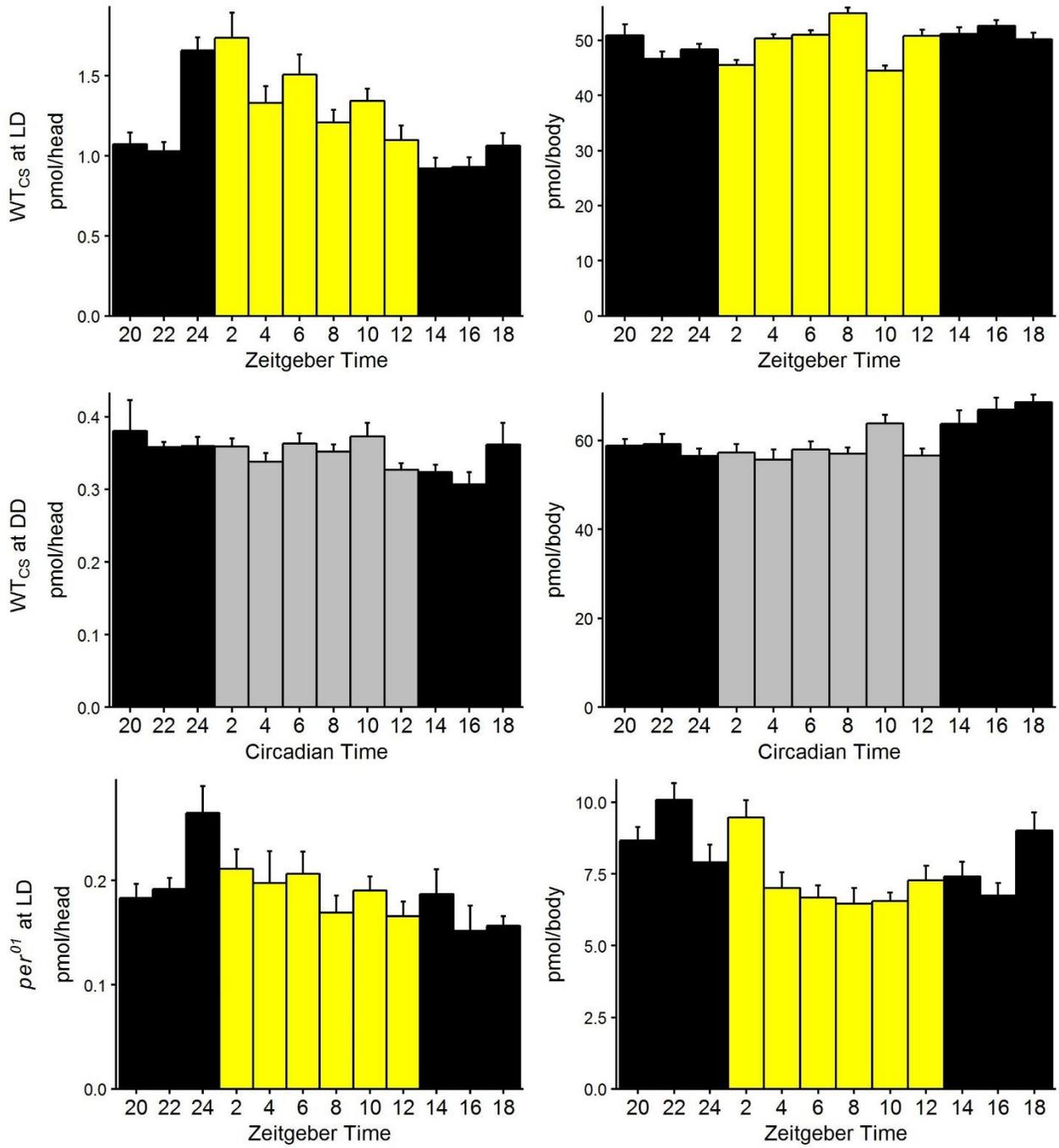




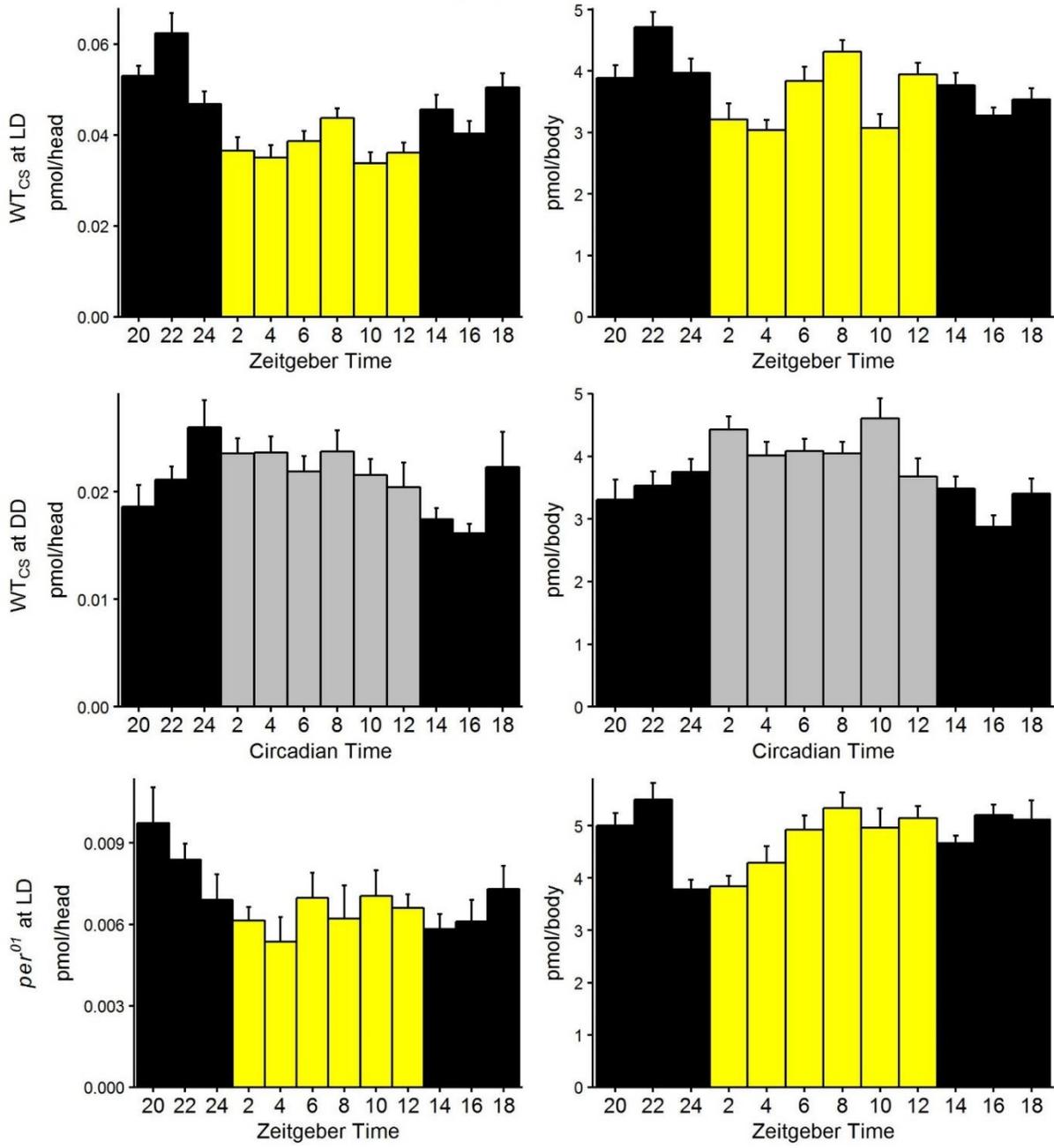
**Angehängte Abbildung 15: Diurnale Rhythmik der DAG (hier: DG) bzw. TAG Spiegel in WT<sub>CS</sub> Fliegen in Kopf (linker Plot) und Körper (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE (n = 12-21).**



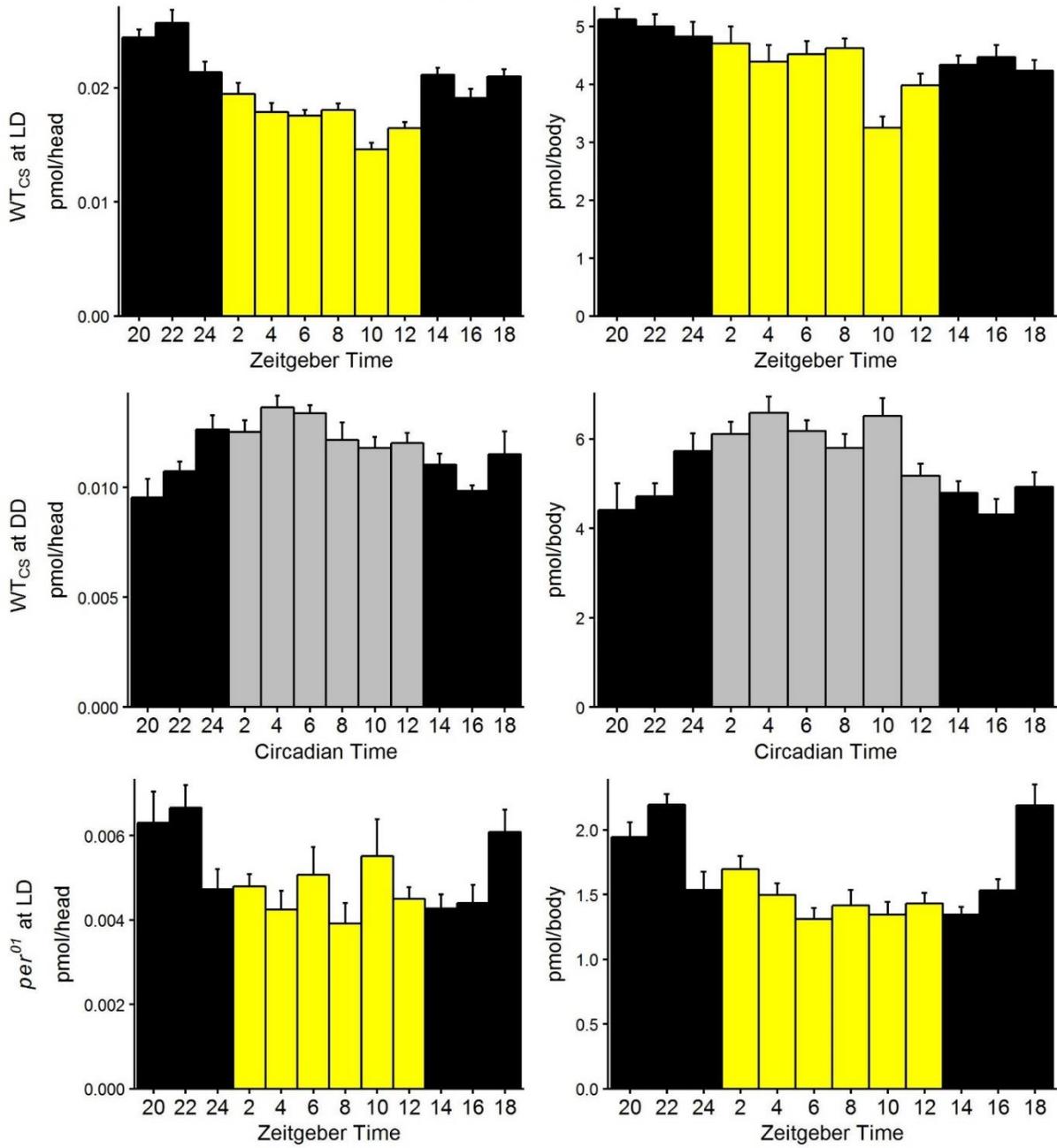
Acetylcarnitine(C2:0)



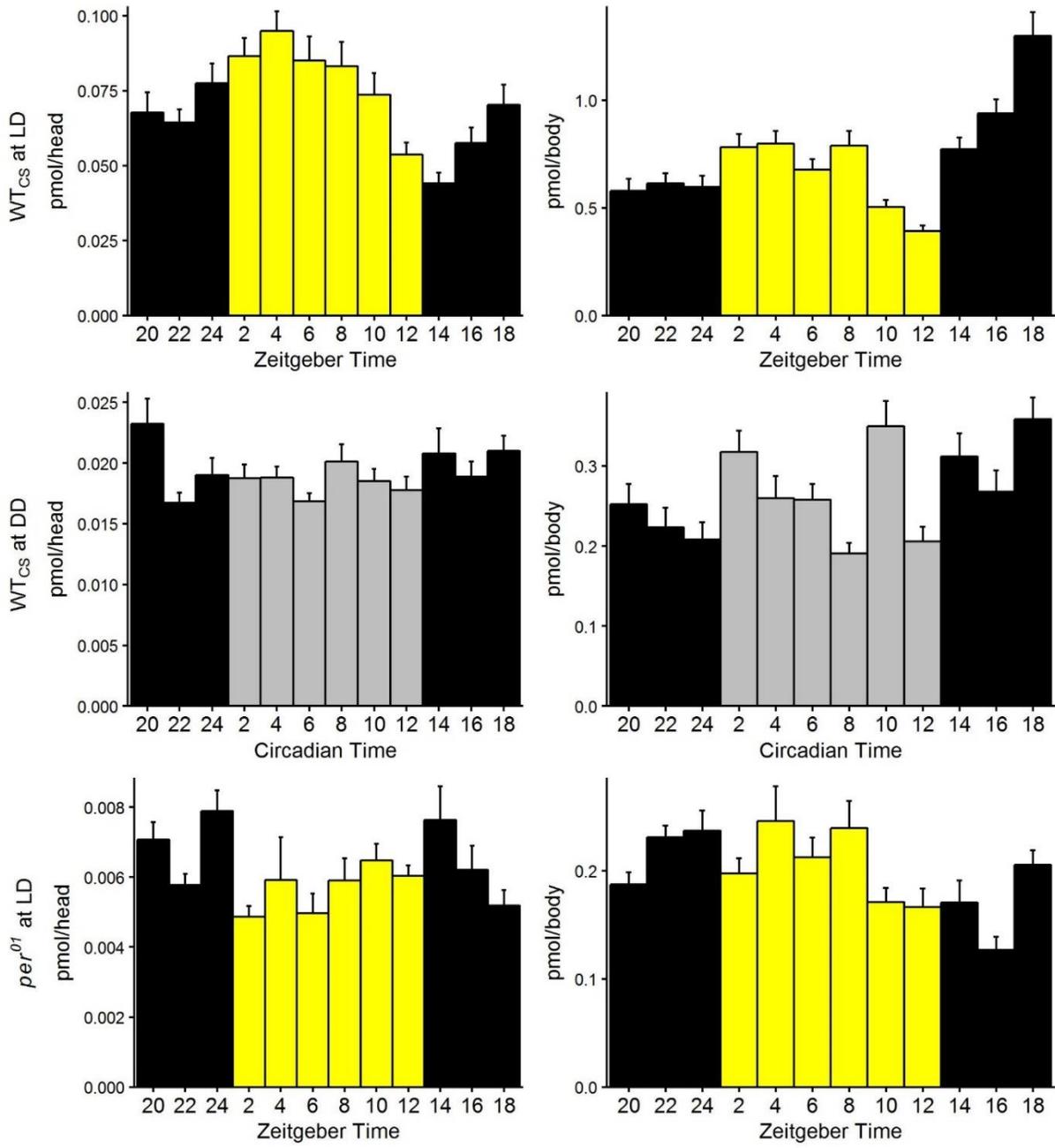
Propionylcarnitine(C3:0)



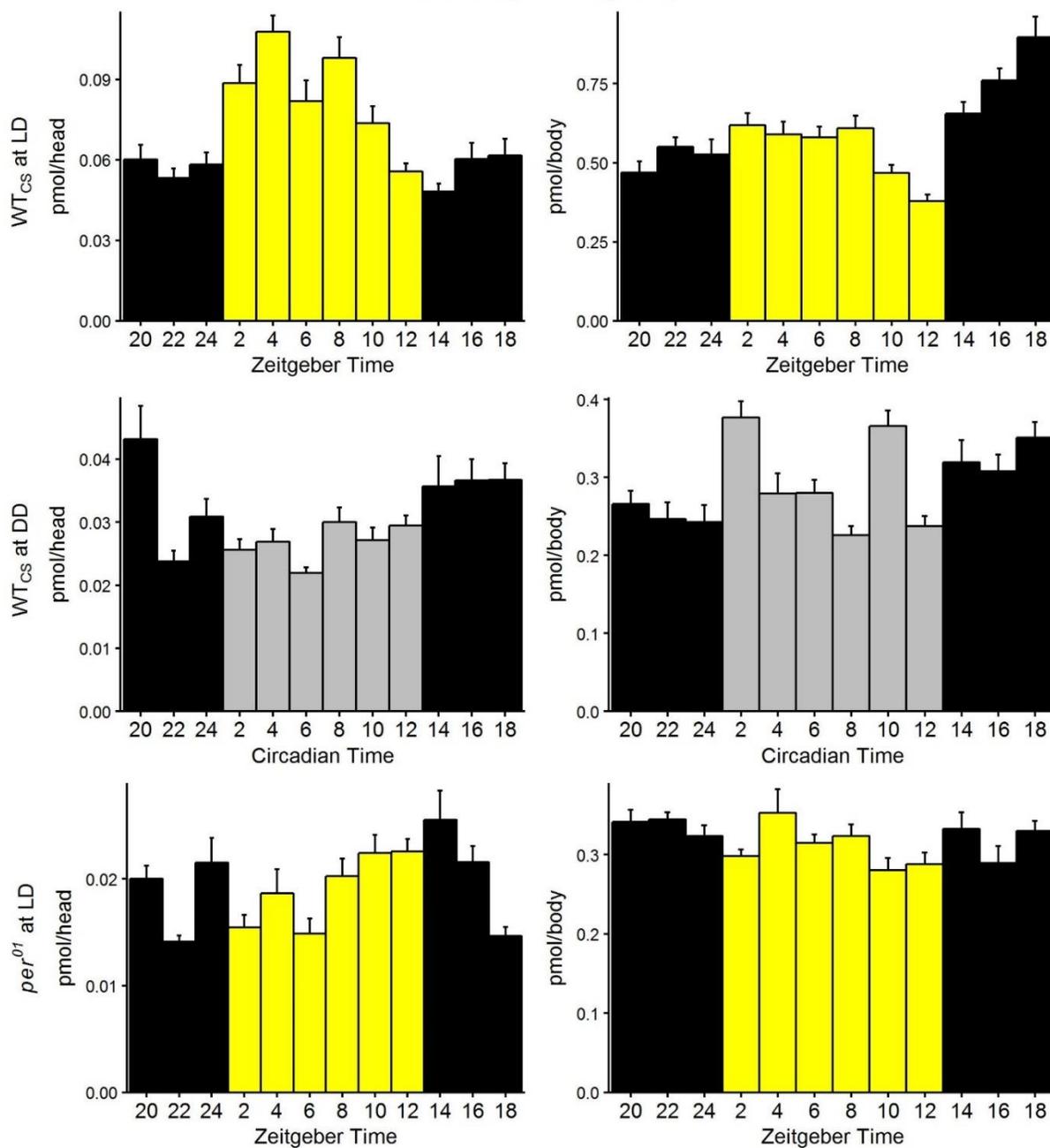
Butyrylcarnitine(C4:0)



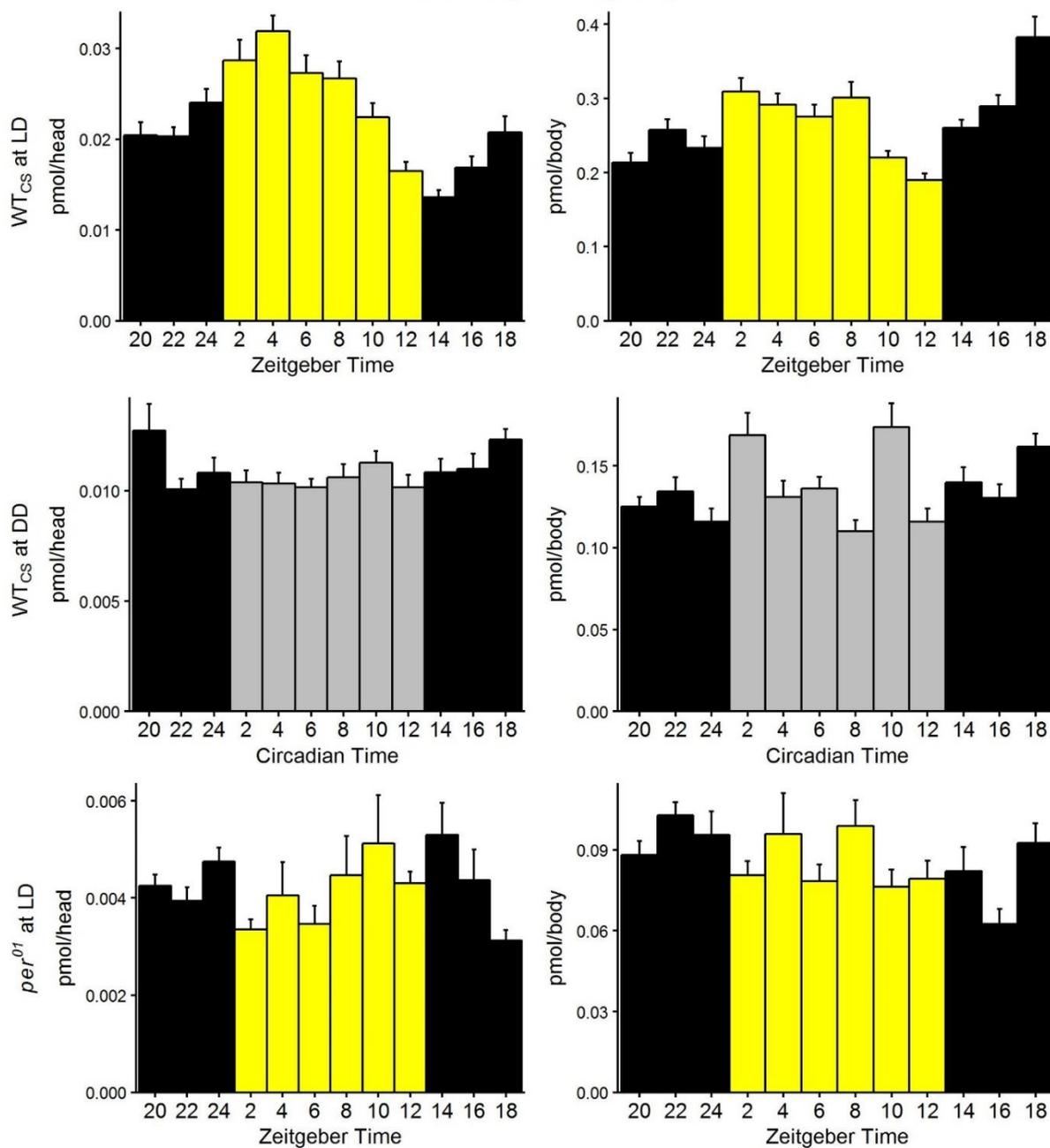
Dodecanoylcarnitine(C12:0)



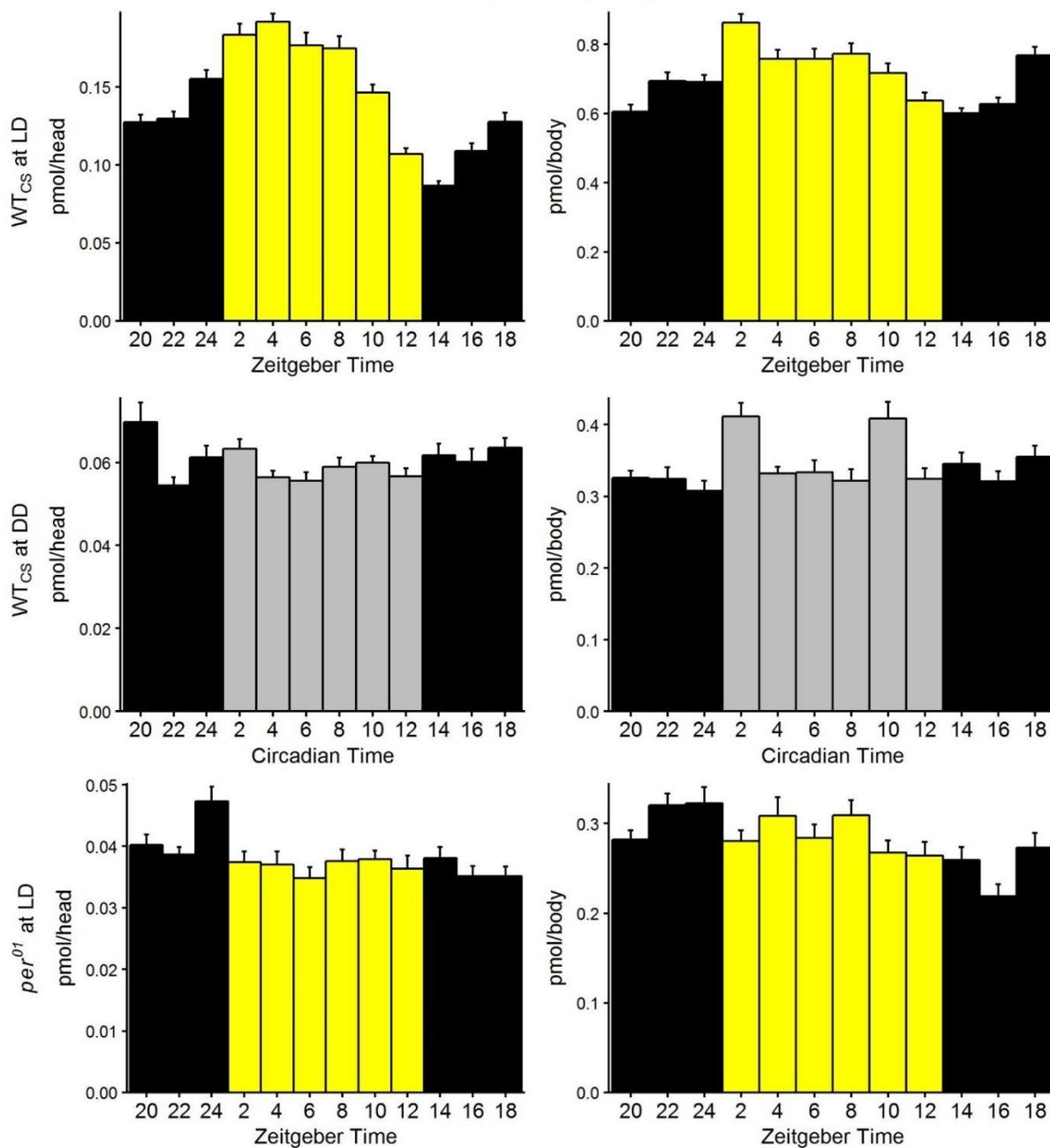
Tetradecanoylcarnitine(C14:0)



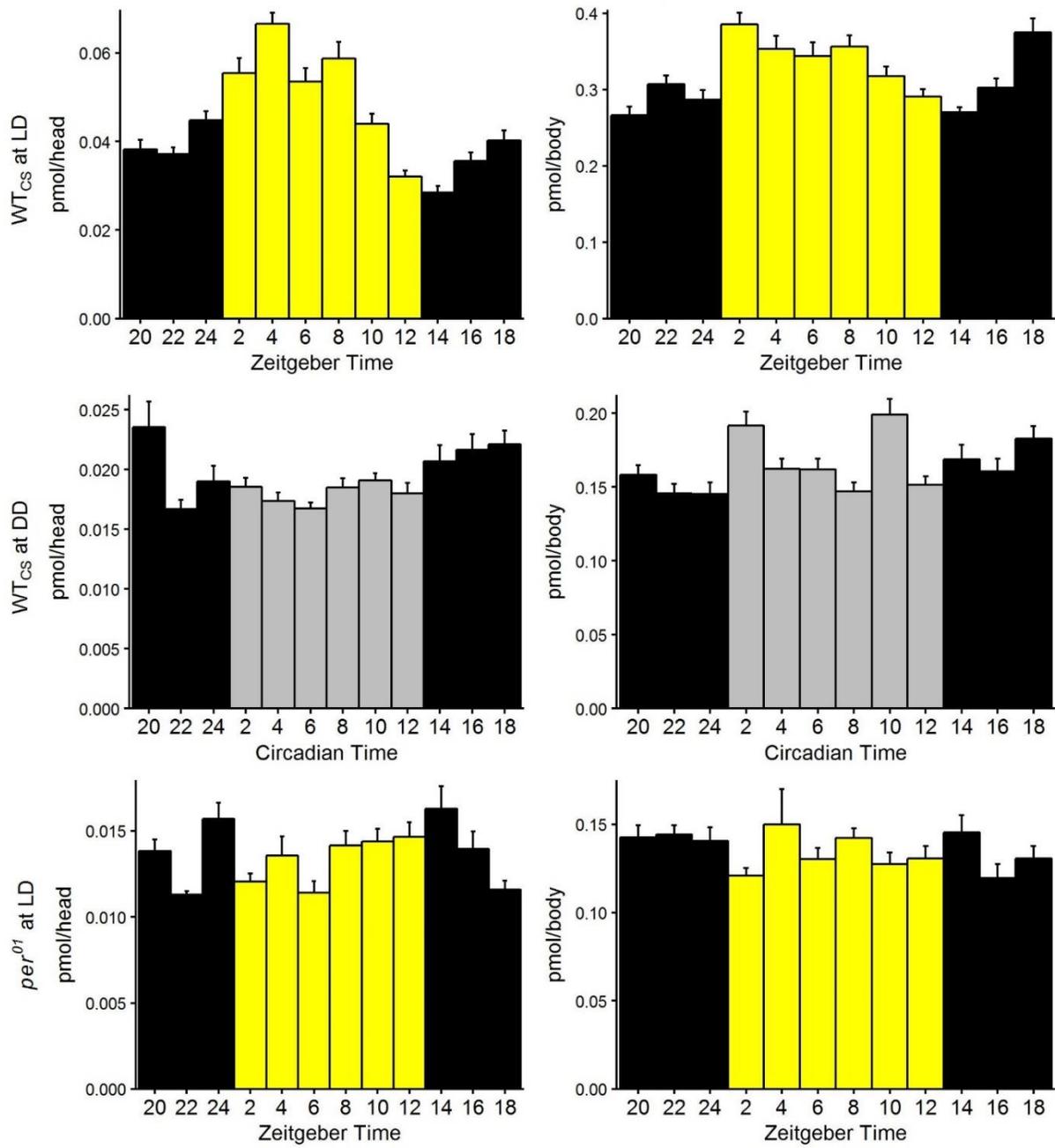
Tetradecenoylcarnitine(C14:1)



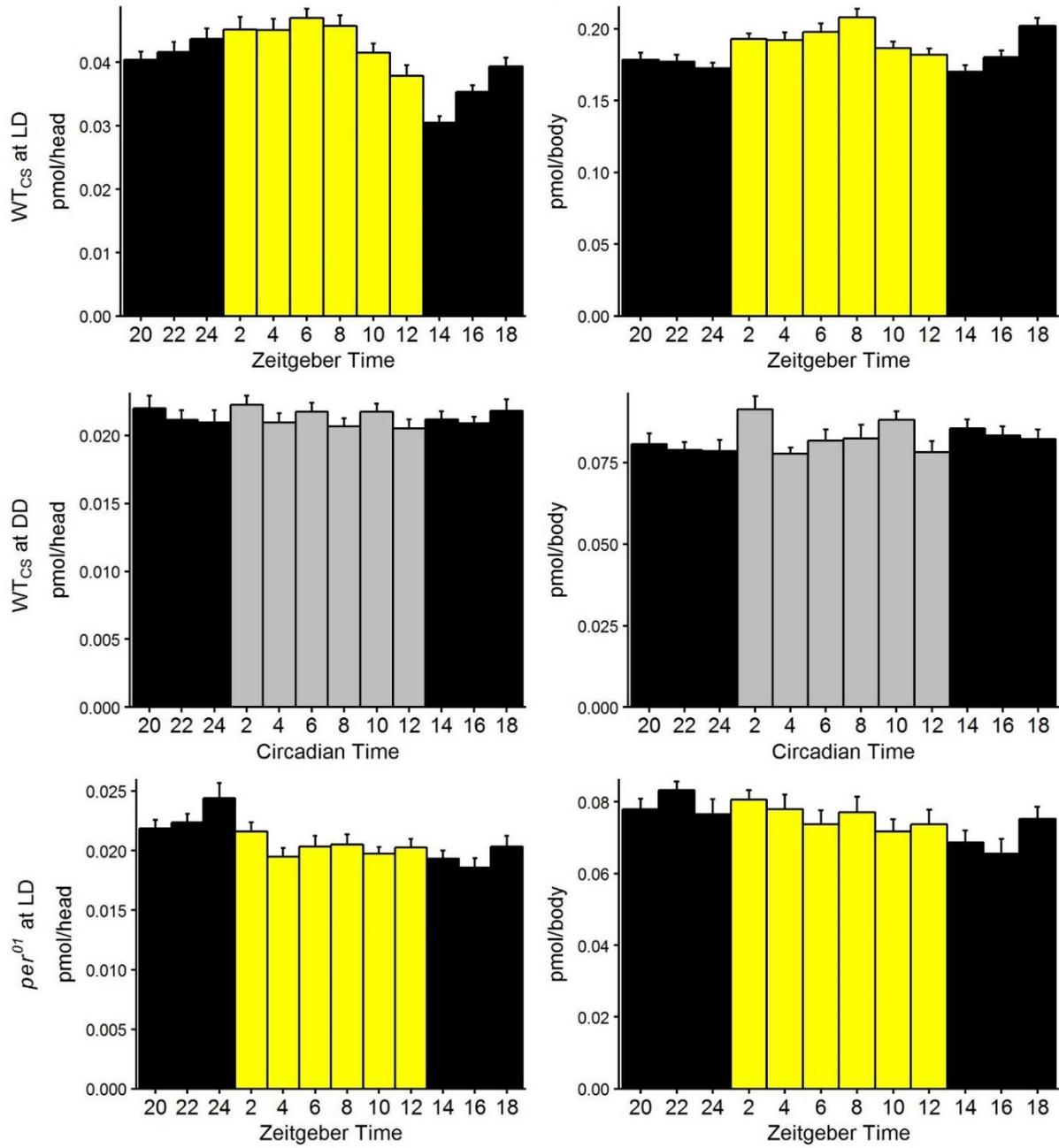
Palmitoylcarnitine(C16:0)



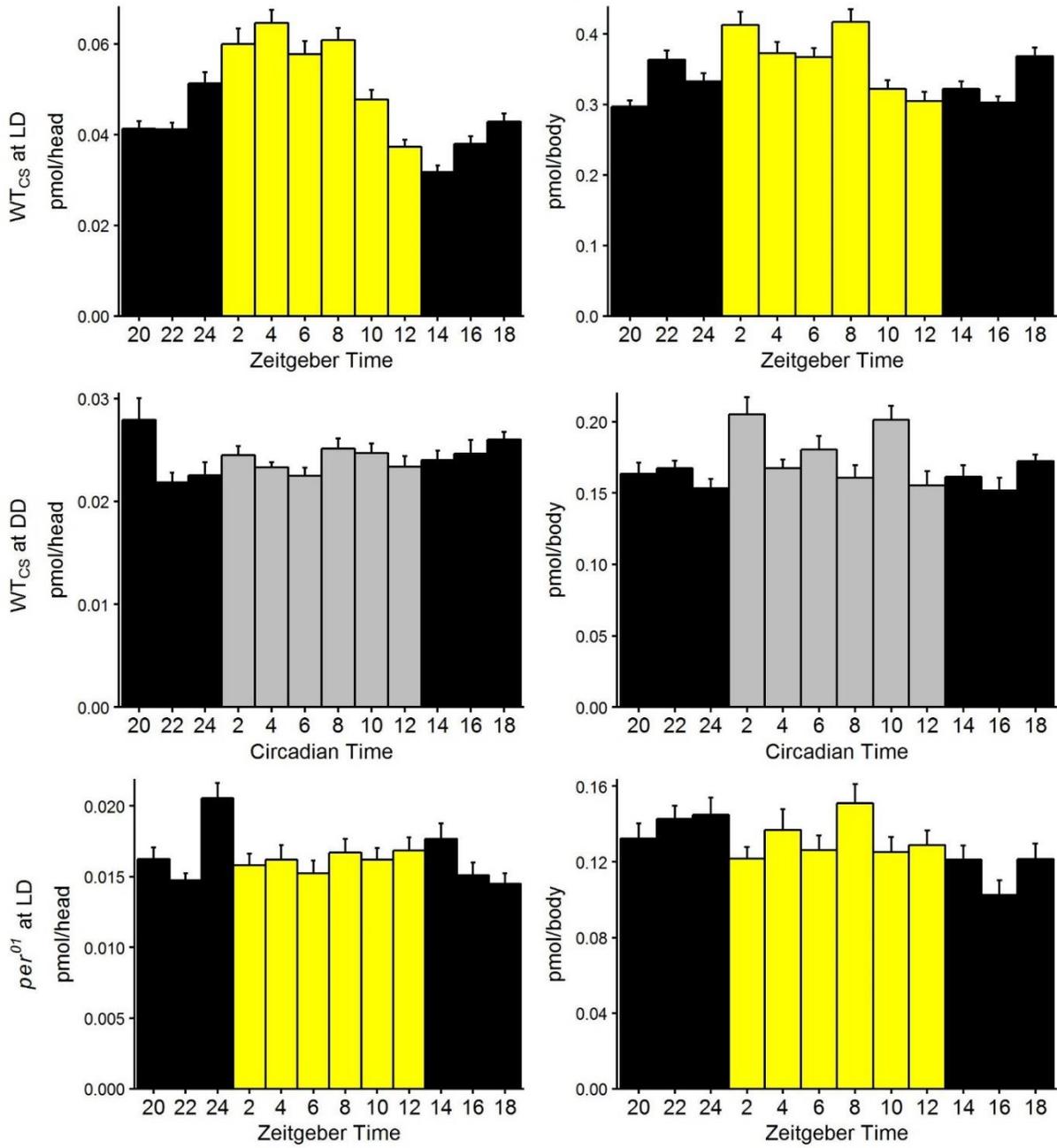
Palmitoleoylcarnitine(C16:1)

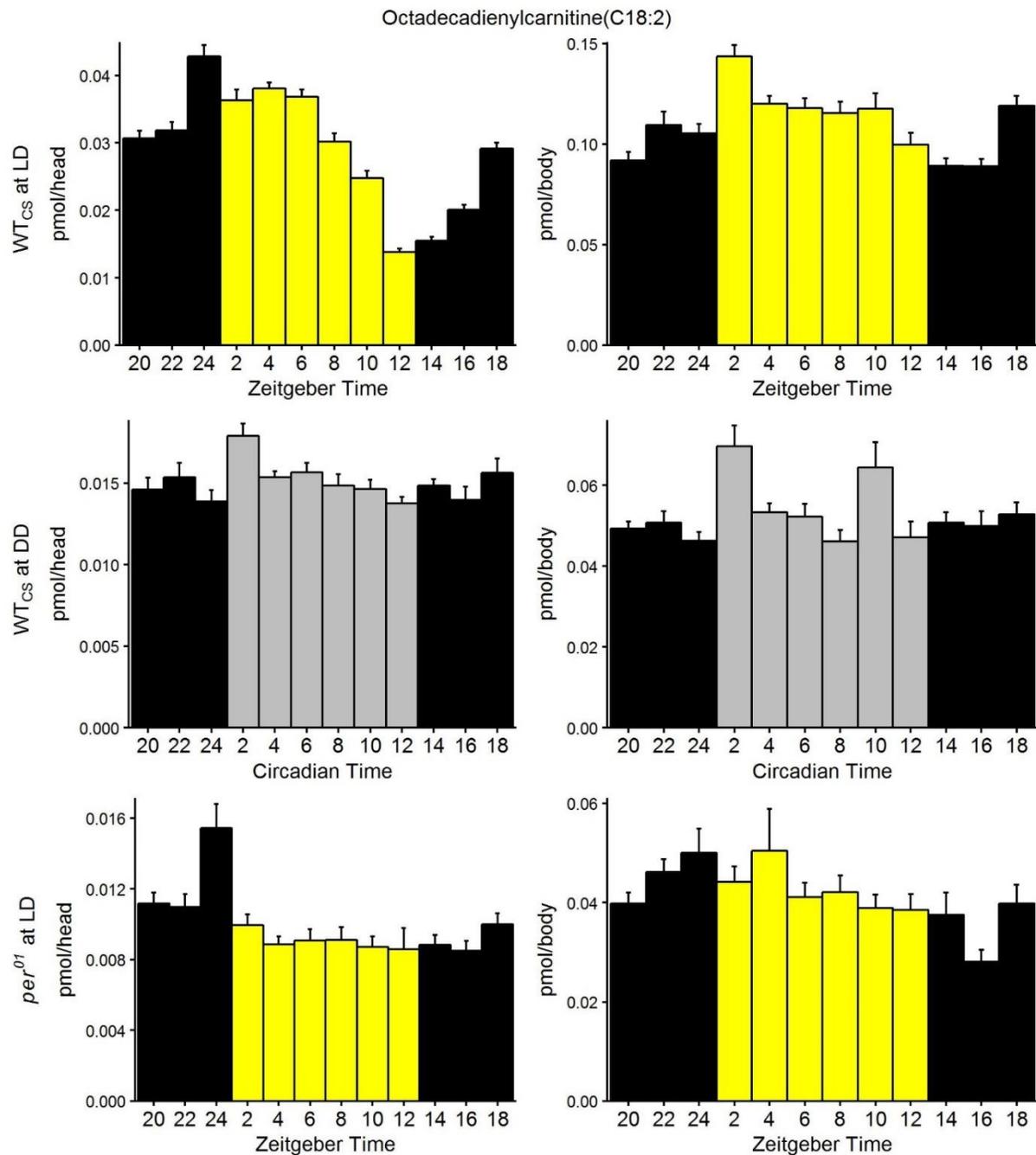


Stearoylcarnitine(C18:0)



Oleoylcarnitine(C18:1)





Angehängte Abbildung 16: Diurnale Rhythmik der CAR und AC Spiegeln in WT<sub>CS</sub> Fliegen unter LD (oberer Plot) und DD (mittlerer Plot), sowie in *per<sup>01</sup>* unter LD (unterer Plot) in Kopf (linker Plot) und Körper (rechter Plot). Die Daten zeigen den zeitpunktspezifischen Mittelwert errechnet für jeden der zwölf Zeitpunkte aus den drei aufeinanderfolgenden Tagen + SE (n = 12-21).

## 7.2 Angehängte Tabellen

**Angehängte Tabelle 1: verwendete CAMERA Parameter bei der Annotation der features mittels der Wrapperfunktion „annotateDiffreport“. FWHM: halbmaximale Peakbreite (engl.: „full width at half maximum“)**

| Parameter  | Beschreibung   | Wert  |
|------------|--|-------|
| sigma      | Multiplikator der Standardabweichung; benötigt zur Berechnung der FWHM | 6     |
| perfwhm    | Prozentsatz der FWHM um die RT_med des Peaks                           | 0.1   |
| maxcharge  | maximale Ladung des Ions   | 3     |
| maxiso     | maximale Anzahl an Isotopenpeaks                                       | 4     |
| ppm        | erlaubter relativer Massenfehler                                       | 5     |
| mzabs      | erlaubter absoluter Massenfehler                                       | 0.003 |
| cor_eic_th | Peakshapekorrelation der EICs innerhalb einer Probe in %               | 0.8   |

**Angehängte Tabelle 2: verwendete CAMERA Parameter bei der Annotation der features mittels der Wrapperfunktion „annotateDiffreport“. FWHM: halbmaximale Peakbreite (engl.: „full width at half maximum“) Lipidspezies**

|  | m/z      | RT   | Lipidspezies      | m/z      | RT    |
|--|----------|------|-------------------|----------|-------|
| [DAG(26:0)+NH4+]+                        | 502.4485 | 7.07 | [TAG(48:3)+NH4+]+ | 818.7239 | 9.41  |
| [DAG(28:0)+NH4+]+                        | 530.4775 | 7.52 | [TAG(49:3)+NH4+]+ | 832.7396 | 9.56  |
| [DAG(28:1)+NH4+]+                        | 528.4632 | 7.15 | [TAG(50:3)+NH4+]+ | 846.7547 | 9.58  |
| [DAG(30:1)+NH4+]+                        | 556.4946 | 7.56 | [TAG(51:3)+NH4+]+ | 860.7704 | 9.73  |
| [DAG(32:1)+NH4+]+                        | 584.5245 | 7.95 | [TAG(52:3)+NH4+]+ | 874.787  | 9.75  |
| [DAG(34:1)+NH4+]+                        | 612.5549 | 8.3  | [TAG(53:3)+NH4+]+ | 888.8027 | 9.9   |
| [DAG(30:2)+NH4+]+                        | 554.4798 | 7.17 | [TAG(54:3)+NH4+]+ | 902.819  | 9.9   |
| [DAG(32:2)+NH4+]+                        | 582.5112 | 7.59 | [TAG(55:3)+NH4+]+ | 916.834  | 9.97  |
| [DAG(34:2)+NH4+]+                        | 610.5426 | 8    | [TAG(56:3)+NH4+]+ | 930.8497 | 10.12 |
| [DAG(36:2)+NH4+]+                        | 638.572  | 8.31 | [TAG(57:3)+NH4+]+ | 944.8654 | 10.27 |
| [DAG(34:3)+NH4+]+                        | 608.5235 | 7.67 | [TAG(58:3)+NH4+]+ | 958.8811 | 10.42 |
| [DAG(20:0)+NH4+]+<br>(internal standard) | 418.3527 | 5.2  | [TAG(44:4)+NH4+]+ | 760.6457 | 10.57 |
| [TAG(34:0)+NH4+]+                        | 628.5511 | 8.36 | [TAG(46:4)+NH4+]+ | 788.6771 | 9.04  |
| [TAG(36:0)+NH4+]+                        | 656.583  | 8.65 | [TAG(48:4)+NH4+]+ | 816.7077 | 9.24  |
| [TAG(37:0)+NH4+]+                        | 670.598  | 8.79 | [TAG(50:4)+NH4+]+ | 844.7399 | 9.43  |
| [TAG(38:0)+NH4+]+                        | 684.6146 | 8.91 | [TAG(52:4)+NH4+]+ | 872.7707 | 9.6   |
| [TAG(39:0)+NH4+]+                        | 698.63   | 9.04 | [TAG(58:4)+NH4+]+ | 956.8658 | 10.22 |
| [TAG(40:0)+NH4+]+                        | 712.646  | 9.16 | [TAG(50:5)+NH4+]+ | 842.7223 | 9.25  |
| [TAG(41:0)+NH4+]+                        | 726.6617 | 9.27 | [TAG(52:5)+NH4+]+ | 870.7537 | 9.44  |

|                   |          |       |  |          |      |
|-------------------|----------|-------|--|----------|------|
| [TAG(42:0)+NH4+]+ | 740.6767 | 9.36  | [TAG(30:0)+NH4+]+<br>(internal standard)                       | 572.4885 | 7.68 |
| [TAG(43:0)+NH4+]+ | 754.693  | 9.47  | [PE(26:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 608.4288 | 6.19 |
| [TAG(44:0)+NH4+]+ | 768.709  | 9.58  | [PE(28:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 636.4602 | 6.75 |
| [TAG(46:0)+NH4+]+ | 796.7391 | 9.74  | [PE(30:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 664.4909 | 7.23 |
| [TAG(38:1)+NH4+]+ | 682.598  | 8.73  | [PE(32:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 692.5249 | 7.64 |
| [TAG(39:1)+NH4+]+ | 696.6137 | 8.85  | [PE(28:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 634.4449 | 6.31 |
| [TAG(40:1)+NH4+]+ | 710.63   | 8.97  | [PE(30:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 662.4763 | 6.81 |
| [TAG(41:1)+NH4+]+ | 724.6457 | 9.08  | [PE(31:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 676.492  | 7.01 |
| [TAG(42:1)+NH4+]+ | 738.6614 | 9.16  | [PE(32:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 690.5074 | 7.28 |
| [TAG(43:1)+NH4+]+ | 752.677  | 9.28  | [PE(33:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 704.5231 | 7.48 |
| [TAG(44:1)+NH4+]+ | 766.6927 | 9.36  | [PE(34:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 718.5376 | 7.68 |
| [TAG(45:1)+NH4+]+ | 780.708  | 9.48  | [PE(36:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 746.5683 | 8.05 |
| [TAG(46:1)+NH4+]+ | 794.723  | 9.57  | [PE(38:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 774.6009 | 8.36 |
| [TAG(47:1)+NH4+]+ | 808.74   | 9.65  | [PE(30:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 660.457  | 6.39 |
| [TAG(48:1)+NH4+]+ | 822.755  | 9.74  | [PE(32:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 688.4919 | 6.87 |
| [TAG(49:1)+NH4+]+ | 836.7707 | 9.89  | [PE(33:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 702.5076 | 7.13 |
| [TAG(50:1)+NH4+]+ | 850.7857 | 9.89  | [PE(34:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 716.5241 | 7.35 |
| [TAG(51:1)+NH4+]+ | 864.8014 | 10.04 | [PE(36:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 744.5531 | 7.72 |
| [TAG(52:1)+NH4+]+ | 878.8166 | 10.03 | [PE(38:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 772.5862 | 8.1  |
| [TAG(53:1)+NH4+]+ | 892.8323 | 10.18 | [PE(32:3)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 686.4766 | 6.58 |
| [TAG(55:1)+NH4+]+ | 920.8623 | 10.31 | [PE(34:3)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 714.5083 | 6.97 |
| [TAG(56:1)+NH4+]+ | 934.878  | 10.46 | [PE(36:3)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 742.5391 | 7.41 |
| [TAG(57:1)+NH4+]+ | 948.8937 | 10.61 | [PE(34:4)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 712.4908 | 6.64 |
| [TAG(58:1)+NH4+]+ | 962.9094 | 10.76 | [PE(36:4)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 740.5241 | 7.08 |
| [TAG(40:2)+NH4+]+ | 708.6143 | 8.81  | [PE(36:5)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 738.5074 | 6.74 |
| [TAG(41:2)+NH4+]+ | 722.63   | 8.96  | [PE(34:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup><br>(internal standard) | 720.553  | 8.02 |
| [TAG(42:2)+NH4+]+ | 736.6457 | 8.99  | [PC(30:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 706.5379 | 7.2  |
| [TAG(43:2)+NH4+]+ | 750.6614 | 9.14  | [PC(32:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 734.5693 | 7.6  |
| [TAG(44:2)+NH4+]+ | 764.6776 | 9.19  | [PC(30:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 704.5241 | 6.71 |
| [TAG(45:2)+NH4+]+ | 778.6933 | 9.34  | [PC(32:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 732.5575 | 7.19 |
| [TAG(46:2)+NH4+]+ | 792.7084 | 9.39  | [PC(34:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 760.5851 | 7.6  |
| [TAG(47:2)+NH4+]+ | 806.7241 | 9.54  | [PC(36:1)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 788.6203 | 7.99 |
| [TAG(48:2)+NH4+]+ | 820.7391 | 9.57  | [PC(30:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 702.5054 | 6.34 |
| [TAG(49:2)+NH4+]+ | 834.7548 | 9.72  | [PC(32:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 730.5402 | 6.77 |
| [TAG(50:2)+NH4+]+ | 848.7706 | 9.73  | [PC(34:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 758.5666 | 7.26 |
| [TAG(51:2)+NH4+]+ | 862.7863 | 9.88  | [PC(35:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 772.5894 | 7.49 |
| [TAG(52:2)+NH4+]+ | 876.802  | 9.9   | [PC(36:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 786.5967 | 7.65 |
| [TAG(53:2)+NH4+]+ | 890.8177 | 10.05 | [PC(37:2)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 800.6124 | 7.85 |

|                               |          |       |  |          |      |
|-------------------------------|----------|-------|--|----------|------|
| [TAG(54:2)+NH4+] <sup>+</sup> | 904.8334 | 10.2  | [PC(32:3)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 728.5253 | 6.45 |
| [TAG(55:2)+NH4+] <sup>+</sup> | 918.8491 | 10.35 | [PC(34:3)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 756.5567 | 6.89 |
| [TAG(57:2)+NH4+] <sup>+</sup> | 946.8805 | 10.65 | [PC(36:3)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 784.5844 | 7.32 |
| [TAG(58:2)+NH4+] <sup>+</sup> | 960.8962 | 10.8  | [PC(34:4)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 754.5373 | 6.58 |
| [TAG(42:3)+NH4+] <sup>+</sup> | 734.6303 | 8.84  | [PC(35:4)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 768.5571 | 6.83 |
| [TAG(43:3)+NH4+] <sup>+</sup> | 748.646  | 8.99  | [PC(36:4)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 782.5728 | 6.98 |
| [TAG(44:3)+NH4+] <sup>+</sup> | 762.6606 | 9.01  | [PC(36:5)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 780.5556 | 6.69 |
| [TAG(45:3)+NH4+] <sup>+</sup> | 776.6763 | 9.16  | [PC(36:6)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 778.5384 | 6.3  |
| [TAG(46:3)+NH4+] <sup>+</sup> | 790.6921 | 9.22  | [PC(38:6)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>                        | 806.5714 | 6.98 |
| [TAG(47:3)+NH4+] <sup>+</sup> | 804.7078 | 9.37  | [PC(28:0)+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup><br>(internal standard) | 678.5065 | 6.64 |

Angehängte Tabelle 3: ausgemachte, sich signifikant zwischen *per*<sup>01</sup> und dem WT unterscheidende features definiert durch m/z und RT. Die Phase gibt an, ob das feature in der wässrigen (a) oder organischen (o) Phase detektiert wurde. Außerdem ist das Körperteil, in dem (Kopf = H, Körper = B) das feature als marker ausgemacht wurde sowie der Zeitpunkt angegeben. Zusätzlich ist das Verhältniss der Spiegel zwischen *per*01 und WTCS fü® die beiden Experimente (E1 & E2) sowie das Ergebnis des Welsh T-Tests angegeben (n= 4 (E1); n = 7 (E2))

| feature id   | Phase | identifiziert als            | Körperteil | Zeitpunkt (ZT) | Verhältnis der detektierten Spiegel (per01/WTCS) |      |      |      |        |      |      |      | p value (unpaired t-test) per01/WTCS |        |        |        |                                    |        |        |        |
|--------------|-------|------------------------------|------------|----------------|--|------|------|------|--------|------|------|------|--------------------------------------|--------|--------|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|
|              |       |                              |            |                | Kopf   |      |      |      | Körper |      |      |      | Kopf                                 |        |        |        | Körper                             |        |        |        |
|              |       |                              |            |                | ZT6  |      | ZT18 |      | ZT6    |      | ZT18 |      | ZT6                                  |        | ZT18   |        | ZT6                                |        | ZT18   |        |
|              |       |                              |            |                | E1   | E2   | E1   | E2   | E1     | E2   | E1   | E2   | E1                                   | E2     | E1     | E2     | E1                                 | E2     | E1     | E2     |
| 72.081_4.36  | a     | -                            | B          | 6              | -  | -    | -    | -    | 0.66   | 0.53 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs   |        |        |        | 0.0037                             | 0.0001 | 0.0001 | 0.0632 |
| 104.107_6.16 | a     | -                            | B          | 6              | -  | -    | -    | -    | 0.82   | 0.82 | -    | -    | 0.0384                               | 0.4819 | 0.7185 | 0.1357 | 0.0057                             | 0.0317 | 0.2818 | 0.3721 |
| 118.086_4.61 | a     | Valine                       | H&B        | 6              | 0.46   | 0.47 | -    | -    | 0.48   | 0.51 | -    | -    | 0.0001                               | 0.0006 | 0.0005 | 0.1065 | 0.0123                             | 0.0000 | 0.1062 | 0.6851 |
| 132.102_3.72 | a     | Leucine/Isoleucine           | H/B        | 6&18/6         | 0.40   | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.70   | 0.50 | -    | -    | 0.0026                               | 0.0017 | 0.0006 | 0.0025 | 0.0000                             | 0.0000 | 0.0024 | 0.6490 |
| 150.078_5.17 | a     | -                            | B          | 6&18           | -  | -    | -    | -    | 0.67   | 0.66 | 0.76 | 0.60 | 0.0658                               | 0.1834 | 0.9008 | 0.2721 | 0.0006                             | 0.0000 | 0.0004 | 0.0298 |
| 153.042_2.15 | a     | Xanthine                     | H          | 6&18           | 0.64   | 0.78 | 0.74 | 0.68 | -      | -    | -    | -    | 0.0032                               | 0.0264 | 0.0057 | 0.0155 | 0.0576                             | 0.0001 | 0.1493 | 0.1516 |
| 154.087_1.63 | a     | -                            | B          | 6              | -  | -    | -    | -    | 0.25   | 0.00 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs   |        |        |        | 0.0009                             | 0.0013 | 0.0066 | 0.1124 |
| 162.077_4.02 | a     | -                            | B          | 6&18           | -  | -    | -    | -    | 1.34   | 0.77 | 1.40 | 0.61 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs   |        |        |        | 0.0089                             | 0.0001 | 0.0133 | 0.0012 |
| 162.113_5.41 | a     | Carnitine                    | H&B        | 6&18           | 0.33   | 0.51 | 0.31 | 0.41 | 0.62   | 0.78 | 0.71 | 0.72 | 0.0000                               | 0.0003 | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000                             | 0.0013 | 0.0003 | 0.0153 |
| 164.058_2.78 | a     | Pterin                       | H          | 6&18           | 0.73   | 0.77 | 0.64 | 0.79 | -      | -    | -    | -    | 0.0251                               | 0.0378 | 0.0057 | 0.0328 | 0.2262                             | 0.0163 | 0.0854 | 0.8792 |
| 166.086_3.41 | a     | Phenylalanine                | H/B        | 6&18/6         | 0.70   | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.80   | 0.80 | -    | -    | 0.0145                               | 0.0281 | 0.0012 | 0.0133 | 0.0078                             | 0.0005 | 0.0020 | 0.1207 |
| 176.568_6.54 | a     | -                            | H          | 18             | -  | -    | 0.78 | 0.80 | -      | -    | -    | -    | 0.2208                               | 0.1902 | 0.0134 | 0.0253 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 184.074_7.36 | a     | Phosphocholin                | H&B        | 6              | 0.74   | 0.68 | -    | -    | 0.84   | 0.63 | -    | -    | 0.0003                               | 0.0063 | 0.0798 | 0.0187 | 0.0059                             | 0.0005 | 0.0258 | 0.2542 |
| 196.097_1.63 | a     | -                            | B          | 6              | -  | -    | -    | -    | 0.25   | 0.23 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs   |        |        |        | 0.0008                             | 0.0005 | 0.0073 | 0.2381 |
| 204.124_4.12 | a     | Acetylcarnitine (AC(2:0))    | H&B        | 6&18           | 0.43   | 0.54 | 0.55 | 0.42 | 0.18   | 0.23 | 0.21 | 0.16 | 0.0034                               | 0.0002 | 0.0036 | 0.0021 | 0.0000                             | 0.0000 | 0.0000 | 0.0002 |
| 205.098_3.79 | a     | Tryptophan                   | B          | 6              | -  | -    | -    | -    | 0.86   | 0.81 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs   |        |        |        | 0.0088                             | 0.0006 | 0.6479 | 0.9230 |
| 206.046_1.79 | a     | Xanthurenic acid             | B          | 6              | -  | -    | -    | -    | 0.38   | 0.48 | -    | -    | 0.0255                               | 0.2695 | 0.4120 | 0.1448 | 0.0001                             | 0.0000 | 0.0001 | 0.0036 |
| 209.093_3.55 | a     | Kynurenine                   | B          | 6&18           | -  | -    | -    | -    | 0.33   | 0.42 | 0.39 | 0.53 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs   |        |        |        | 0.0000                             | 0.0000 | 0.0000 | 0.0053 |
| 218.139_3.69 | a     | Propionylcarnitine (AC(3:0)) | H&B        | 6&18           | 0.16   | 0.21 | 0.15 | 0.26 | 0.41   | 0.38 | 0.37 | 0.48 | 0.0042                               | 0.0078 | 0.0072 | 0.0005 | 0.0011                             | 0.0000 | 0.0004 | 0.0002 |

|              |   |                                   |     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |                                    |        |        |        |        |        |        |        |
|--------------|---|-----------------------------------|-----|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 222.099_1.77 | a | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.62 | 0.76 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0256 | 0.0029 | 0.1968 | 0.5229 |
| 225.088_4.26 | a | Hydroxykynurenine                 | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.53 | 0.51 | 0.57 | 0.50 | 0.0055                             | 0.0736 | 0.0208 | 0.1791 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0011 | 0.0103 |
| 232.155_3.34 | a | Butyrylcarnitine (AC(4:0))        | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.22 | 0.14 | 0.23 | 0.17 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 238.094_2.09 | a | Sepiaterin                        | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.54 | 0.72 | -    | -    | 0.3039                             | 0.3736 | 0.6282 | 0.0794 | 0.0086 | 0.0007 | 0.0331 | 0.2698 |
| 238.094_3.12 | a | Biopterin                         | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 1.37 | 1.14 | -    | -    | 0.2371                             | 0.4862 | 0.2725 | 0.1894 | 0.0007 | 0.0422 | 0.0070 | 0.0292 |
| 241.156_4.6  | a | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.68 | 0.68 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0066 | 0.0006 | 0.0175 | 0.0447 |
| 261.038_4.34 | a | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.52 | 0.48 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0495 | 0.0009 | 0.1105 | 0.6390 |
| 282.121_5.58 | a | -                                 | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.43 | 0.59 | 0.60 | 0.72 | 0.1555                             | 0.6318 | 0.6400 | 0.2328 | 0.0000 | 0.0014 | 0.0001 | 0.0293 |
| 285.243_7.53 | o | -                                 | H   | 6       | 0.60 | 0.52 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0002 | 0.0058 | 0.0000 | 0.2390 | 0.0001 | 0.1001 | 0.0035 |
| 298.098_2.57 | a | Deoxymethylthioadenosine          | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.69 | 0.79 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0121 | 0.0001 | 0.0201 | 0.6291 |
| 311.258_7.58 | o | -                                 | H   | 6       | 0.60 | 0.57 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0001                             | 0.0000 | 0.0055 | 0.0000 | 0.4488 | 0.0000 | 0.4097 | 0.0003 |
| 335.331_5.35 | o | -                                 | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.50 | 0.60 | 0.50 | 0.9523                             | 0.0059 | 0.0418 | 0.0012 | 0.0095 | 0.0011 | 0.0005 | 0.0000 |
| 344.243_1.15 | a | -                                 | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.21 | 0.29 | 0.42 | 0.39 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0324 | 0.0036 | 0.0239 | 0.0062 |
| 344.28_2.57  | a | Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))    | B   | 18      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.23 | 0.97 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.5785 | 0.3087 | 0.0241 | 0.0174 |
| 351.326_4.03 | o | -                                 | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.40 | 0.30 | 0.60 | 0.30 | 0.0691                             | 0.0075 | 0.0718 | 0.0003 | 0.0013 | 0.0002 | 0.0014 | 0.0001 |
| 352.064_4.47 | a | -                                 | H/B | 6/6&18  | 1.88 | 2.30 | -    | -    | 2.06 | 1.83 | 2.04 | 2.10 | 0.0034                             | 0.0133 | 0.1559 | 0.0392 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0036 |
| 353.342_5.33 | o | -                                 | H/B | 18. Jun | -    | -    | 0.40 | 0.52 | 0.60 | 0.50 | -    | -    | 0.7253                             | 0.0075 | 0.0298 | 0.0005 | 0.0093 | 0.0012 | 0.0005 | 0.0000 |
| 359.262_1.14 | a | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.71 | 0.47 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0276 | 0.0000 | 0.5952 | 0.1132 |
| 367.14_7.32  | a | -                                 | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.72 | 0.43 | 0.62 | 0.52 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0006 | 0.0006 | 0.0130 | 0.1294 |
| 367.319_5.82 | o | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 1.52 | 1.41 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0340 | 0.0035 | 0.0031 | 0.0005 |
| 370.295_2.53 | a | Tetradecenoylcarnitine (AC(14:1)) | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.57 | 0.50 | 0.36 | 0.39 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0270 | 0.0346 | 0.0061 | 0.0016 |
| 372.311_2.29 | o | Myristoylcarnitine (AC(14:0))     | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.50 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0002 | 0.0003 | 0.0023 | 0.0031 |
| 377.146_1.87 | a | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.48 | 0.77 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0002 | 0.0045 | 0.0251 | 0.1162 |
| 377.378_6.76 | o | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 1.94 | 1.53 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0003 | 0.0000 | 0.0421 | 0.0000 |
| 379.394_7.24 | o | -                                 | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 1.58 | 1.35 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0040 | 0.0002 | 0.0629 | 0.0010 |

|               |   |                                       |     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |                                    |        |        |        |                                    |        |        |        |
|---------------|---|---------------------------------------|-----|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|--------|--------|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| 386.327_5.22  | o | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.40 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0024 | 0.0000 | 0.0077 | 0.0000                             |        |        |        |
| 387.321_2.78  | a | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.36 | 0.23 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0347 | 0.0297 | 0.0191 | 0.0749                             |        |        |        |
| 397.383_10.11 | o | -                                     | B   | 18     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.50 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.1408 | 0.0002 | 0.0293 | 0.0001                             |        |        |        |
| 398.327_2.48  | o | Hexadecenoylcarnitine (AC(16:1))      | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.40 | -    | -    | 0.2772                             | 0.0014 | 0.2967 | 0.0377 | 0.0000                             | 0.0000 | 0.0065 | 0.0099 |
| 405.096_7.3   | a | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.64 | 0.40 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0103 | 0.0128 | 0.0643 | 0.1638                             |        |        |        |
| 426.357_2.45  | a | Vaccenyl/Elaidic carnitine (AC(18:1)) | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.68 | 0.60 | -    | -    | 0.1857                             | 0.0038 | 0.7300 | 0.0460 | 0.0088                             | 0.0056 | 0.0010 | 0.2253 |
| 428.373_4.06  | o | Stearoylcarnitine (AC(18:0))          | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.60 | 0.70 | 0.70 | 0.5432                             | 0.1236 | 0.0962 | 0.0119 | 0.0063                             | 0.0000 | 0.0113 | 0.0010 |
| 439.378_6.51  | o | -                                     | H/B | 6      | 0.40 | 0.56 | -    | -    | 0.60 | 0.70 | -    | -    | 0.0000                             | 0.0066 | 0.0028 | 0.0021 | 0.0012                             | 0.0001 | 0.0157 | 0.0174 |
| 454.293_3.47  | o | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.50 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0040 | 0.0000 | 0.0015 | 0.0009                             |        |        |        |
| 456.405_4.91  | o | Arachidylcarnitine (AC(20:0))         | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.60 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0069 | 0.0000 | 0.0926 | 0.0052                             |        |        |        |
| 465.431_6.49  | o | -                                     | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 2.69 | 1.67 | 1.42 | 1.54 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0000 | 0.0000 | 0.0002 | 0.0027                             |        |        |        |
| 465.431_7.27  | o | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 1.58 | 1.26 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0000 | 0.0002 | 0.0005 | 0.0634                             |        |        |        |
| 477.28_1.85   | a | -                                     | B   | 18     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 1.44 | 2.54 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0968 | 0.1465 | 0.0239 | 0.0403                             |        |        |        |
| 479.371_6.51  | o | -                                     | H   | 6      | 0.50 | 0.49 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0044 | 0.1392 | 0.0002 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 484.436_5.66  | o | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.50 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0052 | 0.0000 | 0.0111 | 0.0001                             |        |        |        |
| 488.287_3.85  | a | -                                     | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0058 | 0.0010 | 0.0219 | 0.0043                             |        |        |        |
| 502.447_7.05  | o | DAG(26:0)                             | H/B | 6&18/6 | 0.50 | 0.50 | 0.80 | 0.60 | 0.80 | 0.70 | -    | -    | 0.0000                             | 0.0006 | 0.0024 | 0.0001 | 0.0223                             | 0.0000 | 0.0695 | 0.0035 |
| 504.439_6.68  | o | -                                     | H   | 18     | -    | -    | 0.80 | 0.72 | -    | -    | -    | -    | 0.6528                             | 0.1995 | 0.0089 | 0.0490 | 0.3120                             | 0.0223 | 0.2935 | 0.6252 |
| 505.175_4.7   | a | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 1.22 | 2.54 | -    | -    | 0.4411                             | 0.0484 | 0.0152 | 0.4865 | 0.0486                             | 0.0001 | 0.0001 | 0.4255 |
| 520.339_2.44  | a | LysoPC(18:2)                          | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.91 | -    | -    | 0.5417                             | 0.3103 | 0.3993 | 0.9093 | 0.0364                             | 0.0279 | 0.9566 | 0.0076 |
| 522.282_1.77  | a | -                                     | B   | 18     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 2.22 | 2.46 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.1569 | 0.5907 | 0.0338 | 0.0031                             |        |        |        |
| 523.437_5.83  | o | -                                     | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 1.83 | 1.25 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0001 | 0.0029 | 0.0073 | 0.0041                             |        |        |        |
| 528.463_7.12  | o | DAG(28:1)                             | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.60 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0006 | 0.0000 | 0.2588 | 0.0041                             |        |        |        |
| 533.418_7.11  | o | -                                     | H   | 6      | 0.60 | 0.57 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0017 | 0.0070 | 0.0006 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |

|              |   |  |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                                    |        |        |        |                                    |        |        |        |
|--------------|---|--|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|--------|--------|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| 535.433_7.52 | o | DAG(28:0)                                  | H   | 6&18 | 0.40 | 0.42 | 0.70 | 0.68 | -    | -    | -    | -    | 0.0010                             | 0.0005 | 0.0055 | 0.0002 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 549.338_5.2  | o | -  | H   | 18   | -    | -    | 0.50 | 0.45 | -    | -    | -    | -    | 0.6940                             | 0.1579 | 0.0214 | 0.0308 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 549.488_7.94 | o | -  | H/B | 6    | 0.60 | 0.50 | -    | -    | 1.64 | 1.25 | -    | -    | 0.0002                             | 0.0004 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0004                             | 0.0015 | 0.0138 | 0.0431 |
| 559.433_7.18 | o | DAG(30:2)                                  | H   | 6    | 0.50 | 0.52 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0006 | 0.0067 | 0.0002 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 561.449_7.56 | o | DAG(30:1)                                  | H   | 6&18 | 0.60 | 0.53 | 0.40 | 0.47 | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0002 | 0.0031 | 0.0000 | 0.3920                             | 0.0331 | 0.7574 | 0.0760 |
| 584.525_7.96 | o | DAG(32:1)                                  | H   | 6&18 | 0.50 | 0.39 | 0.80 | 0.44 | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0000 | 0.0008 | 0.0000 | 0.0003                             | 0.6226 | 0.0128 | 0.8183 |
| 587.464_7.61 | o | DAG(32:2)                                  | H   | 6&18 | 0.60 | 0.64 | 0.50 | 0.37 | -    | -    | -    | -    | 0.0001                             | 0.0000 | 0.0004 | 0.0000 | 0.9078                             | 0.8452 | 0.7123 | 0.0005 |
| 593.84_7.91  | a | -  | B   | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0001                             | 0.0045 | 0.0001 | 0.0033 |
| 597.519_6.82 | o | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.10 | 0.40 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0003                             | 0.0022 | 0.3971 | 0.8682 |
| 598.504_7.83 | o | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 2.98 | 1.28 | -    | -    | 0.0089                             | 0.2178 | 0.4872 | 0.3799 | 0.0000                             | 0.0029 | 0.0349 | 0.0777 |
| 603.534_6.92 | o | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0489                             | 0.0221 | 0.1221 | 0.5100 |
| 605.466_6.12 | o | -  | B   | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.80 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0047                             | 0.0000 | 0.1730 | 0.0036 |
| 608.526_7.7  | o | DAG(34:3)                                  | H   | 6    | 0.80 | 0.51 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0075                             | 0.0002 | 0.0227 | 0.0000 | 0.0196                             | 0.9699 | 0.1298 | 0.4401 |
| 609.509_5.75 | o | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | -    | -    | -                                  | -      | -      | -      | 0.0003                             | 0.0010 | 0.0003 | 0.0000 |
| 610.542_8.01 | o | DAG(34:2)                                  | H   | 6    | 0.80 | 0.52 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0018                             | 0.0001 | 0.0091 | 0.0000 | 0.0830                             | 0.0220 | 0.0331 | 0.1817 |
| 613.514_7.63 | o | -  | H   | 18   | -    | -    | 0.60 | 0.48 | -    | -    | -    | -    | 0.0159                             | 0.1229 | 0.0022 | 0.0154 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 613.515_6.31 | o | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.20 | 0.50 | -    | -    | -                                  | -      | -      | -      | 0.0008                             | 0.0068 | 0.5415 | 0.5197 |
| 617.511_8.3  | o | DAG(34:1)                                  | H   | 6&18 | 0.60 | 0.42 | 0.70 | 0.53 | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0000 | 0.0030 | 0.0000 | 0.3159                             | 0.0005 | 0.2770 | 0.0006 |
| 624.521_7.86 | o | -  | B   | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 2.86 | 1.34 | 2.22 | 1.32 | 0.0007                             | 0.7842 | 0.0002 | 0.8061 | 0.0000                             | 0.0020 | 0.0120 | 0.0368 |
| 631.481_6.48 | o | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.80 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0043                             | 0.0000 | 0.9210 | 0.0723 |
| 633.497_6.7  | o | Ceramide phosphoethanolamine (d16:1 C16:0) | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.80 | -    | -    | 0.1967                             | 0.3722 | 0.0676 | 0.1150 | 0.0182                             | 0.0000 | 0.0187 | 0.0019 |
| 633.505_8.36 | o | TAG(34:0)                                  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 1.45 | 1.27 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0161                             | 0.0009 | 0.9248 | 0.1037 |
| 650.287_3.8  | a | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.39 | 0.17 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0025                             | 0.0001 | 0.0567 | 0.0043 |
| 652.229_5.27 | a | -  | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.53 | 0.51 | -    | -    | 0.7890                             | 0.0106 | 0.4716 | 0.0616 | 0.0020                             | 0.0043 | 0.0062 | 0.6646 |
| 656.583_8.65 | o | TAG(36:0)                                  | H   | 6&18 | 0.60 | 0.54 | 0.60 | 0.36 | -    | -    | -    | -    | 0.0002                             | 0.0014 | 0.0088 | 0.0000 | 0.0187                             | 0.0309 | 0.4098 | 0.9475 |
| 670.598_8.79 | o | TAG(37:0)                                  | H   | 6&18 | 0.50 | 0.47 | 0.60 | 0.38 | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0005 | 0.0047 | 0.0000 | 0.4025                             | 0.7492 | 0.0542 | 0.7595 |
| 675.543_7.43 | o | -  | B   | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.80 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.6778                             | 0.0000 | 0.0356 | 0.0004 |

|              |   |                         |     |         |      |      |      |      |      |      |      |      |                                    |        |        |        |        |        |        |        |
|--------------|---|-------------------------|-----|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 676.527_7.56 | o | -                       | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.80 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0057 | 0.0001 | 0.1361 | 0.0010 |        |        |        |
| 680.546_7.13 | o | -                       | H   | 6       | 0.70 | 0.70 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0147 | 0.0002 | 0.0013 | 0.9230 | 0.3602 | 0.3469 | 0.9713 |
| 681.578_7.23 | o | -                       | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.30 | 0.50 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0008 | 0.0027 | 0.4340 | 0.6079 |        |        |        |
| 682.598_8.73 | o | TAG(38:1)               | H   | 6&18    | 0.60 | 0.58 | 0.50 | 0.34 | -    | -    | -    | -    | 0.0001                             | 0.0017 | 0.0097 | 0.0000 | 0.8144 | 0.3409 | 0.2468 | 0.1341 |
| 684.458_6.81 | o | PE(30:1)                | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 1.23 | 1.21 | 1.34 | 1.25 | 0.0384                             | 0.8468 | 0.2209 | 0.1295 | 0.0174 | 0.0010 | 0.0227 | 0.0005 |
| 684.615_8.93 | o | TAG(38:0)               | H   | 6       | 0.70 | 0.59 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0018                             | 0.0036 | 0.0042 | 0.0000 | 0.0124 | 0.0819 | 0.6981 | 0.3053 |
| 686.385_3.21 | a | -                       | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.42 | 0.30 | 0.43 | 0.36 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0000 | 0.0106 | 0.0000 | 0.0069 |        |        |        |
| 690.508_7.29 | o | PE(32:1)                | H/B | 6&18/18 | 0.70 | 0.79 | 0.70 | 0.48 | -    | -    | 0.82 | 0.79 | 0.0000                             | 0.0177 | 0.0002 | 0.0095 | 0.0056 | 0.0004 | 0.0062 | 0.0063 |
| 694.383_3.3  | a | -                       | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0001 | 0.0005 | 0.0000 | 0.0003 |        |        |        |
| 698.63_9.04  | o | TAG(39:0)               | H   | 6&18    | 0.60 | 0.52 | 0.60 | 0.40 | -    | -    | -    | -    | 0.0001                             | 0.0010 | 0.0028 | 0.0000 | 0.3133 | 0.6613 | 0.0705 | 0.1658 |
| 700.401_3.19 | a | -                       | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.00 | 0.29 | 0.00 | 0.35 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0038 | 0.0006 | 0.0019 | 0.0055 |        |        |        |
| 701.567_8.85 | o | TAG(39:1)               | H   | 6       | 0.60 | 0.60 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0004                             | 0.0011 | 0.0011 | 0.0000 | 0.0422 | 0.0161 | 0.0037 | 0.0133 |
| 702.507_7.14 | o | -                       | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | 0.70 | 0.80 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0009 | 0.0001 | 0.0136 | 0.0001 |        |        |        |
| 704.522_7.49 | o | PE(33:1)                | H/B | 18. Jun | -    | -    | 0.40 | 0.41 | 0.60 | 0.70 | -    | -    | 0.0004                             | 0.0545 | 0.0001 | 0.0011 | 0.0004 | 0.0000 | 0.0019 | 0.0000 |
| 704.653_5.83 | o | -                       | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 1.44 | 1.35 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0460 | 0.0002 | 0.0126 | 0.0001 |        |        |        |
| 706.539_7.14 | o | -                       | B   | 6&18    | -    | -    | -    | -    | 1.65 | 1.32 | 1.36 | 1.66 | 0.3711                             | 0.6441 | 0.0250 | 0.3556 | 0.0002 | 0.0000 | 0.0007 | 0.0001 |
| 708.4_3.27   | a | Gangliosid (d18:1/14:0) | GD3 | B       | 6&18 | -    | -    | -    | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.02 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |        |        |        |
| 710.63_8.97  | o | TAG(40:1)               | H   | 6       | 0.80 | 0.69 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0170                             | 0.0065 | 0.0095 | 0.0000 | 0.0012 | 0.0883 | 0.0319 | 0.5512 |
| 712.291_6.02 | a | -                       | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.75 | 0.75 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0485 | 0.0056 | 0.0054 | 0.2383 |        |        |        |
| 712.492_6.63 | o | -                       | H   | 18      | -    | -    | 0.60 | 0.53 | -    | -    | -    | -    | 0.6325                             | 0.0380 | 0.0005 | 0.0081 | 0.8928 | 0.0001 | 0.1667 | 0.0939 |
| 714.653_9.16 | o | TAG(40:0)               | H   | 6&18    | 0.80 | 0.74 | 0.60 | 0.71 | -    | -    | -    | -    | 0.0045                             | 0.0073 | 0.0048 | 0.0001 | 0.0678 | 0.9088 | 0.6130 | 0.9342 |
| 718.539_7.7  | o | PE(34:1)                | H/B | 18      | -    | -    | 0.60 | 0.71 | -    | -    | -    | -    | 0.0003                             | 0.0434 | 0.0001 | 0.0096 | 0.0017 | 0.0001 | 0.0005 | 0.0000 |
| 719.486_6.06 | o | PG(32:2)                | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0018 | 0.0000 | 0.0235 | 0.4836 |        |        |        |
| 720.516_6.08 | o | -                       | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.20 | 0.50 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0010 | 0.0203 | 0.1794 | 0.0695 |        |        |        |
| 723.281_3.87 | a | -                       | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 0.34 | 0.16 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0001 | 0.0000 | 0.0133 | 0.4912 |        |        |        |
| 728.521_7.15 | o | PC(30:0)                | B   | 6       | -    | -    | -    | -    | 1.30 | 1.26 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs | 0.0193 | 0.0000 | 0.0299 | 0.0001 |        |        |        |
| 728.56_7.76  | o | Ether-PE(36:2)          | H   | 18      | -    | -    | 0.60 | 0.80 | -    | -    | -    | -    | 0.0027                             | 0.1556 | 0.0013 | 0.0344 | 0.8522 | 0.0033 | 0.2875 | 0.0407 |
| 729.6_9.08   | o | TAG(41:1)               | H   | 6&18    | 0.80 | 0.71 | 0.70 | 0.51 | -    | -    | -    | -    | 0.0171                             | 0.0019 | 0.0039 | 0.0001 | 0.0312 | 0.4673 | 0.0206 | 0.6314 |

|              |   |                |     |        |      |      |      |      |      |      |      |      |                                    |        |        |        |                                    |        |        |        |
|--------------|---|----------------|-----|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|--------|--------|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| 730.537_1.96 | a | -              | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.89 | 0.71 | -    | -    | 0.0160                             | 0.0003 | 0.1935 | 0.7204 | 0.0032                             | 0.0088 | 0.0175 | 0.9757 |
| 730.699_6.77 | o | -              | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.50 | 0.60 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0078                             | 0.0000 | 0.0076 | 0.0042 |
| 731.615_9.27 | o | TAG(41:0)      | H   | 6      | 0.80 | 0.73 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0001                             | 0.0005 | 0.1687 | 0.0008 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 732.555_7.19 | o | PC(32:1)       | H   | 6      | 0.70 | 0.71 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0195 | 0.0000 | 0.0026 | 0.4346                             | 0.0441 | 0.8229 | 0.3752 |
| 736.486_1.29 | a | -              | H   | 6      | 0.72 | 0.50 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0020                             | 0.0108 | 0.2513 | 0.7069 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 739.575_8.01 | o | -              | H   | 6      | 1.40 | 1.23 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0175 | 0.8561 | 0.0039 | 0.7752                             | 0.0238 | 0.6291 | 0.8451 |
| 743.532_5.16 | o | -              | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0001                             | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 |
| 743.688_9.38 | o | -              | H   | 6      | 0.80 | 0.77 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0133                             | 0.0169 | 0.0269 | 0.0025 | 0.2694                             | 0.4596 | 0.3462 | 0.4845 |
| 744.555_7.06 | o | -              | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | 0.80 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0005                             | 0.0000 | 0.0011 | 0.0000 |
| 745.503_6.28 | o | -              | B   | 18     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.80 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.2168                             | 0.0002 | 0.0111 | 0.0166 |
| 747.585_7.49 | o | -              | B   | 18     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0098                             | 0.1047 | 0.0047 | 0.0003 |
| 752.556_8.02 | o | Ether-PE(36:1) | H   | 6      | 1.20 | 1.28 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0004                             | 0.0044 | 0.3374 | 0.0071 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 752.677_9.28 | o | TAG(43:1)      | H   | 6      | 0.70 | 0.68 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0066                             | 0.0059 | 0.0135 | 0.0003 | 0.5888                             | 0.9479 | 0.1483 | 0.2671 |
| 754.539_6.53 | o | -              | H   | 6&18   | 0.80 | 0.66 | 0.60 | 0.56 | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0268 | 0.0000 | 0.0038 | 0.0233                             | 0.0000 | 0.0001 | 0.0042 |
| 754.693_9.47 | o | TAG(43:0)      | H   | 6&18   | 0.60 | 0.69 | 0.70 | 0.78 | -    | -    | -    | -    | 0.0001                             | 0.0135 | 0.0085 | 0.0002 | 0.3588                             | 0.5864 | 0.0667 | 0.0296 |
| 757.557_1.93 | a | -              | H   | 6      | 0.82 | 0.50 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0007                             | 0.0022 | 0.2271 | 0.8916 | 0.0092                             | 0.0268 | 0.0072 | 0.8461 |
| 766.693_9.38 | o | -              | H   | 18     | -    | -    | 0.60 | 0.79 | -    | -    | -    | -    | 0.0013                             | 0.0021 | 0.0024 | 0.0002 | 0.4149                             | 0.0417 | 0.2847 | 0.3411 |
| 768.551_8.06 | o | -              | H   | 18     | -    | -    | 0.70 | 0.76 | -    | -    | -    | -    | 0.0211                             | 0.0667 | 0.0002 | 0.0052 | 0.1932                             | 0.0000 | 0.1857 | 0.0005 |
| 768.7_9.37   | o | -              | H   | 6      | 0.80 | 0.80 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0008                             | 0.0022 | 0.0039 | 0.0002 | 0.5274                             | 0.0516 | 0.2260 | 0.4478 |
| 768.709_9.58 | o | TAG(44:0)      | H   | 6      | 0.70 | 0.72 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0017                             | 0.0011 | 0.0032 | 0.0004 | 0.9668                             | 0.3902 | 0.0730 | 0.5796 |
| 769.271_1.23 | a | -              | B   | 18     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 3.11 | 3.61 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0650                             | 0.6817 | 0.0053 | 0.0167 |
| 770.57_7.12  | o | -              | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.50 | 0.70 | 0.50 | 0.3305                             | 0.1833 | 0.0060 | 0.6677 | 0.0012                             | 0.0000 | 0.0002 | 0.0000 |
| 771.563_5.75 | o | -              | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | 0.70 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0004                             | 0.0005 | 0.0001 | 0.0001 |
| 772.566_5.75 | o | -              | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0010                             | 0.0008 | 0.0010 | 0.0000 |
| 772.622_7.94 | o | -              | B   | 6&18   | -    | -    | -    | -    | 1.79 | 1.36 | 1.94 | 1.34 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0001                             | 0.0001 | 0.0191 | 0.0059 |
| 774.637_8.21 | o | -              | B   | 6      | -    | -    | -    | -    | 1.57 | 1.22 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0018                             | 0.0038 | 0.0003 | 0.2038 |
| 776.521_6.53 | o | -              | H/B | Jun 18 | 0.80 | 0.65 | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.70 | 0.0000                             | 0.0332 | 0.0000 | 0.0021 | 0.0213                             | 0.0000 | 0.0001 | 0.0085 |
| 780.556_6.64 | o | PC(36:5)       | B   | 18     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.80 | 0.0270                             | 0.0938 | 0.0010 | 0.0467 | 0.1097                             | 0.0001 | 0.0019 | 0.0013 |

|              |   |            |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                                    |        |        |        |        |        |        |        |
|--------------|---|------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 780.708_9.48 | o | TAG(45:1)  | H | 6    | 0.60 | 0.65 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0004                             | 0.0027 | 0.0091 | 0.0001 | 0.0833 | 0.0399 | 0.0044 | 0.7725 |
| 781.488_5.15 | o | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0005 | 0.0000 | 0.0051 | 0.0001 |
| 782.566_1.91 | a | PC(34:1)   | H | 6    | 0.81 | 0.51 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0012                             | 0.0027 | 0.3501 | 0.6855 | 0.0038 | 0.1068 | 0.3431 | 0.8356 |
| 785.62_8.59  | o | -          | H | 6    | 1.40 | 1.36 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0363 | 0.0002 | 0.0008 | 0.0097 | 0.0267 | 0.4174 | 0.6377 |
| 787.495_5.16 | o | -          | B | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0230 | 0.0001 | 0.0336 | 0.0004 |
| 788.431_3.59 | a | -          | H | 6    | 0.63 | 0.26 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0319                             | 0.0123 | 0.5494 | 0.9016 | 0.0609 | 0.0501 | 0.1946 | 0.4244 |
| 788.545_6.3  | o | PG(36:4)   | H | 6&18 | 0.70 | 0.59 | 1.30 | 1.67 | -    | -    | -    | -    | 0.0212                             | 0.0224 | 0.0046 | 0.0032 | 0.0987 | 0.0002 | 0.1159 | 0.0058 |
| 790.608_7.2  | o | -          | H | 6    | 0.70 | 0.62 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0267 | 0.0000 | 0.0038 | 0.8628 | 0.0810 | 0.9699 | 0.1477 |
| 791.603_5.21 | o | -          | B | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.40 | 0.60 | 0.40 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0058 | 0.0000 | 0.0059 | 0.0000 |
| 793.545_5.75 | o | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.60 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0017 | 0.0004 | 0.0005 | 0.0002 |
| 794.562_7.46 | o | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0047 | 0.0144 | 0.3462 | 0.0073 |
| 794.723_9.57 | o | TAG(46:1)  | H | 6    | 0.80 | 0.74 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0002                             | 0.0002 | 0.0008 | 0.0000 | 0.3356 | 0.0061 | 0.0034 | 0.0587 |
| 796.583_8.38 | o | -          | B | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0596 | 0.0000 | 0.0466 | 0.0005 |
| 796.622_7.88 | o | -          | B | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.60 | 0.70 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0002 | 0.0000 | 0.0172 | 0.0002 |
| 800.267_5.46 | a | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.46 | 0.77 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0206 | 0.0221 | 0.2754 | 0.9479 |
| 800.615_8.43 | o | PE(40:2)   | B | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | 0.80 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0460 | 0.0000 | 0.0042 | 0.0010 |
| 800.948_3    | a | -          | B | 6&18 | -    | -    | -    | -    | ∞    | ∞    | ∞    | ∞    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0000 | 0.0002 | 0.0005 | 0.0000 |
| 802.632_8.65 | o | -          | B | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.60 | 0.70 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0050 | 0.0000 | 0.0019 | 0.0000 |
| 806.689_9.02 | o | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 1.82 | 1.23 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0269 | 0.0002 | 0.5107 | 0.0686 |
| 806.761_9.83 | o | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 1.38 | 1.21 | -    | -    | 0.0232                             | 0.4889 | 0.7672 | 0.2108 | 0.0209 | 0.0013 | 0.0291 | 0.0049 |
| 808.74_9.65  | o | TAG(47:1)  | H | 6    | 0.60 | 0.69 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0003                             | 0.0056 | 0.1573 | 0.0001 | 0.0542 | 0.0343 | 0.0063 | 0.2273 |
| 812.657_9    | o | Coenzym Q9 | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | -    | -    | 0.5181                             | 0.7741 | 0.7448 | 0.0252 | 0.0000 | 0.0010 | 0.0001 | 0.3181 |
| 822.755_9.74 | o | TAG(48:1)  | H | 6    | 0.80 | 0.66 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0015                             | 0.0003 | 0.0009 | 0.0000 | 0.0224 | 0.4687 | 0.0727 | 0.0035 |
| 826.645_7.52 | o | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0124 | 0.0001 | 0.0012 | 0.0056 |
| 832.275_5.56 | a | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.17 | 0.39 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0476 | 0.0000 | 0.2386 | 0.1041 |
| 832.704_9.05 | o | -          | B | 6    | -    | -    | -    | -    | 3.35 | 1.37 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0000 | 0.0002 | 0.0006 | 0.0006 |
| 847.681_9.28 | o | -          | B | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.0092                             | 0.7910 | 0.1171 | 0.1907 | 0.0021 | 0.0002 | 0.0400 | 0.0001 |

|               |   |           |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                                    |        |        |        |                                    |        |        |        |
|---------------|---|-----------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------------|--------|--------|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| 851.712_9.62  | o | -         | H   | 6    | 1.60 | 1.20 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0017                             | 0.0030 | 0.0000 | 0.0116 | 0.0151                             | 0.2067 | 0.0004 | 0.8139 |
| 863.782_9.75  | o | -         | H   | 6&18 | 0.80 | 0.80 | 0.70 | 0.62 | -    | -    | -    | -    | 0.0002                             | 0.0000 | 0.0065 | 0.0000 | 0.1749                             | 0.0015 | 0.0064 | 0.0057 |
| 866.746_8.13  | o | -         | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 2.24 | 1.26 | -    | -    | 0.0000                             | 0.1809 | 0.0507 | 0.0826 | 0.0009                             | 0.0085 | 0.0186 | 0.7935 |
| 871.704_9.91  | o | -         | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.70 | -    | -    | 0.0071                             | 0.0000 | 0.0119 | 0.0000 | 0.0036                             | 0.0027 | 0.0024 | 0.0548 |
| 874.27_8.42   | o | -         | H   | 18   | -    | -    | 0.70 | 0.80 | -    | -    | -    | -    | 0.6902                             | 0.5015 | 0.0419 | 0.0192 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 874.787_9.75  | o | TAG(52:3) | H&B | 6    | 2.00 | 1.20 | -    | -    | 2.00 | 1.20 | -    | -    | 0.0022                             | 0.0257 | 0.0003 | 0.6228 | 0.0000                             | 0.0087 | 0.0000 | 0.9943 |
| 875.715_9.47  | o | TAG(52:5) | H   | 6    | 1.40 | 1.27 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0006                             | 0.0092 | 0.3633 | 0.0416 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        |
| 881.757_9.9   | o | TAG(52:2) | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 1.81 | 1.21 | -    | -    | 0.0077                             | 0.0584 | 0.0025 | 0.4429 | 0.0000                             | 0.0015 | 0.0001 | 0.9140 |
| 891.814_9.91  | o | -         | B   | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.80 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.2257                             | 0.0000 | 0.0262 | 0.0001 |
| 898.785_9.63  | o | -         | H   | 6    | 1.50 | 1.47 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0388                             | 0.0001 | 0.0032 | 0.0179 | 0.6508                             | 0.3492 | 0.4314 | 0.1968 |
| 900.803_9.77  | o | -         | H   | 6    | 1.50 | 1.50 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0151                             | 0.0002 | 0.0048 | 0.1813 | 0.0994                             | 0.3357 | 0.0009 | 0.6159 |
| 902.819_9.9   | o | -         | H   | 6    | 1.50 | 1.36 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0493                             | 0.0146 | 0.0804 | 0.3793 | 0.0018                             | 0.2312 | 0.0038 | 0.1077 |
| 905.515_6.53  | o | -         | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.80 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0044                             | 0.0055 | 0.7869 | 0.6039 |
| 915.814_9.76  | o | -         | H   | 6    | 1.80 | 1.40 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0033                             | 0.0001 | 0.0002 | 0.0381 | 0.0000                             | 0.0558 | 0.0001 | 0.7825 |
| 916.834_9.97  | o | TAG(55:3) | B   | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 1.33 | 1.31 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0010                             | 0.6922 | 0.0136 | 0.0424 |
| 935.729_9.75  | o | -         | H   | 6    | 1.30 | 1.22 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0054                             | 0.0020 | 0.0022 | 0.0140 | 0.0898                             | 0.3179 | 0.0985 | 0.8474 |
| 942.851_9.98  | o | -         | B   | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 4.94 | 1.53 | 2.02 | 2.21 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0001                             | 0.0065 | 0.0021 | 0.0008 |
| 944.866_10.11 | o | -         | B   | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 2.98 | 1.26 | 1.35 | 1.55 | 0.0005                             | 0.1051 | 0.0000 | 0.3588 | 0.0007                             | 0.0130 | 0.0097 | 0.0069 |
| 966.544_6.65  | o | -         | B   | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.50 | 0.80 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.4776                             | 0.0002 | 0.0018 | 0.0187 |
| 991.817_7.05  | o | -         | H   | 6    | 0.40 | 0.48 | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.0000                             | 0.0001 | 0.0190 | 0.0001 | 0.0171                             | 0.5630 | 0.0905 | 0.0124 |
| 1043.543_6.8  | a | -         | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.52 | 0.00 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0000                             | 0.0191 | 0.0000 | 0.2209 |
| 1106.794_6.78 | o | -         | B   | 6&18 | -    | -    | -    | -    | 0.60 | 0.80 | 0.70 | 0.80 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0000                             | 0.0000 | 0.0000 | 0.0022 |
| 1145.818_6.88 | o | -         | B   | 18   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.80 | 0.70 | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0184                             | 0.0001 | 0.0033 | 0.0029 |
| 1154.079_8.05 | o | -         | B   | 6    | -    | -    | -    | -    | 0.70 | 0.70 | -    | -    | p>0.05 in E1 & 2 und zu beiden ZTs |        |        |        | 0.0438                             | 0.0025 | 0.3951 | 0.1035 |

Angehängte Tabelle 4: Ergebnis der feature Identifikation. Neben dem Namen, dem gemessenen m/z-Verhältnis, der RT, der berechneten Summenformel, der Ionisationsform sind die detektierten Metlin IDs, der Massenfehler für diese, die gefundenen Fragmente sowie das daraus resultierende Level der Identifikation angegeben. Zum Abgleich mit der Metlindatenbank wurde ein Datenfile herangezogen, was im MS<sup>E</sup>-Modus aufgezeichnet wurde und der erlaubte, maximale Massenfehler bei der Datenbanksuche wurde auf 10ppm festgelegt.

| Name                       | feature id   | m/z-Verhältnis | RT [min] | detektierte metlin ids  | Unterschied im m/z [ppm] | berechnete Summenformel                                       | Ionisationsform    | gefundene Fragmente (m/z [Da] & Δm [mDa])              | Identifikationslevel |
|----------------------------|--------------|----------------|----------|---|--------------------------|---|--------------------|--|----------------------|
| Acetylcarnitine (AC(2:0))  | 204.124_4.12 | 204.124        | 4.12     | 66973/6612/3<br>544/2522/956  | 1/1/4/4/4                | C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | 145.051/0.4; 85.019/-9.3                               | 1                    |
| Biopterin                  | 238.094_3.12 | 238.094        | 3.12     | 62978/247/86<br>593/6581/560<br>6/6071/5781/6<br>5993/65562/6<br>5915         | 2/2/2/2/2/2/<br>7/7/7    | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>  | [M+H] <sup>+</sup> | 220.0828/1.3; 194.0679/1.4                             | 1                    |
| Butyrylcarnitine (AC(4:0)) | 232.155_3.34 | 232.155        | 3.34     | 66157/36666/<br>34492/964   | all 3                    | C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>               | [M+H] <sup>+</sup> | 173.0821/-1.8;85.0295/-1.4                             | 1                    |
| Carnitine                  | 162.113_5.41 | 162.113        | 5.41     | 63461/34532/<br>52  | all 4                    | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | 103.041/ 2.1; 60.084/1.4                               | 1                    |
| Hydroxykynurenine          | 225.088_4.26 | 225.088        | 4.26     | 86242/63541/<br>62389/2495/3<br>65  | all 2                    | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | [M+H] <sup>+</sup> | 208.0596/1.9;162.0547/1.5;110.0603/0.8                 | 1                    |
| Kynurenine                 | 209.093_3.55 | 209.093        | 3.55     | 85061/63540/<br>72  | 3/7/5                    | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup> | 174.0544/-2.9;146.0596/1.5;136.0754/-13.3;94.0655/-0.7 | 1                    |
| Leucine/Isoleucine         | 132.102_3.72 | 132.102        | 3.72     | 71198/66871/<br>71280/85268/<br>91525/86059/<br>64934/58006/<br>2074/24/3926/ | all 3                    | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | 86.0969/0.7  | 1                    |

|                              |              |         |      |   |                        |   |                    |                            |   |
|------------------------------|--------------|---------|------|---|------------------------|---|--------------------|----------------------------|---|
|                              |              |         |      | 6334/45882/4<br>5881/23   |                        |   |                    |                            |   |
| Phenylalanine                | 166.086_3.41 | 166.086 | 3.41 | 73234/72521/<br>73241/89305/<br>89753/89395/<br>72021/65707/<br>2018/2183/85<br>5/3934/63528/<br>5937/28                              | all 3                  | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | 120.0802/0.5               | 1 |
| Propionylcarnitine (AC(3:0)) | 218.139_3.69 | 218.139 | 3.69 | 85176/36668/<br>965   | 3/2/9                  | C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>               | [M+H] <sup>+</sup> | 159.063/-1.2; 85.028/-0.8  | 1 |
| Pterin                       | 164.058_2.78 | 164.058 | 2.78 | 5766/87479/8<br>6941/63472/3<br>27/65897  | 5/8/13/13/13/<br>13    | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O                | [M+H] <sup>+</sup> | 147.0296/2.7; 119.0345/1.6 | 1 |
| Tryptophan                   | 205.098_3.79 | 205.098 | 3.79 | 68730/70418/<br>85279/33/685<br>43/4017/6536<br>4/65534/7310<br>4   | 1/1/1/1/1/1/1/<br>1/17 | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | [M+H] <sup>+</sup> | 188.0701/16;146.0589/11    | 1 |
| Valine                       | 118.086_4.61 | 118.086 | 4.61 | 74874/71199/<br>66000/74875/<br>74876/263439<br>8/85259/7487<br>9/63884/3594<br>9/35/35941/35<br>942/35940/69<br>02/287/6508/6<br>762 | all 2                  | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | 72.0808/2.9                | 1 |

|                               |              |         |      |  |   |   |                                   |                           |   |
|-------------------------------|--------------|---------|------|--|---|---|-----------------------------------|---------------------------|---|
| Xanthine                      | 153.042_2.15 | 153.042 | 2.15 | 58027/866/82   | 3/4/7   | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>     | [M+H] <sup>+</sup>                | 136.0139/1.6;110.0350/0.2 | 1 |
| Xanthurenic acid              | 206.046_1.79 | 206.046 | 1.79 | 63302/5841/6<br>7010/66328/2<br>63577/62391/<br>66489/90204  | <1/5/5/1<1/<br>1<1/1<1/1<1  | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>                  | [M+H] <sup>+</sup>                | 188.0336/1.4;160.0382/1.6 | 1 |
| Arachidylcarnitine (AC(20:0)) | 456.405_4.91 | 456.405 | 4.91 | 58411  | <1  | C <sub>27</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>4</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>                | 85.0295/-0.7              | 2 |
| Coenzym Q9                    | 812.657_9    | 812.657 | 9    | 3695   | 4   | C <sub>54</sub> H <sub>82</sub> O <sub>4</sub>                  | [M+H] <sup>+</sup>                | 197.0806/1.3              | 2 |
| Deoxymethylthioadenosine      | 298.098_2.57 | 298.098 | 2.57 | 3425/88395   | 3/1<1   | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S | [M+H] <sup>+</sup>                | 136.0617/0                | 2 |
| DAG(28:1)                     | 528.463_7.12 | 528.463 | 7.12 | 98344/58672/<br>58644  | all 1   | C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> O <sub>5</sub>                  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 493.425/1.6               | 2 |
| DAG(28:0)                     | 535.433_7.52 | 535.433 | 7.52 | 263590/98349<br>/75565/58643   | all <1  | C <sub>31</sub> H <sub>60</sub> O <sub>5</sub>                  | [M+Na] <sup>+</sup>               | 285.24207/2; 495.4410/0   | 2 |
| DAG(30:1)                     | 561.449_7.56 | 561.449 | 7.56 | 58731/58740/<br>98354/98375/<br>58675/58647/<br>93694/41417/<br>41351/90894/<br>41450/3591/4<br>1479/41469/4<br>1500 | <1/<1/<1/<1/<br><1/<1/1<1/1<<br>1/1<1/1<1/1<<br>1/1<1/1<1/1<<br>1/1<1 | C <sub>33</sub> H <sub>62</sub> O <sub>5</sub>                  | [M+Na] <sup>+</sup>               | 521.456/0.4               | 2 |
| DAG(32:1)                     | 584.525_7.96 | 584.525 | 7.96 | 58793/98359/<br>98411/98419/<br>58764/58753/<br>58649/58650/   | all <1  | C <sub>35</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>                  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 549.4880/4.4              | 2 |

|                                  |              |         |      |   |        |   |                     |              |   |
|----------------------------------|--------------|---------|------|---|--------|---|---------------------|--------------|---|
|                                  |              |         |      | 58677/58743/<br>4264  |        |   |                     |              |   |
| DAG(32:2)                        | 587.464_7.61 | 587.464 | 7.61 | 88660/88178/<br>98360/98412/<br>98420/87643/<br>58806/58678/<br>58651/58679/<br>58765/58794/<br>4265  | all <1 | C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>5</sub>    | [M+Na] <sup>+</sup> | 547.472/2    | 2 |
| DAG(34:1)                        | 617.511_8.3  | 617.511 | 8.3  | 58767/58755/<br>58896/58911/<br>98426/98366/<br>58684/58656/<br>4260/4259/42<br>72/4278/4682/<br>4258 | all <1 | C <sub>37</sub> H <sub>70</sub> O <sub>5</sub>    | [M+Na] <sup>+</sup> | 577.519/-3.7 | 2 |
| Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))   | 344.28_2.57  | 344.28  | 2.57 | 75483/34490/<br>3547  | all <1 | C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>4</sub>   | [M+H] <sup>+</sup>  | 85.029/0.3   | 2 |
| Hexadecenoylcarnitine (AC(16:1)) | 398.327_2.48 | 398.327 | 2.48 | 58388   | 1      | C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>4</sub>   | [M+H] <sup>+</sup>  | 85.0295/0.1  | 2 |
| LysoPC(18:2)                     | 520.339_2.44 | 520.339 | 2.44 | 61696/40302/<br>40301/40300/<br>1   | all <1 | C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P | [M+H] <sup>+</sup>  | 184.0739/0.8 | 2 |
| Myristoylcarnitine (AC(14:0))    | 372.311_2.29 | 372.311 | 2.29 | 85175/75484/<br>58293   | all <1 | C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>4</sub>   | [M+H] <sup>+</sup>  | 85.0295/0.4  | 2 |

|          |              |         |      |   |       |   |                     |  |   |
|----------|--------------|---------|------|---|-------|---|---------------------|--|---|
| PC(34:1) | 782.566_1.91 | 782.566 | 1.91 | 76040/76284/<br>76705/76735/<br>76012/75809/<br>75615/75699/<br>75728/75783/<br>76769/76787/<br>77084/77230/<br>77253/77279/<br>77064/77039/<br>76814/76866/<br>76880/77010/<br>60905/60351/<br>39325/39326/<br>39420/39427/<br>39324/39323/<br>39319/39320/<br>39321/39322/<br>39615/39626/<br>59514/59547/<br>59709/59741/<br>59483/59451/<br>59329/59361/<br>59420/59421/<br>39317 | all 1 | C <sub>42</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P | [M+Na] <sup>+</sup> | PE: [M+H] <sup>+</sup> -141.0191<br>=641.5479/n.d.; PC: 184.0739/1.2 | 2 |
| PC(36:5) | 780.556_6.64 | 780.556 | 6.64 | 59941/60070/<br>59909/59876/<br>59681/59682/<br>60102/60135/<br>77213/77346/<br>77185/77051/<br>76824/77021/<br>59650/59617/  | all 2 | C <sub>44</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P | [M+H] <sup>+</sup>  | 184.0739/0.7   | 2 |

|          |              |         |      |  |                              |   |                    |              |   |
|----------|--------------|---------|------|--|------------------------------|---|--------------------|--------------|---|
|          |              |         |      | 59340/59341/<br>40029/39699/<br>39375/39435/<br>59372/59432/<br>59586/59587/<br>59554/59522/<br>59463/59464/<br>39373  |                              |   |                    |              |   |
| PC(32:1) | 732.555_7.19 | 732.555 | 7.19 | 76681/76728/<br>76744/76762/<br>76637/76085/<br>75780/75805/<br>76037/76806/<br>76861/77276/<br>77446/103471<br>/77226/77061/<br>76875/77006/<br>77034/39233/<br>75719/40736/<br>59322/40735/<br>40731/39235/<br>39309/39624/<br>59354/59418/<br>60648/75609/<br>75632/60343/<br>59544/59449/<br>75693/59480/<br>59511/89421 | all 1 except<br>the last (9) | C <sub>40</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>8</sub> P | [M+H] <sup>+</sup> | 184.0739/0.5 | 2 |

|          |              |         |      |   |        |   |                    |   |   |
|----------|--------------|---------|------|---|--------|---|--------------------|---|---|
| PE(32:1) | 690.508_7.29 | 690.508 | 7.29 | 76607/76630/<br>75801/75754/<br>75713/76691/<br>76717/77076/<br>77029/76800/<br>76776/75645/<br>75623/60272/<br>60303/60271/<br>59383/59351/<br>60365/60386/<br>75601/60469/<br>60437/60416/<br>39476                                 | all 1  | C <sub>37</sub> H <sub>72</sub> NO <sub>8</sub> P | [M+H] <sup>+</sup> | PE: [M+H] <sup>+</sup> -141.0191 =549.4877/-<br>1.7; PC: 184.0739/to be confirmed | 2 |
| PE(33:1) | 704.522_7.49 | 704.522 | 7.49 | 76720/76756/<br>76673/76649/<br>75875/76631/<br>76778/76802/<br>77077/77461/<br>77030/77004/<br>76859/75802/<br>75715/59352/<br>59416/59320/<br>39228/39183/<br>39226/59446/<br>60336/75624/<br>75692/60471/<br>60439/60337/<br>39182 | all <1 | C <sub>38</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>8</sub> P | [M+H] <sup>+</sup> | PE: [M+H] <sup>+</sup> -141.0191 =563.5029/-<br>2.7; PC: 184.0739/to be confirmed | 2 |

|  |              |         |      |  |  |   |                     |   |   |
|--|--------------|---------|------|--|--|---|---------------------|---|---|
| PE(34:1)   | 718.539_7.7  | 718.539 | 7.7  | 75744/75803/<br>75876/75717/<br>75666/75627/<br>75647/76036/<br>76613/77005/<br>77032/77275/<br>76804/76779/<br>76697/76726/<br>75608/60646/<br>40497/40498/<br>40707/39278/<br>39276/39115/<br>39121/40708/<br>59386/60419/<br>60440/60624/<br>60387/60310/<br>59448/60278/<br>4106 | all 1  | C <sub>39</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>8</sub> P               | [M+H] <sup>+</sup>  | PE: [M+H] <sup>+</sup> -141.0191 =577.519/-3        | 2 |
| Ceramide<br>phosphoethanol<br>amine (d16:1<br>C16:0) | 633.497_6.7  | 633.497 | 6.7  | 103058   | <1   | C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P | [M+H] <sup>+</sup>  | PE: [M+H] <sup>+</sup> -141.0191 =492.4775/-<br>4.5 | 2 |
| PE(30:1)   | 684.458_6.81 | 684.458 | 6.81 | 76690/76622/<br>75711/76713/<br>76797/77495/<br>76870/75660/<br>75620/60301/<br>60269/39168/<br>60363/60383/   | <1/<1/<1/<1/<br><1/<1/<1/<1/<br><1/<1/<1/<1/<br><1/<1/<1/13/<br>14 | C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> NO <sub>8</sub> P               | [M+Na] <sup>+</sup> | [M+H] <sup>+</sup> -141.0191 = 521.456/1            | 2 |

|                |              |         |      |   |        |   |                     |   |   |
|----------------|--------------|---------|------|---|--------|---|---------------------|---|---|
|                |              |         |      | 75598/44980/<br>53942   |        |   |                     |   |   |
| PE(40:2)       | 800.615_8.43 | 800.615 | 8.43 | 75886/75908/<br>75849/75820/<br>75738/75793/<br>76019/76048/<br>76885/77287/<br>76289/76123/<br>76073/76094/<br>61134/60941/<br>60428/60457/<br>60410/60038/<br>40543/59404/<br>60482/60512/<br>60909/60910/<br>60882/60691/<br>60659/40538 | all 1  | C <sub>45</sub> H <sub>86</sub> NO <sub>8</sub> P | [M+H] <sup>+</sup>  | PE: [M+H] <sup>+</sup> -141.0191<br>=659.5973/2.4.; PC: 184.0739/n.d. | 2 |
| Phosphocholin  | 184.074_7.36 | 184.074 | 7.36 | 3318/71191  | 4/3    | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub> P  | [M+H] <sup>+</sup>  | 124.999/3.1;86.0965/-0.2  | 2 |
| Ether-PE(36:1) | 752.556_8.02 | 752.556 | 8.02 | 76415/62234/<br>62205/62180/<br>76489/76512/<br>77647/77527/<br>77512/62159/<br>62120/60435/<br>59414/59413/<br>60436/60466/<br>62091/60675/<br>60491/46707   | all <1 | C <sub>41</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>7</sub> P | [M+Na] <sup>+</sup> | 589.5559/-1.3   | 2 |

|                                 |              |         |      |  |                                       |  |                                   |   |   |
|---------------------------------|--------------|---------|------|--|---------------------------------------|--|-----------------------------------|---|---|
| Ether-PE(36:2)                  | 728.56_7.76  | 728.56  | 7.76 | 62236/62235/<br>76490/77528/<br>77575/77529/<br>60467/62207/<br>60492/60468/<br>62206/60522/<br>60708/62181/<br>62160/103314<br>/91175 | 1/1/1/1/1/1/<br>1/1/1/1/1/1/<br>1/9/9 | C <sub>41</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>7</sub> P            | [M+H] <sup>+</sup>                | PE: [M+H] <sup>+</sup> -141.0191 =587.5398/-<br>7 | 2 |
| Sepiaterin                      | 238.094_2.09 | 238.094 | 2.09 | 247/62978/86<br>593/6071/658<br>1/5781/5606/6<br>5993/65562/6<br>5915/1077   | 3/3/3/3/3/3/<br>9/9/9/12              | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | 220.0819/4.1;192.0871/2;165.064<br>5/-0.8         | 2 |
| Stearoylcarnitine<br>(AC(18:0)) | 428.373_4.06 | 428.373 | 4.06 | 62365/62336/<br>46553/5811   | all 1                                 | C <sub>25</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 85.029/0.9  | 2 |
| TAG(36:0)                       | 656.583_8.65 | 656.583 | 8.65 | 62030/75582/<br>63990  | <1/<1/9                               | C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> O <sub>6</sub>               | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -   | 2 |
| TAG(37:0)                       | 670.598_8.79 | 670.598 | 8.79 | 98486  | <1                                    | C <sub>40</sub> H <sub>76</sub> O <sub>6</sub>               | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -   | 2 |
| TAG(38:1)                       | 682.598_8.73 | 682.598 | 8.73 | 98488  | <1                                    | C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> O <sub>6</sub>               | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -   | 2 |
| TAG(39:0)                       | 698.63_9.04  | 698.63  | 9.04 | 99032/98489/<br>87413  | all <1                                | C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> O <sub>6</sub>               | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -   | 2 |
| TAG(41:1)                       | 729.6_9.08   | 729.6   | 9.08 | 99093/99527/<br>99065/99037/<br>98553/98497  | all 1                                 | C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> O <sub>6</sub>               | [M+Na] <sup>+</sup>               | -   | 2 |
| TAG(43:0)                       | 754.693_9.47 | 754.693 | 9.47 | 99068/99123/<br>99530/99041/   | all 1                                 | C <sub>46</sub> H <sub>88</sub> O <sub>6</sub>               | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -   | 2 |

|   |              |         |      |  |   |   |                                   |          |   |
|---|--------------|---------|------|--|---|---|-----------------------------------|----------|---|
|   |              |         |      | 98613/98556/<br>98583/98502  |   |   |                                   |          |   |
| Vaccenyl/Elaidic<br>carnitine<br>(AC(18:1)) | 426.358_3.32 | 426.358 | 3.32 | 58415/58401/<br>42603  | <1/<1/23  | C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>4</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | 85.029/0 | 2 |
| DAG(26:0)                                   | 502.447_7.05 | 502.447 | 7.05 | 98346  | <1  | C <sub>29</sub> H <sub>56</sub> O <sub>5</sub>  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -        | 3 |
| DAG(30:2)                                   | 559.433_7.18 | 559.433 | 7.18 | 58741/58676/<br>98355/98347/<br>98376/58867/<br>58683/98363/<br>58137/58116/<br>64109/41470/<br>6998/429/412<br>83/41485/414<br>80/41382/214/<br>41350 | <1/<1/<1/<1/<br><1/4/4/4/9/9/9/<br>/9/9/9/9/9/9/9/<br>9 | C <sub>33</sub> H <sub>60</sub> O <sub>5</sub>  | [M+Na] <sup>+</sup>               | -        | 3 |
| DAG(34:2)                                   | 610.542_8.01 | 610.542 | 8.01 | 88644/58929/<br>58912/89832/<br>90025/98367/<br>90310/58809/<br>58796/36782/<br>4281/4277/58<br>657/58685/58<br>768/58744/42<br>75                     | all 2   | C <sub>37</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -        | 3 |
| DAG(34:3)                                   | 608.526_7.7  | 608.526 | 7.7  | 58853/58824/<br>58930/58948/<br>98368/58977/<br>58810/58733/   | all 1   | C <sub>37</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -        | 3 |

|                               |              |         |      |   |        |   |                     |   |   |
|-------------------------------|--------------|---------|------|---|--------|---|---------------------|---|---|
|                               |              |         |      | 4336/4319/58<br>658/58659/58<br>686/4279  |        |   |                     |   |   |
| Gangliosid<br>GD3(d18:1/14:0) | 708.9_3.27   | 708.9   | 3.27 | 62573   | 6      | C <sub>66</sub> H <sub>117</sub> N <sub>3</sub> O <sub>29</sub> | [M+H] <sup>+</sup>  | - | 3 |
| PC(30:0)                      | 728.521_7.15 | 728.521 | 7.15 | 59384/59415/<br>60335/59319/<br>40657/40704/<br>40733/60417/<br>76612/77421/<br>77462/77488/<br>77416/77405/<br>76648/76777/<br>40650/40635/<br>39224/39225/<br>39273/39203/<br>39181/39158/<br>39180/39303/<br>39443/39999/<br>40463/40585/<br>39736/39710/<br>39477/39478/<br>39137 | all 1  | C <sub>38</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>8</sub> P               | [M+Na] <sup>+</sup> | - | 3 |
| PG(32:2)                      | 719.486_6.06 | 719.486 | 6.06 | 79149/79167/<br>79383/79753/<br>79107/79078/<br>78885/78945/<br>78969/78995/<br>61861   | all <1 | C <sub>38</sub> H <sub>71</sub> O <sub>10</sub> P               | [M+H] <sup>+</sup>  | - | 3 |

|  |              |         |      |   |                      |   |                                   |   |   |
|--|--------------|---------|------|---|----------------------|---|-----------------------------------|---|---|
| PG(36:4)                                 | 771.518_6.3  | 771.518 | 6.3  | 61869/61868/<br>40867/61892/<br>61893/61921/<br>61908/61907/<br>40848/78933/<br>61950/61949/<br>79261/79421/<br>79711/79684/<br>79614/61935/<br>61934 | all 1                | C <sub>42</sub> H <sub>75</sub> O <sub>10</sub> P | [M+H] <sup>+</sup>                | - | 3 |
| Tetradecenoylca<br>rnitine<br>(AC(14:1)) | 370.295_2.53 | 370.295 | 2.53 | 45444/6437  | both <1              | C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>4</sub>   | [M+H] <sup>+</sup>                | - | 3 |
| TAG(34:0)                                | 633.505_8.36 | 633.505 | 8.36 | 92829/89512/<br>103058  | 3/3/11               | C <sub>37</sub> H <sub>70</sub> O <sub>6</sub>    | [M+Na] <sup>+</sup>               | - | 3 |
| TAG(38:0)                                | 684.615_8.93 | 684.615 | 8.93 | 98518/98487/<br>87427   | al 1                 | C <sub>41</sub> H <sub>78</sub> O <sub>6</sub>    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(39:1)                                | 701.567_8.85 | 701.567 | 8.85 | 99033/98490   | both 2               | C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> O <sub>6</sub>    | [M+Na] <sup>+</sup>               | - | 3 |
| TAG(40:0)                                | 712.646_9.16 | 712.646 | 9.16 | 99034/98550/<br>98519/98491   | all 1                | C <sub>43</sub> H <sub>82</sub> O <sub>6</sub>    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(40:1)                                | 710.63_8.97  | 710.63  | 8.97 | 99063/99035/<br>98551/98492/<br>92830   | all <1               | C <sub>43</sub> H <sub>80</sub> O <sub>6</sub>    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(41:0)                                | 726.661_9.27 | 726.661 | 9.27 | 99036/99064/<br>98581/98552/<br>98493/45324   | <1/<1/<1/<1/<br><1/4 | C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> O <sub>6</sub>    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |

|           |              |         |      |  |   |  |                                   |   |   |
|-----------|--------------|---------|------|--|---|--|-----------------------------------|---|---|
| TAG(43:1) | 752.677_9.28 | 752.677 | 9.28 | 99531/99150/<br>99559/99586/<br>99992/99124/<br>99097/98557/<br>98614/99042/<br>99069/98503  | all <1  | C <sub>46</sub> H <sub>86</sub> O <sub>6</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(44:0) | 768.709_9.58 | 768.709 | 9.58 | 99125/99532/<br>99587/263507<br>/99071/99047/<br>98523/98559/<br>98615/98643/<br>98504   | all 1   | C <sub>47</sub> H <sub>90</sub> O <sub>6</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(45:1) | 780.708_9.48 | 780.708 | 9.48 | 99616/99590/<br>99564/99641/<br>99996/100428<br>/100049/1000<br>23/99536/992<br>02/99050/987<br>30/98618/990<br>78/99106/991<br>79/99155/991<br>29/98566 | all <1  | C <sub>48</sub> H <sub>90</sub> O <sub>6</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(46:1) | 794.723_9.57 | 794.723 | 9.57 | 99619/99643/<br>99593/99570/<br>99227/99542/<br>99667/99999/<br>100430/10083<br>3/100076/100<br>051/100025/9<br>9250/99181/9                             | 2/2/2/2/2/2/<br>2/2/2/2/2/2/<br>2/2/2/2/2/2/<br>2/2/2/2/2/5/5 | C <sub>49</sub> H <sub>92</sub> O <sub>6</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |

|           |              |         |      |  |        |  |                                   |   |   |
|-----------|--------------|---------|------|--|--------|--|-----------------------------------|---|---|
|           |              |         |      | 8568/98512/8<br>7426/61720/9<br>8621/98703/9<br>9161/99135/9<br>9108/98732/9<br>9080/439/853<br>92   |        |  |                                   |   |   |
| TAG(47:1) | 808.74_9.65  | 808.74  | 9.65 | 100005/10002<br>8/99692/9967<br>0/99646/1000<br>54/100078/10<br>0835/100860/<br>100483/10043<br>3/100102/996<br>25/99599/991<br>14/99137/990<br>57/98811/987<br>34/99163/991<br>87/99544/995<br>72/99252/992<br>30/99211/986<br>27 | all 1  | C <sub>50</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(48:1) | 822.755_9.74 | 822.755 | 9.74 | 100007/10003<br>4/100060/997<br>17/99695/996<br>52/99676/100<br>081/100105/1<br>00862/100883<br>/101205/1008<br>38/100486/10<br>0127/100439/   | all <1 | C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |

|           |             |         |     |   |        |   |                     |   |   |
|-----------|-------------|---------|-----|---|--------|---|---------------------|---|---|
|           |             |         |     | 99627/99601/<br>98705/98737/<br>99087/98629/<br>98575/61722/<br>61732/99115/<br>99168/99296/<br>99578/99258/<br>99236/99189/<br>99213/4716  |        |   |                     |   |   |
| TAG(52:2) | 881.757_9.9 | 881.757 | 9.9 | 100526/10050<br>2/100572/100<br>610/100629/1<br>00242/100224<br>/100097/9988<br>8/100121/100<br>188/100205/1<br>00713/100854<br>/101330/1012<br>88/101349/10<br>1565/101652/<br>101266/10124<br>7/100942/100<br>920/100963/1<br>00999/101017<br>/99813/4813/4<br>812/4825/482<br>6/61731/4811/<br>4802/4786/47<br>83/4789/4798/<br>4799/61743/6<br>1744/99437/9<br>9349/99711/9 | all <1 | C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub> | [M+Na] <sup>+</sup> | - | 3 |

|           |              |         |      |  |       |   |                                   |   |   |
|-----------|--------------|---------|------|--|-------|---|-----------------------------------|---|---|
|           |              |         |      | 9733/99754/9<br>9331/99312/9<br>8537/87419/9<br>8657/98753/9<br>8804/4782  |       |   |                                   |   |   |
| TAG(52:3) | 874.787_9.75 | 874.787 | 9.75 | 100503/10027<br>7/100260/100<br>527/100594/1<br>00630/100611<br>/100243/1002<br>25/99876/.../4<br>800  | all 1 | C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |
| TAG(52:5) | 875.715_9.47 | 875.715 | 9.47 | 100650/10063<br>2/100667/100<br>684/100857/1<br>00699/100613<br>/100529/1002<br>45/100227/10<br>0262/100279/<br>100505/10029<br>4/100923/100<br>945/101579/1<br>01576/101663<br>/101666/1017<br>45/101742/10<br>1419/101404/<br>101069/10096<br>6/101269/101 | all 5 | C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>  | [M+Na] <sup>+</sup>               | - | 3 |

|           |              |         |      |  |       |   |                                   |   |   |
|-----------|--------------|---------|------|--|-------|---|-----------------------------------|---|---|
|           |              |         |      | 291/101387/1<br>01312/100208<br>/100124/6175<br>6/4882/61771/<br>98756/98862/<br>98807/4881/4<br>880/4844/484<br>1/4845/4859/4<br>865/4864/993<br>15/99334/997<br>36/99714/997<br>57/99878/100<br>100/99891/99<br>461/99451/99<br>369/99352/99<br>386/99401/99<br>440/4837 |       |   |                                   |   |   |
| TAG(55:3) | 916.834_9.97 | 916.834 | 9.97 | 101009/10099<br>2/101027/101<br>044/101115/1<br>01061/100770<br>/100736/1003<br>18/99940/100<br>331/100374/1<br>00723/101126<br>/101340/1017<br>65/101714/10<br>1960/101996/<br>102000/10165<br>7/101624/101<br>377/101359/1<br>01465/101570                               | all 1 | - | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | - | 3 |

|  |  |  |  |   |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|---|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  | /101593/9993<br>1/99921/3691<br>4/36852/3692<br>1/36922/3693<br>5/36848/3684<br>7/36838/3683<br>7/36842/3684<br>3/36844/3694<br>0/36959/9886<br>8/98868/9882<br>5/98887/9950<br>2/99910/3706<br>3/37062/3696<br>2/36961/3700<br>9/37020/3702<br>1/36836 |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|---|--|--|--|--|--|

Angehängte Tabelle 5: Identifikation der TAG-Spezies mit ungeradzahlicher Fettsäurenkettenlänge. Neben dem Namen, dem gemessenen m/z-Verhältnis, der RT, der berechneten Summenformel, der Massenfehler für diese, die gefundenen Fragmente und deren Massenfehler sowie die daraus resultierenden, möglichen TAG-Spezies. Die Datenaquise hierfür erfolgte mittels eines gerichteten MS/MS Experiments, bei dem die zu identifizierenden Spezies (potentielle TAG-Spezies mit ungeradzahlicher Fettsäurenkettenlänge) spezifisch im Quadrupol selektiert und anschließend fragmentiert wurden. Das gesamte Experiment wurde von Kelechi Amatobi am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Rahmen seiner Promotion durchgeführt.

| Name     | Rt (min) | m/z     | Summenformel | Adduct                            | Massenfehler | Fragmente (Massenfehler in mDa)  | TAG-Spezies                            |
|----------|----------|---------|--------------|-----------------------------------|--------------|--|--|
| TAG-45:1 | 9.6      | 780.708 | C48H94NO6    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 7.1 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 535.4725 (0.1), 521.4564 (0.6), 509.4561 (0.8)  | TAG-14:0/15:0/16:1                     |
| TAG-47:1 | 9.77     | 808.740 | C50H98NO6    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 3.7 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 549.4898 (0.8), 535.4716 (1.7), 563.5034 (1.2), 509.4562 (1.4), 577.5167 (3.6)                | TAG-14:0/15:0/18:1, TAG-13:0/16:0/18:1 |
| TAG-43:1 | 9.38     | 752.677 | C46H90NO6    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 5.6 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 507.4419 (0.3), 481.426 (0.1), 493.4258 (0.24), 521.4572 (0.1)                                | TAG-14:0/13:0/16:1                     |
| TAG-47:2 | 9.61     | 806.724 | C50H96NO6    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 0.5 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 535.472 (1.0), 547.4725 (0.6), 561.4882 (0.5), 549.4857 (3.0), 533.4564 (1.0), 509.4546 (2.8) | TAG-18:2/14:0/15:0, TAG-16:1/16:0/15:1 |
| TAG-39:0 | 9.12     | 698.630 | C42H84NO6    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 2.2 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 453.3951 (0.5), 481.4263 (0.4), 467.4104 (0.1), 439.3795 (0.5), 495.4432 (1.6)                | TAG-15:0/13:0/11:0, TAG-14:0/13:0/12:0 |
| TAG-45:2 | 9.44     | 778.693 | C48H92NO6    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 2.1 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 507.4412 (1.0), 533.4599 (2.0), 521.457 (0.9), 519.4414 (0.9), 547.4733 (0.3), 481.4253 (1.3) | TAG-14:0/16:1/15:1, TAG-14:0/18:2/13:0 |
| TAG-49:2 | 9.8      | 834.755 | C52H100NO6   | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 1.8 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 563.5037 (0.0), 561.4893 (1.2), 535.4709 (1.5), 577.5195 (0.1), 549.4855 (2.6)                | TAG-16:0/16:1/17:1, TAG-18:1/16:0/15:1 |
| TAG-49:1 | 9.97     | 836.771 | C52H102NO6   | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 0.7 mDa      | [M-RCOOH+NH <sub>3</sub> ] : 563.5038 (0.2), 591.534 (1.3), 577.5197 (0.04), 537.4857 (2.6), 549.4868 (1.5)                | TAG-16:0/18:1/15:0, TAG-17:0/18:1/14:0 |

Angehängte Tabelle 6 JTK\_CYCLE Ergebnisse der per-Metaboliten basierend auf den normalisierten Peakflächen. Ein Metabolit wurde als rhythmisch angesehen (grün hervorgehoben), wenn sowohl BH.Q und ADJ.P bei einer Periodenlänge von 24h kleiner 0.05 war. BH.Q Benjamini-Hoechberg Falscherkennungsrate, ADJ.P korrigierter p-value, LAG Phase (Maximum) der Oszillation, AMP.rel relative Amplitude [%]

| Name                       | Phase         | Kopf    |         |      |      |          | Körper  |         |      |      |         |
|----------------------------|---------------|---------|---------|------|------|----------|---------|---------|------|------|---------|
|                            |               | BH.Q    | ADJ.P   | PE R | LA G | AMP.r el | BH.Q    | ADJ.P   | PE R | LA G | AMP.rel |
| DAG(28:0)                  | organisc<br>h | 2.2E-02 | 3.5E-03 | 24   | 4    | 7        | 3.1E-04 | 3.7E-06 | 24   | 3    | 13      |
| DAG(30:1)                  | organisc<br>h | 3.4E-03 | 1.6E-04 | 24   | 2    | 6        | 6.3E-04 | 1.3E-05 | 24   | 0    | 10      |
| DAG(32:1)                  | organisc<br>h | 7.0E-06 | 1.5E-08 | 24   | 2    | 12       | 3.2E-04 | 3.9E-06 | 24   | 1    | 11      |
| DAG(32:2)                  | organisc<br>h | 3.8E-02 | 8.7E-03 | 24   | 2    | 4        | 1.6E-02 | 1.4E-03 | 24   | 0    | 8       |
| TAG(39:0)                  | organisc<br>h | 1.8E-02 | 2.4E-03 | 24   | 14   | 4        | 9.0E-03 | 5.9E-04 | 24   | 14   | 6       |
| TAG(48:1)                  | organisc<br>h | 4.0E-04 | 7.2E-06 | 24   | 2    | 7        | 2.8E-04 | 3.2E-06 | 24   | 0    | 9       |
| TAG(48:4)                  | organisc<br>h | 6.7E-03 | 4.7E-04 | 24   | 23   | 20       | 8.4E-03 | 5.2E-04 | 24   | 23   | 24      |
| TAG(50:2)                  | organisc<br>h | 2.1E-02 | 3.4E-03 | 24   | 2    | 9        | 2.3E-02 | 2.2E-03 | 24   | 0    | 12      |
| TAG(50:5)                  | organisc<br>h | 4.8E-02 | 1.2E-02 | 24   | 23   | 21       | 1.0E-03 | 2.6E-05 | 24   | 19   | 14      |
| DAG(26:0)                  | organisc<br>h | 1.6E-01 | 6.8E-02 | 24   | 0    | 4        | 3.4E-02 | 3.8E-03 | 24   | 1    | 10      |
| DAG(28:1)                  | organisc<br>h | 4.1E-01 | 2.2E-01 | 24   | 0    | 2        | 3.4E-02 | 3.8E-03 | 24   | 0    | 6       |
| DAG(30:2)                  | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d  | n.d  | n.d      | 2.4E-02 | 2.4E-03 | 24   | 21   | 17      |
| Palmitoylcarnitine (C16:0) | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d  | n.d  | n.d      | 4.2E-04 | 6.7E-06 | 24   | 3    | 7       |
| PC(36:2)                   | organisc<br>h | 3.6E-01 | 1.8E-01 | 24   | 6    | 3        | 3.7E-02 | 4.3E-03 | 24   | 8    | 4       |
| TAG(37:0)                  | organisc<br>h | 1.9E-01 | 8.1E-02 | 24   | 13   | 2        | 2.7E-02 | 2.8E-03 | 24   | 14   | 6       |
| TAG(41:0)                  | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d  | n.d  | n.d      | 7.9E-03 | 4.7E-04 | 24   | 14   | 6       |
| TAG(43:0)                  | organisc<br>h | 2.6E-01 | 1.3E-01 | 24   | 14   | 2        | 2.7E-02 | 2.8E-03 | 24   | 13   | 5       |
| TAG(44:3)                  | organisc<br>h | 7.8E-02 | 2.5E-02 | 24   | 2    | 5        | 3.0E-03 | 1.2E-04 | 24   | 23   | 13      |
| TAG(53:1)                  | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d  | n.d  | n.d      | 7.6E-04 | 1.6E-05 | 24   | 1    | 7       |
| TAG(54:3)                  | organisc<br>h | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 0    | 4        | 4.0E-04 | 5.5E-06 | 24   | 2    | 7       |
| DAG(34:2)                  | organisc<br>h | 8.8E-05 | 8.2E-07 | 24   | 2    | 12       | 2.1E-01 | 5.6E-02 | 24   | 2    | 5       |
| PE (O-36:2)                | organisc<br>h | 3.0E-02 | 5.8E-03 | 24   | 5    | 2        | 6.2E-02 | 9.3E-03 | 24   | 0    | 8       |
| PE(30:1)                   | organisc<br>h | 9.3E-05 | 9.3E-07 | 24   | 14   | 9        | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 14   | 3       |
| PE(36:2)                   | organisc<br>h | 2.8E-03 | 1.1E-04 | 24   | 5    | 4        | 1.0E+00 | 6.6E-01 | 24   | 2    | 0       |

|                            |               |         |         |     |     |     |         |         |    |    |    |
|----------------------------|---------------|---------|---------|-----|-----|-----|---------|---------|----|----|----|
| PE(36:5)                   | organisc<br>h | 1.1E-02 | 1.1E-03 | 24  | 0   | 1   | 3.8E-01 | 1.2E-01 | 24 | 23 | 0  |
| PE(O-36:1)                 | organisc<br>h | 5.8E-03 | 3.7E-04 | 24  | 6   | 8   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 6  | 5  |
| TAG(40:2)                  | organisc<br>h | 4.2E-02 | 1.0E-02 | 24  | 14  | 4   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 22 | 10 |
| TAG(41:1)                  | organisc<br>h | 4.3E-02 | 1.0E-02 | 24  | 13  | 3   | 1.3E-01 | 2.8E-02 | 24 | 14 | 5  |
| TAG(46:1)                  | organisc<br>h | 7.2E-03 | 5.3E-04 | 24  | 2   | 3   | 7.3E-01 | 3.0E-01 | 24 | 0  | 2  |
| Arachidylcarnitine (C20:0) | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 6.0E-01 | 24 | 1  | 4  |
| Coenzym Q9                 | organisc<br>h | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 22  | 1   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 6  | 2  |
| PC(30:0)                   | organisc<br>h | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 4   | 2   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 3  | 2  |
| PC(30:1)                   | organisc<br>h | 1.0E-01 | 3.8E-02 | 24  | 9   | 1   | 9.7E-01 | 4.3E-01 | 24 | 8  | 1  |
| PC(30:2)                   | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 5  | 4  |
| PC(32:0)                   | organisc<br>h | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 12  | 1   | 4.6E-01 | 1.6E-01 | 24 | 8  | 1  |
| PC(32:1)                   | organisc<br>h | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 12  | 1   | 4.6E-01 | 1.6E-01 | 24 | 8  | 1  |
| PC(32:3)                   | organisc<br>h | 1.0E+00 | 9.7E-01 | 24  | 23  | 0   | 1.7E-01 | 4.0E-02 | 24 | 23 | 2  |
| PC(34:2)                   | organisc<br>h | 4.9E-01 | 2.8E-01 | 24  | 2   | 2   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 4  | 2  |
| PC(34:4)                   | organisc<br>h | 7.9E-01 | 5.1E-01 | 24  | 23  | 1   | 8.3E-01 | 3.5E-01 | 0  | 0  | 0  |
| PC(35:2)                   | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 4.8E-01 | 1.7E-01 | 24 | 11 | 9  |
| PC(36:3)                   | organisc<br>h | 3.0E-01 | 1.5E-01 | 24  | 2   | 2   | 4.1E-01 | 1.4E-01 | 0  | 0  | 0  |
| PC(36:5)                   | organisc<br>h | 8.6E-01 | 5.6E-01 | 24  | 0   | 1   | 1.0E-01 | 2.0E-02 | 24 | 23 | 1  |
| PC(36:6)                   | organisc<br>h | 7.0E-01 | 4.3E-01 | 24  | 16  | 4   | 1.0E+00 | 5.6E-01 | 24 | 23 | 2  |
| PE (33:1)                  | organisc<br>h | 1.0E+00 | 7.1E-01 | 24  | 8   | 0   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 12 | 7  |
| PE (O-36:2)                | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 8.7E-01 | 24 | 1  | 0  |
| PE Cer d16:1 C16:0         | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 5.7E-01 | 24 | 1  | 1  |
| PE(28:0)                   | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.2E-01 | 2.4E-02 | 24 | 8  | 8  |
| PE(30:0)                   | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 4  | 4  |
| PE(31:1)                   | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 2.6E-01 | 7.4E-02 | 24 | 14 | 9  |
| PE(32:3)                   | organisc<br>h | 1.0E+00 | 8.5E-01 | 0   | 0   | 0   | 1.0E+00 | 9.0E-01 | 0  | 0  | 0  |
| PE(33:2)                   | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 6  | 4  |
| PE(34:1)                   | organisc<br>h | 1.3E-01 | 5.0E-02 | 24  | 3   | 2   | 1.0E-01 | 1.9E-02 | 24 | 0  | 2  |
| PE(34:2)                   | organisc<br>h | 7.9E-01 | 5.0E-01 | 24  | 2   | 1   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 4  | 1  |
| PE(38:1)                   | organisc<br>h | 3.3E-01 | 1.7E-01 | 24  | 16  | 1   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 22 | 2  |
| PE(38:2)                   | organisc<br>h | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.7E-01 | 4.0E-02 | 24 | 22 | 9  |

|                                    |               |             |             |     |     |     |             |             |     |     |     |
|------------------------------------|---------------|-------------|-------------|-----|-----|-----|-------------|-------------|-----|-----|-----|
| PE(40:2)                           | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 1.3E-<br>01 | 2.7E-<br>02 | 24  | 0   | 11  |
| PG(36:4)                           | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 1.0E+0<br>0 | 8.5E-<br>01 | 24  | 0   | 2   |
| Stearoylcarnitine<br>(C18:0)       | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 1.0E+0<br>0 | 9.3E-<br>01 | 24  | 2   | 2   |
| TAG(34:0)                          | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 12  | 4   |
| TAG(36:0)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 6   | 3   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 11  | 0   |
| TAG(38:0)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 19  | 4   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 22  | 3   |
| TAG(38:1)                          | organisc<br>h | 8.3E-<br>01 | 5.4E-<br>01 | 24  | 8   | 7   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 10  |
| TAG(39:1)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 3   | 3   | 8.2E-<br>01 | 3.5E-<br>01 | 24  | 14  | 6   |
| TAG(40:0)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 4   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 22  | 2   |
| TAG(40:1)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 10  | 2.9E-<br>01 | 8.6E-<br>02 | 24  | 22  | 6   |
| TAG(40:2)                          | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 1.8E-<br>01 | 4.4E-<br>02 | 24  | 0   | 7   |
| TAG(41:2)                          | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 8   | 5   |
| TAG(42:0)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 20  | 3   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 4   |
| TAG(42:1)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 4   | 7.9E-<br>01 | 3.3E-<br>01 | 24  | 0   | 2   |
| TAG(42:2)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 6   | 1.0E+0<br>0 | 4.6E-<br>01 | 24  | 0   | 3   |
| TAG(43:1)                          | organisc<br>h | 6.0E-<br>01 | 3.6E-<br>01 | 24  | 10  | 2   | 7.1E-<br>01 | 2.9E-<br>01 | 24  | 14  | 2   |
| TAG(43:2)                          | organisc<br>h | 4.5E-<br>01 | 2.5E-<br>01 | 24  | 9   | 3   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 12  | 4   |
| TAG(44:0)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 20  | 5   | 1.0E+0<br>0 | 9.7E-<br>01 | 24  | 9   | 2   |
| TAG(44:1)                          | organisc<br>h | 3.4E-<br>01 | 1.7E-<br>01 | 24  | 3   | 4   | 1.0E+0<br>0 | 5.5E-<br>01 | 24  | 3   | 3   |
| TAG(45:1)                          | organisc<br>h | 9.8E-<br>01 | 6.7E-<br>01 | 24  | 9   | 1   | 1.0E+0<br>0 | 9.5E-<br>01 | 24  | 9   | 4   |
| TAG(46:0)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 5   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 6   |
| TAG(47:0)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 1   | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d |
| TAG(47:1)                          | organisc<br>h | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 4   | 4   | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24  | 12  | 4   |
| TAG(50:3)                          | organisc<br>h | 1.3E-<br>01 | 5.0E-<br>02 | 24  | 0   | 13  | 1.0E+0<br>0 | 6.3E-<br>01 | 24  | 21  | 3   |
| TAG(51:3)                          | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 6.1E-<br>02 | 9.1E-<br>03 | 24  | 0   | 9   |
| TAG(52:2)                          | organisc<br>h | 3.4E-<br>01 | 1.8E-<br>01 | 24  | 2   | 8   | 1.3E-<br>01 | 2.9E-<br>02 | 24  | 0   | 15  |
| TAG(52:3)                          | organisc<br>h | 4.0E-<br>01 | 2.1E-<br>01 | 24  | 2   | 8   | 1.2E-<br>01 | 2.4E-<br>02 | 24  | 2   | 4   |
| Tetradecanoylcarnitine<br>(C14:0)  | organisc<br>h | n.d         | n.d         | n.d | n.d | n.d | 1.0E+0<br>0 | 9.2E-<br>01 | 24  | 19  | 5   |
| Octadecadienylcarnitine<br>(C18:2) | wässrig       | 2.1E-<br>22 | 1.4E-<br>25 | 24  | 1   | 44  | 8.2E-<br>06 | 8.8E-<br>08 | 24  | 2   | 13  |
| Oleoylcarnitine<br>(C18:1)         | wässrig       | 2.6E-<br>12 | 6.3E-<br>15 | 24  | 3   | 13  | 1.7E-<br>04 | 6.3E-<br>06 | 24  | 3   | 3   |

|                                |         |         |         |     |     |     |         |         |    |    |    |
|--------------------------------|---------|---------|---------|-----|-----|-----|---------|---------|----|----|----|
| Palmitoylcarnitine (C16:0)     | wässrig | 9.1E-12 | 2.8E-14 | 24  | 2   | 16  | 2.1E-04 | 8.5E-06 | 24 | 3  | 4  |
| Tetradecenoylcarnitine (C14:1) | wässrig | 2.0E-02 | 1.4E-03 | 24  | 1   | 15  | 4.2E-02 | 7.1E-03 | 24 | 19 | 6  |
| Valine                         | wässrig | 2.0E-03 | 4.4E-05 | 24  | 8   | 11  | 1.8E-04 | 6.7E-06 | 24 | 9  | 15 |
| Acetylcarnitine (C2:0)         | wässrig | 4.9E-05 | 3.7E-07 | 24  | 4   | 11  | 6.7E-01 | 2.9E-01 | 24 | 19 | 2  |
| Biopterin                      | wässrig | 1.8E-03 | 3.7E-05 | 24  | 16  | 4   | 1.0E+00 | 8.1E-01 | 24 | 17 | 3  |
| Palmitoleoylcarnitine (C16:1)  | wässrig | 7.5E-06 | 4.1E-08 | 24  | 2   | 17  | 8.9E-01 | 4.3E-01 | 0  | 0  | 0  |
| Stearoylcarnitine (C18:0)      | wässrig | 5.6E-05 | 4.4E-07 | 24  | 3   | 13  | 6.2E-02 | 1.2E-02 | 24 | 5  | 4  |
| Trehalose                      | wässrig | 4.9E-03 | 1.6E-04 | 24  | 15  | 6   | 1.0E+00 | 6.4E-01 | 0  | 0  | 0  |
| Dodecanoylcarnitine (C12:0)    | wässrig | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 8.6E-05 | 2.2E-06 | 24 | 19 | 20 |
| Leucine/Isoleucine             | wässrig | 6.7E-01 | 1.8E-01 | 24  | 11  | 4   | 2.4E-03 | 1.7E-04 | 24 | 10 | 8  |
| Phosphorylcholine              | wässrig | 5.0E-01 | 1.2E-01 | 24  | 23  | 4   | 5.0E-03 | 4.4E-04 | 24 | 2  | 4  |
| Sepiaterin                     | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 12  | 3   | 1.2E-02 | 1.3E-03 | 24 | 22 | 3  |
| Taurin                         | wässrig | 1.0E+00 | 8.1E-01 | 24  | 18  | 3   | 3.1E-04 | 1.4E-05 | 24 | 14 | 3  |
| Tryptophan                     | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 0   | 5   | 1.8E-02 | 2.3E-03 | 24 | 7  | 2  |
| PC(34:1)                       | wässrig | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 5.2E-02 | 9.6E-03 | 24 | 19 | 3  |
| Butyrylcarnitine (C4:0)        | wässrig | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 9  | 4  |
| Carnitine                      | wässrig | 1.0E-01 | 1.5E-02 | 24  | 20  | 5   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 12 | 3  |
| Dihydrobiopterin               | wässrig | 1.0E+00 | 6.9E-01 | 24  | 7   | 5   | 9.1E-02 | 2.0E-02 | 24 | 21 | 2  |
| Drosoppterin                   | wässrig | 1.0E+00 | 8.9E-01 | 24  | 15  | 3   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 20 | 5  |
| GangliosidGD3 (d18:1/14:0)     | wässrig | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 20 | 4  |
| GSH                            | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 4   | 5   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 6  | 11 |
| GSSG                           | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 4   | 4   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 23 | 2  |
| Histidine                      | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 18  | 5   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 18 | 2  |
| Hydroxykynurenine              | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 14  | 2   | 1.0E+00 | 5.8E-01 | 24 | 15 | 1  |
| Kynurenine                     | wässrig | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 19 | 2  |
| LysoPC(18:2)                   | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 2   | 4   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 14 | 2  |
| Methionine                     | wässrig | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 10 | 1  |
| Methylthioadenosine            | wässrig | n.d     | n.d     | n.d | n.d | n.d | 8.5E-01 | 4.0E-01 | 24 | 8  | 2  |
| Nad+/NadH                      | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 12  | 3   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24 | 14 | 2  |
| Phenylalanine                  | wässrig | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 4   | 9   | 2.3E-01 | 7.1E-02 | 24 | 13 | 1  |

|                                |         |             |             |    |    |    |             |             |    |    |   |
|--------------------------------|---------|-------------|-------------|----|----|----|-------------|-------------|----|----|---|
| Pterin                         | wässrig | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24 | 18 | 3  | 1.0E+0<br>0 | 5.0E-<br>01 | 24 | 7  | 1 |
| Tetradecanoylcarnitine (C14:0) | wässrig | 5.9E-<br>01 | 1.5E-<br>01 | 24 | 2  | 10 | 1.0E-<br>01 | 2.4E-<br>02 | 24 | 19 | 8 |
| Xanthine                       | wässrig | 6.8E-<br>01 | 1.9E-<br>01 | 24 | 11 | 6  | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24 | 8  | 4 |
| Xanthurenic acid               | wässrig | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24 | 18 | 2  | 1.0E+0<br>0 | 1.0E+0<br>0 | 24 | 18 | 3 |

Angehängte Tabelle 7 JTK\_CYCLE Ergebnisse des Lipid-Profilings. Ein Lipid wurde als rhythmisch angesehen (grün hervorgehoben), wenn sowohl BH.Q und ADJ.P bei einer Periodenlänge von 24h kleiner 0.05 war. BH.Q Benjamini-Hoechberg Falscherkennungsrate, ADJ.P korrigierter p-value, LAG Phase (Maximum) der Oszillation, AMP.rel relative Amplitude [%]

| Substance | head     |          |      |      |         | body     |          |     |     |         |
|-----------|----------|----------|------|------|---------|----------|----------|-----|-----|---------|
|           | BH.Q     | ADJ.P    | PER  | LAG  | AMP.rel | BH.Q     | ADJ.P    | PER | LAG | AMP.rel |
| AC(C18:2) | 1.3E-45  | 1.0E-46  | 24   | 2    | 33      | 1.3E-08  | 1.9E-09  | 24  | 3   | 12      |
| AC(C16:0) | 3.1E-36  | 4.8E-37  | 24   | 4    | 26      | 3.6E-09  | 2.8E-10  | 24  | 3   | 10      |
| AC(C18:1) | 2.2E-26  | 5.1E-27  | 24   | 4    | 23      | 5.4E-07  | 1.7E-07  | 24  | 4   | 11      |
| TAG(48:4) | 1.4E-02  | 1.4E-03  | 24   | 23   | 17      | 1.6E-02  | 5.4E-03  | 24  | 21  | 16      |
| AC(C16:1) | 2.9E-24  | 9.0E-25  | 24   | 4    | 25      | 1.1E-04  | 5.3E-05  | 24  | 4   | 8       |
| AC(C4:0)  | 4.8E-22  | 1.8E-22  | 24   | 22   | 14      | 2.1E-06  | 8.0E-07  | 24  | 23  | 8       |
| AC(C18:0) | 7.1E-16  | 3.8E-16  | 24   | 3    | 13      | 1.3E-02  | 6.8E-03  | 24  | 8   | 5       |
| TAG(39:0) | 6.0E-04  | 9.8E-06  | 24   | 14   | 7       | 5.7E-06  | 3.4E-07  | 24  | 14  | 10      |
| DAG(34:1) | 1.9E-04  | 4.1E-05  | 24   | 2    | 6       | 4.7E-03  | 8.7E-04  | 24  | 0   | 12      |
| TAG(52:2) | 3.3E-02  | 5.4E-03  | 24   | 2    | 6       | 1.6E-06  | 2.4E-08  | 24  | 22  | 15      |
| DAG(32:1) | 8.8E-07  | 6.3E-08  | 24   | 2    | 9       | 1.1E-02  | 2.7E-03  | 24  | 0   | 9       |
| TAG(39:1) | 1.3E-02  | 8.2E-04  | 24   | 14   | 7       | 8.0E-04  | 1.3E-04  | 24  | 14  | 7       |
| TAG(41:0) | 3.0E-03  | 9.7E-05  | 24   | 14   | 6       | 3.3E-06  | 9.8E-08  | 24  | 14  | 9       |
| TAG(41:1) | 1.2E-02  | 6.0E-04  | 24   | 13   | 6       | 2.8E-05  | 2.1E-06  | 24  | 14  | 9       |
| TAG(43:0) | 1.4E-02  | 1.2E-03  | 24   | 14   | 5       | 5.0E-06  | 2.2E-07  | 24  | 14  | 9       |
| TAG(37:0) | 1.7E-02  | 2.2E-03  | 24   | 13   | 5       | 5.6E-05  | 5.0E-06  | 24  | 14  | 9       |
| AC(C2:0)  | 9.74E-13 | 5.99E-13 | 24   | 4    | 18      | 2.90E-02 | 1.78E-02 | 24  | 3   | 4       |
| AC(C14:0) | 8.3E-12  | 5.8E-12  | 24   | 5    | 28      | 1.1E-01  | 7.6E-02  | 24  | 18  | 5       |
| AC(C14:1) | 8.1E-20  | 3.8E-20  | 24   | 4    | 26      | 3.5E-01  | 2.9E-01  | 0   | 0   | 0       |
| AC(C12:0) | 2.7E-11  | 2.1E-11  | 24   | 4    | 22      | 2.4E-01  | 1.8E-01  | 24  | 22  | 11      |
| AC(C3:0)  | 2.5E-09  | 2.1E-09  | 24   | 22   | 15      | 5.2E-01  | 4.8E-01  | 24  | 22  | 2       |
| DAG(34:2) | 2.0E-05  | 2.8E-06  | 24   | 2    | 9       | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24  | 0   | 6       |
| DAG(32:2) | 9.5E-03  | 2.7E-03  | 24   | 2    | 4       | 1.6E-01  | 1.2E-01  | 24  | 22  | 9       |
| DAG(30:2) | n.d.     | n.d.     | n.d. | n.d. | n.d.    | 3.9E-03  | 4.9E-04  | 24  | 19  | 15      |
| TAG(50:1) | 7.2E-02  | 1.5E-02  | 24   | 1    | 7       | 2.0E-02  | 7.2E-03  | 24  | 22  | 11      |
| DAG(28:0) | 7.2E-01  | 4.1E-01  | 24   | 1    | 3       | 2.5E-02  | 9.3E-03  | 24  | 4   | 13      |
| TAG(50:5) | 9.6E-02  | 2.4E-02  | 24   | 23   | 19      | 7.0E-05  | 7.4E-06  | 24  | 18  | 25      |
| TAG(53:2) | n.d.     | n.d.     | n.d. | n.d. | n.d.    | 1.6E-02  | 5.2E-03  | 24  | 1   | 6       |
| TAG(53:1) | n.d.     | n.d.     | n.d. | n.d. | n.d.    | 1.0E-03  | 2.0E-04  | 24  | 1   | 5       |
| TAG(44:0) | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24   | 19   | 6       | 1.6E-02  | 5.6E-03  | 24  | 14  | 5       |
| TAG(56:3) | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24   | 20   | 5       | 6.6E-03  | 1.6E-03  | 24  | 1   | 4       |
| TAG(42:0) | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24   | 20   | 5       | 2.0E-02  | 7.8E-03  | 24  | 14  | 1       |
| TAG(43:2) | 7.8E-02  | 1.8E-02  | 24   | 13   | 5       | 1.6E-02  | 5.2E-03  | 24  | 14  | 4       |
| DAG(30:1) | 1.3E-01  | 4.6E-02  | 24   | 2    | 5       | 4.0E-02  | 1.8E-02  | 24  | 0   | 5       |
| TAG(43:1) | 6.6E-02  | 1.2E-02  | 24   | 13   | 4       | 4.0E-04  | 5.7E-05  | 24  | 14  | 5       |
| TAG(45:2) | 8.0E-01  | 4.1E-01  | 24   | 13   | 3       | 3.4E-03  | 7.6E-04  | 24  | 14  | 5       |
| TAG(46:1) | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24   | 4    | 3       | 2.0E-02  | 7.5E-03  | 24  | 14  | 1       |
| TAG(47:2) | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24   | 4    | 2       | 2.4E-02  | 1.0E-02  | 24  | 14  | 3       |
| TAG(45:1) | 8.0E-01  | 4.2E-01  | 24   | 13   | 2       | 4.0E-04  | 6.0E-05  | 24  | 14  | 4       |
| DAG(26:0) | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24   | 4    | 7       | 2.3E-02  | 1.9E-02  | 24  | 0   | 5       |
| TAG(47:1) | 1.0E+00  | 1.0E+00  | 24   | 12   | 2       | 2.9E-04  | 3.5E-05  | 24  | 14  | 4       |

|           |         |         |      |      |      |         |         |      |      |      |
|-----------|---------|---------|------|------|------|---------|---------|------|------|------|
| TAG(40:0) | 1.0E+00 | 7.9E-01 | 0    | 0    | 0    | 1.0E-03 | 2.0E-04 | 24   | 14   | 2    |
| TAG(41:2) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | 1.5E-01 | 9.2E-02 | 24   | 13   | 4    |
| TAG(51:3) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | 5.0E-01 | 3.9E-01 | 24   | 22   | 3    |
| TAG(34:0) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 20   | 10   | 1.3E-01 | 6.8E-02 | 24   | 13   | 4    |
| TAG(50:3) | 8.0E-01 | 4.1E-01 | 24   | 23   | 10   | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 16   | 7    |
| TAG(48:3) | 2.7E-01 | 8.4E-02 | 24   | 23   | 8    | 2.4E-01 | 1.7E-01 | 24   | 19   | 3    |
| TAG(52:2) | 5.0E-01 | 2.1E-01 | 24   | 2    | 8    | 1.7E-01 | 1.1E-01 | 24   | 23   | 19   |
| TAG(42:3) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 4    | 8    | 1.8E-01 | 1.3E-01 | 24   | 21   | 9    |
| TAG(40:2) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 4    | 7    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 22   | 5    |
| DAG(28:1) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 4    | 7    | 3.7E-01 | 3.0E-01 | 24   | 23   | 2    |
| TAG(52:3) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 0    | 7    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 0    | 7    |
| TAG(49:3) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 22   | 7    | 1.5E-01 | 9.6E-02 | 24   | 20   | 3    |
| TAG(45:3) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 12   | 6    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 14   | 4    |
| DAG(36:2) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 0    | 5    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 0    | 3    |
| TAG(44:3) | 4.0E-01 | 1.6E-01 | 24   | 0    | 5    | 6.4E-02 | 2.8E-02 | 24   | 22   | 8    |
| TAG(50:2) | 3.6E-01 | 1.3E-01 | 24   | 2    | 4    | 5.7E-01 | 4.6E-01 | 24   | 20   | 3    |
| TAG(42:2) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 4    | 4    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 20   | 5    |
| TAG(48:1) | 1.2E-01 | 3.2E-02 | 24   | 1    | 3    | 1.4E-01 | 8.6E-02 | 24   | 20   | 5    |
| TAG(44:2) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 4    | 3    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 18   | 2    |
| TAG(54:3) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 14   | 3    | 1.2E-01 | 6.1E-02 | 24   | 0    | 7    |
| TAG(49:1) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 22   | 2    | 1.9E-01 | 1.4E-01 | 24   | 14   | 1    |
| TAG(51:2) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 11   | 2    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 0    | 2    |
| TAG(36:0) | 7.5E-01 | 3.5E-01 | 24   | 13   | 2    | 7.2E-01 | 5.9E-01 | 24   | 14   | 0    |
| TAG(40:1) | 7.4E-01 | 3.3E-01 | 24   | 13   | 2    | 9.6E-02 | 4.6E-02 | 24   | 16   | 0    |
| TAG(48:2) | 8.0E-01 | 4.2E-01 | 24   | 2    | 2    | 7.2E-01 | 6.0E-01 | 24   | 20   | 4    |
| TAG(51:1) | 1.0E+00 | 7.2E-01 | 24   | 2    | 1    | 1.8E-01 | 1.2E-01 | 24   | 23   | 5    |
| TAG(49:2) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 22   | 1    | 4.9E-01 | 3.7E-01 | 24   | 13   | 2    |
| TAG(42:1) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 14   | 1    | 1.3E-01 | 7.0E-02 | 24   | 14   | 1    |
| TAG(46:0) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 12   | 1    | 4.8E-01 | 3.5E-01 | 24   | 14   | 1    |
| TAG(44:1) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 12   | 1    | 6.7E-02 | 3.1E-02 | 24   | 13   | 1    |
| TAG(38:1) | 7.4E-01 | 3.1E-01 | 24   | 9    | 0    | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 8    | 2    |
| TAG(38:0) | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24   | 22   | 0    | 6.7E-02 | 3.1E-02 | 24   | 14   | 1    |
| AC(C20:0) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| DAG(34:3) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(43:3) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(44:4) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(47:0) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(53:3) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(54:2) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(55:1) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(55:3) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(56:1) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(57:1) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(57:3) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(58:1) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(58:2) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(58:3) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |
| TAG(58:4) | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. | n.d.    | n.d.    | n.d. | n.d. | n.d. |

Angehängte Tabelle 8: JTK\_CYCLE Ergebnisse der gesamt TAG-, DAG-, sowie AC-Spiegel. Zusätzlich wurde für bei den TAGs die Summer der TAGs aus Gruppe 1 (TG(36:0), TG(37:0), TG(38:0), TG(38:1), TG(39:0), TG(39:1), TG(40:0), TG(40:1), TG(40:2), TG(41:0), TG(41:1), TG(41:2), TG(42:0), TG(42:1), TG(42:2), TG(42:3), TG(43:0), TG(43:1), TG(43:2), TG(44:0), TG(44:1), TG(44:2), TG(44:3), TG(45:1), TG\_45:2), TG(45:3), TG(46:00), TG(46:1), TG(46:2), TG(47:1), TG(47:2), TG(34:0), TG(45:1), TG(45:2) und Gruppe 2 (TG(48:1), TG(48:2), TG(48:3), TG(48:4), TG(49:1), TG(49:2), TG(49:3), TG(50:1), TG(50:2), TG(50:3), TG(50:4), TG(50:5), TG(51:1), TG(51:2), TG(51:3), TG(52:1), TG(52:2), TG(52:3), TG(52:4), TG(52:5), TG(53:1), TG(53:2), TG(54:3), TG(56:3), TG(46:3), TG(46:4), TG(47:3), TG(48:0), TG(58:2)) gesondert, bei den ACs, die Summe der kurz, mittel- und langkettigen ACs betrachtet . Ein Metabolit wurde als rhythmisch angesehen (grün hervorgehoben), wenn sowohl BH.Q und ADJ.P bei einer Periodenlänge von 24h kleiner 0.05 war. BH.Q Benjamini-Hoechberg Falscherkennungsrate, ADJ.P korrigierter p-value, LAG Phase (Maximum) der Oszillation, AMP.rel relative Amplitude [%]

|                           | Kopf    |         |     |     |         | Körper  |         |     |     |         |
|---------------------------|---------|---------|-----|-----|---------|---------|---------|-----|-----|---------|
|                           | BH.Q    | ADJ.P   | PER | LAG | AMP.rel | BH.Q    | ADJ.P   | PER | LAG | AMP.rel |
| Gesamtsumme TAGs          | 2.7E-01 | 2.7E-01 | 24  | 14  | 0       | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 22  | 2       |
| Summe TAGs Gruppe 1       | 1.2E-02 | 7.7E-03 | 24  | 14  | 1       | 1.0E+00 | 1.0E+00 | 24  | 22  | 1       |
| Summe TAGs Gruppe 2       | 9.5E-02 | 7.9E-02 | 24  | 20  | 5       | 6.2E-02 | 3.1E-02 | 24  | 1   | 3       |
| Gesamtsumme DAGs          | 1.9E-05 | 1.9E-05 | 24  | 2   | 6       | 6.0E-04 | 6.0E-04 | 24  | 0   | 7       |
| Gesamtsumme Carnitine     | 1.3E-09 | 1.3E-09 | 24  | 3   | 9       | 5.2E-02 | 4.3E-02 | 24  | 15  | 1       |
| kurzkettige ACs           | 3.7E-13 | 2.5E-13 | 24  | 22  | 15      | 1.3E-03 | 8.9E-04 | 24  | 23  | 4       |
| mittel- & langkettige ACs | 1.1E-25 | 5.3E-26 | 24  | 4   | 23      | 2.4E-01 | 2.4E-01 | 0   | 0   | 0       |
| langkettige ACs           | 1.6E-34 | 2.6E-35 | 24  | 4   | 23      | 1.4E-08 | 4.5E-09 | 24  | 3   | 9       |

Angehängte Tabelle 9: JTK\_CYCLE Ergebnisse der quantifizierten CAR und AC Menge in WT<sub>cs</sub> unter LD- und DD- Bedingungen sowie für *per*<sup>01</sup> Fliegen unter LD- Bedingungen in Kopf- und Körperproben. Ein Metabolit wurde als rhythmisch angesehen (grün hervorgehoben), wenn sowohl BH.Q und ADJ.P bei einer Periodenlänge von 24h kleiner 0.05 war. BH.Q Benjamini-Hochberg Falscherkennungsrate, ADJ.P korrekierter p-value, LAG Phase (Maximum) der Oszillation, AMP.rel relative Amplitude [%]

|                                 | Spezies                            | BH.Q     | ADJ.P    | PER | LAG | AMP rel. |
|---------------------------------|------------------------------------|----------|----------|-----|-----|----------|
| Köpfe of WT <sub>cs</sub> in LD | Carnitine                          | 2.96E-07 | 2.73E-07 | 24  | 20  | 6.2      |
|                                 | Acetylcarnitine (AC(2:0))          | 9.74E-13 | 5.99E-13 | 24  | 4   | 17.7     |
|                                 | Propionylcarnitine (AC(3:0))       | 2.48E-09 | 2.10E-09 | 24  | 22  | 14.8     |
|                                 | Butyrylcarnitine (AC(4:0))         | 4.77E-22 | 1.84E-22 | 24  | 22  | 14.4     |
|                                 | Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))     | 2.66E-11 | 2.05E-11 | 24  | 4   | 21.9     |
|                                 | Tetradecanoylcarnitine (AC(14:0))  | 8.32E-12 | 5.76E-12 | 24  | 5   | 28.2     |
|                                 | Tetradecenoylcarnitine (AC(14:1))  | 8.14E-20 | 3.76E-20 | 24  | 4   | 26.5     |
|                                 | Palmitoylcarnitine (AC(16:0))      | 3.11E-36 | 4.78E-37 | 24  | 4   | 25.6     |
|                                 | Palmitoleoylcarnitine (AC(16:1))   | 2.91E-24 | 8.96E-25 | 24  | 4   | 25.0     |
|                                 | Stearoylcarnitine (AC(18:0))       | 7.13E-16 | 3.84E-16 | 24  | 3   | 13.1     |
|                                 | Oleoylcarnitine (AC(18:1))         | 2.22E-26 | 5.13E-27 | 24  | 4   | 23.4     |
|                                 | Octadecadienylcarnitine (AC(18:2)) | 1.32E-45 | 1.02E-46 | 24  | 2   | 33.4     |

|                                  | Spezies                            | BH.Q     | ADJ.P    | PER | LAG | rel. AMP |
|----------------------------------|------------------------------------|----------|----------|-----|-----|----------|
| Körper of WT <sub>cs</sub> in LD | Carnitine                          | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 14  | 1.0      |
|                                  | Acetylcarnitine (AC(2:0))          | 9.74E-13 | 5.99E-13 | 24  | 4   | 17.7     |
|                                  | Propionylcarnitine (AC(3:0))       | 5.20E-01 | 4.80E-01 | 24  | 22  | 1.5      |
|                                  | Butyrylcarnitine (AC(4:0))         | 2.08E-06 | 7.98E-07 | 24  | 23  | 8.0      |
|                                  | Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))     | 2.39E-01 | 1.84E-01 | 24  | 22  | 11.5     |
|                                  | Tetradecanoylcarnitine (AC(14:0))  | 1.10E-01 | 7.64E-02 | 24  | 18  | 5.3      |
|                                  | Tetradecenoylcarnitine (AC(14:1))  | 3.46E-01 | 2.93E-01 | 0   | 0   | 0.0      |
|                                  | Palmitoylcarnitine (AC(16:0))      | 3.63E-09 | 2.80E-10 | 24  | 3   | 9.9      |
|                                  | Palmitoleoylcarnitine (AC(16:1))   | 1.14E-04 | 5.27E-05 | 24  | 4   | 7.8      |
|                                  | Stearoylcarnitine (AC(18:0))       | 1.27E-02 | 6.84E-03 | 24  | 8   | 4.9      |
|                                  | Oleoylcarnitine (AC(18:1))         | 5.41E-07 | 1.67E-07 | 24  | 4   | 11.4     |
|                                  | Octadecadienylcarnitine (AC(18:2)) | 1.25E-08 | 1.92E-09 | 24  | 3   | 12.5     |

|                                 | Spezies                            | BH.Q     | ADJ.P    | PER | LAG | rel. AMP |
|---------------------------------|------------------------------------|----------|----------|-----|-----|----------|
| Köpfe of WT <sub>cs</sub> in DD | Carnitine                          | 8.07E-01 | 6.34E-01 | 24  | 21  | 1.9      |
|                                 | Acetylcarnitine (AC(2:0))          | 2.90E-02 | 1.78E-02 | 24  | 3   | 4.3      |
|                                 | Propionylcarnitine (AC(3:0))       | 5.80E-05 | 2.07E-05 | 24  | 4   | 13.7     |
|                                 | Butyrylcarnitine (AC(4:0))         | 1.84E-08 | 3.95E-09 | 24  | 5   | 11.0     |
|                                 | Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))     | 1.00E+00 | 9.93E-01 | 24  | 19  | 2.8      |
|                                 | Tetradecanoylcarnitine (AC(14:0))  | 2.13E-05 | 6.09E-06 | 24  | 18  | 12.7     |
|                                 | Tetradecenoylcarnitine (AC(14:1))  | 4.62E-01 | 3.30E-01 | 24  | 19  | 4.0      |
|                                 | Palmitoylcarnitine (AC(16:0))      | 4.62E-01 | 3.27E-01 | 24  | 19  | 2.5      |
|                                 | Palmitoleoylcarnitine (AC(16:1))   | 4.38E-04 | 1.88E-04 | 24  | 17  | 6.0      |
|                                 | Stearoylcarnitine (AC(18:0))       | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 2   | 1.8      |
|                                 | Oleoylcarnitine (AC(18:1))         | 1.00E+00 | 8.98E-01 | 24  | 18  | 0.9      |
|                                 | Octadecadienylcarnitine (AC(18:2)) | 1.55E-01 | 8.88E-02 | 24  | 3   | 4.4      |

|                                  | Spezies                            | BH.Q     | ADJ.P    | PER | LAG | rel. AMP |
|----------------------------------|------------------------------------|----------|----------|-----|-----|----------|
| Körper of WT <sub>cs</sub> in DD | Carnitine                          | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 8   | 1.9      |
|                                  | Acetylcarnitine (AC(2:0))          | 1.11E-04 | 2.39E-05 | 24  | 17  | 4.7      |
|                                  | Propionylcarnitine (AC(3:0))       | 1.34E-04 | 2.22E-05 | 24  | 7   | 13.6     |
|                                  | Butyrylcarnitine (AC(4:0))         | 3.88E-07 | 2.77E-08 | 24  | 5   | 18.3     |
|                                  | Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))     | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 16  | 12.1     |
|                                  | Tetradecanoylcarnitine (AC(14:0))  | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 16  | 8.1      |
|                                  | Tetradecenoylcarnitine (AC(14:1))  | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 16  | 3.7      |
|                                  | Palmitoylcarnitine (AC(16:0))      | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 8   | 4.3      |
|                                  | Palmitoleoylcarnitine (AC(16:1))   | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 16  | 3.9      |
|                                  | Stearoylcarnitine (AC(18:0))       | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 12  | 1.7      |
|                                  | Oleoylcarnitine (AC(18:1))         | 5.25E-01 | 2.25E-01 | 24  | 4   | 1.8      |
|                                  | Octadecadienylcarnitine (AC(18:2)) | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 8   | 5.4      |

|  | Spezies                            | BH.Q     | ADJ.P    | PER | LAG | rel. AMP |
|--|------------------------------------|----------|----------|-----|-----|----------|
| Köpfe of <i>per<sup>01</sup></i> in LD | Carnitine                          | 3.26E-03 | 1.16E-03 | 24  | 21  | 9.9      |
|  | Acetylcarnitine (AC(2:0))          | 1.05E-02 | 4.50E-03 | 24  | 3   | 11.4     |
|  | Propionylcarnitine (AC(3:0))       | 2.51E-02 | 1.26E-02 | 24  | 21  | 12.2     |
|  | Butyrylcarnitine (AC(4:0))         | 3.50E-04 | 7.50E-05 | 24  | 21  | 15.2     |
|  | Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))     | 9.58E-02 | 8.21E-02 | 24  | 17  | 5.2      |
|  | Tetradecanoylcarnitine (AC(14:0))  | 2.50E-04 | 3.57E-05 | 24  | 14  | 14.9     |
|  | Tetradecenoylcarnitine (AC(14:1))  | 6.09E-01 | 5.65E-01 | 24  | 15  | 5.5      |
|  | Palmitoylcarnitine (AC(16:0))      | 7.27E-02 | 5.20E-02 | 24  | 0   | 4.6      |
|  | Palmitoleoylcarnitine (AC(16:1))   | 7.62E-02 | 5.99E-02 | 24  | 14  | 5.7      |
|  | Stearoylcarnitine (AC(18:0))       | 1.61E-03 | 4.59E-04 | 24  | 0   | 6.2      |
|  | Oleoylcarnitine (AC(18:1))         | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 6   | 4.0      |
|  | Octadecadienylcarnitine (AC(18:2)) | 1.09E-06 | 7.79E-08 | 24  | 0   | 14.9     |

|   | Spezies                            | BH.Q     | ADJ.P    | PER | LAG | rel. AMP |
|---|------------------------------------|----------|----------|-----|-----|----------|
| Körper of <i>per<sup>01</sup></i> in LD | Carnitine                          | 9.70E-07 | 3.47E-07 | 24  | 21  | 6.4      |
|   | Acetylcarnitine (AC(2:0))          | 3.68E-07 | 1.05E-07 | 24  | 22  | 16.2     |
|   | Propionylcarnitine (AC(3:0))       | 1.43E-03 | 8.18E-04 | 24  | 14  | 8.0      |
|   | Butyrylcarnitine (AC(4:0))         | 4.82E-10 | 3.45E-11 | 24  | 22  | 19.3     |
|   | Dodecanoylcarnitine (AC(12:0))     | 6.48E-06 | 2.78E-06 | 24  | 2   | 13.9     |
|   | Tetradecanoylcarnitine (AC(14:0))  | 9.57E-03 | 7.28E-03 | 24  | 23  | 5.7      |
|   | Tetradecenoylcarnitine (AC(14:1))  | 3.80E-02 | 3.26E-02 | 24  | 23  | 10.1     |
|   | Palmitoylcarnitine (AC(16:0))      | 1.43E-03 | 7.59E-04 | 24  | 2   | 8.2      |
|   | Palmitoleoylcarnitine (AC(16:1))   | 1.00E+00 | 1.00E+00 | 24  | 20  | 3.7      |
|   | Stearoylcarnitine (AC(18:0))       | 9.57E-03 | 7.52E-03 | 24  | 2   | 6.4      |
|   | Oleoylcarnitine (AC(18:1))         | 3.21E-01 | 2.98E-01 | 24  | 4   | 7.5      |
|   | Octadecadienylcarnitine (AC(18:2)) | 1.59E-03 | 1.02E-03 | 24  | 3   | 11.9     |

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Professor Dr. Dr. Müller für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie anfertigen zu dürfen, bedanken. Das freundliche Miteinander am Lehrstuhl und der Austausch mit Ihnen und den Kollegen war mir stets ein inneres Lachsbrötchen.

Außerdem möchte ich mich bei Professorin Dr. Charlotte Helfrich-Förster, Professor Christian Wegener, Dr. Pamela Menegazzi und Dr. Dirk Rieger für die Hilfe bei der Planung des Projekts sowie bei der biologischen Auswertung der Ergebnisse bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Agnes Fekete, die mein Interesse an der Massenspektrometrie geweckt hat und mich stets gefordert und gefördert hat. Ohne deinen Input und deine unerschöpfliche Geduld, wär der Abschluss dieser Arbeit wohl niemals zustande gekommen.

Mein herzlicher Dank gilt des Weiteren der Balkongang – Stephi, Manu & Michel – sowie Dr. Markus Krischke die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass die Arbeit an diesem Projekt stets mit Freude verbunden war. Ohne euch hätte ich die Segel vermutlich weit vor Abschluss dieser Arbeit bereits gestrichen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen anderen Menschen danken, die niemals müde wurden, mir vorzubeten, dass es das Dümme wäre, was man machen kann, diese Arbeit nicht abzuschließen.

Vielen Dank auch an Frank dafür, dass du mich bei dir im Büro akzeptiert hast und stets die Fahne für die Wissenschaft und das wissenschaftliche Arbeiten hochgehalten hast.

Außerdem möchte ich mich bei Maria, Larissa, Franzi, Kelechi und Hego bedanken, die mich bei der Laborarbeit und Datenauswertung unterstützt haben und bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Neurobiologie und Genetik für die Hilfe bei der Drosoanzucht.

Abschließend gilt mein Dank Julia, Familie und Freunden dafür, dass ihr einfach die Besten seid und mich so akzeptiert wie ich halt bin! Und Numa, du warst die Größte!

# Lebenslauf





## Pubilkationen

Schäbler, S., Amatobi, K. M., Horn, M., Rieger, D., Helfrich-Förster, C., Mueller, M. J. & Fekete, A. (2020): Loss of function in the *Drosophila* clock gene *period* results in altered intermediary lipid metabolism and increased susceptibility to starvation. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 4939–4956 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03441-6>

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Characterization of the circadian Drosophila metabolome by applying mass- spectrometry-based approaches" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Waldbronn,

Place, Date

Signature

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Characterisierung des circadianen Drosophila Metaboloms unter Zuhilfenahme massenspektrometrischer Methoden" eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Waldbronn,

Ort, Datum

Unterschrift