Identifizierung des orthologen Ergothionein-Transporters des Zebrafischs, Etablierung und Phänotypisierung des Knockout-Modells

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Markus Bach

aus Stolberg

Köln, 2009

Berichterstatter:	Professor Dr. Günter Schwarz
	PD Dr. Michael Kroiher
	Professor Dr. Dirk Gründemann
Tag der mündlichen Prüfung:	28.10.2009

für meinen Opa

„The desire to take medicine is perhaps the greatest feature which distinguishes man from animal“

(Sir William Osler, 1849-1919)

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Professor Dr. Dirk Gründemann für das spannende und fordernde Thema meiner Doktorarbeit bedanken. Weiterhin bin ich für deine Hilfestellung und Diskussionen sehr dankbar und ich hoffe, dass mir mein nächster Chef ebenfalls solche Freiräume für Experimente lässt und mir soviel Vertrauen entgegenbringt.
Des Weiteren möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Günter Schwarz für die Betreuung und seine Hilfe danken.
Danken möchte ich ebenfalls PD Dr. Michael Kroiher für seine kurzfriste Unterstützung als Gutachter.
Mein Dank gilt auch PD Dr. Martin Gajewski für seine Unterstützung bei der Zebrafischhaltung und Etablierung der notwendigen Methoden. In diesem Zusammenhang danke ich ebenfalls Suma Choorapoikayil und Rabea Niemann.
Im Labor möchte ich mich vor allem bei Beatrix Steinrücken, Simone Kalis und Regina Baucks für ihre Hilfe bedanken. Weiter möchte ich meinen Kollegen und Freunden Gregor, Christian, Petra, David, Susi, Tim und allen Diplomanden und Praktikanten danken, die meine Arbeit zeitweise begleitet und den Laboralltag so angenehm gemacht haben.
Weiterhin danke ich den Mitarbeitern von Herrn PD Dr. Raimund Wagener für ihre Unterstützung, besonders Cristian Neacsu.
Der größte Dank gilt meiner Familie, die immer hinter mir steht und mich unterstützt. Danken möchte ich auch dem besten Bruder der Welt, Michael.
Vor allem möchte ich meiner Freundin Linda danken, die im Labor sowie in meinem Leben auch in den härtesten Zeiten immer für mich da ist. Ich liebe dich.

Mein letzter Dank gilt meinem Opa Willi Dremel, einem der wichtigsten Menschen in meinem Leben, der die Fertigstellung dieser Arbeit trotz eines langen Kampfes leider nicht mehr erleben konnte (*03.06.1928 - †28.05.2008). Ich vermisse dich sehr!

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Ergothionein 2

1.2 Der Ergothionein-Transporter 3

1.3 Lokalisation des humanen ETT 6

1.4 Assoziation des ETTh mit chronischen Erkrankungen 8

1.5 Zebrafisch (*Danio rerio*) 11

1.6 Ziel der Doktorarbeit 14

2 MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Material 16

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 16

2.1.2 Lösungen und Puffer 17

2.1.3 Enzyme 17

2.1.4 Kit-Systeme 18

2.1.5 Bakterienstämme und Kulturmedien 19

2.1.6 Expressionssystem 20

2.1.7 Oligonukleotide 21

2.1.8 Inkubationssiebchen für die *in situ* Hybridisierung 24

2.2 Molekularbiologische Methoden 25

2.2.1 DNA-Techniken 25

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* 25

2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion 26

2.2.1.3 Alkoholpräzipitation von DNA 27

2.2.1.4 Spot-Test 27

2.2.1.5 Restriktion von DNA 28

2.2.1.6 Gelelektrophorese von DNA 28

2.2.1.7 Extraktion von DNA aus präparativen Agarosegelen 29

2.2.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden 30

2.2.1.9 Auffüllen und phosphorylieren von DNA-Enden 30

2.2.1.10 DNA-Ligation 30

2.2.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 31
2.2.1.12 DNA-Sequenzierung nach Sanger 31
2.2.1.13 cDNA-Synthese durch reverse Transkription 32
2.2.2 RNA-Techniken 33
2.2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA 33
2.2.2.2 Gelelektrophorese von RNA 34
2.3 Mikrobiologische Methoden 36
2.3.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli* 36
2.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* 36
2.3.3 Elektrotransformation von *E. coli* 37
2.4 Zellbiologische Methoden 37
2.4.1 Kultivierung und Passage von HEK-293-Zellen 38
2.4.2 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen 38
2.5 Funktionelle Charakterisierung von Transportproteinen 39
2.5.1 Vorbereitung der Aufnahmeversuche 39
2.5.2 Aufnahmeversuche 39
2.5.3 Zellaufschluss 40
2.5.4 Proteinbestimmung mittels BCA-Tests 40
2.5.5 Radiotracer-Assay 41
2.6 LC-MS/MS-Analytik 42
2.6.1 Massenspektrometrie und HPLC 42
2.6.2 Kalibrierung und Vorbereitung der Proben 43
2.6.3 Auswertung 44
2.7 Protein-Analytik 44
2.7.1 Färbung der HEK-293-Zellen 45
2.7.2 Konfokal-Mikroskopie 46
2.8 *In situ* Hybridisierung 46
2.8.1 *In vitro* Transkription der RNA-Sonden 47
2.8.2 Southern Blot 48
2.8.3 Whole-mount *in situ* Hybridisierung 50
2.9 Zebrafisch-Methoden 52
2.9.1 Zebrafischhaltung und Gewinnung von Embryonen 52
2.9.2 Fixierung und Dechorionisierung von Embryonen 53

2.9.3 Gewinnung von genomischer DNA und Genotypisierung 53
2.9.4 Alcianblau-Färbung 54
2.9.5 Isolation von Geweben 55
2.9.6 Inkubation und Verfüttern von Zebrafischeiern 55
2.9.7 Generierung einer DR2 transgenen Fischlinie 56
2.9.8 Ac/Ds-System 57
2.9.9 Injektionen 58
2.10 Histologische Analyse 58
2.10.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung 59
2.10.2 Blutisolation und Pappenheimfärbung 59
2.11 Induktion von UV-Stress 59

3 ERGEBNISSE 61

3.1 Klonierung 61
3.2 Funktionelle Charakterisierung 63
3.2.1 Aktivitätstests für die Proteine DR1, DR2 und DR3 64
3.2.2 Ergothionein ist das physiologische Substrat des DR2-Transporters 66
3.2.3 Substratspektrum des DR2-Transporters 69
3.2.4 Natrium-Abhängigkeit 71
3.3 Lokalisation des DR2-Transporters 73
3.3.1 Lokalisation der DR2-mRNA mittels *in situ* Hybridisierung 73
3.3.2 Lokalisation der DR2-mRNA mittels RT-PCR 76
3.4 ET-Gewebekonzentrationen 78
3.4.1 *In vivo* Aktivität des DR2-Transporters 81
3.4.2 ET-Applikation 81
3.5 Knockout-Fische 83
3.5.1 Genetische Charakterisierung 84
3.5.2 ET-Gewebekonzentration im Knockout-Fisch 85
3.6 Phänotypisierung 89
3.6.1 Histologische Analyse 92
3.6.2 Analyse der Blutbildung und der Blutzellen 95
3.7 Induktion von oxidativem Stress durch UV-Licht 97
3.8 Promotoranalyse durch Erzeugung einer transgenen eGFP-Fischlinie 99

4 DISKUSSION 102

4.1 Identifikation des orthologen ETT im Zebrafisch 103

4.2 Etablierung des Knockout-Modells 105

4.3 Lokalisation des Ettzf 107

4.3.1 Mögliche Funktion von ET im Auge 107

4.3.2 Mögliche Funktion von ET im Gehirn 110

4.3.3 Mögliche Funktion von ET in Blutzellen 112

4.3.4 Mögliche Funktion von ET im Darm 114

4.4 Induktion von oxidativem Stress im *ettzf*$^{-/-}$-Modell 116

4.5 Ausblick 118

5 ZUSAMMENFASSUNG 120

6 ABSTRACT 121

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 122

8 LITERATURVERZEICHNIS 125

9 ANHANG 138

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Ergothionein 2
Abb. 2: Strukturformeln von Herzynin, Thiamazol und Tetraethylammonium 4
Abb. 3: Strukturformeln von Carnitin und Mildronat 5
Abb. 4: Gewebeverteilung der ETTh-mRNA 7
Abb. 5: Konzentrationen verschiedener Verbindungen in NPC-Patienten 11
Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum der SLC22-Familie 13
Abb. 7: Schematische Darstellung der Primerpositionen 54
Abb. 8: Schematische Darstellung des Promotorkonstrukts 57
Abb. 9: Experimenteller Aufbau zur Induktion von UV-Stress 60
Abb. 10: Lokalisation der DR1-3eGFP-Chimären in HEK-293-Zellen 62
Abb. 11: Relative Transporteffizienz der Transporter DR1-3 65
Abb. 12: Clearance des DR2-Transporters 66
Abb. 13: Sättigungskurve und Linearisierung der ET-Aufnahme 67
Abb. 14: Zeitverlauf der ET-Aufnahme 68
Abb. 15: Efflux von ET und Stachydrin aus HEK-293-Zellen 69
Abb. 16: Strukturformeln von Stachydrin, Glycinbetain und TEA 70
Abb. 17: Substratspektren von DR2 und ETTh 71
Abb. 18: Natrium-Abhängigkeit des DR2-Transporters 72
Abb. 19: *In situ* Hybridisierung I 74
Abb. 20: *In situ* Hybridisierung II 75
Abb. 21: *In situ* Hybridisierung III 76
Abb. 22: Lokalisation der DR2-mRNA im adulten Zebrafisch 77
Abb. 23: Normierung der ET-Gehalte über Prolin 79
Abb. 24: Korrelation zwischen Prolingehalt und Organgewicht 80
Abb. 25: ET-Gewebekonzentrationen 80
Abb. 26: Inkubation der Zebrafischeier in ET 82
Abb. 27: *In vivo* Aufnahme von ET 83
Abb. 28: Lokalisation der Virusinsertion 85
Abb. 29: Genotypisierung 85
Abb. 30: Chromatogramme aus wildtypischem und homozygotem Fisch 87

Abb. 31: ET-Gewebekonzentration von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen 88
Abb. 32: ET-Gehalt von wildtypischen und homozygoten Fischen 88
Abb. 33: Embryonalentwicklung von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen 0,75 - 16 hpf.....90
Abb. 34: Embryonalentwicklung von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen 24 - 96 hpf 91
Abb. 35: Adulte Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fische 92
Abb. 36: Mikroskopische Analyse der Linsen 93
Abb. 37: Histologische Analyse des Auges 93
Abb. 38: Histologische Analyse von Niere, Gehirn, Darm und Kiemen 94
Abb. 39: Vergleich der Blutzirkulation in Larven.....96
Abb. 40: Vergleich von reifen, zirkulierenden Blutzellen 97
Abb. 41: Induktion von Katarakt durch UVB-Licht.....98
Abb. 42: Induktion von Katarakt durch UVA-Licht.....99
Abb. 43: Transgene Fischlinie 100
Abb. 44: Effekt des elektromagnetischen Spektrums auf das Auge.....109
Abb. 45: Relative ETTh-Expression in neuronalen Geweben.....111
Abb. 46: Sequenz des DR2-Transporters mit Virusinsertion.....138
Abb. 47: Putativer Promotorbereich des DR2-Transporters.....138
Abb. 48: Alignment der Transporter ETTh, CTTh, DR1, DR2 und DR3.....140

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Homologie der orthologen Transporter 13
Tab. 2: Restriktionsendonukleasen 17
Tab. 3: Enzyme für die Klonierung....18
Tab. 4: Enzyme für RNA-Isolation, cDNA-Synthese und *in situ* Hybridisierung 18
Tab. 5: Enzyme für die PCR....18
Tab. 6: Kit-Systeme....19
Tab. 7: Primer für die Klonierung 22
Tab. 8: Primer für die Sondensynthese für *in situ* Hybridisierungen....22
Tab. 9: Primer für die eGFP-Konstrukte 23
Tab. 10: Primer für die RT-PCR zum Nachweis der Transporter 23
Tab. 11: Primer für die Sequenzierung....24
Tab. 12: Primer für die Genotypisierung....24
Tab. 13: Primer für die Klonierung des DR2-Promotorbereichs....24
Tab. 14: LC-Gradient....43
Tab. 15: Muttermassen, Fragmente und Kollisionsenergien der Analyten 43
Tab. 16: Laser des Konfokalmikroskops 46
Tab. 17: Verwendete Fischlinien 53
Tab. 18: Parameter der Injektionsnadeln 58

1 Einleitung

Oxidativer Stress spielt bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten eine entscheidende Rolle und stellt eine Stoffwechsellage dar, bei der eine über das physiologische Maß hinaus hohe Menge an reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS; reactive oxygen species) gebildet wird oder diese nicht mehr adäquat aus dem Organismus entfernt werden kann. So konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress bei einer Vielzahl von Erkrankungen (Diabetes mellitus, Alzheimer, Krebs) (Giugliano et al., 1996; Khandrika et al., 2009; Mark et al., 1996) ernsthafte Störungen des Metabolismus und Schäden an biologischen Makromolekülen verursachen kann (Mates et al., 1999). Auslöser für oxidativen Stress können verschiedener Natur sein, z.B. Umweltgifte, Medikamente oder Alkoholkonsum. (Bondy, 1992). Die Folgen können je nach Intensität des oxidativen Stresses sehr unterschiedlich ausfallen und alle Organe gleichermaßen betreffen.

Der Organismus steht diesen Gefahren allerdings nicht machtlos gegenüber, sondern ist normalerweise mit einer Vielzahl protektiver Enzyme (z.B. Superoxid-Dismutase, Glutathionperoxidase und Katalase) und Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure, Glutathion, α-Tocopherol) auf die Abwehr vorbereitet (Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999; Cullen et al., 2003; Jacob, 2006; Mates et al., 1999). Einige dieser Abwehrmechanismen sind über viele Spezies hinweg hochkonserviert. Sind diese Abwehrmechanismen jedoch defekt oder fehlen in ausreichender Menge, kann das für den Organismus Gewebeschäden zur Folge haben.

Manche der protektiven Verbindungen, wie Vitamine, können von den meisten Organismen nicht selbst synthetisiert werden und müssen daher über die Nahrung aufgenommen werden. Einige dieser natürlichen Verbindungen, die für einen antioxidativen Schutz in Frage kommen, sind zwar seit geraumer Zeit bekannt, dennoch ist die physiologische Funktion noch völlig unklar (Jacob, 2006). Dies führt zu der Frage, ob ein natürlicher und permanenter Schutz durch diese Verbindungen eine ausreichende Minimierung des oxidativen Stresses bewirken bzw. die schädlichen Auswirkungen und somit den möglichen Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann.

1.1 Ergothionein

Eine solche natürliche Verbindung ist das Ergothionein (ET). ET ist bereits seit 1909 bekannt und konnte erstmals aus dem Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) isoliert werden. Da es ausschließlich von Pilzen (Aspergillus-, Alternaria- und Penicillium-Arten) und einigen Mykobakterien synthetisiert werden kann, sind alle höheren Organismen für diese Verbindung auxotroph und auf eine Aufnahme über die Nahrung angewiesen (Melville et al., 1957). Chemisch gesehen handelt es sich um das Betain der Aminosäure L-Histidin die an der zweiten Position des Imidazolrings einen Schwefelsubstituenten trägt (Barger und Ewins, 1913). ET liegt in einem Thiol-Thion-Tautomerie-Gleichgewicht vor, in dem unter physiologischen Bedingungen die Thion-Form überwiegt (Abb. 1). Diese Eigenschaft besitzen andere Thiole, wie Glutathion oder Cystein nicht, was bei physiologischem pH-Wert zur Autoxidation führt. Weiterhin ist ET in der Lage ROS abzufangen, wie z.B. Hydroxyl-Radikale (·OH), Hypochlorige Säure (HOCl), Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$), und es ist ein Inhibitor für die Fe^{2+}- und Kupfer-Ionen-abhängige Entstehung von ·OH aus H_2O_2 (Fenton-Reaktion) (Akanmu et al., 1991; Hartman, 1990; Rougee et al., 1988). Außerdem kann ET Nitritverbindungen abfangen, wie Peroxynitrit (ONOO-), das an der Entstehung von chronischen Erkrankungen beteiligt zu sein scheinen (Dijkstra et al., 1998). ET verhindert z.B. die Nitrierung von Tyrosin sowie die Inaktivierung von α1-Antiproteinase durch Peroxynitrit. (Aruoma et al., 1997).

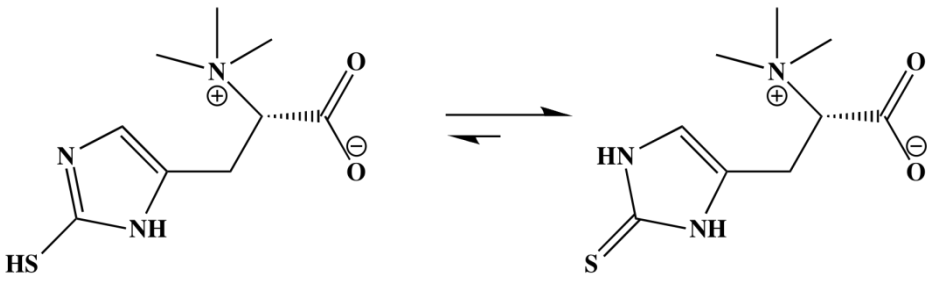


Abb. 1: Strukturformel von Ergothionein
Dargestellt sind die Thiol- (links) und die Thion-Form (rechts). Unter physiologischen Bedingungen ist das Gleichgewicht zur Thion-Form verschoben.

Die Basis für die Synthese von ET in Pilzen und Mykobakterien bildet die Aminosäure Histidin, während das Schwefelatom von einem Cystein zur Verfügung gestellt wird (Genghof und Van Damme, 1968; Melville et al., 1957). Die Konzentrationen, die man in einigen Pilzen findet, liegen zwischen 0,1 - 2 mg/g Trockenmasse. Welche Funktion ET in

Pilzen und Bakterien übernimmt ist noch unklar. Sicher ist, dass die Verbindung auch von höheren Pflanzen über die Wurzeln aktiv aufgenommen werden kann und so in die Nahrungskette gelangt.

Nach der Aufnahme über die Nahrung erfolgt die Resorption aus dem Darm schnell und ohne Metabolisierung. Die Plasmahalbwertszeit wird für Ratten mit 10 - 18 min angegeben (Mayumi et al., 1978; Melville, 1958). Eine Ausscheidung über den Urin konnte nicht nachgewiesen werden (Lawson et al., 1950; Melville, 1958). Die Verteilung in humanen Geweben zeigt große Unterschiede. Besonders hohe Konzentrationen findet man z.B. im Knochenmark, in den Erythrozyten und im Auge (Hartman, 1990). Aufgrund seiner Hydrophilie ist ET nicht in der Lage eine intakte Biomembran zu passieren, was einen aktiven Transport erforderlich macht (Gründemann et al., 2005).

1.2 Der Ergothionein-Transporter

Der humane Ergothionein-Transporter (ETT) ist ein 551 Aminosäuren langes Membranprotein und das vierte Mitglied der SLC22-Familie (Solute Carrier, Gensymbol *SLC22A4*). Kloniert wurde dieser bereits 1997 aus der humanen Leber (Tamai et al., 1997). Drei Jahre später erfolgte die Klonierung der orthologen Transporter aus Ratte und Maus (Tamai et al., 2000; Wu et al., 1998).

Da die Transporter dieser Familie wasserlösliche Verbindungen transportieren, wird diese auch als Amphiphilic Solute Facilitator (ASF) bezeichnet (Schömig et al., 1998a; Schömig et al., 1998b). Die Familie umfasst Transporter, die organische Anionen, Kationen, sowie Zwitterionen transportieren und trotz der Unterschiede in ihren Substratspezifitäten Gemeinsamkeiten aufweisen, wie z.B. die aus zwölf α-helikalen Transmembrandomänen bestehende Topologie. N- und C-Terminus sind dabei immer intrazellulär lokalisiert. Man unterscheidet in der Familie drei Untergruppen, die als Novel Organic Cation Transporter (OCTN), Organic Cation Transporter (OCT) und Organic Anion Transporter (OAT) bezeichnet werden (Abb. 6). Zu der Untergruppe der Novel Organic Cation Transporter wird auch der ETT (OCTN1) gezählt. Die leicht verwirrende und nach heutigem Wissensstand falsche Bezeichnung OCTN1 geht auf die Zeit zurück, in der das physiologische Substrat Ergothionein noch nicht bekannt war und Tetraethylammonium (TEA) als Leitsubstrat galt (Tamai et al., 1997). Bekannt war, dass der Transporter eine

geringe Affinität zu Carnitin aufweist, was fälschlicherweise zu der Bezeichnung „low-affinity“ Carnitin-Transporter führte (Xuan et al., 2003). Die Bezeichnung OCTN1 suggeriert, dass der ETT ein unspezifischer Transporter für organische Kationen ist. Die Entdeckung des physiologischen Substrates, die mit Hilfe einer neu entwickelten LC-MS-Strategie (liquid chromatography mass spectrometry) möglich wurde, machte allerdings deutlich, dass es sich um einen hochspezifischen Transporter handelt (Gründemann et al., 2005). Dieser Befund wurde durch die Untersuchung des Substratspektrums bestätigt, die zeigte, dass weder das strukturverwandte Thyreostatikum Thiamazol noch die Verbindung Herzynin, der lediglich der Schwefelsubstituent fehlt, nennenswert transportiert werden (Abb. 2) (Grigat et al., 2007). Für den Transport von ET nutzt der Transporter den nach intrazellulär gerichteten Na^+-Gradienten.

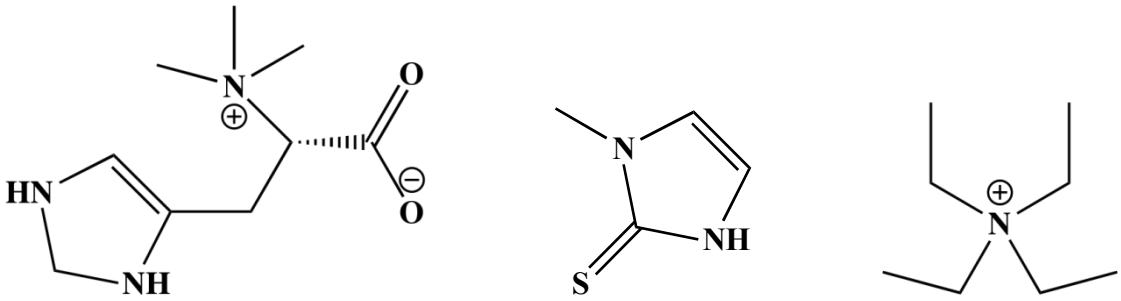


Abb. 2: Strukturformeln von Herzynin, Thiamazol und Tetraethylammonium

Der nah verwandte Carnitin-Transporter CTT (Gensymbol: *SLC22A5*, OCTN2) wurde erstmals aus der Rattenniere kloniert und vorläufig als UST (Unspecified Substrate Transporter) bezeichnet, da das Substrat unbekannt war (Schömig et al., 1998). Für diesen Transporter wurde zuerst das Kation TEA als Substrat identifiziert, was die Verwendung für die anfängliche Charakterisierung des ETT erklärt (Abb. 2). Es folgten mehrere andere kationische Verbindungen, für die eine Transportaktivität nachgewiesen werden konnte, was dem OCTN2h die Bezeichnung „polyspezifischer organischer Kationen-Transporter“ einbrachte (Wu et al., 1999). Auch nach der Entdeckung, dass der OCTN2h mit deutlich höherer Effizienz Carnitin und auch das kurzkettige Acylcarnitin transportiert, wird von einigen Autoren noch Wert darauf gelegt, dass OCTN2 neben einem Carnitin-Transporter auch ein polyspezifischer Kationen-Transporter ist (Ohashi et al., 2001; Wu et al., 1999). Der OCTN2h nutzt ebenfalls den nach intrazellulär gerichteten Natriumgradienten für den Carnitin/Na^+-Kotransport (Tamai et al., 1998). Nur Carnitin zeigt eine Na^+-Abhängigkeit,

während die anderen organischen Kationen unabhängig von der Na^+-Konzentration transportiert werden. Die Transportaktivität für andere Verbindungen ist im Vergleich zu Carnitin jedoch zu vernachlässigen und die einzige Verbindung, die ebenso gut transportiert wird und gleichzeitig eine Na^+-Abhängigkeit zeigt, ist die dem Carnitin verwandte Verbindung Mildronat, das zur Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt werden kann (Abb. 3) (Grigat et al., 2009).

Abb. 3: Strukturformeln von Carnitin und Mildronat

Mildronat führt zu einer Verringerung des Carnitingehalts der Zelle und vermindert so die Oxidation von Fettsäuren. Carnitin sorgt dafür, dass Fettsäuren das Innere der Mitochondrien erreichen und dort der β-Oxidation zugeführt werden können (Bremer, 1983). Die Hydroxylgruppe des, aus der Aminosäure Lysin synthetisierten, zwitterionischen Carnitins wird mit der Acylgruppe, der durch Koenzym A aktivierten Fettsäure, verbunden, wobei Acylcarnitin entsteht. Als Acylcarnitin wird die Fettsäure über einen Carnitin-Acyl-Kotransporter auf die Matrixseite der Mitochondrien transportiert. Der Carnitin-Acyl-Kotransporter funktioniert als Antiporter mit Carnitin, das auf der Matrixseite entsteht, wenn die Acylgruppe wieder auf Koenzym A übertragen wird (Fritz und Yue, 1964). Für den Carnitin-Transporter sind Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) bekannt, die zu einer vollständigen Inaktivierung des Carnitin-Transports führen (Nezu et al., 1999; Tang et al., 1999). Diese autosomal-rezessiv vererbbare Krankheit führt zu einer systemischen Carnitindefizienz, die durch fortschreitende Kardiomyopathie und Skelettmyopathie gekennzeichnet ist (Karpati et al., 1975; Stanley et al., 1990; Treem et al., 1988). Symptome sind schwere Muskelkrämpfe besonders nach Fasten, körperlicher Anstrengung oder fettreicher Ernährung, da die Fettsäureoxidation unter diesen Bedingungen der wichtigste energieliefernde Prozess ist.
Ein weiterer Vertreter der OCTNs (OCTN3) akzeptiert ebenfalls Carnitin als Substrat. Im Vergleich zu OCTN2 ist die Affinität des OCTN3 jedoch deutlich geringer. Bis jetzt konnte OCTN3 nur in der Maus nachgewiesen werden (Tamai et al., 2000).

Somit haben die Transporter OCTN1 und OCTN2 jeweils ein spezifisches Substrat, das sie eindeutig voneinander abgrenzt. Daher sollten die ungenauen und veralteten Literaturbezeichnungen OCTN1 durch Ergothionein-Transporter (ETT) und OCTN2 durch Carnitin-Transporter (CTT) ersetzt werden (Grigat et al., 2009; Gründemann et al., 2005).

1.3 Lokalisation des humanen ETT

Die Lokalisation des Transporters lässt vermuten, dass es sich bei Ergothionein, im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden hydrophilen Antioxidantien Ascorbinsäure oder Glutathion, nicht um ein „Breitband-Antioxidans“ handelt, sondern dass es in unterschiedlichen Geweben spezifische Aufgaben übernimmt. Die Verteilung von ET zeigt einige Speziesunterschiede, die darauf hindeuten, dass der Nutzen von ET für die Organismen unterschiedlich ist (Melville, 1958).

Durch Real-Time-PCR ist eine genaue Quantifizierung der Transporterexpression möglich (Abb. 4) (Grigat et al., 2007; Gründemann et al., 2005). Auffällig ist die hohe Expression des Transporters im Ileum (Resorption), in der Niere (Rückresorption) und im Knochenmark. In adulten humanen Leber findet man kein Signal für den ETT, während man in Maus und Ratte die mRNA für den orthologen Transporter nachweisen kann (Tamai et al., 2000; Wu et al., 2000). Das Signal im Knochenmark ist zu einem großen Teil auf die Expression des ETT in kernhaltigen $CD71^{+}$-Zellen zurückzuführen (Pronormoblasten und basophile Normoblasten). Dieses Oberflächen-Antigen entspricht genetisch dem Transferrin-Rezeptor, der während der Hämatopoese das Eisen für die Hämoglobinsynthese in den Zellen bereitstellt (Okumura et al., 1992). In den reifen Erythrozyten nimmt die ET-Konzentration im Laufe der Lebensdauer der Zelle nicht ab (Hartman, 1990). Die Konzentration in reifen Erythrozyten liegt zwischen 0,1 - 1,0 mmol/l, während die Plasmakonzentration zwischen 0,4 - 1,7 µmol/l liegt (Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999). Man findet nicht nur zwischen verschiedenen Geweben große Unterschiede in der ET-Konzentration, sondern, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Ernährung, auch zwischen verschiedenen Spezies. So ist die intrazelluläre ET-Konzentration in Erythrozyten des Schweins ca. 5,5-mal höher als in denen des Rinds (Shires et al., 1997). ET besitzt eine hohe Affinität zu Hämproteinen und bildet somit vermutlich einen Schutz für Hämoglobin vor oxidativen Schäden (Arduini et al., 1992;

Mann und Leone, 1953). *In vitro* Experimente zeigten, dass ET nicht mit nativem Hämoglobin reagiert, jedoch reagiert es mit hypervalenten Eisenkomplexen (Ferrylhämoglobin, $HbFe^{IV}=O$), einem reaktiven Zwischenprodukt bei der autokatalytischen Reaktion von nativem Hämoglobin zu Methämoglobin (Everse und Hsia, 1997). ET könnte somit das reaktive Zwischenprodukt abfangen und vor Ferrylhämoglobin-induzierten Schäden der Zelle schützen (Gründemann et al., 2005).

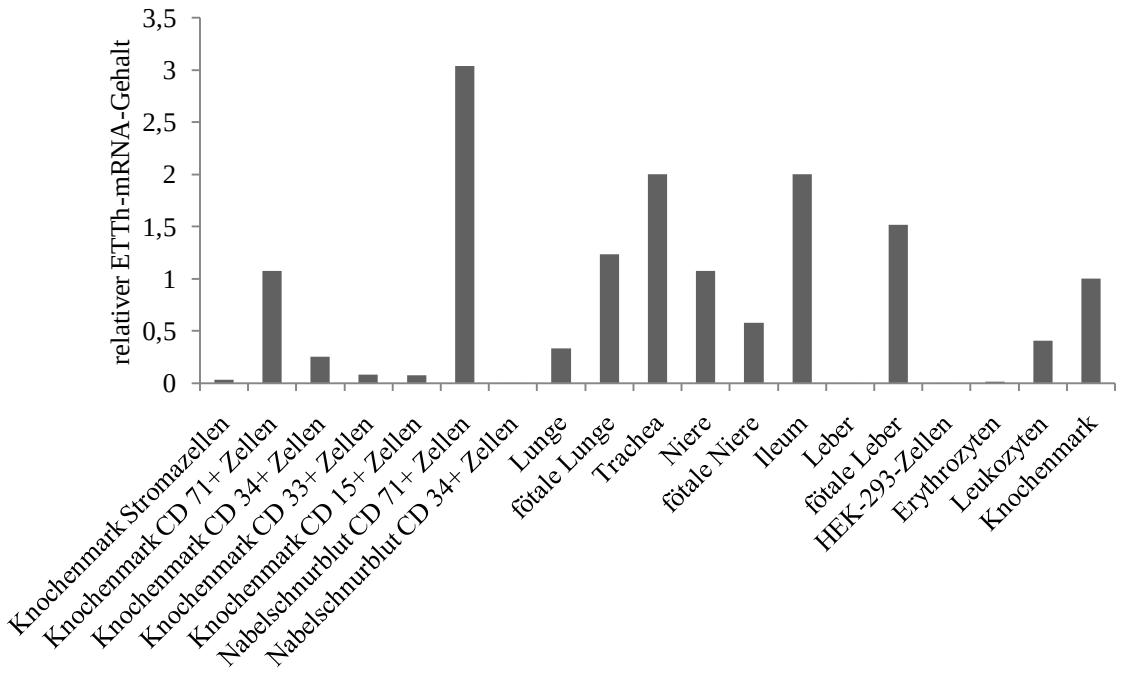


Abb. 4: Gewebeverteilung der ETTh-mRNA
Real-Time-PCR-Analyse nach dem TaqMan™ Verfahren. Dargestellt ist der Gehalt der ETTh-mRNA relativ zum Gehalt des Knochenmarks. Oberflächen-Antigene: $CD71^+$ Vorläuferzellen der Erythrozyten, $CD33^+$ Promyelozyten, $CD34^+$ Myeloblasten, $CD15^+$ Neutrophile und Eosinophile. Verändert nach (Gründemann et al., 2005).

Des Weiteren findet man eine starke Expression des Transporters in der fötalen Leber, jedoch nicht in der adulten Leber. Da die Hämatopoese des Embryos in der Leber stattfindet und noch nicht im Knochenmark, ist dieses Signal ebenso wie das Signal aus dem Nabelschnurblut, auf $CD71^+$-Zellen zurückzuführen. Durch Antikörperfärbung gegen den ETTh konnte gezeigt werden, dass die Expression in der Trachea vermutlich nicht auf eine Lokalisation im Gewebe, sondern auf eingewanderte $CD14^+$-Zellen zurückzuführen ist (Horvath et al., 2007). Mittels quantitativer Real-Time-PCR konnte man eine Expression in diesen Immunzellen nachweisen (Monozyten und Makrophagen, CD14), allerdings nicht in B- oder T-Lymphozyten (CD4 bzw. CD8) (Tokuhiro et al., 2003).

Neben der Expression des Transporters kann man das Substrat ET in Geweben nachweisen, die besonders hohem oxidativem Stress ausgesetzt sind. So findet man z.B. hohe ET-Konzentrationen in der Samenflüssigkeit und in den Augenlinsen, jedoch mit deutlichen Speziesunterschieden (Leone, 1954; Mann und Leone, 1953; Shires et al., 1997). In der Augenlinse des Rinds findet man z.B. eine 35-mal höhere ET-Konzentration im Vergleich zur Glutathion-Konzentration, während die ET-Konzentration in der Linse des Schweins im Vergleich zur Glutathion-Konzentration 45-mal niedriger ist. Die ET-Konzentration in der Linse des Rinds liegt sogar bis zu 250-mal höher als die ET-Konzentration in der Linse des Schweins (Shires et al., 1997).

Auch die ET-Konzentrationen der Samenflüssigkeit zeigen große Speziesunterschiede. Während die Samenflüssigkeit des Ebers (0,13 - 11 mM) und des Hengstes (0,4 mM) hohe Konzentrationen aufweist, findet man dies z.B. beim Menschen oder Bullen nicht (Kosiniak, 1975; Leone, 1954; Mann und Leone, 1953; Tischner et al., 1974). Die Seminalflüssigkeit scheint daher in einigen Spezies ein weiterer Wirkungsort von ET zu sein. Betrachtet man die molekulare Zusammensetzung von Augen und Spermatozoen, so weisen sie eine besondere Gemeinsamkeit auf. Beide besitzen einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, poly unsaturated fatty acids), die äußerst anfällig für Lipidperoxidation durch ROS sind (Parks und Lynch, 1992; Stone et al., 1979; White, 1993).

Durch die hohe Spezifität des ETTs zu seinem Substrat kann das ETT-Protein oder die -mRNA als molekularer Marker für ET-Aktivität genutzt werden. Dies grenzt die möglichen Wirkungsorte ein und erleichtert die Analyse der physiologischen Funktion (Grigat et al., 2007; Gründemann et al., 2005).

1.4 Assoziation des ETTh mit chronischen Erkrankungen

Nicht nur Mutationen des CTTh können mit Krankheiten assoziiert werden, sondern auch Mutationen des ETTh scheinen bei der meist multifaktoriellen Entstehung einiger chronischer Erkrankungen eine Rolle zu spielen. So konnte durch Sequenzierung des als Zytokin-Gencluster bezeichneten Bereichs, in dem neben ETT und CTT auch der inhibitorische Transkriptionsfaktor RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) lokalisiert ist, unabhängig von mehreren Arbeitsgruppen SNPs gefunden werden, die mit chronisch

entzündlichen Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden konnten (Ma et al., 1999; Peltekova et al., 2004; Rioux et al., 2001). SNPs, die im Promotorbereich des ETTh oder in exonischen Bereichen lokalisiert sind, konnten unabhängig in mehreren Studien mit der Entstehung von Morbus Crohn bei Erwachsenen sowie bei Kindern assoziiert werden (Cucchiara et al., 2007; Gazouli et al., 2005; Newman et al., 2005; Torok et al., 2005). Morbus Crohn zählt wie die ulzerative Kolitis zu den entzündlichen Darmerkrankungen (IBD: inflammatory bowel disease), für die es ebenfalls eine Prävalenz, bei vorliegenden Mutationen im ETT, gibt (Waller et al., 2006). Morbus Crohn ist eine chronisch-granulomatöse Entzündung, die den gesamten Magen-Darm-Trakt betreffen kann. Beschrieben wurde die Erkrankung erstmals von dem Arzt Burrill Crohn. Die genaue Pathogenese ist noch unklar, jedoch deutet die familiäre Prädisposition auf genetische Faktoren hin. Bei der Therapie werden Corticoide verwendet, was auf immunologische Einflüsse hindeutet.

Die exonische Punktmutation im humanen ETT an Position 1672 führt zum Austausch von Leucin gegen Phenylalanin. Die Transportleistung erhöht sich durch diese Mutation ca. um den Faktor zwei (Bach et al., Manuskript eingereicht). Wie dies mit der Pathogenese in Verbindung steht ist noch unklar.

Eine Transition an Position 1531 führt zum Austausch eines Glycins gegen ein Glutamat an Position 462 der Aminosäuresequenz. Diese Mutation führt zu einem Verlust der Transportaktivität für TEA (Kawasaki et al., 2004) und ist auch nach eigenen Messungen für den ET-Transport vollkommen inaktiv (Bach et al., Manuskript eingereicht). Aufgrund der Seltenheit konnte für diese Mutation bis jetzt keine Assoziation mit chronisch entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden.

Neben den entzündlichen Darmerkrankungen konnte auch ein Zusammenhang mit Typ-1-Diabetes nachgewiesen werden (Santiago et al., 2006). Aber nicht nur Mutationen im ETT können mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung gebracht werden, sondern auch ein verminderter ET-Gehalt in Geweben. Im diabetischen Rattenmodell konnte daraufhin gezeigt werden, dass durch Injektion von ET embryonale Fehlbildungen, die durch Glukose erzeugte Radikale entstehen, vermindert werden (Guijarro et al., 2002).

Des Weiteren konnte eine verminderte ET-Konzentration bei Patienten mit Katarakt (Grauer Star) beobachtet werden (Shukla et al., 1981). Diese Reduktion der Konzentration geht mit einer Abnahme des Glutathion- und Ascorbinsäure-Spiegels einher. In Hühnerküken, bei denen durch Injektion von Hydrocortison in das Ei künstlich Katarakt

induziert wurde, konnte eine Trübung der Linse durch spätere Injektion von ET bei manchen Versuchstieren ganz verhindert oder zumindest abgeschwächt werden (Nishigori 1984). Weiterhin gibt es Befunde, die *in vitro* einen Schutz vor UV-induzierter Lipidperoxidation in Hautzellen zeigen (Dong et al., 2007; Markova et al., 2009; Obayashi et al., 2005).

Von J. Suh, aus der Arbeitsgruppe von B. Ames (Children's Hospital of Oakland Research Institute), wurden uns freundlicherweise Daten zur Verfügung gestellt, die eine Erkrankung beschreiben, bei der ebenfalls eine verminderte ET-Konzentration nachgewiesen werden konnte. Abbildung 5 zeigt die Konzentrationen von verschiedenen Verbindungen, die in Erythrozyten von vier Patienten gemessen wurden, die an Niemann-Pick Typ C (NPC) leiden. NPC ist eine autosomal-rezessive, neurodegenerative Störung der Cholesterin-Verteilung in sauren Kompartimenten der Zelle. Die Prävalenz der Erkrankung liegt bei 1/120000 – 1/150000 (Lloyd-Evans et al., 2008; te Vruchte et al., 2004; Vanier und Millat, 2003). Bei ca. 95 % der Patienten liegt eine Mutation in dem Gen für das Transmembranprotein *NPC1* vor, die zu einem gestörten endozytotischen Transport lysosomalen Cholesterins und Fettsäuren führt und somit eine Akkumulation in den Lysosomen zur Folge hat. Die anfängliche Manifestation der Krankheit kann pulmonalen, hepatischen, psychiatrischen oder neurologischen Ursprung haben (Liu et al., 2007). Erste Messungen der ET-Konzentration in Erythrozyten zeigten, dass nur noch 5 % der normalen ET-Konzentration bei diesen Patienten nachweisbar ist. Die ET-Reduktion geht einher mit einer schwachen Abnahme von GSH (reduziertes Glutathion) sowie einer starken Reduktion von GSSG (oxidiertes Glutathion) und SAH (S-Adenosylhomocystein) (Abb. 5).

Eine kurative Therapie von NPC gibt es zurzeit noch nicht, jedoch werden verschiedene Angriffspunkte für eine palliative Therapie in Betracht gezogen. Der erste Ansatz ist eine reversible Inhibition der Glucosylceramid-Synthase durch Miglustat, welche den ersten Schritt der Glucosphingolipid-Synthese katalysiert (Lachmann et al., 2004; Patterson et al., 2007). Eine andere Alternative ist die Aktivierung der Ausscheidung von Cholesterin-Ablagerungen aus den Zellen und ein Abbau über natürliche Mechanismen. So konnte im NPC-Mausmodell gezeigt werden, dass die Gabe von Cyclodextrin zu einem gesteigerten Auswärtstransport von Lipid-Einlagerungen führt (Liu et al., 2009).

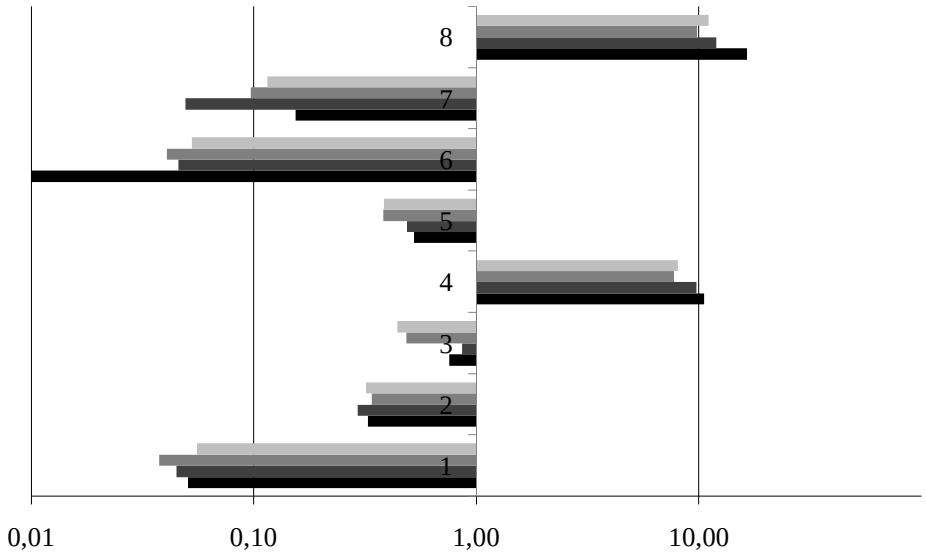


Abb. 5: Konzentrationen verschiedener Verbindungen in NPC-Patienten
Gemessen wurden die Verbindungen in Erythrozyten, von vier Nieman-Pick Typ C Patienten. Dargestellt ist die Abweichung vom geometrischen Normwert. 1: Ergothionein, 2: Glutamin, 3: Glutamat, 4: Glycin, 5: reduziertes Glutathion GSH, 6: oxidiertes Glutathion GSSG, 7: S-Adenosylhomocystein, 8: Threonin. Verändert nach D. Gründemann.

1.5 Zebrafisch (*Danio rerio*)

Der Zebrafisch, zoologisch korrekt Zebrabärbling, ist ein bis zu 6 cm großer, tropischer Süßwasserfisch aus der Gruppe der Kärpflinge (*Cyprinidae*), der sich in den letzten Jahren zu einem immer wertvolleren Modellorganismus entwickelt hat. In den Anfängen waren es vor allem Entwicklungsbiologen, die die hohe Nachkommenzahl und die Entwicklung *ex utero* für ihre Untersuchungen nutzten. Die Embryonalentwicklung erfolgt sehr schnell und es dauert nur 5 Tage von der Befruchtung der Eizelle bis zum freischwimmenden Fisch (Kimmel et al., 1995; Kimmel et al., 1990). Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms wurde der Zebrafisch auch zunehmend für medizinische Fragestellungen interessant, da es auch zwischen Fisch und Mensch viele orthologe Gene gibt. Weiterhin sind viele Prozesse im Fisch denen im Menschen sehr ähnlich. So ist z.B. die Blutbildung beider Organismen gut vergleichbar. Das Blut wird zwar in unterschiedlichen Organen gebildet, im adulten Fisch in der Niere und im Menschen im Knochenmark, jedoch unterscheiden sich die Zusammensetzung und die Regulation nur geringfügig (Song et al., 2004). Ein weiterer Vorteil bei der Untersuchung von Mutationen ist, dass der Zebrafischembryo im Gegensatz zu anderen Wirbeltiermodellen innerhalb der ersten 9

Tage kein intaktes Herz-Kreislaufsystem benötigt, da der Sauerstoff über Diffusion in den Embryo gelangt (Chen et al., 1996; Fishman und Stainier, 1994). Dadurch sind Untersuchungen selbst bei schweren kardiovaskulären Defekten oder fehlender Blutbildung möglich, ohne dass Nebeneffekte des präfinalen Embryos berücksichtigt werden müssen.

Das Genom umfasst 1,52 x 10^9 Basenpaare und ist auf 25 Chromosome verteilt, die für ca. 17000 Proteine kodieren. Durchsucht man das Genom des Zebrafischs nach orthologen Transportern für den humanen ETT und CTT, so findet man drei potentielle Kandidaten. Der Grund, dass man für viele Mammalia-Gene zwei Kopien im Zebrafisch findet, ist eine Genomduplikation im Verlaufe der Evolution. Man konnte mit Hilfe der hochkonservierten HOX-Cluster (Homöobox) nachweisen, dass eine Genomduplikation vor ca. 420 Mio. Jahren stattfand, bevor sich die Genome von Mensch und Fisch getrennt haben. Nach der Trennung der Genome hat im Zebrafisch ein zweites Duplikationsereignis stattgefunden. So findet man im Menschen vier HOX-Cluster, während man im Zebrafisch sieben Cluster zählt (Amores et al., 1998).

Die Gene, die man für den orthologen ETT und CTT im Zebrafischgenom findet, kodieren für Proteine, die sich nur wenig in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden und somit nicht eindeutig den humanen Transportern zugeordnet werden können (Tab. 1). Trotz intensiver Suche ist es nicht gelungen mit den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen ein viertes Kandidatengen auszumachen (zwei Kandidaten für den ETT und zwei für den CTT). Es ist aber nicht selten, dass Gene während der Evolution wieder verlorengehen, bzw. dass sich die Sequenzen zweier Kopien stark verändern. Da die Funktion der drei potentiellen Transporter noch nicht bekannt war, müssten diese nach den Zebrafisch-Nomenklatur-Richtlinien als *slc22a4a, slc22a4b* und *slc22a4c* bezeichnet werden. Um den täglichen Laboralltag zu vereinfachen und um Verwechslungen zu vermeiden, wurden die Kandidatengene sowie die Proteine mit den neutralen Namen Danio rerio 1 bis 3 (DR1-3) bezeichnet.

Tab. 1: Homologie der orthologen Transporter

Identität in %	ETT human	CTT human
DR1	59,4	60,8
DR2	64,6	64,1
DR3	57,5	57,6

Die Gene kodieren für Proteine mit einer Länge von 553, 546 und 549 Aminosäuren. Ein Stammbaum, basierend auf dem Alignment der Aminosäuresequenzen, zeigt die Verwandtschaft der Kandidaten mit den humanen Transportern der SLC-22 Familie (Abb. 6). Es ist zu erkennen, dass DR1 und DR3 scheinbar einen gemeinsamen Ursprung haben, während sich DR2 von diesen abgrenzt.

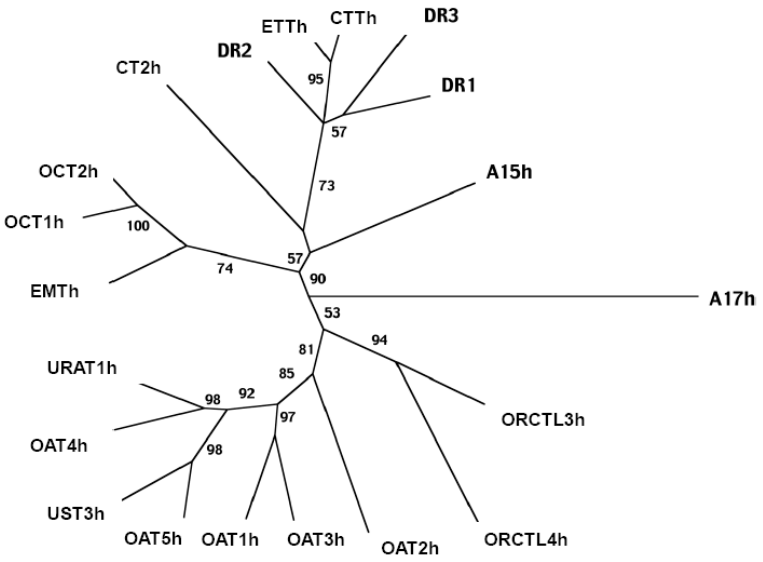


Abb. 6: Phylogenetischer Stammbaum der SLC22-Familie
Der Stammbaum basiert auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen, die mit zunehmender Entfernung abnimmt. Kandidaten für den orthologen ETTh (h = human): DR1-3 = Danio rerio 1-3. (D. Gründemann)

Nach erfolgreichen Identifizierung des orthologen ETT im Zebrafisch bestünde die Möglichkeit einen gezielten Knockdown über Morpholino-Injektion oder einen permanenten Knockout durch retrovirale Insertionsmutagenese oder TILLING (targeting induced local lesions in genomes) mittels ENU-Mutagenese (ENU = N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) zu erzeugen (Amsterdam et al., 1999; Driever et al., 1996; Golling et al., 2002; Wienholds et al., 2003).

Bis jetzt ist es nicht gelungen eine ET-Mangelsituation in Versuchstieren hervorzurufen, weshalb es auch nicht zu den Vitaminen gezählt wird (Baldridge und Lewis, 1953). So

zeigte z.B. eine ET-freie Ernährung von Ratten keine negativen Effekte (Kawano et al., 1982). Die Frage ist allerdings, ob wirklich eine vollständige Mangelsituation erzeugt werden konnte. Wurde ET einmal durch den Organismus aufgenommen wird es kaum metabolisiert oder ausgeschieden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass ein ET-Mangel erst sichtbar wird, wenn ein entsprechender oxidativer Stress ein Eingreifen von ET notwendig macht. So konnte gezeigt werden, dass Nitrit-induzierte Entstehung von Methämoglobin durch die Aufnahme von ET über die Nahrung reduziert werden kann (Mortensen, 1953; Spicer et al., 1951).

1.6 Ziel der Doktorarbeit

Trotz intensiver Suche nach der physiologischen Funktion von ET ist es bisher nicht gelungen diese aufzuklären (Brummel, 1985, 1989). Dennoch weisen die hohen Konzentrationen, besonders in den Geweben, die hohem oxidativem Stress unterliegen, auf eine essentielle Funktion hin. Die Frage ist, welche Funktion ET neben den ubiquitär vorhandenen Antioxidantien, wie Glutathion oder Ascorbinsäure, hat und ob es vielleicht sogar bei der Prophylaxe oder der Therapie chronischer Erkrankungen eingesetzt werden kann. Es gibt viele *in vitro* Experimente, die einen Nutzen von ET und spezifische Vorteile gegenüber anderen Antioxidantien zeigen. So konnte gezeigt werden, dass ET vor Lipidperoxidation schützt, UV-induzierte Schädigung der DNA verhindert und eine Vielzahl von Radikalen abfangen kann (Bao et al., 2008; Botta et al., 2008; Dong et al., 2007; Franzoni et al., 2006; Obayashi et al., 2005). Um die Bedeutung von ET für Vertebraten und somit den Zusammenhang zu der Entstehung von chronischen Entzündungskrankheiten im Menschen aufklären zu können, muss man jedoch *in vivo* einen vollständigen ET-Mangel erzeugen. Nach der Identifizierung eines spezifischen Transporters im Zebrafisch wäre es möglich die Anwesenheit der Transporter-mRNA oder des Proteins als molekularen Marker zu nutzen, um ET im Organismus zu lokalisieren und den Wirkungsort auszumachen (Gründemann et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit ist es den orthologen Kandidaten für den humanen Ergothionein-Transporter im Zebrafisch zu identifizieren und diesen funktionell zu charakterisieren, um ihn von den anderen Kandidaten abgrenzen zu können. Trotz der hohen Verwandtschaft der humanen Transporter besitzen der ETT sowie der CTT ein spezifisches Substrat, das

der jeweils Andere nicht akzeptiert. Durch dieses spezifische Substrat soll auch der orthologe Transporter im Zebrafisch identifiziert werden. Sollte es einen orthologen ETT geben, ist die nächste Aufgabe die Suche nach einer effektiven Methode, um einen permanenten Knockout des Transporters zu erzeugen. Diese Fischlinie sollte im Idealfall kein ET mehr aufnehmen können und einen absoluten ET-Mangel aufweisen. Anschließend soll die Charakterisierung der Fische zeigen, ob durch den ET-Mangel ein spezifischer Phänotyp verursacht wird und ET für den Zebrafisch vielleicht sogar ein Vitamin darstellt.

2 Material und Methoden

Alle für diese Arbeit durchgeführten Experimente wurden im Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dirk Gründemann durchgeführt. Weiterhin wurden für die Fischzucht und die Haltung sowie deren Analyse Einrichtungen im Institut für Genetik von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Martin Gajewski, sowie im Institut für Biochemie II in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Raimund Wagener genutzt.
Die Konfokalbilder der HEK-293-Zelllinien wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Hamid Kashkar im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene angefertigt.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) mit dem Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“ verwendet.
Radioaktive Chemikalien wurden von den Firmen ARC (St. Louis, MO, USA), Amersham (Freiburg, Deutschland) und NEN (Dreieich, Deutschland) geliefert.
Glas- und Plastikgefäße wurden von den Firmen Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und VWR International (Darmstadt, Deutschland) bezogen.
Alle Materialien wurden vor dem Gebrauch bei 121 °C in Wasserdampf unter 1,2 bar für 20 min im Varioklav autoklaviert (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland). Alle Glasgefäße wurden 4 h in einem Heißluftsterilisator (Typ T12, Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland) bei 200 °C gebacken.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Lösungen bzw. deren Stammlösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (SG Clear, SG Wasseraufarbeitungs- und Regenerationsstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland) bei Raumtemperatur angesetzt und anschließend autoklaviert oder steril filtriert (Steril Syringe Filter w/0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Leuven, Niederlande).

2.1.3 Enzyme

In allen Ansätzen wurden die Enzyme in einer einfachen Pufferkonzentration verwendet.

Tab. 2: Restriktionsendonukleasen

Bezeichnung	**Hersteller**
Bsp QI	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
Eco RI	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Sma I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Esp 3I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Hin dIII	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Nco I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Not I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Sma I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Xho I	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Bsi WI	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)

Tab. 3: Enzyme für die Klonierung

Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Promega (Madison, WI, USA)
T_4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
T_4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
T_4-Polynukleotidkinase (PNK)	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

Tab. 4: Enzyme für RNA-Isolation, cDNA-Synthese und *in situ* Hybridisierung

Bezeichnung	Hersteller
Proteinase K	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
RNase-A (DNase-frei)	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
RNase-Inhibitor	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
RQ1 DNase	Promega (Madison, WI, USA)
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
T_3-RNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
T_7- RNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

Tab. 5: Enzyme für die PCR

Bezeichnung	Hersteller
BigDye® Terminator Mix v 1.1	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
GoTaq Polymerase	Promega (Madison, WI, USA)
High Fidelity PCR-Enzym-Mix	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

2.1.4 Kit-Systeme

Es wurden folgende Kit-Systeme nach den Herstellerangaben verwendet. Abweichungen von den Protokollen werden in späteren Abschnitten angegeben.

Tab. 6: Kit-Systeme

Kit-System	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
DIG RNA Labeling Mix	Roche (Mannheim, Deutschland)
Image-iT™ LIVE	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
mMESSAGE mMACHINE® Kit	Ambion (Darmstadt, Deutschland)
NuleoSpin®RNA II	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Plasmid Maxi Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Plasmid Mini Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Tfx™-50-Transfection Kit	Promega (Madison, WI, USA)

2.1.5 Bakterienstämme und Kulturmedien

Bei den verwendeten Bakterien handelte es sich um *Escherichia coli* (*E. coli*) des Stamms DH10B (Genotyp: F^-, *mcr*A, Δ (*mrr-hsd*RMs-mcrBC), Φ80*dlac*Z ΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *ara*D139, Δ (*ara*, *leu*) 7697, *gal*U, *gal*K, *rps*L, *end*A1, *nup*G).
E. coli wurde in Flüssigmedium und auf Agar-Platten kultiviert. Zur Selektion wurde Ampicillin verwendet.

LB-Medium

10 g/l Casein-Hydrolysat
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl

LB-Agar

10 g/l Casein-Hydrolysat
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
15 g/l Agar

SOC-Medium

10 mM $MgCl_2$
10 mM $MgSO_4$
20 mM Glukose
in SOB-Mg Medium aufgenommen

SOB-Mg Medium

20 g/l Casein-Hydrolysat
5 g/l Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

Ampicillin 100

100 mg/ml Ampicillin, steril filtriert

2.1.6 Expressionssystem

Für die Expression von verschiedenen cDNAs (engl. c = complementary) wurde der Expressionsvektor pEBTetD verwendet (Bach et al., 2007). Dieser Vektor basiert auf Elementen des Epstein-Barr-Virus. Als Grundgerüst diente das Plasmid pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) und zur Steuerung der Expression wurde das Tetracyclin-Repressor-System verwendet.

Das Epstein-Barr-Virus ist ein humanpathogenes DNA-Virus, das zur Familie der Herpesviren gezählt wird. Es wurden zwei Regionen der Virus-DNA identifiziert, die eine autonome Replikation zirkulärer DNA erlauben: der Replikationsursprung oriP und das DNA-Bindeprotein EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen) (Yates et al., 1985). Da sich alle notwendigen Bestandteile für die induzierbare Expression, im Gegensatz zu anderen Expressionssystemen (z.B. Flp-In™-T-Rex™-System, FIT-System, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), auf einem einzigen Vektor befinden, ist eine Zelllinie schon nach einer einzigen Transfektion und anschließender Selektionsphase etabliert, was eine Zeitersparnis von ca. 2 - 9 Wochen gegenüber anderen Systemen, wie dem FIT-System, bedeutet.

In Abbildung 7 ist der schematische Aufbau des Vorläufer-Vektors pEBTet dargestellt. Zur Vermehrung in Bakterien enthält pEBTet einen pUC-Replikationsursprung (engl., plasmid of the University of California) mit einer Ampicillin-Resistenz-Kassette. Weiterhin enthält dieser Vektor einen SV40 Promotor (Simianes Virus 40), der in humanen Zelllinien nach erfolgreicher Transfektion eine konstante Puromycinresistenz aufrecht erhält. Der Tet-Repressor wird kontinuierlich exprimiert und bildet Homodimere, die an die Tet-Operatoren binden und so die Transkription der stromabwärts liegenden cDNA verhindert. Durch die Bindung von Doxyzyklin an den Tet-Repressor ändert sich dessen Konformation, wodurch er nicht mehr an den Operator binden kann und somit die Transkription freigibt.

Da der ursprüngliche pEBTet-Vektor im nicht induzierten Zustand eine gewisse Grundexpression besaß, ergab sich ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis auf mRNA-Ebene von 100:1 (Bach et al., 2007). Die mRNAs der exprimierten Transportproteine

wiesen jedoch eine hohe Stabilität auf. Aufgrund der hohen Translationseffizienz führte dieser geringe mRNA-Hintergrund im nicht induzierten Zustand bei der funktionellen Charakterisierung der Transporter zu einem starken Hintergrund in der Substrataufnahme. Dieses Problem konnte behoben werden indem die BGH poly-(A)-site (bovine growth hormone) stromabwärts der cDNA aus dem Vektor pEBTet entfernt wurde. Bei dem so entstandenen Vektor pEBTetD (D, Deletion) erfolgt die Termination der Transkription durch den oriP (Yates et al., 2000) was auch durch die Länge der mRNAs bestätigt wurde. Der fehlende poly-(A)-Schwanz führt zu einer instabileren mRNA und die Anzahl translatierter Proteine pro mRNA-Molekül wird verringert (Kahvejian et al., 2005; Kozak, 2004).

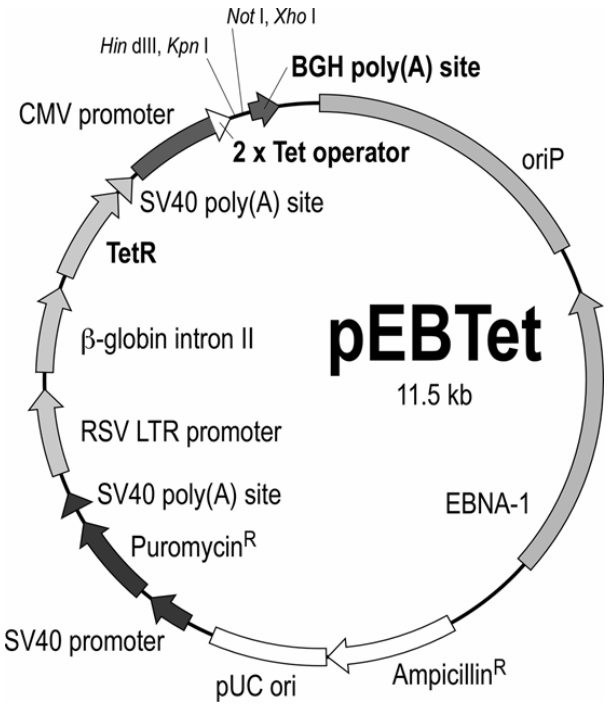


Abb. 7: Schematische Darstellung des pEBTet-Expressionsvektors
Funktionellen Elemente und deren Orientierung sind Pfeile dargestellt. Außerhalb des Vektors sind die verwendeten Schnittstellen für die Klonierung (*Not* I, *Xho* I, *Kpn* I und *Hind* III) dargestellt.

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Biomers.net bestellt und in sterilem 1x TE gelöst. Die Konzentration der Stammlösungen betrug 50 - 100 µM.

Primer für die Klonierung:

Die drei potentiellen ET-Transporter des Zebrafischs wurden in jeweils zwei Fragmenten amplifiziert (Fragmente A und B). Über die zusätzlich eingefügten Schnittstellen einer asymmetrisch schneidenden Endonuklease konnten die Fragmente im Expressionsvektor anschließend ligiert werden.

Tab. 7: Primer für die Klonierung

Bezeichnung	Sequenz
FA_DR1	5‘-aga aag ctt gcc acc atg agg gat tat gac gac atc acg tct ttt ctg-3‘
RA_DR1	5‘-tgc ggc ttc ctc aat ctc tga gga gct-3‘
FB_DR1	5‘-aac gcc ctc act ggc ctg ctg tat ttc-3‘
RB_DR1	5‘-aga ctc gag tta taa ttt gac ttc ctg cag aac ttt g-3‘
FA_DR2	5‘-aga aag ctt gcc acc atg aac ctc cag gac tac gag gag caa acc-3‘
RA_DR2	5‘-aga gct ctt cgg gga tgg tga ggg cca gca tca gag a-3‘
FB_DR2	5‘-aga gct ctt ctc ccc ggg ttc ttc tac atc ccc ctg tg-3‘
RB_DR2	5‘-aga ctc gag tca gat acg cgc ctc ttc act gat aat g-3‘
FA_DR3	5‘-aga ggt acc gcc atg ggg aat tat tat taa gac act-3‘
RA_DR3	5‘-aga gcg atg ggt cag gcc gga cag aac cct cag-3‘
FB_DR3	5‘-aga gcg atg ctg agg gtt ctg tcc ggc ctg acc-3‘
RB_DR3	5‘-aga ctc gag tca gag ttt ctc ttc cct cat ctt ctc tc-3‘

Primer für die Sondensynthese für *in situ* Hybridisierungen:

Teile der cDNA wurden mit spezifischen Primern, die am 5‘-Ende T_3- bzw. T_7-Promotorsequenzen enthielten, amplifiziert (fett gedruckt), um die erzeugten PCR-Fragmente für *in vitro*-Transkriptionen einsetzen zu können.

Tab. 8: Primer für die Sondensynthese für *in situ* Hybridisierungen

Bezeichnung	Sequenz
F_DR2_in-situ	5‘ -**aat taa ccc tca cta aag gg**c ccg ttc cag aag- 3‘
R_DR2_in-situ	5‘ -**taa tac gac tca cta tag gg**t aaa gct cag cag- 3‘

Primer für die eGFP-Konstrukte:

Um an die Leserahmen der Transporter DR1, DR2 und DR3 das grün fluoreszierende Protein (eGFP, enhanced green fluorescent protein) anhängen zu können, wurde das 3‘-Ende der B-Fragmente mit Hilfe der Primer verändert. Das Stopcodon der Transporter wurde durch die Erkennungssequenz für die Endonuklease NcoI (siehe 2.1.2) ersetzt, an die das eGFP im Expressionsvektor angefügt werden konnte. So entstand anstelle des Stopcodons die Aminosäure Serin, die den Übergang zum eGFP bildete.

Tab. 9: Primer für die eGFP-Konstrukte

Bezeichnung	Sequenz
F_DR1 eGFP	5‘-aga aag ctt cct gct cca tga cgg ccc gca-3‘
R_DR1 eGFP	5‘-aga ctc gag cgg ccg cca tgg ata att tga ctt cct gca gaa c-3‘
R_DR2 eGFP	5‘-aga cca tgg aga tac gcg cct ctt cac tga taa tg - 3‘
R_DR3 eGFP	5‘ -aga cca tgg aga gtt tct ctt ccc tca tct tct ctc- 3‘

Primer für die RT-PCR zum Nachweis der Transporter:

Zum Nachweis der mRNA der Transporter in verschiedenen Geweben wurde das Fragment A des Transporters amplifiziert. Zur Kontrolle der cDNA wurde ein 203 bp langes Fragment des Housekeeping-Gens β-Actin amplifiziert.

Tab. 10: Primer für die RT-PCR zum Nachweis der Transporter

Bezeichnung	Sequenz
F_ACTB	5‘ -ggc atc ctc acc ctg aag ta- 3‘
R_ACTB	5‘- ggg gtg ttg aag gtc tca aa -3‘

Primer für die Sequenzierung:

Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden auf die Richtigkeit ihrer Sequenzen hin überprüft. Dies erfolgte mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Hierzu wurden folgende Primer verwendet.

Tab. 11: Primer für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz
FpcDNA3	5‘ -gta cgg tgg gag gtc tat at- 3‘
M13	5‘ -gta aaa cga cgg cca gt- 3‘
M13 reverse	5‘ -gga aac agc tat gac cat g- 3‘

Tab. 12: Primer für die Genotypisierung

Bezeichnung	Sequenz
F_Exon 1	5‘-aga aac tcc agg act acg ag-3‘
F_Exon 1 nest	5‘-gtt cca gaa gac tac gag-3‘
5‘ltr	5‘-gac gca ggc gca taa aat cag tc-3‘
5’ltr nest	5’-aca gac aca gat aag ttg ctg gcc-3‘
R_7837-5-48 nest	5’-ctc cga cac tat ggt gga gc-3’
R_7837-5-75	5’-gca gac aga ata acc gca ga-3’

Tab. 13: Primer für die Klonierung des DR2-Promotorbereichs

Bezeichnung	Sequenz
F_Promotor DR2	5‘-aga gaa ttc ctg gat aaa taa ttc aat aaa aac act gta c-3‘
R_Promotor DR2	5‘-aga cca tgg tgt cag aat gaa gag cga ctc cgg cgg ctg cgg ag-3‘

2.1.8 Inkubationssiebchen für die *in situ* Hybridisierung

Die Embryonen wurden während der *in situ* Hybridisierung (siehe 2.8) in kleinen Siebchen inkubiert.

Die Siebchen wurden aus 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen angefertigt (Thisse und Thisse, 2008). Hierzu wurden der Deckel und der Boden entfernt. Auf den Rand wurde ein Maschengewebe (Maschenweite: 160 µm) aus rostfreiem Stahl befestigt (GKD Business Unit SolidWEAVE, Düren, Deutschland).

2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Eppendorf-Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Stammlösungen wurden, wie in 2.1.1 beschrieben autoklaviert.

2.2.1 DNA-Techniken

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Extraktion von Plasmid-DNA wurde mit dem Extraktions-Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt (Plasmid Mini Purification Kit, Plasmid Maxi Purification Kit). Die Flüssigkulturen wurden mit einer ausgeglühten Platinöse mit einem Klon einer Plattenkultur (sieh: 2.3.1) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 UpM (Inkubationsschüttler Minitron HT, Infors AG, Bottmingen, Deutschland) inkubiert.
Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.
Zum Schnelltest von Klonen wurde eine Flüssigkultur von 2 ml gewählt, die ebenfalls über Nacht bei 37 °C und 200 UpM inkubiert wurde. Die Bakterien wurden für 10 min bei 1000 x g gesammelt, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte mit 400 µl P2-Puffer. Nach vorsichtigem Mischen wurde der pH-Wert durch die Zugabe von 300 µl P3-Puffer neutralisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Abtrennung der denaturierten Proteine erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 16000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 10 µl 1 x TE aufgenommen und bei -20° C gelagert.

P1

50 mM Tris
10 mM EDTA
pH 8,0 mit HCl

P2

0,2 M NaOH
1 % SDS

P3

3 M Kaliumacetat
pH 5,5 mit CH_3COOH

1x TE

10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8,0 mit HCl

2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Proteine zu denaturieren und aus DNA-haltigen Lösungen zu entfernen, wurden die Gemische einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 1 x Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und anschließend für 1 min bei 13000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Extraktion wurde mit 0,5 x Volumen 1 x TE wiederholt und die wässrigen Phasen vereinigt. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die DNA durch eine Alkoholpräzipitation konzentriert (siehe 2.2.1.3).

TE-gesättigtes Phenol

Die wässrige Phase des Phenols wurde zunächst verworfen. Anschließend wurde es mit 0,5 x Volumen 1 M Tris-HCl pH 8,0 äquilibriert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 5000 x g wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Dieser Schritt wurde mit 0,5 x Volumen 1 x TE wiederholt. Es wurde erneut zentrifugiert und die untere Phase entnommen. Als Oxidationsschutz wurde das Phenol mit 0,1 % 8-Hydroxy-Chinolin versetzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

CIA (24:1)	**PCI (25:24:1)**
1 x Volumen Isoamylalkohol	1 x Volumen TE-gesättigtes Phenol
24 x Volumen Chloroform	1 x Volumen CIA (24:1)

2.2.1.3 Alkoholpräzipitation von DNA

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 x Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,4, 2,5 x Volumen 96 % Ethanol und 4 µl linearem Polyacrylamid gemischt (Gaillard und Strauss, 1990). Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit 70 % (v/v) Ethanol wurde die DNA bei 60 °C getrocknet und im Anschluss in TE-Puffer resuspendiert. DNA, die anschließend in salzsensitiven Reaktionen wie Elektroporation oder Blunt-End-Ligation eingesetzt wurde, wurde zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 0,5 x TE aufgenommen.

2.2.1.4 Spot-Test

Der Spot-Test ist eine schnelle und einfache Methode, um die Konzentration von DNA-Lösungen abzuschätzen. Hierzu wurde 1 µl der DNA-Lösung auf eine Ethidiumbromid-haltige (5 µg/ml) Agaroseplatte (1% w/v) gegeben und anschließend für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht (302 nm). Um die Konzentration der DNA abschätzen zu können, wurden verschiedene Konzentrationen λ-DNA von 5 - 200 ng/µl auf die Platten aufgetragen. Da die Intensität der Fluoreszenz in diesem Konzentrationsbereich proportional zur vorhandenen DNA-Konzentration ist, kann man über die Eichreihe der λ-DNA die Konzentration der Probe abschätzen.

2.2.1.5 Restriktion von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurden DNA-Fragmente mit glatten oder überstehenden Enden erzeugt, die der Vorbereitung zur weiteren Klonierung oder der Analytik von Plasmiden dienten.

Die einzusetzende Enzymmenge wurde nach der zu schneidenden DNA-Menge und der Anzahl der vorhandenen Erkennungsstellen berechnet. Die Spaltaktivität gibt an, welche DNA-Stoffmenge von 1 U Enzym in einer Stunde gespalten werden kann. Eine Einheit entspricht der Enzymmenge, durch die 1 µg λ-DNA/h unter Standardbedingungen vollständig gespalten wird.

Die Volumina der Restriktionsansätze wurden so gewählt, dass die Glycerolkonzentration im Puffer der Enzyme eine Endkonzentration von 5 % nicht überschritt. In jedem Ansatz wurde 0,1 x Volumen des von der Firma mitgelieferten 10-fach Pufferns eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden, wenn nicht anders beschrieben, im Wasserbad für eine Stunde mit der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Bei einem Verdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (Doppelverdau), die unterschiedliche Puffersysteme benötigten, wurde entweder ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme noch eine zufriedenstellende Teilaktivität aufwiesen, oder es wurden zwei aufeinander folgende Restriktionen mit dem jeweils optimalen Puffersystem durchgeführt. In diesem Fall wurde nach dem ersten Verdau eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.1.2) sowie eine Ethanolpräzipitation (siehe 2.2.1.3) durchgeführt. Der Erfolg der Restriktion wurde anschließend mittels Agarosegelelektophorese (siehe 2.2.1.6) überprüft.

2.2.1.6 Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese wurde nach jeder PCR (siehe 2.2.1.11) und nach jeder Restriktion (siehe 2.2.1.5) zur Kontrolle oder zur Isolation von DNA-Fragmenten (siehe 2.2.1.7) durchgeführt. Als Längenstandard wurde ein 1 bis 10 kb-DNA-Marker, sowie ein 0,1 bis 1,5 kb-DNA-Marker verwendet (Promega, Madison, WI, USA).

Für Fragmente von 1 bis 12 kb wurde eine Agarosekonzentrationen von 0,8 % (w/v) und für Fragmente < 1 kb Konzentrationen von 1 bis 1,6 % (w/v) verwendet. Die Agarose

wurde in TAE aufgekocht und anschließend in eine mit einem Probenkamm bestückte Gelform gegossen.

Die Elektrophorese erfolgte in einem horizontalen Flachbettgel. Die Agarosegele wurden in eine Elektrophoresekammer (BioRad, München, Deutschland) gelegt und mit 1 x TAE bedeckt. Die Proben wurden mit 0,2 x Volumen des Auftragspuffers gemischt und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand. Die DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel für 10 min bei 60 °C in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in TAE) inkubiert und anschließend mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm mit Hilfe des 3UV™ Benchtop Transilluminator (UVP, Cambridge, UK) angeregt und fotografiert (Kodak DC290 Zoom, Rochester, NY, USA). Die Bildbearbeitung erfolgte mittels des Abbildungssystems EDAS 290 (Electrophoresis Documentation and Analysis System Accessories, Kodak, Rochester, NY, USA).

Wenn die Fragmente nach der Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten (siehe 2.2.1.7) und zur Klonierung verwendet werden sollten, wurde der TAE-Puffer zuvor mit Cytidin versetzt (Endkonzentration 5 mM). Das Cytidin in diesen präparativen Gelen schützt die DNA vor UV-induzierten Schäden (Gründemann und Schömig, 1996).

1 x TAE

40 mM Tris
1 M EDTA
pH 8,0 mit CH_3COOH

1 x Auftragspuffer

10 % Glycerol
0,01 % Bromphenolblau
0,05 % Orange G
in TAE

2.2.1.7 Extraktion von DNA aus präparativen Agarosegelen

Um DNA aus Agarosegelen zu isolieren wurde das Qiaquik® Gel Extraktion Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Banden wurden hierzu mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend durch Alkoholpräzipitation (siehe 2.2.1.3) konzentriert und die Konzentration mit einem Spot-Test (siehe 2.2.1.4) bestimmt.

2.2.1.8 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um das erneute Schließen linearisierten Vektors zu verhindern, wurde nach der Restriktion eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (CIAP, engl. calf intestine alkaline phosphatase) durchgeführt. Für 1 µg Vektor wurde 1 U alkalische Phosphatase in 1 x Phosphatasepuffer eingesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA über Phenol-Chloroform (siehe 2.2.1.2) extrahiert und mittels Alkoholpräzipitation (siehe 2.2.1.3) gefällt.

2.2.1.9 Auffüllen und phosphorylieren von DNA-Enden

Für eine Ligation mit glatten Enden (blunt end), müssen die überstehenden 5'-Enden mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Für 10 - 40 ng DNA wurden 2,5 mM dNTPs und 625 µM ATP sowie 5 U T_4-Polynukleotidkinase und 1 U T_4-Polymerase eingesetzt und für 20 min bei 25 °C inkubiert. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.1.2) und anschließende Alkoholpräzipitation (siehe 2.2.1.3) gereinigt und konzentriert.

2.2.1.10 DNA-Ligation

Das Insert wurde in 3-facher Konzentration im Vergleich zum Vektor eingesetzt. Bei überhängenden Enden wurden 2,5 U und bei glatten Enden 15 U T_4-DNA-Ligase eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 25 °C, bzw. bei 16 °C. Bei einer Ligation mit mehreren Inserts wurde darauf geachtet, dass die Fragmente über komplementäre Überhänge ligiert wurden, so dass die Positionen der Fragmente und ihre Orientierung nicht vertauscht werden können. Nach der Ligation wurde die DNA mit PCI extrahiert (siehe 2.2.1.2) und mit Ethanol gefällt (siehe 2.2.1.3). Die DNA wurde für die folgende Elektroporation in *E. coli* (siehe 2.3.3) zweimal mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 0,5 x TE aufgenommen.

2.2.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion handelt es sich um eine enzymatische *in vitro* Replikation definierter DNA-Bereiche durch spezifische Primer (Mullis et al., 1986). Zur Kontrolle wurde immer ein Ansatz ohne DNA pipettiert um sicherzustellen, dass die Amplifikate nur auf die Template-DNA zurückzuführen sind.

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation der Fragmente der Transporter DR1-3, ihrer eGFP-Chimären, sowie zur Genotypisierung der Fische verwendet. Die PCR-Primer für die Klonierungen wurden so gewählt, dass an den Enden eines jeden Fragments die passenden Schnittstellen für die spätere Klonierung entstanden.

Des Weiteren wurde die PCR zur Amplifikation der Template-DNA für die Synthese der RNA-Sonden genutzt. Mit Hilfe dieser Methode wurden die Promotorsequenzen für die T_3- bzw. die T_7-Polymerase in das Amplifikat eingebaut.

Je Ansatz wurden ca. 10 ng DNA-Template, 0,5 µM sense- bzw. antisense-Primer, 0,2 mM dNTPs (Desoxynukleotide), 5 % DMSO (Dimethylsulfoxid), das 0,1 x Volumen des jeweiligen Polymerase-Puffers mit $MgCl_2$ und 0,25 U Polymerase (Taq-Polymerase oder High Fidelity Polymerase) auf 50 µl Wasser eingesetzt.

Die PCR für die Klonierungsfragmente lief in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf, Deutschland) unter folgenden Bedingungen:

Amplifikationsprogramm:	94 °C	5 min	
	94 °C	30 sec	↩
	50 °C	60 sec	30 Zyklen
	72 °C	60 sec	↩
	72 °C	5 min	

2.2.1.12 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Zur Analyse der DNA-Sequenz von Klonierungsprodukten wurde das BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet, dass auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) basiert.

Ein 10 µl Ansatz enthielt ca. 200 ng Plasmid-DNA, 2 pmol Primer, 2 µl 5 x Puffer und 2 µl Terminator-Mix (T-Mix). Die Analyse erfolgte in einem 16 Kapillar-Sequenzer (ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Abfolge der Farbsignale gibt die Sequenz wieder.
Die Sequenzier-PCR lief in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf, Deutschland) unter folgenden Bedingungen ab:

Amplifikationsprogramm:	94 °C	5 min	
	Pause: Zugabe des T-Mix		
	94 °C	30 sec	
	50 °C	30 sec	30 Zyklen
	62 °C	4 min	
	62 °C	10 min	

Die Ansätze wurden nach der PCR mit 15 µl H_2O verdünnt und über eine Sephadex-Platte gereinigt (Sephadex G-50, Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Die aufgereinigten Proben wurden 1:2 mit H_2O verdünnt und in eine MicroAmp® Optical 96-Well-Platte gegeben. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm MacVector®.

2.2.1.13 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden 5 µg RNA zur Denaturierung für 5 min auf 65 °C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Die RNA wurde mit folgenden Komponenten in einem 20 µl-Ansatz gemischt: 1 x Reverse-Transkriptase-Puffer (RT-Puffer), 10 mM DTT (Dithiothreitol), 7 mM $MgCl_2$, je 1,5 mM dNTPs und 10 µM randomisierte Primer-Nonamere. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur, sowie 2 min bei 45 °C wurden 100 U Superscript II Reverse Transkriptase hinzugegeben und für 1 h bei 45 °C im Wasserbad inkubiert. Gleichzeitig wurde eine Negativkontrolle angesetzt, die kein Enzym enthielt. An Hand dieser Kontrollen konnte später durch Amplifikation von β-Actin über PCR verifiziert werden, dass die Amplifikate nicht aus Verunreinigungen durch genomische DNA stammten.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Da die *Taq*-Polymerase schwache RT-Funktion hat, wurde die cDNA mit RNase behandelt. Die Proben wurden 5 min bei 65 °C erneut denaturiert, mit 5µl RNase-A-Lösung versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Zebrafisch-cDNA wurde beispielsweise als Ausgangsprodukt in der PCR zur Amplifikation der Klonierungsfragmente verwendet. Die cDNAs verschiedener Zebrafischorgane wurde in PCRs auf die Transkripte der Transporter hin untersucht.

RT-Puffer
0,75 M KCl
0,5 M Triethanolamin
pH 8,7 mit HCl
DEPC-behandelt

RNase-A-Lösung
0,5 mg/ml RNase-A in 10 mM Tris
pH 7,5 mit HCl
50 % Glycerol

2.2.2 RNA-Techniken

Die Extraktion von RNA wurde unter besonders reinen Bedingungen durchgeführt, um eine Denaturierung durch Ribonukleasen (RNasen) zu verhindern. Aus diesem Grund wurden der Arbeitsplatz und alle Geräte mit 0,1 M Natronlauge und 70 % (v/v) Isopropanol gereinigt. Es wurden nur RNase-freie Filterspitzen verwendet. Alle Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt (1:1000, v/v), über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, wodurch die RNase irreversibel inaktiviert wird. Aus diesem Grund wurde das Amin Tris bei RNA-Arbeiten durch Triethanolamin ersetzt.

2.2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA

Bei der Extraktion von Gesamt-RNA wurden die Proben in flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben, in 10 ml Extraktionslösung überführt und homogenisiert (Ultra-Thorax, Ika-Werk, Staufen, Deutschland). Das in der Denaturierungslösung enthaltene chaotrope Salz

Guanidinisothiocyanat gewährleistet als Protein-denaturierendes Agens die Inaktivierung endogener RNasen beim Aufschluss des Gewebes. β-Mercaptoethanol und N-Laurylsarkosin bieten als reduzierende Agenzien einen weiteren Abbauschutz. Das Homogenat wurde mit 1 ml Natriumacetat, 10 ml Aqua-Roti-Phenol und 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, CIA) versetzt, gut geschüttelt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die RNA verbleibt in der wässrigen Phase, während DNA und Proteine in der organischen Phase verbleiben. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 10000 x g (Ausschwing-Rotor, Sorvall RCB5 Plus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Falcon überführt und mit dem gleichen Volumen CIA versetzt und gut gemischt. Es folgte eine Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Die obere Phase wurde in ein neues Falcon überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol mittels Zentrifugation gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Isopropanol gewaschen und bei RT getrocknet. Anschließend wurde es in 200 µl H_2O_{DEPC} aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst.

Extraktionslösung

4 M	Guanidiniumthiocyanat
25 mM	Natriumcitrat
0,5 %	N-Laurylsarkosin
pH 7,0	mit NaOH
0,1 M	β-Mercaptoethanol

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die RNA 1:70 mit H_2O_{DEPC} verdünnt und in einer 1 cm Quarzküvette bei 260 nm und 320 nm photometrisch vermessen (DU 640 Spectrophotometer, Beckmann, USA). Die RNA-Konzentration (c) konnte über die optische Dichte (OD) mit folgender Formel ermittelt werden:

$(OD_{260} \times OD_{320}) \times$ Verdünnungsfaktor $\times$ 40 µg/ml = c

2.2.2.2 Gelelektrophorese von RNA

Die Qualität der RNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Damit die bei neutralem pH negativ geladene RNA keine Sekundärstrukturen ausbilden kann und das

Laufverhalten vergleichbar mit dem des 0,5 bis 10 kb RNA-Längenstandards (Carlsbad, CA, USA) bleibt, wurden die Proben durch Zugabe von 3 µl Denaturierungslösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,625 µg/ml) versetzt und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 1 µl 0,2 % Orange G versetzt und neben dem ebenfalls denaturierten RNA-Längenstandard in die Taschen des 1 %igen Agarosegels aufgetragen. Für das 1 %ige Gel wurde 1 x BE mit der entsprechenden Menge Agarose aufgekocht, auf ca. 50 °C abgekühlt und nach Zugabe von Natriumiodessigsäure (Endkonzentration 5 mM) in den Gelschlitten gegossen. Die Elektrophorese wurde in einer Flachbettapparatur mit 1 x BE-Laufpuffer bei 5 V/cm durchgeführt. Nachdem die Probe in das Gel eingelaufen war, wurde eine Umwälzpumpe angeschlossen, die die Bildung von Ionengradienten im Laufpuffer verhinderte. Die Detektion erfolgte über den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid durch UV-Bestrahlung.

50 x BE

10 mM BES
5 mM EDTA
pH 6,7 mit NaOH
DEPC-behandelt

Denaturierungslösung

67 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
1,33 M Glyoxal (frisch deionisiert)
1,33 x BE

2.3 Mikrobiologische Methoden

Alle Arbeitsschritte mit *E. coli* wurden unter einer Reinraumwerkbank (Laminar Flow, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Die Nährmedien wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung autoklaviert und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert oder zu 1 ml aliquotiert und bei -20 °C eingefroren (SOC-Medium).

2.3.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium oder auf Agarplatten mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml (siehe 2.1.6). Die Flüssigkulturen wurden mit einem einzelnen Klon von einer Agarplatte angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 Upm mit dem Inkubationsschüttler inkubiert (Inkubationsschüttler Minitron HT, Infors AG, Bottmingen, Deutschland).
Elektrotransformierte *E. coli*-Bakterien wurden auf Agarplatten kultiviert, indem 100 µl der Bakteriensuspension auf der Platte mit einem sterilen Drigalsky-Spatel ausgestrichen wurden. Die Inkubation erfolgte ebenfalls über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.
Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und konnten so mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung der Bakterien wurde 1 ml LB-Medium mit einem einzelnen Klon angeimpft und für 4 - 5 h wachsen gelassen. Die Bakteriensuspension wurde mit 10 % (v/v) Glycerol in LB-Medium gemischt und zu 1 ml Aliquots bei -80 °C in Kryoröhrchen eingefroren.

2.3.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurde eine Einzelkolonie in 5 ml SOB-Mg-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm kultiviert. 4 ml der Vorkultur wurden dann in 200 ml SOB-Medium resuspendiert und weitere 2,5 h bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei

4 °C und 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 ml eiskaltem 10 %igem Glycerol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Waschschritt wiederholt. Das Pellet wurde schließlich in 500 µl 10 %igem Glycerol aufgenommen. Diese Suspension wurde je zu 25 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Elektrotransformation von *E. coli*

Für die Elektroporation wurde 1 µl (1 - 20 ng) DNA mit 25 µl der elektrokompetenten Zellen gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit der DNA in eine bereits vorgekühlte Küvette (1 mm Elektrodenabstand, Biorad, München, Deutschland) überführt. Ein optimales Transformationsergebnis erhielt man bei einem Widerstand von 200 Ω, einer Kapazität von 200 µF und einer Spannung von 1,6 kV mittels eines Gene-Pulsers der Firma Bio-Rad. Bei diesen Einstellungen sollte eine Zeitkonstante von < 5 ms nicht überschritten werden. Nach dem Impuls wurden die Bakterien sofort mit 1 ml SOC-Medium gemischt und für 1 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl unverdünnte Kulturlösung sowie 100 µl einer 1:100-Verdünnung auf je einer Agarplatte (Ampicillin 100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeitsschritte, wurden unter einer Sicherheitsbank (Hera Safe, Heraeus, Kendro Laboratoy Products, Hanau, Deutschland) mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Medien und Puffer wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Alle Puffer und Lösungen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Antibiotika, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden durch Filtration (Steril Syringe Filter w/0,2 µm Polyethersulfon Membran, VWR International, Darmstadt, Deutschland) sterilisiert. Alle Gegenstände wurden vor dem Gebrauch unter der Sicherheitsbank mit 70 % (v/v) Isopropanol desinfiziert.

2.4.1 Kultivierung und Passage von HEK-293-Zellen

Die Kultivierung der HEK-293-Zellen (human embryonic kidney, American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573) erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre (Hera Cell, Hereus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland). Die Zellen wurden in 175 cm^2 Plastikkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde ein mit 10 % hitzeinaktiviertem (60 min, 56 °C) fötalem Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetztes Dulbecoo's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Die Subkultivierung (Passage) der Zellen erfolgte stets zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellen fast zu 100 % konfluent waren. Je nach Bedarf wurden 10 - 40 % der Zellen verwendet, um die Kultur fortzusetzen. Die Zellen wurden in eine neue 175 cm^2 Kulturflasche gegeben und auf ein Volumen von 30 ml mit DMEM mit 10 % FCS aufgefüllt.

2.4.2 Stabile Transfektion von HEK-293-Zellen

Das verwendete Tfx™-50 Reagenz (Promega Madison, WI, USA) besteht aus den kationischen Liposomen-bildenden Molekülen N,N,N',N'-Tetramethyl-N,N'-(bis(2-hydroxyethyl)-2,3,-dioleoyloxy)-1,4-butandiammoniumiodid und L-Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE). Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nach der Inkubation wurde das Gemisch aus den Kulturflaschen entfernt und durch 15 ml DMEM mit 10 % FCS ersetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Umstellung auf Selektionsmedium, das sich aus dem Wachstumsmedium DMEM, 10 % FCS und Puromycin (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland), in einer Endkonzentration von 3 µg/ml, zusammensetzte.

2.5 Funktionelle Charakterisierung von Transportproteinen

2.5.1 Vorbereitung der Aufnahmeversuche

Für die Aktivitätstests wurden die transfizierten Zellen in Polystyrol-Schälchen (Ø 60 mm, Nunclon™, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Um eine bessere Adhärenz der Zellen während des Aufnahmeversuches zu gewährleisten wurden die Polystyrol-Schälchen zuvor mit 2 ml steril filtriertem Poly-L-Ornithin beschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schälchen wurden mit 3 ml serumfreiem DMEM gewaschen und anschließend wurden ca. 2 Mio. Zellen in 4 ml DMEM mit 10 % FCS und 3 µg/ml Puromycin ausgesät. Mindestens 20 h vor dem Aufnahmeversuch wurde die Expression der Transporter durch Mediumwechsel mit dem Zusatz von 1 µg/ml Doxyzyklin induziert. Zum Zeitpunkt der Aufnahmeversuche lag die Konfluenz der Zellen bei mindestens 70 %.

Poly-L-Ornithin-Lösung
0,1 g/l Poly-L-Ornithin
150 mM Borsäure
pH 8,4 mit NaOH

2.5.2 Aufnahmeversuche

Die Aufnahmeversuche wurden unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt, da die Zellen unmittelbar nach dem Versuch lysiert wurden. Die Zellen wurden für 24 - 30 min bei 37 °C mit 4 ml 1 x Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer (KRH) äquilibriert. Nach der Vorinkubation wurde der 1 x KRH-Puffer durch die auf 37 °C temperierte Aufnahmelösung ersetzt. Die initiale Substrataufnahme wurde nach einer Minute durch vierfaches Waschen mit 4 ml eiskalter KRH-Lösung gestoppt.
Die Substratkonzentration der Aufnahmelösungen, die über LC-MS/MS gemessen wurden, entsprach 10 µmol/l (siehe 2.6). Zur Ermittlung des endogenen Substratgehaltes der Zellen wurden parallel Zellen für eine Minute mit 1 x KRH ohne Substrat inkubiert. Die

unspezifische Aufnahme wurde durch Zellen ermittelt, deren Transporter-Expression nicht mit Doxyzyklin eingeschaltet wurde. Substrate, die über Radiotracer-Assay quantifiziert wurden, wurden in einer Konzentration von 0,1 µmol/l angeboten. Bei der Untersuchung von Sättigungskinetiken wurden Substratkonzentrationen von 1 µM bis 330 µM eingesetzt.

Krebs-Ringer-Henseleit-Lösung (KRH)

5,6 mM	Glukose
125 mM	NaCl
4,8 mM	KCl
1,2 mM	KH_2PO_4
1,2 mM	$CaCl_2$
1,2 mM	$MgSO_4$
25 mM	HEPES

pH 7,4 mit NaOH

2.5.3 Zellaufschluss

Die Zellen wurden, bei radioaktiv-markierten Verbindungen, mit 1 ml 0,1 % Triton-X-100 (v/v) in 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) lysiert oder mit 1 ml 4 mmol/l $HClO_4$, wenn die Analyse mittels LC-MS/MS erfolgte. Die Inkubationszeit betrug für beide Methoden 20 min bei Raumtemperatur. Die Zelllysate wurden bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren. Bei einem Aufnahmeversuch mit nicht radioaktiv markierten Verbindungen wurden parallel 3 Schälchen für die Proteinkonzentrationsbestimmung ausgesät, da für diese Bestimmung, mittels des BCA-Tests, ein alkalisches Milieu benötigt wird (siehe 2.5.4). Die Zellen wurden viermal mit 4 ml 1 x KRH-Lösung (4 °C) gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,1 % Triton-X-100 (v/v) in 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) lysiert.

2.5.4 Proteinbestimmung mittels BCA-Tests

Die Proteinkonzentration der einzelnen Schälchen eines Aufnahmeversuchs wurde mit Hilfe von Bicinchoninsäure (BCA) (Smith et al., 1985) unter Verwendung des Protein-

Assay Kits (Tab. 6) bestimmt. Die Färbelösung setzt sich aus 50 Teilen Reagenz A (BCA) und 1 Teil Reagenz B (4 %ige Kupfersulfatlösung) zusammen.
Die Proben wurden 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, 1:10 mit 0,15 mol/l NaCl verdünnt und 40 µl auf eine 96-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland) aufgetragen. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Parallel wurden zwei Eichreihen mit bekannten Konzentrationen Rinderserumalbumin-Standard (BSA) gemessen (118,2 µg/ml, 227,3 µg/ml, 345,5 µg/ml und 454,5 µg/ml), über die am Ende die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte.
Je Vertiefung wurden 200 µl Färbelösung zu der Probe gemischt und die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde dann bei 568 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers (Thermo Max Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) gemessen.

2.5.5 Radiotracer-Assay

Die Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Verbindungen erfolgte mittels Flüssigszintillationszählung.
Für die Messung wurden 2,1 ml Szintillationsflüssigkeit (Quick Safe A, Zinzer Analytic, England) mit 700 µl Zelllysat in ein Szintillationsröhrchen gegeben. Parallel wurden die spezifische Aktivität der Aufnahmelösungen (2,1 ml Szintillationsflüssigkeit, 700 µl Lyselösung, 100 µl Aufnahmelösung) und die Nullrate (2,1 ml Szintillationsflüssigkeit, 700 µl Lyselösung, 100 µl 1 x KRH) bestimmt. Die Messung erfolgte im Flüssigszintillationzähler 1214 Rackbeta der Firma LKB Wallace. Jede Probe wurde dreimal für 10 min gezählt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Zählraten verwendet.

2.6 LC-MS/MS-Analytik

Die Quantifizierung der nicht radioaktiv markierten Verbindungen sowie die Ergothionein- und Prolin-Konzentrationen in Geweben wurden mittels LC-MS/MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) durchgeführt.

2.6.1 Massenspektrometrie und HPLC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nicht radioaktiv markierten Verbindungen Ergothionein, Stachydrin, und MPP^+ mit Hilfe des Tripelquadrupol-Tandem-Massenspektrometers Q Trap 4000 quantifiziert (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die chemische Auftrennung der Verbindungen erfolgte mit einer HPLC-Anlage (High Performance Liquid Chromatography) der Firma Shimadzu (SLC-20AD Prominance, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Die Chromatographie zur Messung von Ergothionein, Stachydrin und MPP^+ in Aufnahmeversuchen erfolgte isokratisch über eine Normalphasensäule (Atlantis™ HILIC Silicia, 5 µm, 3,0 x 100 mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA) mit entsprechender Vorsäule (20 x 4,6 mm) und dauerte 6 min bei einer Flussrate von 300 µl/min (Laufmittel: 40/60, 0,1 % Ameisensäure/Methanol). Die Temperatur der Säule im Säulenofen (CTO-20AC Prominance) betrug 40 °C und das Injektionsvolumen des Autosamplers (SIL-20A10 Prominance) je 20 µl. Die Proben wurden auf 6 °C gekühlt.

Die Chromatographie zur Quantifizierung von Ergothionein aus Geweben wurde aufgrund der unterschiedlichen Matrix und deren ungünstigen Einfluss auf die Ionisierung des ET mit einem Gradienten durchgeführt (Tab. 14).

Tab. 14: LC-Gradient

Zeit (min)	Laufmittel MeOH (%)
0,25	90
2	10
4	10
5	90
6	90

Die Detektion der Massen erfolgte durch die Auftrennung der Proben nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring). Da nur Verbindungen in der Gasphase gemessen werden können, müssen polare oder geladene Moleküle in positiv geladene Gasphasenionen überführt werden. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Sprayvoltage: 5500 V). Dieser Prozess wurde unterstützt durch zusätzliches Stickstoffgas und zwei beheizbare Turboheater (550 °C). Anschließend konnten die protonierten Moleküle im Hochvakuum des Quadrupols analysiert werden. Die positiv geladenen Analyten wurden durch ein elektrisches Potential CE (engl., collision energy) beschleunigt und in der Kollisionszelle Q2 fragmentiert. Vor einer Messung wurden die Verbindungen in einer Konzentration von 500 ng/ml direkt in das Massenspektrometer infundiert (10 µl/min) und die Fragmente sowie die entsprechenden Kollisionsenergien ermittelt.

Tab. 15: Muttermassen, Fragmente und Kollisionsenergien der Analyten

Verbindung	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	CE [V]
ET	230	127	27
Stachydrin	144	84	31
MPP^+	170	128	43
Prolin	115	70	23

2.6.2 Kalibrierung und Vorbereitung der Proben

Bei jeder Messung wurde eine Eichgerade mit sechs Konzentrationen des Analyten erstellt (0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml). Um die Matrix der

Proben möglichst genau abzubilden und Unterschiede bei der Ionisierung zwischen Eichreihe und Proben zu minimieren wurden die Eichproben ebenfalls in Zelllysat angesetzt. Das Zelllysat wurde erzeugt, indem nicht transfizierte HEK-293-Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert und anschließend mit 12 ml 4 mM $HClO_4$ für 30 min bei Raumtemperatur lysiert wurden.
Die Proben wurden aufgetaut und 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Je 100 µl der Proben und der Eichreihe wurden zusammen mit 10 µl MPP^+ (500 ng/ml) als interner Standard in ein 200 µl Inlet eines Vials pipettiert.

2.6.3 Auswertung

Die Auswertung der LC-MS/MS-Daten erfolgte mit der Analyst 1.4.2-Software. Die Peaks wurden nach der Vorgabe eines Standardpeaks in allen Proben automatisch gesucht und integriert. Anschließend wurde der Quotient aus Analyten-Peak-Fläche und Interner-Standard-Peak-Fläche berechnet (Response Ratio).
Um die spezifische Aufnahme zu berechnen wurde vom gemessenen Gesamtgehalt die unspezifische Aufnahme, die über Endozytose, extrazelluläre Bindung und Diffusion entstand, abgezogen. Auch der endogene Substratgehalt, also die Substanzmenge die vor dem Aufnahmeversuch bereits in den Zellen war wurde subtrahiert.
Die spezifische Aufnahme hängt proportional von den in der Membran vorhandenen Transportproteinen ab. Da die Anzahl der Transporter nicht oder nur schwer messbar ist, wurde die Zellzahl der einzelnen Schälchen über die Proteinkonzentration korrigiert (siehe 2.5.4).

2.7 Protein-Analytik

Um die Expression und die Lokalisation der Fischproteine in humanen Zelllinien zu analysieren wurden eGFP-Chimären konstruiert, deren Lokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft wurde.

2.7.1 Färbung der HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit den Plasmiden pEBTetD-DR1eGFP, pEBTetD-DR2eGFP und pEBTetD-DR3eGFP transfiziert. Vor der Analyse wurden die Zellen auf Poly-Ornithin beschichtete Deckgläschen (18 x 18 mm, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) in Polysterol-Schälchen ausgesät. Die Expression der Transporter-Chimären wurde 20 Stunden vor der Analyse induziert (siehe 2.5.2).

Die Färbung erfolgte mittels des, Image-iT™ Live Plasma Membrane and Nuclear Labeling Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben. Das Kit besteht aus zwei Farbstoffen: Alexa Fluor® 594 WGA (engl., wheat germ agglutinin) der selektiv an *N*-Acetylglucosammin- und *N*-Acetylneuraminsäure-Reste bindet und so spezifisch die Zellmembran färbt. Hoechst 33342 Dye bindet selektiv an DNA und färbt so spezifisch den Zellkern. Die Extinktionsmaxima liegen bei ca. 591/618 nm, bzw. 350/461 nm.

Die Substanzen wurden in HBSS (Hank's balanced salt solution) zu 5 µg/ml (Alexa Fluor® 594 WGA) und zu 1 µM (Hoechst 33342 Dye) verdünnt. Die Zellen wurden dreimal mit auf 37 °C temperiertem HBSS gewaschen und anschließend mit 500 µl der Färbelösung für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend für 15 min bei 37 °C mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Abschließend wurden die fixierten Zellen noch zweimal mit HBSS gewaschen und mit dem Deckglas-Medium Aqua-Poly/Mount (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) auf Objektträger überführt (76 x 26 mm, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland).

HBSS (Hank's balanced salt solution)

0,137 M	NaCl
5,4 mM	KCl
0,25 mM	Na_2HPO_4
0,44 mM	KH_2PO_4
1,3 mM	$CaCl_2$
1 mM	$MgSO_4$
4,2 mM	$NaHCO_3$

2.7.2 Konfokal-Mikroskopie

Für die mikroskopische Analyse wurde ein Konfokalmikroskop (Olympus Fluoview^{TM}FV1000 IX 81, Melville, NY, USA) der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. H. Kashkar verwendet. Es wurde ein Wasserobjektiv mit einer 60-fachen Vergrößerung verwendet. Je nach digitalem Zoom wurde zusätzlich bis zu 5 x vergrößert. Die Anregungswellenlängen der verschiedenen Laser sind in Tabelle 16 dargestellt. Das emittierte Licht wurde über einen Photomultiplier mit Hilfe der Geräte-Software Fluoview Version 1.7.a ausgewertet.

Tab. 16: Laser des Konfokalmikroskops

Farbstoff	Wellenlänge [nm]	Laser	Leistung [mW]
Alexa Fluor ® 594 WGA	559	He/Ne-Laser	1,5
eGFP	488	Ar-Laser	30
Hoechst 33342 Dye	405	UV Laser Diode	20

2.8 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung basiert auf der Basenpaarung komplementärer Nukleinsäuren und dient der räumlichen und zeitlichen Expression von mRNA. Es wird eine für das Zielgen spezifische antisense-RNA-Sonde eingesetzt, die mit der mRNA des Zielgens hybridisiert. Die Digoxygenin-markierte antisense-Sonde wird immunochemisch durch eine Färbereaktion mittels alkalischen Phosphatase (AP) sichtbar gemacht. Der Zebrafisch bietet die Möglichkeit eine Färbung innerhalb der ersten fünf Tage (5 dpf, days post fertilization) nach der Befruchtung am ganzen Fisch durchzuführen.

2.8.1 *In vitro* Transkription der RNA-Sonden

Die RNA-Sonden wurden mit Hilfe von PCR-Produkten der cDNA des DR2-Transporters synthetisiert, indem durch die Primer ein 1312 bp langes Fragment erzeugt wurde, das am 5‘- bzw. 3‘-Ende die Promotorsequenz der T_3- und T_7-RNA-Polymerasen enthielt.

T_3-Promotorsequenz: 5‘ -**aat taa ccc tca cta aag gg**- 3‘

T_7-Promotorsequenz: 5‘ -**taa tac gac tca cta tag gg**- 3‘

Die Amplifikation erfolgte mit einer High-Fidelity-Polymerase unter unten angegebenen Bedingungen.

Amplifikationsprogramm:	94 °C	5 min	
	94 °C	30 sec	
	60 °C	1 min	30 Zyklen
	72 °C	2 min	
	72 °C	5 min	

Das PCR-Produkt wurde durch eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.6) aufgetrennt und aus einem präparativen Agarosegel (siehe 2.2.1.7) isoliert. Die DNA wurde nach der Isolation in H_2O_{DEPC} aufgenommen und die Konzentration für die weitere Synthese über einen Spot-Test (siehe 2.2.1.4) bestimmt.

Durch *in vitro* Transkription wurden die RNA-Sonden hergestellt, indem 1 µg DNA mit 1 x T_3- bzw. T_7-Transkriptionspuffer und RNA-Nukleotiden aus einem dNTP Labeling Mix von Roche in einfacher Konzentration versetzt wurde. In dieser Reaktion wurde mit Digoxigenin markiertes Uracil in die RNA eingebaut, an die nach der Hybridisierung ein spezifischer Antikörper binden kann. Um die RNA bei der Synthese zu schützen wurden in den Reaktionsansatz 10 U RNase-Inhibitor hinzugegeben. Der Ansatz wurde zum Schluss mit 40 U T_3- bzw. T_7-Polymerase versetzt und auf 20 µl mit H_2O_{DEPC} aufgefüllt. Die Inkubationszeit für die T_3-Polymerase betrug 2,5 h bei 37 °C, für die T_7-Polymerase 2 h.

Nachfolgend wurde die DNA-Matrize durch die RQ1DNase (20 U) für 15 min bei 37 °C abgebaut. Die Reaktion wurde mit 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 abgestoppt.

Anschließend wurde die RNA mit dem 3-fachen Volumen 100 % Ethanol und 1/10 x Volumen 4 M Lithiumchlorid für 30 min bei -80 °C tiefgefroren. Die Fällung für 15 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg,

Deutschland) bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 50 µl 70 % $Ethanol_{DEPC}$ bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die RNA wurde bei 60 °C getrocknet und in 100 µl H_2O_{DEPC} aufgenommen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Sonden mit 1 x Volumen Formamid versetzt und bei -20 °C gelagert. Die Länge der Sonden wurde mittels RNA-Gel überprüft (siehe 2.2.2.2).

2.8.2 Southern Blot

Zum Nachweis der Spezifität der Sonden wurde ein Southern Blot durchgeführt (Southern, 1975). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der Transporter DR1-3 wurde mit dem Southern Blot lediglich nachgewiesen das *in vivo* keine Kreuzhybridisierung stattfindet.

Die cDNA der Transporter wurde mit *Hin* dIII und *Xho* I aus den vorhandenen Vektorkonstrukten ausgeschnitten und auf einem Agarosegel elektophoretisch aufgetrennt. Für die Restriktion wurden jeweils 200 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden 1:10 mit H_2O verdünnt und 10 µl der Verdünnungen auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.2.1.6). Das Gel wurde gefärbt, fotografiert und der Ausschnitt mit den Banden der cDNA ausgeschnitten. Es folgte eine zweimalige Inkubation für 15 min in Denaturierungslösung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur bei der die DNA in Einzelstränge gespalten wurde. Zur Vorbereitung auf den DNA-Transfer wurde das Gel zweimal für 15 min in Renaturierungslösung inkubiert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

Zwei Lagen Whatman 3MM Papiere wurden blasenfrei als Docht auf eine Erhöhung in einer Schale aufgelegt. Das Gel wurde mit der Unterseite nach oben auf den Docht gelegt und mit einer Hybond N^+ Membran bedeckt, die zuvor mit 2 x SSC angefeuchtet wurde. Auf die Membran wurden 3 Lagen Whatman 3MM aufgelegt, die ebenfalls mit 2 x SSC angefeuchtet werden. Als saugfähiges Material wurden Papierhandtücher zurechtgeschnitten und aufgelegt. Die Papiertücher wurden mit einer Glasplatte und einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert um einen effizienten Kapillartransfer zu gewährleisten.

Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Membran luftgetrocknet und die DNA im Crosslinker mit 1500 x 100 µJ/cm^2 dauerhaft fixiert. Die Vorhybridisierung erfolgte bei 42 °C für 1 h in Hybridisierungslösung in einem 15 ml-Falcon im Rollinkubator (HB-1000 Hybridizer,

UVP, Cambridge, UK). Die Sonde wurde 1:350 in Hybridisierungslösung verdünnt, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die Membran wurde in ein 15 ml-Falcon mit Sonde bei 65 °C über Nacht im Rollinkubator inkubiert.

Anschließend wurde die Membran zweimal mit 50 ml Waschpuffer 1 in einem 50 ml Falcon bei 65 °C im Rollinkubator gewaschen. Es folgten drei Waschschritt mit 50 ml Waschpuffer 2 für 10 min bei 65 °C.

Alle folgenden Schritte wurden in kleinen Petrischalen und RT auf einem Schüttler durchgeführt. Zunächst wurde die Membran 5 min in Puffer 1 inkubiert, dann zweimal 15 min mit Puffer 2 gesättigt und anschließend 1 h in Puffer 2 mit Antikörper (anti-Digoxygenin-F_{ab}) 1:5000 inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschritte für 15 min mit Puffer 1. Äquilibriert wurde die Membran für 3 min in Puffer 3. Der Nachweis der Sonde erfolgte mittels BM Purple (Roche, Mannheim, Deutschland). Die Reaktion wurde durch Waschen mit 1 x TE abgestoppt.

Denaturierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Renaturierungslösung

1 M Tris
1,5 M NaCl
pH 7,4 mit HCl

Waschpuffer 1

2 x SSC
0,1 % SDS

Waschpuffer 2

0,15 x SSC
0,1 % SDS

Hybridisierungslösung

5 x SSC
0,5 % Böhringer Block-Reagenz
0,1 % N-Laurylsarkosin
50 % Formamid
0,02 % SDS

20 x PBS (phosphate buffered saline)

2,76 M NaCl
50 mM KCl
160 mM Na_2HPO_4
50 mM KH_2PO_4

2.8.3 Whole-mount *in situ* Hybridisierung

Für Whole-mount *in situ*-Hybridisierungen wurde ein modifiziertes Protokoll von Schulte-Merker (Schulte-Merker et al., 1992) verwendet.

Für jede Bedingung und jedes Altersstadium wurden mindestens 20 Embryonen verwendet. Die Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, in Inkubationssiebchen (siehe 2.1.8) in einer 24-Well-Platte mit 1 ml Lösung. Für jeden Ansatz wurde als Kontrolle ein Ansatz mit der T_3-Sonde mitgeführt (sense-Sonde).

Die für die *in situ* Hybridisierung verwendeten Embryonen wurden wie in 2.9.1 beschrieben aufgezogen und fixiert. Im ersten Schritt wurden die Embryonen von PFA in PBST (phosphate buffered saline mit 0,1 % Tween) überführt. Dieser Waschschritt erfolgte zweimal für 5 min. Anschließend folgte bei älteren Embryonen (ab 3 dpf) das Bleichen mit Wasserstoffperoxid-Lösung (3 %) für maximal 1 h bei Raumtemperatur. Abgestoppt wurde die Reaktion durch fünfmaliges waschen für 5 min mit PBST.

Im nächsten Schritt wurde die Permeabilität der Embryonen für die Sonde durch Proteinase K-Behandlung (10 µg/ml) erhöht. Diese Inkubation wurde erst ab einem Alter von 3 Tagen durchgeführt. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach dem Alter der Embryonen:

3 dpf:	40 min
4 dpf:	1 h 15 min
5 dpf:	1 h 45 min
6 dpf:	2 h 15 min

Nach der Proteinase-Behandlung wurden die Embryonen für 20 min mit 4 % PFA nachfixiert und zweimal 5 min mit PBST gewaschen.

Anschließend wurden die Embryonen einer Hitzebehandlung für 10 min bei 95 °C unterzogen. Diese Inkubation dient der Denaturierung von Proteinen und Ribosomen, die andernfalls durch ihre Bindung an die mRNA-Moleküle diese für die Sonde blockieren würden. Anschließend wurden die Embryonen für 5 min auf Eis abgekühlt, so dass die Renaturierung der Proteine verhindert wurde. Danach wurden die Embryonen zweimal für 5 min bei RT mit PBST gewaschen.

Die endogenen Phosphatasen, die einen unspezifischen Hintergrund während der Färbung verursachen können, wurden mit Acetanhydrid (1:400 in 0,1 M Triethanolamin, pH 7,8) für 10 min inhibiert. Danach wurden die Embryonen erneut viermal 5 min in PBST gewaschen.

Zur Vorhybridisierung wurden die Embryonen zuerst für 5 min bei Raumtemperatur und weiterhin für 1 h bei 65 °C in Hybridisierungslösung inkubiert.

Die Sonde wurde 1:200 mit Hybridisierungslösung verdünnt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Unmittelbar danach wurde die Lösung auf Eis abgeschreckt und dann wieder langsam auf 65 °C erwärmt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 h bei 65 °C.

Um nichtgebundene RNA-Sonde aus dem Gewebe zu waschen, wurden die Embryonen nach der Hybridisierung für 30 min mit Hybridisierungslösung ohne Sonde bei 65 °C inkubiert. Es folgten zwei 30-minütige Inkubationen in 50 % Hybridisierungslösung/ 50 % 2 x SSCT und zwei 30-minütige Inkubationen in 0,2 x SSCT bei 65 °C.

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten wieder bei Raumtemperatur. Zuerst wurden die Embryonen zweimal für 10 min in PBST gewaschen. Die Blockierung mittels BSA (bovine serum albumine) und Schafserum in Blockierungslösung I erfolgte für 10 min und in Blockierungslösung II für 1 h.

Die Antikörper-Inkubation mit anti-Digoxygenin-F_{ab} wurde mit einem Verdünnungsfaktor von 1:2000 in Blockierungslösung II für 4 h durchgeführt.

Nach der Inkubation folgten acht 15-minütige und zwei 30-minütige Waschschritte mit PBST, bevor die Embryonen für die Färbung mit AP-Puffer für 10 min vorbereitet wurden. Der AP-Puffer aktiviert die alkalische Phosphatase durch den Kofaktor $MgCl_2$. Levamisol inhibiert die endogenen Phosphatasen, jedoch nicht das Isoenzym, das an den Antikörper gekoppelt ist.

Für die Färbung wurden die Embryonen in eine 24-Well-Platte überführt und der AP-Puffer wurde durch BM Purple-Substrat-Reagenz ersetzt. Die Färbung erfolgte im Dunkeln und dauerte ca. 2 - 6 h. Zur Beendigung der Färbung wurde das BM Purple durch PBST ersetzt und noch zweimal 15 min gewaschen. Falls erforderlich konnte die Färbung nach erneuter Aktivierung mit AP-Puffer und anschließender Inkubation mit BM Purple fortgesetzt werden. Endgültige Fixierung und Konservierung erfolgte durch 4 % PFA.

Die Bilder der Embryonen wurden im Institut für Biochemie II mit einem Binokular der Firma Nikon (Nikon SMZ1500, Objektiv P-HR Plan Apo 1,6 x WD24, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Raimund Wagener

gemacht. Zur Darstellung und Bearbeitung der Bilder wurde die Software NIS Elements BR Version 3.00 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) verwendet.

Block I

0,2 % BSA
in PBST

Block II

0,2 % BSA
5 % Schafserum (hitzeinaktiviert)
in PBST

Wasserstoffperoxid-Lösung

3 % H_2O_2
0,5 % KOH

AP-Puffer

100 mM Tris pH 9,5
50 mM $MgCl_2$
100 mM NaCl
0,1 % Tween-20
5 mM Levamisol

Hybridisierungslösung

50 % Formamid
5 x SSC
0,5 % Böhringer Block-Reagenz
1 mg/ml Hefe-RNA
100 µg/ml Heparin
1 x Denhard's
0,1 % Tween-20
0,1 % CHAPS
5 mM EDTA

2.9 Zebrafisch-Methoden

2.9.1 Zebrafischhaltung und Gewinnung von Embryonen

Die transgenen Knockout- und die Wildtyp-Fische wurden im Institut für Genetik sowie im Institut für Biochemie II gehalten. Die Versuche zur Ergothionein-Aufnahme wurden aus Sicherheitsgründen für die anderen Fische ausschließlich in der isolierten Anlage im Institut für Biochemie II durchgeführt.

Die Fische wurden in PP-Modulen oder einer Aquarienanlage bestehend aus seriell angeordneten Wasserbecken (Aqua-Schwarz, Göttingen, Deutschland) bei einer Temperatur zwischen 26 - 28 °C gehalten (Christine Nüsslein-Volhard und Ralf Dahm, Zebrafish, Oxford University Press, 2002).

Der tägliche Wasserwechsel der Anlagen betrug 1/10 des Gesamtvolumens. Das verwendete Wasser wurde aus Leitungswasser mit VE-Wasser verschnitten (6 - 10 Härtegradeinheiten). Die Fütterung der Fische erfolgte dreimal täglich (Trockenfutter von Aqua Schwarz oder Artemien). Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 14 h Licht und 10 h Dunkelheit.

Zur Verpaarung der Fische wurden ein Männchen und ein Weibchen in eine Einzelbox zusammengesetzt, deren Boden mit Glaskugeln bedeckt war. Am nächsten Morgen löste der Lichtreiz das Paarungsverhalten aus. Nach ca. 30 min konnten die befruchteten Eier aus der Box aufgesammelt werden. Die Aufzucht erfolgte nach (Kimmel et al., 1995).

In dieser Arbeit wurden folgende Fischlinien verwendet:

Tab. 17: Verwendete Fischlinien

Fischbezeichnug	Gen	Referenz
Tü (Tübingen)	Wildtyp	-
gata1^{dsRED}	gata1	Traver 2003
ZM_00007837	slc22a4b	Znomics

2.9.2 Fixierung und Dechorionisierung von Embryonen

Da nach 24 hpf (hours post fertilization) die Pigmentierung der Fische einsetzt, wurde bei einer Verwendung in der *in situ* Hybridisierung das Systemwasser mit 200 mM 1-Phenyl-2-thiourea (PTU) versetzt, das die Melanogenese durch Blockieren aller Tyrosinase-abhängigen Schritte inhibiert (Karlsson et al., 2001). Für *in situ* Hybridisierung und lichtmikroskopische Untersuchungen wurden Embryonen im gewünschten Altersstadium für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Vor der Weiterverwendung wurde das Chorion mechanisch mit feinen Pinzetten entfernt.

2.9.3 Gewinnung von genomischer DNA und Genotypisierung

Die Fische wurden mit einer 0,003 %igen Tricain-Lösung pH 7 betäubt (Tricain, Sigma-Aldrich München, Deutschland) und ein Stück der Schwanzflosse (mind. 1 mm^2) mit

einem sterilen Skalpell abgeschnitten. Der Fisch wurde zum Aufwachen in frisches Systemwasser in eine separate Box zurückgesetzt.

Die Gewebeprobe wurde mit 100 µl 50 mM NaOH versetzt und für 20 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit 10 µl 1 M Tris (pH 8) eingestellt.

In der Lösung verbliebene Gewebetrümmer wurden durch Zentrifugation (3 min, 16000 x g) entfernt und der Überstand in der PCR eingesetzt (siehe 2.2.1.11).

Die Genotypisierung der Knockout-Fische erfolgte mittels nested PCR (Abb.7).

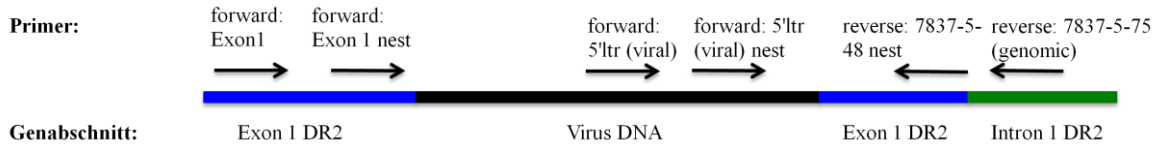


Abb. 7: Schematische Darstellung der Primerpositionen

Für die erste PCR-Reaktion wurden jeweils die drei äußeren Primer (forward Exon1, forward 5'ltr und reverse 7837-5-75) verwendet und in der zweiten Reaktion entsprechend die inneren Primerkombinationen. Diese Primer ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis des Wildtyp-Allels und der Virusinsertion in einer Reaktion.

Amplifikationsprogramm:	95 °C	5 min	
	95 °C	30 sec	
	55 °C	1 min	35 Zyklen
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	

DNA-Extraktionspuffer

50 mM	NaOH
1 M	Tris pH 8

2.9.4 Alcianblau-Färbung

Die Alcianblau-Färbung wurde eingesetzt um spezifisch das Knorpelgewebe der Fische anzufärben (Walker und Kimmel, 2007). Hierzu wurden drei bis vier Tage alte Fische mit

Tricain betäubt und mit 4 %igem Paraformaldehyd in PBS für zwei Stunden fixiert. Anschließend wurden die Larven gewaschen und mit 1 ml 50 %igem Ethanol für 10 min dehydriert. Nach dieser Inkubation wurde das Ethanol durch eine 0,02 %ige Alcianblau-Lösung mit 50 mM $MgCl_2$ in 70 % Ethanol ersetzt und über Nacht inkubiert. Nach der Färbung wurden die Fische mit 1 ml Wasser gewaschen und im Anschluss die Pigmentierung der Fische entfernt. Hierzu wurden die Larven mit 1 ml 1,5 % H_2O_2 und 1 % KOH 20 min bei RT entfärbt. Anschließend wurden die Larven für 30 min mit 0,25 % KOH in 50 % Glycerol gewaschen und mit einem Binokular (Nikon SMZ1500, Objektiv P-HR Plan Apo 1,6 x WD24, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) fotografiert.

2.9.5 Isolation von Geweben

Die Isolation von Geweben wurde an zwei bis drei Monate alten Fischen vorgenommen. Hierzu wurden die Fische mit Eiswasser getötet und die Organe unter einem Stereo Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) umgehend entnommen. Um die Ergothionein-Konzentration in den Geweben zu ermitteln wurden die Organe in 100 µl 4 mM $HClO_4$ aufgenommen und mit einem Mörser in den Eppendorfgefäßen mechanisch aufgeschlossen. Die Proben wurden anschließend über Nacht bei -20 °C eingefroren. Die Extraktion des Ergothioneins und vor allem die Fällung von störenden Proteinen erfolgten am nächsten Tag durch Zugabe von 400 µl 100 %igem Methanol. Nach der Zentrifugation für 30 min bei 16000 x g wurde der Überstand abgenommen und sofort für die Messung mittels LC-MS vorbereitet (siehe 2.6).

2.9.6 Inkubation und Verfüttern von Zebrafischeiern

Um gezielt ET an die Versuchsfische zu verfüttern wurde ein natürliches Verhalten der Tiere ausgenutzt. In der Aquariumhaltung müssen die Fische nach dem Ablaichen umgehend von den Eiern getrennt werden bzw. muss dafür gesorgt werden, dass die Fische das Gelege nicht erreichen können, da diese sonst die Eier fressen.

Eier wurden verwendet um gezielt ET zu verfüttern. Hierzu wurden 6 hpf alte Eier eines Geleges mit 1 mM ET in Systemwasser für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte

ein Waschschritt für 1 min mit 20 ml Systemwasser. Aus jedem inkubiertem Gelege wurden 5 Eier verwendet um die Dosis zu bestimmen. Die Aufarbeitung der Proben wurde analog zu den Gewebeproben durchgeführt (siehe 2.9.5). Die Inkubation der Eier erfolgte unmittelbar vor dem Versuch und wurde immer frisch angesetzt.

24 Stunden vor der Fütterung wurden die Fische voneinander getrennt und in einzelnen Boxen gehalten. Um eine möglichst große Aufnahme von Eiern zu gewährleisten erfolgte die letzte normale Fütterung 12 Stunden vor dem Versuch. Die Eier wurden mit einer Pasteurpipette auf die Wasseroberfläche fallen gelassen um immer wieder den Fressreiz auszulösen. Die Fütterungen wurden 1 bis 2-mal pro Tag durchgeführt. Die Anzahl der gefressenen Eier lag zwischen 40 - 100. Alle Versuchstiere wurden gleichzeitig gefüttert um die Fütterung unterbrechen zu können wenn eines der Tiere keine Eier mehr aufnehmen konnte.

2.9.7 Generierung einer DR2 transgenen Fischlinie

Um die räumliche und zeitliche Expression am lebenden Fischen analysieren zu können ist eine *in situ* Hybridisierung nicht geeignet. Da der Zebrafisch sich jedoch außerhalb der Mutter entwickelt und in den ersten Tagen völlig transparent ist lässt sich die Expression und Regulation von Genen mit transgenen Fischlinien untersuchen. Aus diesem Grund wurde der intergenische Bereich zwischen dem letzten Exon des DR1-Gens und des ersten Exons des DR2-Gens per PCR amplifiziert (siehe 2.2.1.11). Über die eingefügten Schnittstellen (5‘: *Eco* RI und 3‘: *Nco*I) konnte der putative Promotorbereich mittels Standardverfahren vor die cDNA des eGFPs kloniert werden (Abb. 8).

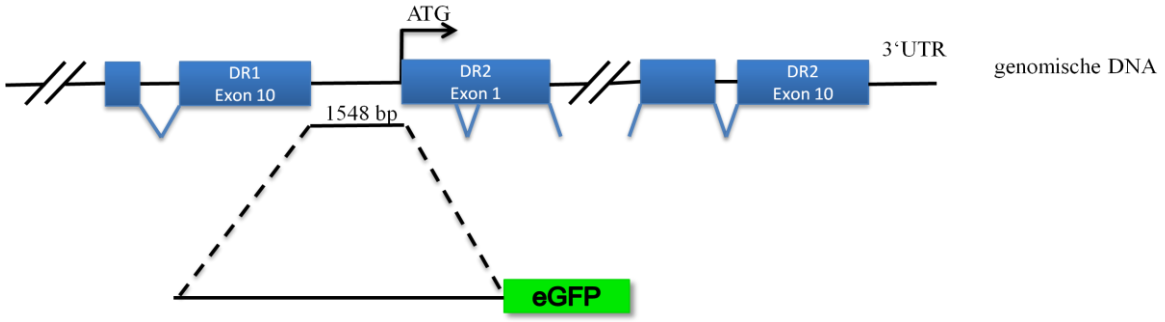


Abb. 8: Schematische Darstellung des Promotorkonstrukts
Dargestellt ist die genomische Organisation der Gene DR1 und DR2. Der putative Promotorbereich des DR2-Transporters mit einer Länge von 1548 bp befindet sich zwischen den beiden Genen und wurde als putativer Promotorbereich amplifiziert. Exons sind als blaue Rechtecke dargestellt und der Pfeil weist in die Transkriptionsrichtung.

2.9.8 Ac/Ds-System

Da bei der normalen Injektion von linearisierter DNA nur selten Integrationen ins Genom stattfinden wurde eine Methode verwendet, die Integrationen in die Keimbahn und somit eine Vererbung an die Nachkommen von bis zu 60 % ermöglicht. Dieses System besteht aus dem Activator (Ac) und dem Dissociation (Ds) Element, das durch die Transposase ausgeschnitten und in das Wirtsgenom integriert wird. In dieser Arbeit wurde mit einer veränderten Transposase aus Mais (*zea mays*) gearbeitet, die durch das Anhängen eines Kernlokalisations-Signals verändert wurde (Emelyanov et al., 2006). Die Synthese der benötigten Transposase-mRNA wurde mit Hilfe des mMessage Machine SP6 nach Herstellerangaben durchgeführt. Für jede Umschreibung wurde 1 µg pAc-SP6 Plasmid eingesetzt. Die Aufreinigung der mRNA erfolgte über das RNeasy mini Kit (Qiagen), ebenfalls nach Herstellerangaben. Die mRNA wurde in einem Volumen von 30 µl eluiert, in 2 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Der intergenische Bereich (Abb. 8) wurde über die Schnittstellen *Eco* RI und *Nco* I aus dem oben beschriebenen Konstrukt geschnitten und in das Plasmid pMDS-eGFP (Emelyanov et al., 2006) kloniert. Das neue Konstrukt wurde als pMDS-P-DR2eGFP (P, Promotor) bezeichnet, das von den 5'- und 3'-Ds-cis-Sequenzen (250 bzw. 370 bp) flankiert wird. Die Injektionslösung setzte sich aus 2 µl mRNA (150 ng), 1 µl (100 ng) pMDS-P-DR2eGFP, 0,1 M KCl und 0,1 x Volumen Phenolrot zusammen.

Als Kontrolle des Systems und der Injektionen wurde in parallelen Ansätzen das Konstrukt pMDs-*krt8*-eGFP injiziert, das den 2,25 kb langen Promotorbereich des *keratin 8* Gens trägt (Gong et al., 2002).

2.9.9 Injektionen

Die Injektion der RNA bzw. DNA wurde mittels eines FemtoJet® und einem Mikromanipulator der Firma Eppendorf durchgeführt. Die Injektionskapillaren wurden mit Hilfe eines Slutter P9 Micropipette Pullers hergestellt. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet (Tab 18).

Tab. 18: Parameter der Injektionsnadeln

Puller	Heat	Velocity	Pull	Time
Horizontal	537	100	100	150

Die Injektionen erfolgten in befruchtete Eier im Einzell-Stadium (Kimmel et al., 1995).

2.10 Histologische Analyse

Die histologische Analyse wurde an, in Paraffin eingebetteten, adulten Zebrafischen durchgeführt. Um die Fische zu fixieren und um kalkhaltige Strukturen zu entfernen wurden diese 96 Stunden in Dietrich-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe. Nach drei Inkubationsschritten für eine Stunde mit Xylol bei RT erfolgte die erste Inkubation für 3 Stunden in Paraffin Nr. 3 (Thermo Scientific). Dieser Schritt wurde über Nacht wiederholt. Es folgten zwei Schritte für 3 Stunden mit Paraffin Nr. 6 und eine weitere Inkubation über Nacht bevor die Fische endgültig in Paraffin Nr. 9 eingebettet wurden. Die Schnitte wurden auf einem Mikrom HM 355 (Thermo Scientific, MA, USA) mit einer Schnittdicke von 7 µm angefertigt.

2.10.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Die Schnitte wurden durch Inkubation mit Xylol zweimal 3-minütige mit Xylol von dem Paraffin befreit und mit einer absteigende Ethanolreihe rehydriert. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Sigma-Adrich) für 6 min und die Gegenfärbung mit 1 % Eosinlösung (Sigma-Aldrich) bei RT. Es folgten eine aufsteigende Ethanolreihe und ein letzter Inkubationsschritt mit Xylol, bevor die Präparate mit DPX (Fluka) eingedeckelt wurden. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica DM L Mikroskop aufgenommen (Leica, Wetzlar, Deutschland).

2.10.2 Blutisolation und Pappenheimfärbung

Die Blutisolation wurde an adulten, mit Tricain betäubten Fischen durchgeführt. Die Schwanzarterie wurde geöffnet und das Blut mit einem heparinisierten Mikrohaematokritröhrchen (Assistent, Sondheim, Deutschland) entnommen. Das Blut wurde mit 1,5 µl 0,2M EDTA pH 8 auf einen Objektträger gegeben und ausgestrichen. Anschließend wurde eine modifizierte Pappenheimfärbung durchgeführt.
Die Blutzellen wurden 5 min mit Methanol fixiert und 4 min bei RT mit May-Grünwald (Sigma) gefärbt. Nach der Inkubation wurden die Objektträger kurz in Wasser geschwenkt und für 20 min mit Giemsa-Lösung (Sigma) gegengefärbt. Die Reste der Färbelösung wurden durch schwenken in Wasser entfernt und die Objektträger luftgetrocknet. Die Analyse erfolgte mit einem Zeiss Axiophot mit einer 1000-fachen Vergrößerung.

2.11 Induktion von UV-Stress

Die Induktion von oxidativem Stress erfolgte mit einer UV-Platte der Firma (UVP, Upland CA, USA). Es wurden die Wellenlängen 302 nm (UVB) und 365 nm (UVA) verwendet. Die Becken für die Inkubationen wurden 2 cm vom Boden aus mit Aquariumwasser gefüllt und unter ein Gestell geschoben, um eine reproduzierbare Bestrahlung zu gewährleisten

(Abb. 9). Die Inkubationen betrugen 15 - 60 min, wobei die Temperaturveränderungen nicht mehr als 2 °C betrugen (23 - 25 °C).

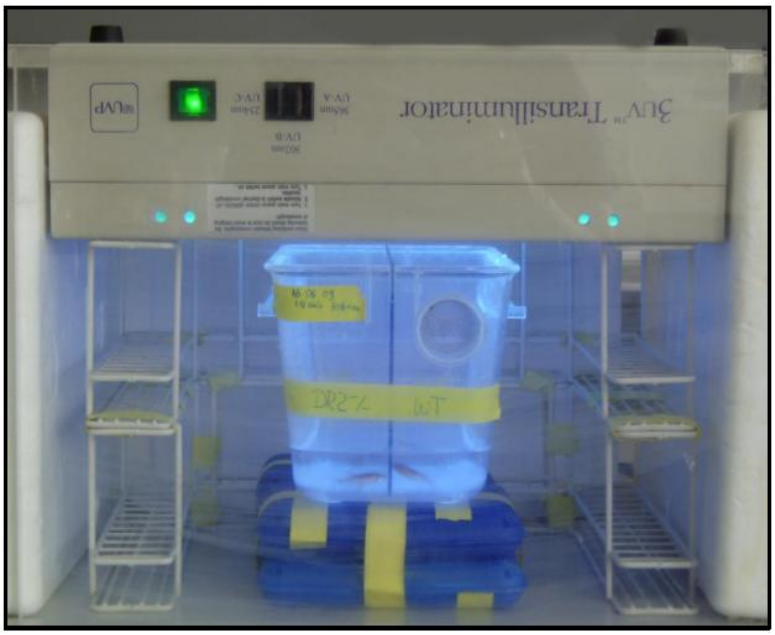


Abb. 9: Experimenteller Aufbau zur Induktion von UV-Stress

Nach der Bestrahlung wurden die Fische in Standardbecken 7 Tage bei normaler Fütterung gehalten, bevor die Augenlinsen in Tyrodelösung präpariert wurden. Die Linsen wurden auf einer Neubauer-Zählkammer in Tyrodelösung gelegt und die Linien, die durch die Linse liefen fokussiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica DM L Mikroskop aufgenommen.

Tyrodelösung:

5,0 mM	Glukose
136 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
1,2 mM	KH_2PO_4
1,8 mM	$CaCl_2$
0,5 mM	$MgCl_2$
0,36 mM	NaH_2PO_4
11,9 mM	$NaHCO_3$

pH 6,5

3 Ergebnisse

Die bisherigen Analysen der ET-Funktion beschränken sich überwiegend auf *in vitro* Untersuchungen, die vorrangig in Zellkultur durchgeführt wurden. Versuche *in vivo* sind begrenzt auf ET-freie Ernährung von Versuchstieren (Kaninchen, Ratten) ohne die Kontrolle, ob ein ET-Mangel erzeugt wurde (Mortensen, 1953; Spicer et al., 1951). Im Tiermodell konnte lediglich durch zusätzliche Applikation von ET und die anschließende Induktion von oxidativem Stress ein Schutz von ET vor Lipidperoxidation in der Ratte und vor Methämoglobin-Entstehung in der Ratte und im Kaninchen erreicht werden (Deiana et al., 2004; Mortensen, 1953; Spicer et al., 1951). Ein Tiermodell mit einem Knockout des ETT gibt es bisweilen noch nicht. Da auch im Genom des Zebrafischs drei mögliche Kandidaten für einen orthologen ETTh (Tab. 1) identifiziert werden konnten, wird in dieser Arbeit der Zebrafisch als *in vivo* Modell verwendet. Ziel ist es den orthologen ETT des Zebrafischs zu identifizieren und zu inaktivieren, um einen vollständigen ET-Mangel zu erzeugen.

3.1 Klonierung

Da der Vergleich der Aminosäuresequenzen der putativen ETTs im Zebrafisch keine eindeutige Zuordnung zu ihrer Funktion zuließ, wurden diese in der Reihenfolge ihrer Klonierung als DR1, DR2 und DR3 (*Danio rerio*) bezeichnet. Die Gene sind alle auf Chromosom 21 lokalisiert, auf dem DR1 und DR2 direkt benachbart liegen (Ensembl 47.7a-Zv7). Die Klonierung der drei Kandidaten wurde von Beatrix Steinrücken durchgeführt (siehe 2.2). Die cDNA für die Klonierung stammte aus der Gesamt-RNA eines Zebrafischs des Tübingen-Stamms. Die Klonierung erfolgte in zwei Fragmenten (FA und FB), um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen fehlerfrei amplifizierte Fragmente zu erhalten. Diese wurden nach der Sequenzierung in den Expressionsvektor pEBTetD kloniert (Bach et al., 2007). Die vollständigen Sequenzen der drei Transporter sind im Anhang dargestellt. Da es bei heterolog exprimierten Membranproteinen wichtig ist, dass diese auch die Plasmamembran erreichen, wurde die Lokalisation in den HEK-293-Zellen

durch die Erzeugung von Transporterchimären mit dem grün fluoreszierenden Protein (Green Fluorescent Protein (GFP)) überprüft.

An die offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) von DR1-3 wurde mittels PCR (siehe 2.2.1.11) eine Schnittstelle für *Nco* I (Erkennungssequenz: CCATGG) eingefügt, die das Anhängen des eGFPs (eGFP, enhanced GFP (Genbank-Eintrag U57609)) ermöglichte. Das eGFP wurde über die Schnittstellen *Nco* I und *Xho* I mittels Standardverfahren an einen, per PCR erzeugten Übergang, an die Transporter-cDNA angefügt (Tab. 9). Die Stopcodons der Transporter wurden durch die neue Schnittstelle auf Aminosäureebene zu einem Serin, das als Verbindung diente. Die Konstrukte wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft und in HEK-293-Zellen zur Expression gebracht. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und die Expression der Transporterchimären 16 h vor der mikroskopischen Analyse durch Doxyzyklin induziert. Die spezifische Färbung der Plasmamembran erfolgte mit dem Farbstoff Alexa Fluor®594WGA und die Kernfärbung mit Hoechst 33342 Dye (siehe 2.7.1).

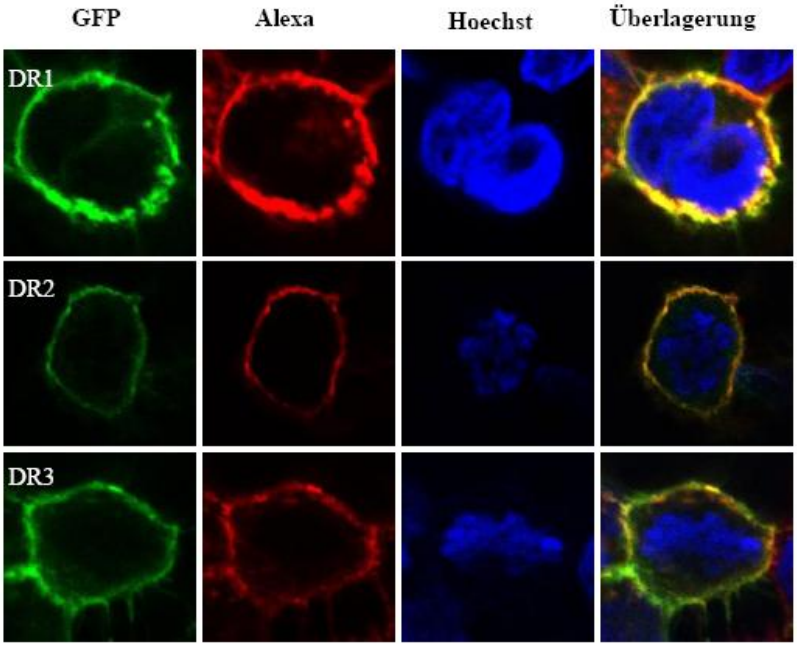


Abb. 10: Lokalisation der DR1-3eGFP-Chimären in HEK-293-Zellen

Die Reihen zeigen Zelllinien, die mit den Konstrukten pEBTetD-DR1eGFP, pEBTetD-DR2eGFP und pEBTetD-DR3eGFP transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 250-facher Vergrößerung eines Konfokal-Laser-Mikroskops fotografiert. Die erste Spalte zeigt die GFP-Fluoreszenz, die zweite eine spezifische Färbung der Zellmembran mit Alexa Fluor®594WGA und die dritte eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 Dye. Die vierte Spalte zeigt die Überlagerung aller Bilder.

Abbildung 10 zeigt die Lokalisation der mit eGFP gekoppelten Proteine innerhalb der Zelle. Die Positionen aller drei Kandidaten stimmt mit der Position der gefärbten Zellmembran überein, wie die Überlagerungen deutlich zeigen. Die Färbung des Zellkerns zeigt das Stadium des Zellzyklus in dem sich die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung befunden haben. So ist z.B. der vertikal durch die Zelle verlaufende grüne Streifen in der Bilderreihe des DR1-Transporters dadurch zu erklären, dass die Zelle eine neue Plasmamembran ausbildet.

3.2 Funktionelle Charakterisierung

Nachdem die Lokalisation der Transporter in den Plasmamembranen der Zellen nachgewiesen werden konnte, erfolgte die funktionelle Charakterisierung durch heterologe Expression in HEK-293-Zellen. Hierzu wurden die Transporter ohne eGFP-Anhang verwendet, um mögliche Beeinflussungen der Transportleistungen auszuschließen. Um bei dem Funktionstest nur die durch den Transporter geleistete Akkumulation des Substrats berechnen zu können, war es notwendig die unspezifische Aufnahme von dem Gehalt des intrazellulär vorhandenen Substratgehalts zu subtrahieren. Hierzu wurden Kontrollzellen verwendet, die den Transporter nicht exprimieren. Dies ist z.B. durch eine parallele Transfektion mit dem entsprechenden Leer-Vektor möglich. Da es jedoch zu Unterschieden in den Zelllinien kommen kann, wurde in der Arbeitsgruppe der Expressionsvektor pEBTetD entwickelt, der eine über Doxyzyklin induzierbare Transkription von cDNAs in humanen Zelllinien ermöglicht. Durch dieses System werden die Zellen während des Wachstums nicht oder nur geringfügig durch die Synthese des fremden Proteins belastet (Bach et al., 2007).

Die Aufnahmeversuche (siehe 2.5 und 2.6) zum Vergleich der Transportaktivität von DR1-3 wurden immer mit parallel transfizierten Zellen durchgeführt, um Unterschiede durch das Alter und die Anzahl der Passagen zu vermeiden. Als Kontrolle wurden stets die gut charakterisierten humanen Transporter ETT und CTT parallel getestet. Für alle Bedingungen wurden Triplikate angefertigt, die anschließend mittels Radiotracer-Assay oder LC-MS quantifiziert wurden. Da man bei der LC-MS-Analytik nicht zwischen aufgenommener und bereits vor dem Versuch vorhandener Substanzkonzentration unterscheiden kann, ist es wichtig, dass der Transporter oder verwandte Transporter nicht

nativ in der verwendeten Zelllinie exprimiert werden. Für HEK-293-Zellen konnte keine ETTh-mRNA mittels Real-Time-PCR gefunden werden (Gründemann et al., 2005). Die Menge, die bereits zu Beginn der Aufnahme in den Zellen vorhanden war, wurde als endogenes Level durch Inkubation mit physiologischem Puffer (KRH) unter identischen Bedingungen bestimmt und von dem Gesamtgehalt subtrahiert. Es ist bekannt, dass ETTh-exprimierende Zellen einen geringen ET-Gehalt, vermutlich durch Aufnahme aus dem Nährmedium, aufweisen. Die unspezifische Aufnahme wurde durch Zellen bestimmt, in denen die Expression des Transporters nicht mit Doxyzyklin induziert wurde. Für alle Substrate wurde die initiale Transporteffizienz (TE) berechnet. Diese ergibt sich aus k_{cat}/K_m. Der Quotient beinhaltet die Affinität (K_m) und die Wechselzahl (k_{cat}, turnover number) eines Transporters für ein bestimmtes Substrat. Diese Parameter sind analog zur Enzymkinetik. Weiterhin gilt $V_{max} = k_{cat} \times T_{total}$ (T_{total} = Gesamtzahl der Transportproteine), wodurch die TE alternativ über V_{max}/K_m beschrieben werden kann, unter der Bedingung, dass S viel kleiner als K_m ist (Schömig et al., 2006). Die in den Aufnahmeversuchen verwendeten Konzentrationen lagen zwischen 0,1 µM für radioaktiv markierte Substrate, bzw. 10 µM für unmarkierte Substrate. Die Clearance v/S, also das Volumen, das pro Minute pro mg Protein von dem Substrat befreit wird, ist nach der Michaelis-Menten-Gleichung $v = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$ (v = Aufnahmegeschwindigkeit, V_{max} = maximale Aufnahmegeschwindigkeit, K_m = Michaelis-Menten-Konstante und [S] = Substratkonzentration) gleich dem Ausdruck V_{max}/K_m, da v die initiale Aufnahmerate der spezifischen Aufnahme darstellt.

3.2.1 Aktivitätstests für die Proteine DR1, DR2 und DR3

Da anhand der Aminosäuresequenz eine Zuordnung der Transporter zu seinem jeweiligen Substrat nicht möglich war, wurden in einem ersten Versuch die Transporter DR1, DR2 und DR3 auf die Transportleistung für die Substrate Ergothionein (ET) und Carnitin hin getestet. Für die humanen Transporter (ETTh und CTTh) ist bekannt, dass jeder nur ein spezifisches Substrat besitzt, das ihn von dem jeweils anderen unterscheidet (Grigat et al., 2007; Gründemann et al., 2005) (Bacher et al. Manuskript eingereicht). Die ET-Aufnahme wurde mittels LC-MS quantifiziert, während die Carnitin-Aufnahme mit einem Radiotracer-Assay quantifiziert wurde. Die Transportleistung der humanen Transporter

wurde auf 100 % gesetzt und darüber die relative Aufnahme für die Transporter des Zebrafischs berechnet. Der als DR1 bezeichnete Transporter zeigte weder für ET noch für Carnitin ein nennenswertes Signal. Auch die Substratsuche für den DR1-Transporter mittels LC-MS Differenz-Abtönung (difference shading) (Gründemann et al., 2005) zeigte keine Aktivität für dieses Protein (Daten nicht gezeigt). Für den DR2-Transporter konnte eine deutliche Aufnahme von Ergothionein nachgewiesen werden, die im Vergleich mit der Aufnahme des humanen Transporters bei 21 % lag.

Der DR3-Transporter zeigte ein Signal für Carnitin, aber wie der verwandte CTTh kein Signal für ET. Die Transporter ETTh und DR2 scheinen somit eine hohe Selektivität für ihr spezifisches Substrat ET zu besitzen. Dies bedeutet, dass eine erste Zuordnung der Zebrafisch-Proteine zu ihren orthologen humanen Transportern möglich ist (DR2 ≈ ETTh, DR3 ≈ CTTh).

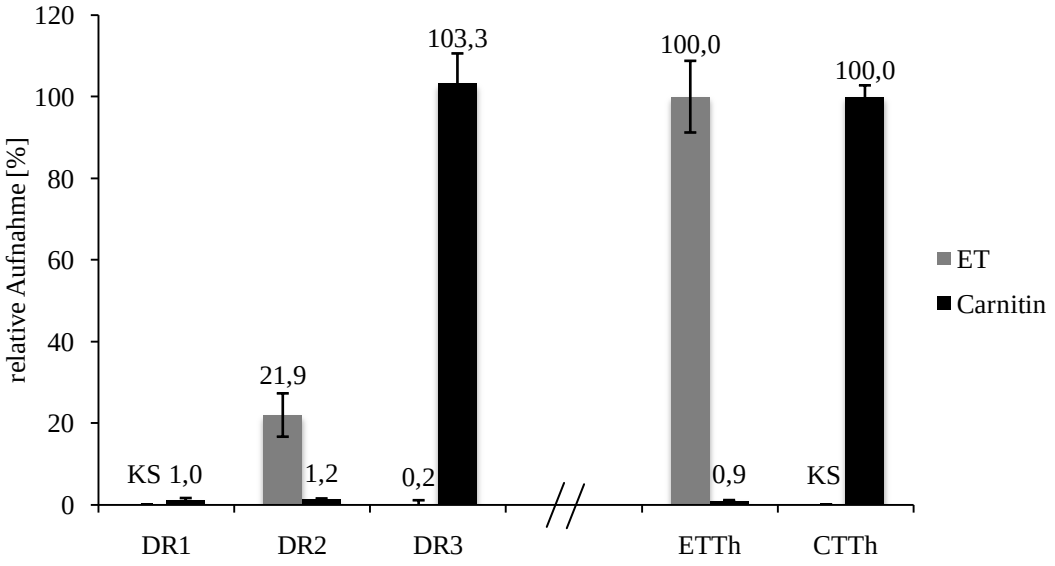


Abb. 11: Relative Transporteffizienz der Transporter DR1-3
Dargestellt ist die relative Transporteffizienz von ET und Carnitin durch die Transporter DR1, DR2, DR3, ETTh und CTTh in stabil transfizierte HEK-293-Zellen. Die spezifische Transporteffizienz der Fischproteine wurde auf die Transporteffizienz von ET bzw. Carnitin der humanen Transporter normiert (100 %). Die Aktivitäten der humanen Transporter wurden als Kontrolle eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM), KS = kein Signal, n = 3.

Die Clearance des DR2-Transporters lag, mit dem hier verwendeten Expressionsvektor pEBTetD, bei $15{,}0 \pm 0{,}3$ µl min^{-1} mg Protein^{-1} im induzierten Zustand (= 100 %) und $0{,}50 \pm 0{,}05$ µl min^{-1} mg Protein^{-1} (= 3 %) im nicht induzierten Zustand (Abb. 12). Die Clearance des humanen ETT lag durchschnittlich um den Faktor 5 höher. Die

Steuerbarkeit der Zelllinie und somit das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis war für den DR2-Transporter mit 1:30 für die Charakterisierung zufriedenstellend.

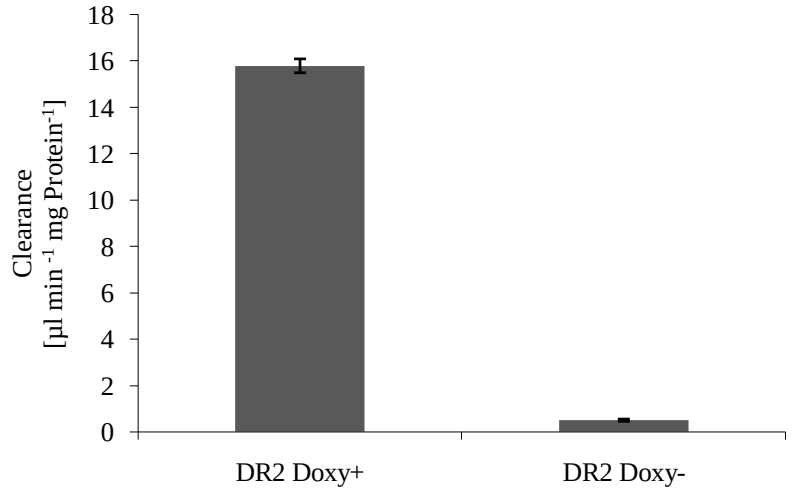


Abb. 12: Clearance des DR2-Transporters
Dargestellt ist die Steuerbarkeit des Expressionssystems pEBTetD und die Clearance der DR2-vermittelten ET-Aufnahme in stabil transfizierte HEK-293-Zellen. Die Steuerbarkeit beträgt 30:1 (induziert Doxy+ gegen nicht induziert Doxy-). Der endogene ET-Gehalt wurde parallel durch Inkubation mit KRH quantifiziert und subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.2.2 Ergothionein ist das physiologische Substrat des DR2-Transporters

Nachdem der DR2-Transporter in den ersten Experimenten eine spezifische Aktivität für ET zeigte, wurde dieser genauer analysiert, um ihn eindeutig seinem humanen Ortholog zuordnen zu können.

Als nächstes wurde die Affinität des DR2-Transporters zu ET getestet. Die Affinität (K_m-Wert) des Transporters wird durch steigende Konzentrationen in der Aufnahmelösung gemessen, die zu einer Sättigung des spezifischen Transports führen. Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Aufnahmegeschwindigkeit dient als Maß für die Affinität. Die Affinität eines Transporters ist unabhängig vom Expressionssystem und der Anzahl aktiver Transporter in der Membran. Der Verlauf der Sättigungskurve wird durch die Michaelis-Menten-Funktion beschrieben.

Um das endogene Level der Zellen zu bestimmen, wurden Zellen mit physiologischem Puffer inkubiert. Die unspezifische Aufnahme wurde durch nicht induzierte Zellen

bestimmt und von der Gesamtaufnahme abgezogen. Die Affinität von DR2 für ET betrug 116 µmol/l (95 % Konfidenzintervall: 110 - 133 µmol/l, Abb. 13) während die Affinität des humanen ETT bei 21 µmol/l liegt (Gründemann et al., 2005).

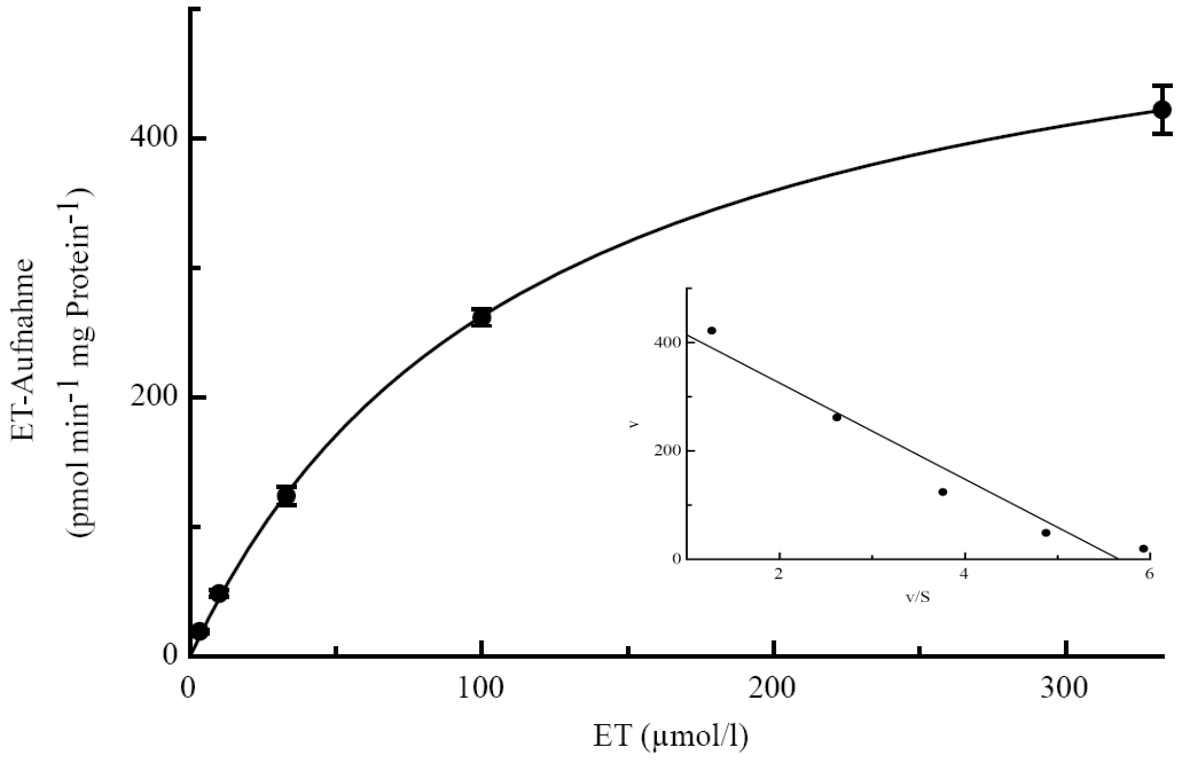


Abb. 13: Sättigungskurve und Linearisierung der ET-Aufnahme
Sättigungskurve der initialen ET-Aufnahme (1 min). Die unspezifische Aufnahme und das endogene Level von ET wurden in parallelen Ansätzen quantifiziert und subtrahiert. Der V_{max}-Wert betrug 422,1 ± 18,4 pmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3. Kleine Abb.: Eadie-Hofstee-Linearisierung der Michaelis-Menten-Funktion. Aufgetragen sind v = Aufnahmegeschwindigkeit (pmol min^{-1} mg $Protein^{-1}$) gegen v/S, S = Substratkonzentration.

Als nächstes wurde die zeitabhängige Akkumulation von ET durch den DR2-Transporter untersucht (Abb. 14). Durch das Angebot von 10 µmol/l ET in der Aufnahmelösung wurde nach 60 min eine intrazelluläre Konzentration von 196 ± 5 µmol/l erreicht. Bei dieser Berechnung wurde ein intrazelluläres Wasservolumen von 6,7 µl/mg Protein angenommen (Martel et al., 1996). Dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 20, während man beim humanen Transporter eine Anreicherung um den Faktor 80 findet. Die nicht induzierten Kontrollzellen zeigten nach 60 min eine intrazelluläre Konzentration von 8,2 ± 0,6 µmol/l und waren somit fast vollständig impermeabel für ET.

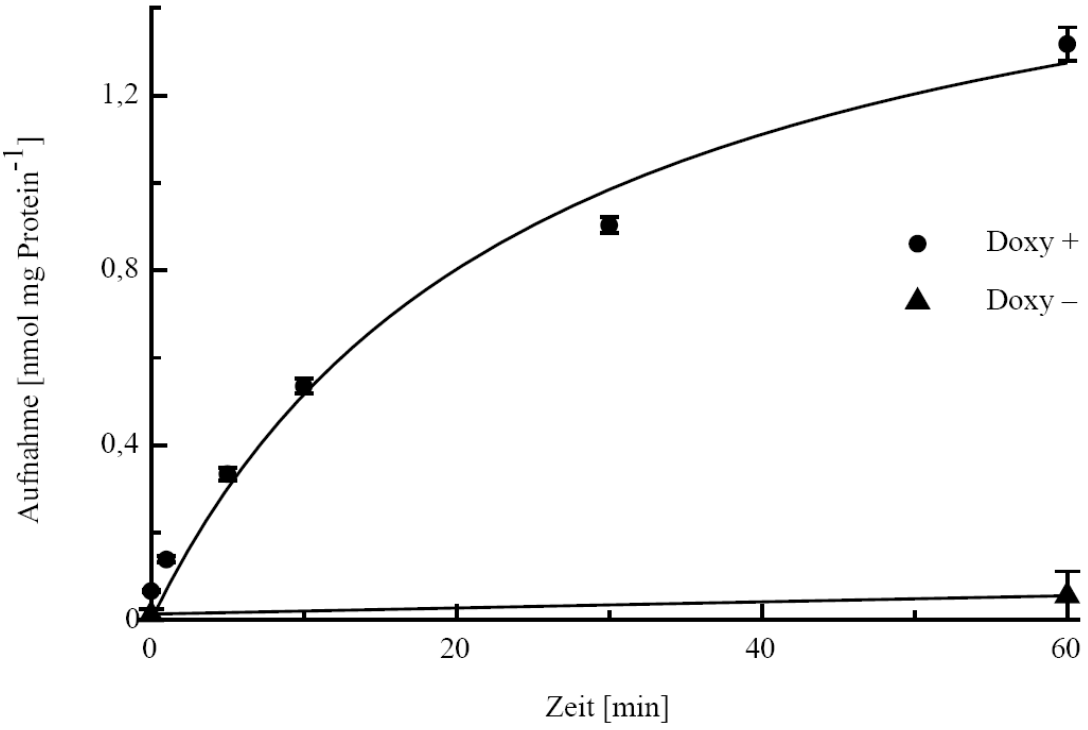


Abb. 14: Zeitverlauf der ET-Aufnahme
Zeitverlauf für die DR2-vermittelte ET-Aufnahme in stabil transfizierte HEK-293-Zellen im induzierten (Doxy+) und nicht induzierten (Doxy-) Zustand. Die Inkubation erfolgte mit 10 µM ET bei 37° C für die angegebenen Zeiten. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Für den humanen Transporter ist aus der Literatur bekannt, dass die intrazelluläre Konzentration von Stachydrin nach der Aufnahme schnell wieder abfällt, jedoch für ET nur langsam absinkt. Obwohl bekannt ist, dass der ETTh in der Lage ist Substrate (z.B. TEA) bidirektional zu transportieren, zeigt er diese Eigenschaft für ET nicht (Gründemann et al., 2005; Tamai et al., 1997).

Der DR2-Transporter verhielt sich in diesem Experiment folgendermaßen: Nach der Beladung der stabil transfizierten Zellen für 60 min mit 10 µmol/l Stachydrin oder ET wurde die Inkubationslösung entfernt und durch physiologischen Puffer ersetzt. Der Efflux wurde über 60 min bestimmt, die verbliebene intrazelluläre Konzentration quantifiziert und relativ zu Kontrollzellen berechnet (Abb. 15). Die Konzentration des Stachydrins sank innerhalb der ersten 10 min auf unter 3 % des Ausgangswerts, ET dagegen nur auf 45 %. Innerhalb von 60 min sank aber auch der ET-Gehalt auf 10 % des Ausgangswerts ab.

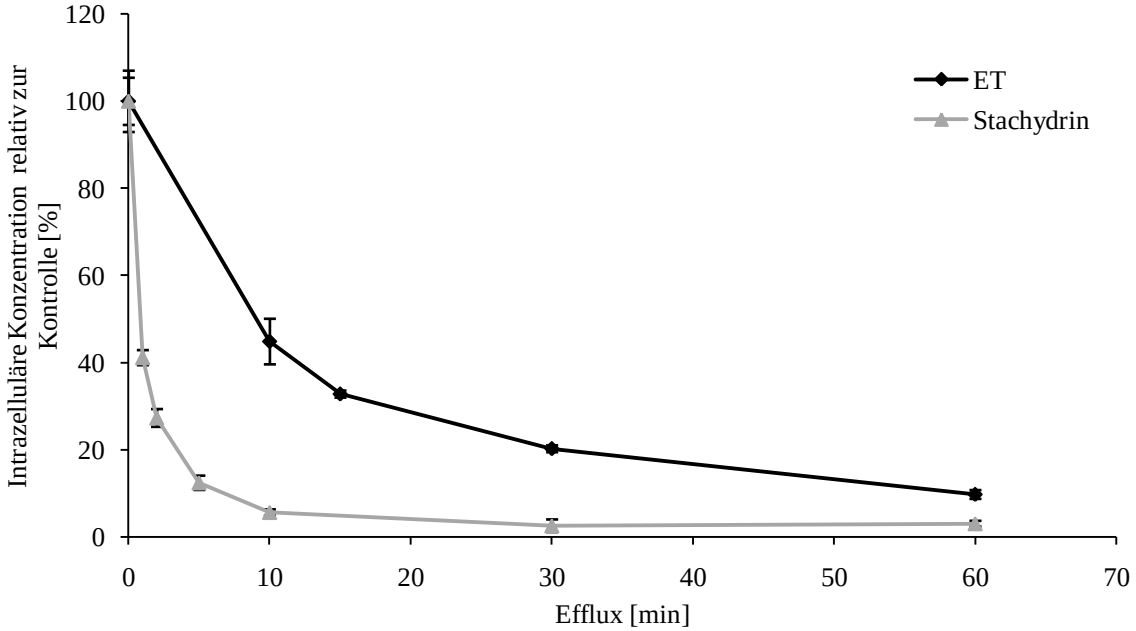


Abb. 15: Efflux von ET und Stachydrin aus HEK-293-Zellen
Die Vorinkubation der pEBTetD-DR2 Zellen erfolgte mit 10 µM ET bzw. Stachydrin für 60 min bei 37 °C in physiologischem Puffer (KRH). Der Efflux erfolgte ebenfalls in KRH für die dargestellten Zeiträume. Die verbliebene intrazelluläre Konzentration von Stachydrin und ET wurde bestimmt und relativ zur Kontrolle berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.2.3 Substratspektrum des DR2-Transporters

Um das Substratspektrum des DR2-Transporters näher zu analysieren, wurden Verbindungen getestet, die chemisch verwandt zu ET sind. Hierzu wurden die aus der funktionellen Charakterisierung des ETTh bekannten Substrate verwendet (Stachydrin, Glycinbetain) (Gründemann et al., 2005). Weiterhin wurde TEA als Substrat angeboten, das bis zu der Entdeckung von ET das bestbekannte Substrat für den ETTh darstellte (Tamai et al., 1997). Die Verbindungen TEA, Carnitin und Glycinbetain wurden mittels Radiotracer-Assay, ET und Stachydrin mittels LC-MS quantifiziert. ET wurde immer in parallelen Ansätzen angeboten, um die Aktivität der Transporter zu überprüfen. Die Aufnahme von ET wurde zur Normierung der Transporteffizienzen, der anderen Verbindungen, verwendet. Durch diese Normierung konnten versuchsbedingte Schwankungen ausgeschlossen und so eine Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Aufnahmeversuche erreicht werden (Gründemann et al., 1999).

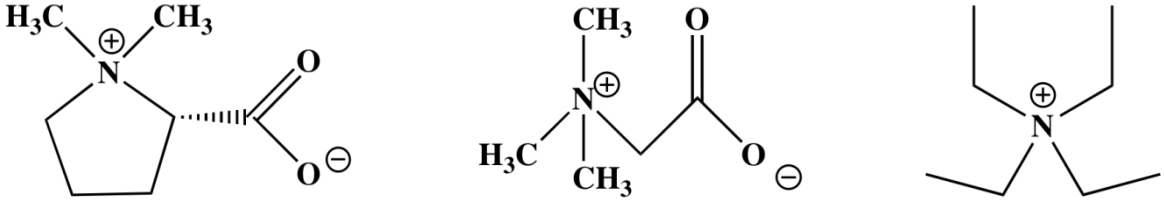


Abb. 16: Strukturformeln von Stachydrin, Glycinbetain und TEA

Abbildung 17 zeigt, dass ETTh neben ET auch Stachydrin als Substrat akzeptierte. Auch der DR2-Transporter zeigte prozentual im Vergleich zu ET eine ähnliche Aktivität für dieses Substrat.

Stachydrin ist das Betain der Aminosäure Prolin und besitzt alle chemischen Strukturmerkmale des ET-Rückgrats (Betainstruktur und Carboxylgruppe, Abb. 16). Die Blutplasmakonzentration unterliegt hohen Schwankungen und reicht von 0 - 50 µmol/l. Es wird, wie ET, nicht von höheren Organismen synthetisiert, sondern wird mit Zitrus- und Beerenfrüchten über die Nahrung aufgenommen, wodurch auch die unterschiedlichen Plasmakonzentrationen zu erklären sind. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass Stachydrin das physiologische Substrat des DR2-Transporters oder des ETTh ist. Die Stachydrin-Konzentrationen im Urin und im Plasma sind identisch, da es zu keiner Aufnahme oder Speicherung kommt (Lever et al., 1994).

Tetraethylammonium wurde zuerst zur funktionellen Charakterisierung des CTT (OCTN2) verwendet und dann auch bei ersten Funktionstests des ETT eingesetzt (Tamai et al., 1997). Die chemische Struktur unterscheidet sich jedoch deutlich von der Struktur des ETs, was sich in der ineffizienteren Transportleistung widerspiegelt. Der DR2-Transporter zeigte für TEA eine ähnlich hohe Aufnahme wie für Stachydrin (Abb. 17).

Glycinbetain enthält, mit einer Carboxylgruppe und einer permanent positiv geladenen Betaingruppe, nur das chemische Rückgrat von ET (Abb. 16). Dass diese Grundstruktur für einen effizienten Transport nicht ausreicht, zeigte die Aktivität beider Transporter für Glycinbetain, verglichen mit ET (Abb. 17). Dies bestätigte, dass der ETTh eine hohe Spezifität für sein physiologisches Substrat besitzt. Auch der DR2-Transporter zeigte eine deutliche Spezifität für ET, auch wenn dieser eine höhere Transporteffizienz für TEA zeigte als der humane Transporter. Mit diesem Experiment konnte erstmals gezeigt werden, dass auch der Zebrafisch einen hochspezifischen Ergothionein-Transporter besitzt. Als Negativ-Kontrolle wurde beiden Transportern Carnitin angeboten, das trotz der extrem

schlechten Transporteffizienz immer noch in einigen Publikationen als Substrat angesehen wird (Garrett et al., 2008).

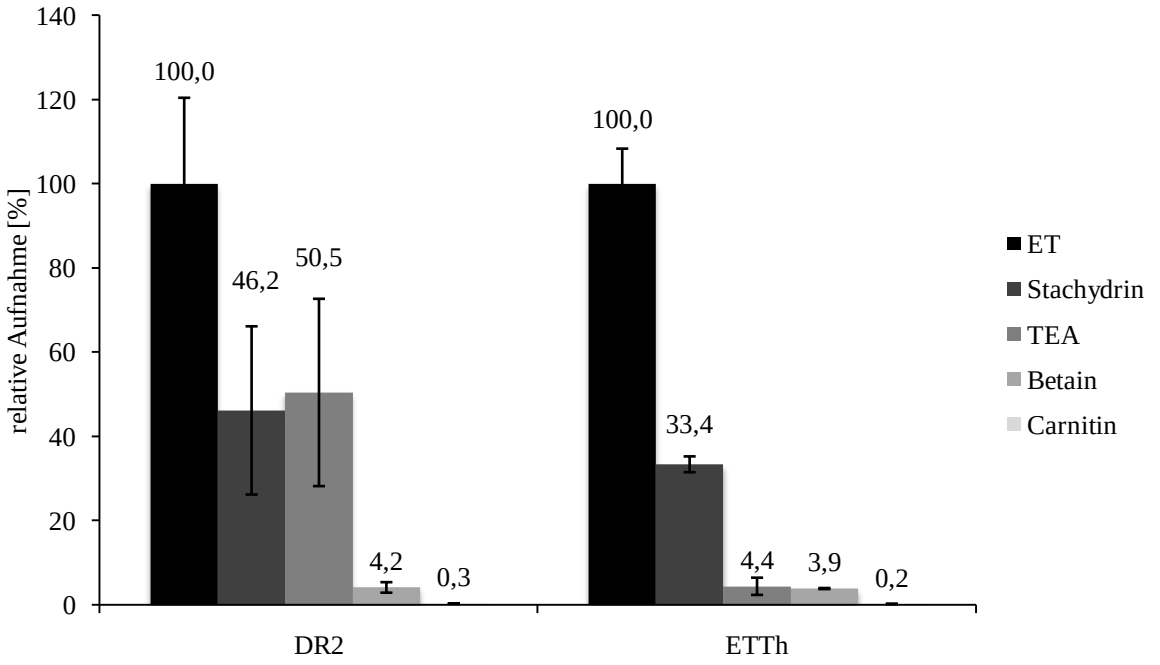


Abb. 17: Substratspektren von DR2 und ETTh
Dargestellt ist die Clearance der Substrate relativ zur ET-Clearance. Für die Quantifizierung von TEA, Betain und Carnitin wurde ein Radiotracer-Assay verwendet. ET und Stachydrin wurden mittels LC-MS quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.2.4 Natrium-Abhängigkeit

Der humane ETT nutzt für den Transport von ET den physiologischen, nach intrazellulär gerichteten Na^+-Gradienten als Triebkraft. Der Transport der nicht physiologischen Substrate TEA und Stachydrin zeigt keine Abhängigkeit von der extrazellulären Na^+-Konzentration (Gründemann et al., 2005; Tamai et al., 1997; Yabuuchi et al., 1999). Für die Na^+-Abhängigkeit konnte in der Sequenz des ETTh eine kritische Aminosäure identifiziert werden. Der Na^+-abhängige Transport von ET konnte durch einen Aminosäureaustausch an Position 200 (Phe200Arg) zum Erliegen gebracht werden. Der Transport von Stachydrin nahm im Vergleich zum Wildtyp-Transporter jedoch nur um den Faktor zwei ab (Daten nicht gezeigt). Die Aminosäuresequenz des DR2-Transporters zeigte an dieser Position ebenfalls ein Phenylalanin.

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob auch die Transportaktivität des DR2-Transporters elektrogen ist und von dem Na^+-Gradienten abhängt. Hierzu wurden die Zellen vor der Aufnahme mit physiologischen Lösungen mit entsprechenden Na^+-Konzentrationen umgepuffert, in denen das Na^+ isoosmotisch durch N-Methyl-D-Glukosamin substituiert wurde. Aufgrund der niedrigen Signale waren die Fehler in diesem Experiment größer als bei den anderen Messungen. Die Daten zeigen jedoch eindeutig, dass auch der DR2-Transporter, wie auch ETTh und CTTh, den Na^+-Gradienten als Triebkraft nutzt (Abb. 18).

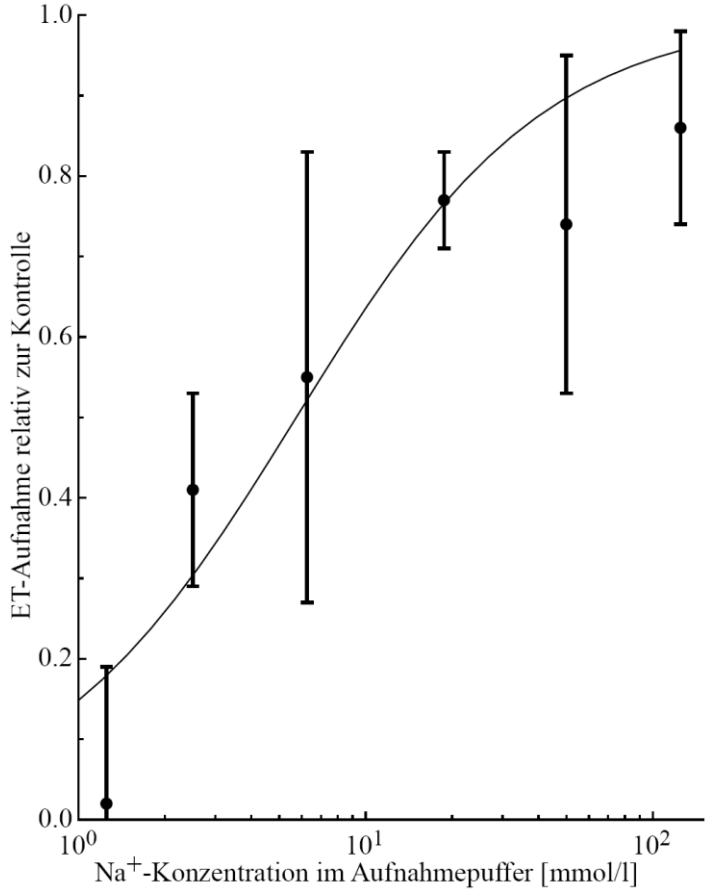


Abb. 18: Natrium-Abhängigkeit des DR2-Transporters
Gemessen wurde die initiale Aufnahme von 10 µM ET für 1 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Na^+-Konzentrationen. Vor der Inkubation wurden die Zellen in Substrat-freien Lösungen umgepuffert. Diese Lösungen enthielten entsprechende Na^+-Konzentrationen, die isoosmotisch mit N-Methyl-D-Glukosamin (NMDG) ersetzt wurden und in der ebenfalls die Inkubation mit Substrat erfolgte. Der endogene ET-Gehalt wurde parallel bestimmt und subtrahiert. Aufgetragen wurden die Aufnahmen relativ zu der Aufnahme mit physiologischer Na^+-Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

3.3 Lokalisation des DR2-Transporters

Nachdem der DR2-Transporter als orthologer ETTh identifiziert werden konnte, sollte die Gewebeverteilung im Zebrafisch untersucht werden, da diese bei der Analyse der physiologischen Aufgabe eines Transporters von besonderer Bedeutung ist. Da der Fisch einige Gewebe besitzt, die im Menschen fehlen (z.B. Kiemen), ist eine vollständige Übertragung des Expressionsmusters nicht möglich.
Die Expression des DR2-Transporters wurde mittels *in situ* Hybridisierung und RT-PCR nachgewiesen.

3.3.1 Lokalisation der DR2-mRNA mittels *in situ* Hybridisierung

Die Lokalisation der mRNA mittels *in situ* Hybridisierung erfolgte an Embryonen 6 hpf (Stunden nach der Befruchtung; engl. hours post fertilisation) bis 5 dpf (Tage nach der Befruchtung; engl. days post fertilisation). Mit dieser Methode konnte ein erster Eindruck über die zeitliche und räumliche Expression des DR2-Transporters gewonnen werden. Bereits 6 hpf konnte mit einer antisense-Sonde ein Signal in der Gastrula beobachtet werden. Auch in Embryonen 24 und 48 hpf wurde ein Signal gefunden, während die Kontrolle (sense-Sonde) kein Signal zeigte (Abb. 19). Die Färbung trat nach Inkubationszeiten zwischen 6 - 8 Stunden ein. Eine Inkubation der Kontrollen über Nacht zeigte in keinem der Ansätze eine Färbung.
Um ausschließen zu können, dass die DR2-Sonde, aufgrund der hohen Identität der Sequenzen, ein Signal für die Transporter-mRNA von DR1 oder DR3 zeigte, wurde ein Southern Blot durchgeführt. Der Blot zeigte, dass die Sonde für den DR2-Transporter zumindest in diesem Test spezifisch an die cDNA des Transporters band und kein Signal für die anderen cDNAs erzeugte (Abb. 19 F).
In den ersten 24 Stunden war das Signal in der *in situ* Hybridisierung noch diffus über den ganzen Embryo verteilt und es waren keine Gewebe zu unterscheiden. Erst 48 Stunden nach der Befruchtung konnte man eine gewebespezifische Zuordnung der Färbung der Embryonen vornehmen. Die Expression des DR2-Transporters war vor allem im Kopfbereich, sowie auf einen Zellbereich auf dem Dotter konzentriert. Bei diesem Bereich

handelte es sich um die Knospen der Brustflossen, die während der Entwicklung über den Dotter wandern. (Abb. 19 D).

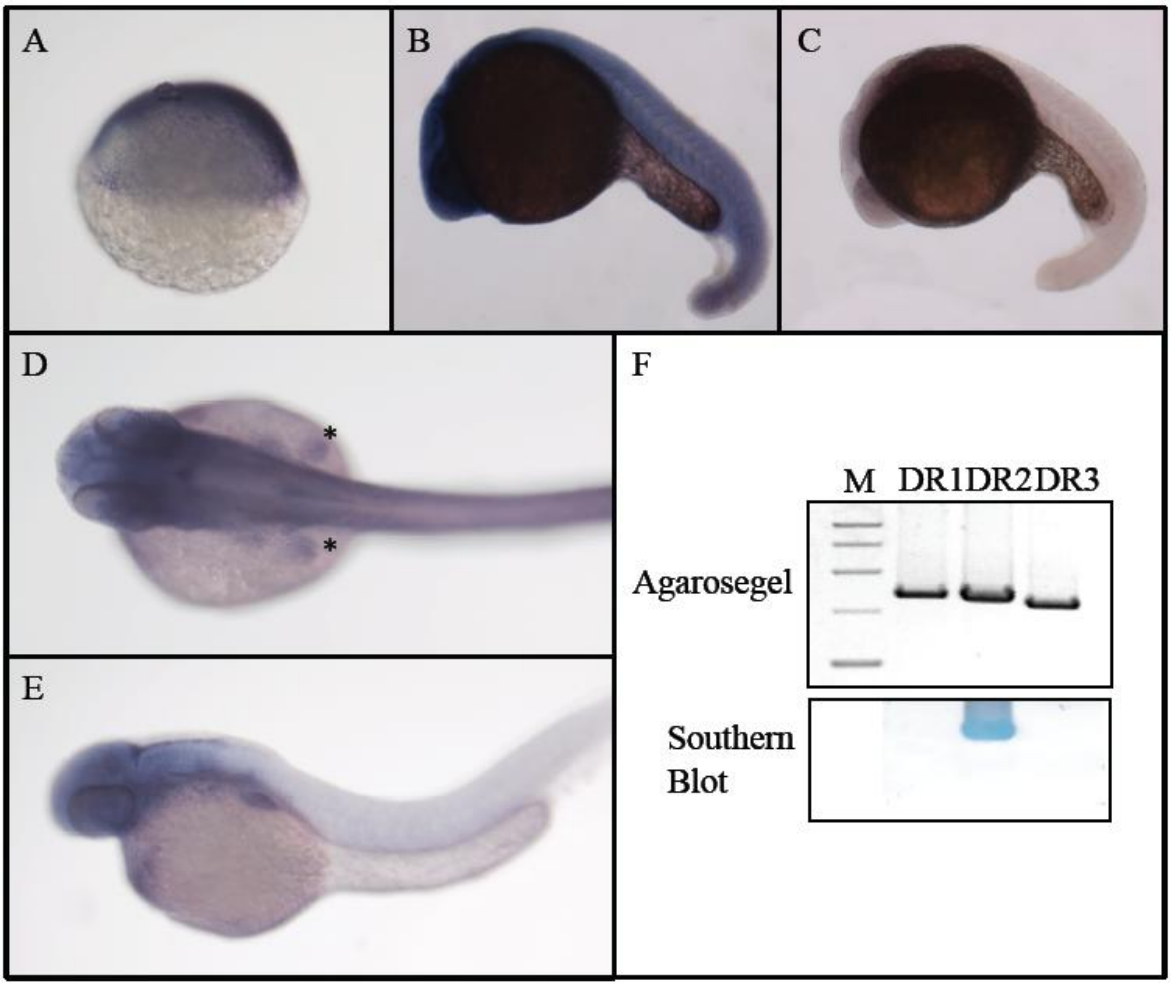


Abb. 19: *In situ* Hybridisierung I
Dargestellt sind *in situ* Hybridisierungen von Embryonen 6 hpf bis 48 hpf mit der antisense-Sonde. A) Embryo 6 hfp, B) Embryo 24 hpf, C) Kontrolle 24 hpf sense-Sonde, D) 48 hpf dorsale Ansicht, Knospen der Brustflosse markiert durch Sterne E) laterale Ansicht, F) Southern-Blot mit DR2-Sonde. Die Embryonen wurden vor der Hybridisierung mechanisch dechorionisiert.

Mit fortschreitender Entwicklung der Organe war auch eine Zuordnung der *in situ* Signale zu verschiedenen Organen möglich. In jungen Larven (5 dpf), die in diesem Entwicklungsstadium bereits geschlüpft und freischwimmend waren, konnte man ein deutliches Signal im Kopfbereich und vor allem in den Kiemenbögen sehen. Eine Färbung des Knorpelgewebes mittels Alcianblau zeigte eine deutliche Übereinstimmung der Lokalisation der vier Kiemenbögen mit dem umgebenden Gewebe, das durch *in situ* Hybridisierung angefärbt wurde (Abb. 20). Weiterhin war in diesem Altersstadium ein

deutliches Signal im Darm oberhalb des Dotters zu erkennen. (Abb. 20 C). Die sense-Sonde zeigte auch in diesem Altersstadium keine unspezifische Färbung (Abb. 20 D).

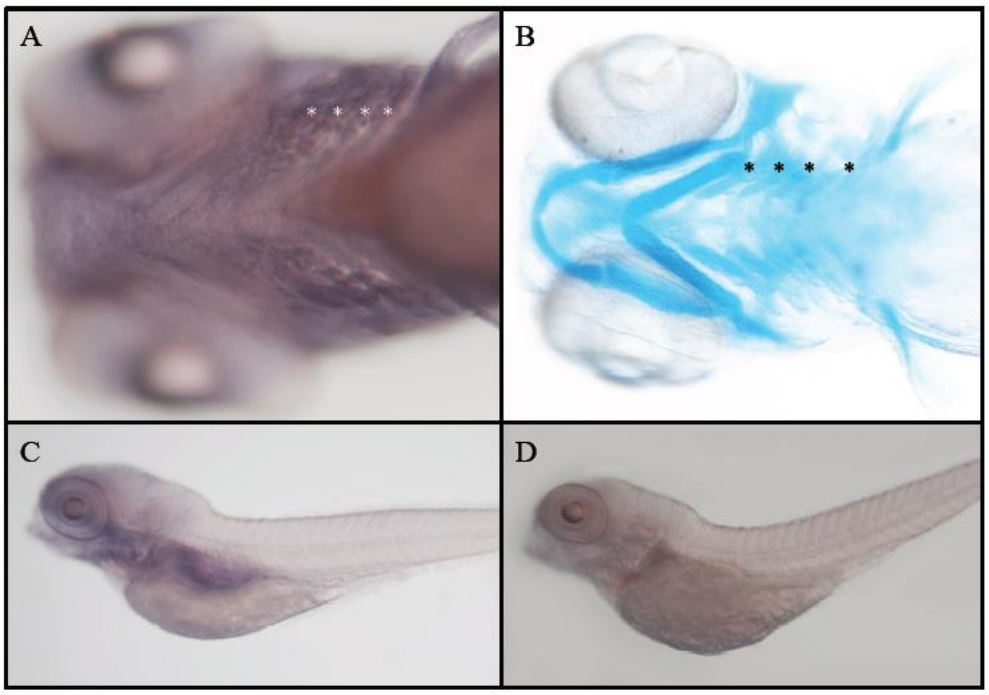


Abb. 20: *In situ* Hybridisierung II
Dargestellt sind *in situ* Hybridisierungen von Larven 5 dpf, A) Vergrößerung der Kiemen (ventral, antisense-Sonde), B) Alcianblau-Färbung der Kiemenbögen (ventral). Die Sterne markieren vier Kiemenbögen C) Übersicht (ventral, antisense-Sonde), D) Kontrolle (sense-Sonde).

Die Analyse der *in situ* Hybridisierung zeigte erste Übereinstimmungen zwischen den Expressionsmustern der Ergothionein-Transporter von Mensch und Zebrafisch.

Vor allem der Darm und die Augen scheinen wichtige Wirkungsorte für ET zu sein. Daher wurde die Expression in diesen Organen genauer analysiert. Abbildung 21 zeigt eine Vergrößerung des Kopf- und Darmbereichs. Die Bilder wurden im Gegensatz zu den anderen Aufnahmen nur mit einer Beleuchtungsquelle von oben aufgenommen. Sie zeigen klar die Position des Darms in der Larve und eine weitere Expression im Kopf- und Augenbereich. Ob das Signal im Auge auf ein Signal des durchleuchtenden Gehirns zurückzuführen war oder aus dem Auge selbst stammte, konnte in den whole-mount *in situ* Hybridisierungen nicht eindeutig geklärt werden. Daher wurden die Larven nach der Hybridisierung in Einbettmedium fixiert und von kaudal mit einem Kryotom in 7 µm dicke Präparate geschnitten. Abbildung 21 C zeigt deutliche lila schimmernde Signale, die

eindeutig auf eine Expression im Auge zurückzuführen sind. Auch die Schnitte durch den Darm zeigen eine Färbung der Darmwand (Abb. 21 D).

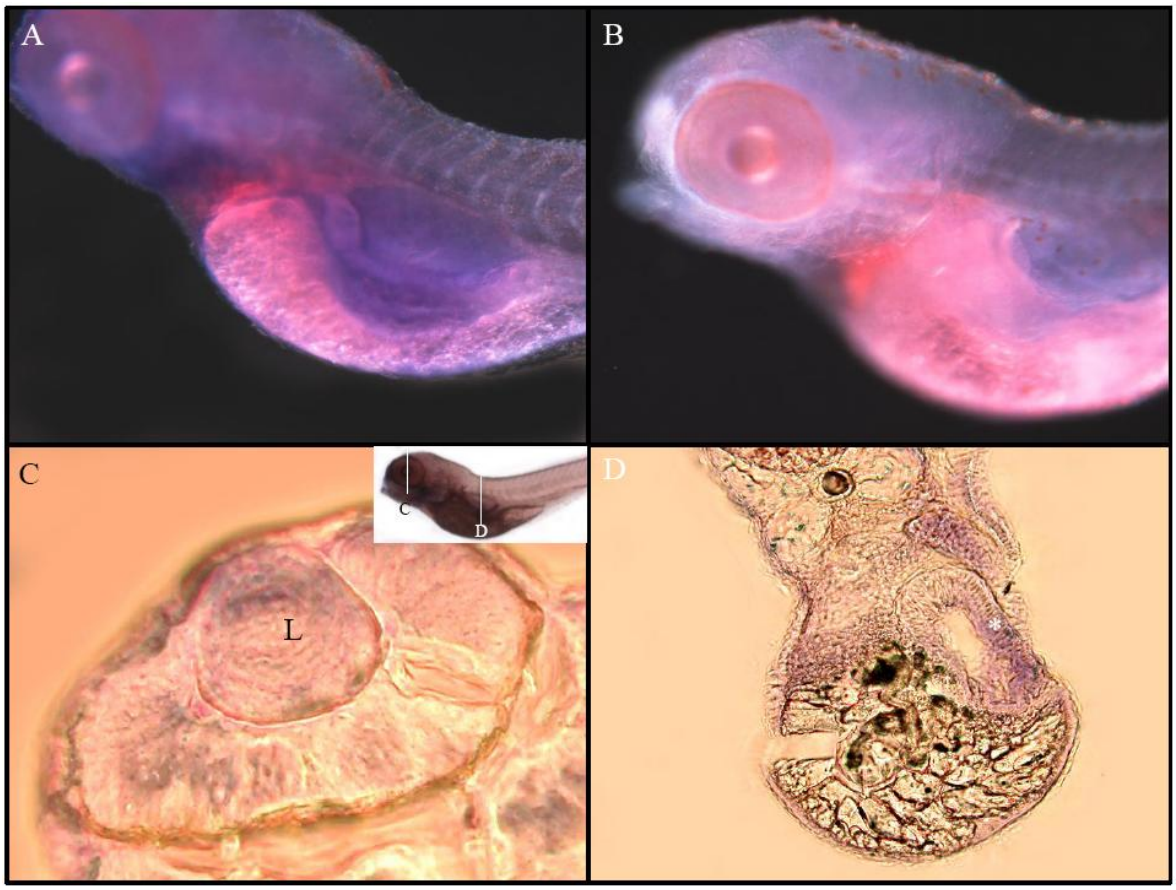


Abb. 21: *In situ* Hybridisierung III
Dargestellt sind *in situ* Hybridisierungen von Larven 5 dpf, bei den Aufnahmen wurde für einen besseren Kontrast nur mit Auflicht gearbeitet. A) und B) ventrale Ansicht (antisense-Sonde), B) Kontrolle (sense-Sonde). C) und D) 7 µm dicke Kryotom-Schnitte durch die Larve. Das kleine Bild zeigt die Höhe der Schnittebenen; L = Linse, Stern in D) markiert die Darmwand.

Die *in situ* Hybridisierung am ganzen Embryo beschränkte sich auf Altersstadien bis zu 5 dpf. Nach dieser Zeit sind die Embryonen zu groß und die Organe zu kompakt, um die Diffusion der Sonde in jeden Bereich des Embryos zu gewährleisten. Daher wurde der Nachweis von mRNA in adulten Tieren mittels RT-PCR durchgeführt.

3.3.2 Lokalisation der DR2-mRNA mittels RT-PCR

Die Organe für die RNA-Isolation wurden aus zehn adulten Tieren gewonnen. Die einzelnen Organe wurden, um den RNA-Gehalt zu erhöhen und um mögliche

Schwankungen in der Expression einzelner Tiere zu vermeiden, vereinigt und in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.1.13). Zum Nachweis des DR2-Transporters wurde das Fragment A mit den Klonierungsprimern amplifiziert. Als Kontrolle der Umschreibung wurde jede cDNA auf das Haushaltsgen β-Aktin getestet. Der Nachweis wurde für die Organe Leber, Herz, Gehirn, Niere, Auge, Muskeln, Kiemen, Darm und Milz durchgeführt. Die PCR zeigte ein deutliches Signal im Gehirn, der Niere, dem Auge und dem Darm. Dies stimmte mit der Lokalisation des Transporters durch *in situ* Hybridisierung überein. Lediglich das *in situ* Signal in den Kiemen konnte in der RT-PCR nicht bestätigt werden.

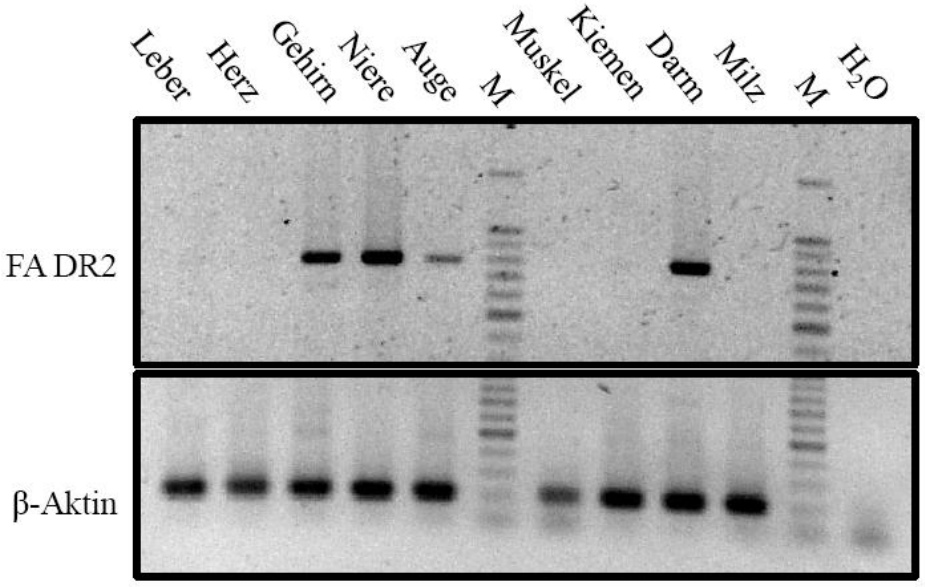


Abb. 22: Lokalisation der DR2-mRNA im adulten Zebrafisch
Gewebeverteilung des Transporters in verschiedenen Organen. Die Banden zeigen die Signale aus Organen zehn verschiedener Wildtyp-Fische, die, um Schwankungen zu reduzieren, vereint wurden, bevor die RNA isoliert wurde. Das Fragment A (FA) stellt die ersten 799 bp des offenen Leserahmens dar. Ein 203 bp langes Fragment von β-Aktin diente als Kontrolle der cDNA. M = Marker, H_2O = Kontrolle ohne cDNA.

Die Lokalisation des DR2-Transporters zeigt deutliche Übereinstimmungen mit der Lokalisation des orthologen humanen Transporters. So findet man den DR2-Transporter ebenfalls in Organen, die Aufgaben wie die Resorption (Darm), Rückresorption (Niere) und Blutbildung (Kopfniere) übernehmen.

3.4 ET-Gewebekonzentrationen

Als nächstes sollte überprüft werden, ob der DR2-Transporter *in vivo* in der Lage ist, ET in diesen Geweben zu akkumulieren. Daher wurde die Gewebekonzentration einzelner Gewebe quantifiziert.

Die ET-Konzentration in den verschiedenen Geweben ist abhängig von der Organgröße und die Aufnahme der Substrate ist proportional zur Anzahl der aktiven Transporter in der Membran. Da die Anzahl der Transporter aber nicht erfasst werden konnte, musste der ET-Gehalt der Organe normiert werden. Eine gängige Bezugsgröße für eine Normierung stellt das Gewicht dar. Da es jedoch große Unterschiede im Wasseranteil der Organe gibt, ist es notwendig für die Normierung das Trockengewicht zu verwenden, das für einige Organe (Milz, Gehirn) deutlich unter einem Milligramm liegt. Daher musste eine Methode gefunden werden, die es erlaubt, die ET-Gehalte zwischen gleichen Organen aber auch zwischen verschiedenen Organen zu normieren und direkt miteinander vergleichbar zu machen. Da die Messungen der ET-Gehalte mittels LC-MS durchgeführt und die Organe sauer mit $HClO_4$ aufgeschlossen wurden, standen diese Proben für eine anschließende Proteinbestimmung mittels BCA-Test (siehe 2.5.4) nicht mehr zur Verfügung.

Da es möglich ist mehrere Verbindungen mittels LC-MS parallel zu messen, wurde nach einem Parameter gesucht, der konstant ist und sich somit für eine Normierung eignet. Es war bekannt, dass der Prolingehalt und die Proteinkonzentration in HEK-293-Zellen proportional zur Anzahl der Zellen sind (Gründemann et al., 2005). Daher wurde versucht diesen Ansatz auf die Fischorgane zu übertragen. Der Prolingehalt der Organe von neun Fischen (5 Männchen und 4 Weibchen) wurde gemessen und es zeigte sich, dass der Wert unter gleichaltrigen Fischen eine konstante Größe für jedes Organ besaß. Vergleicht man z.B. die Prolin-Gehalte aller gemessenen Nieren liegt die Abweichung unter 10 %, wie auch bei allen anderen Organen (Abb. 23). Die Prolinwerte wurden mit dem internen Standard (MPP^+) verrechnet, um Schwankungen während der Messung auszuschließen. Somit ist der Prolingehalt für die Normierung der ET-Gehalte gut geeignet und ermöglicht es Unterschiede in der Organgröße gleicher Organe zu verrechnen. Dies erspart das aufwendige Wiegen der Organe und erlaubt den Vergleich der ET-Gehalte von verschiedenen Fischen in Bezug auf ein bestimmtes Organ.

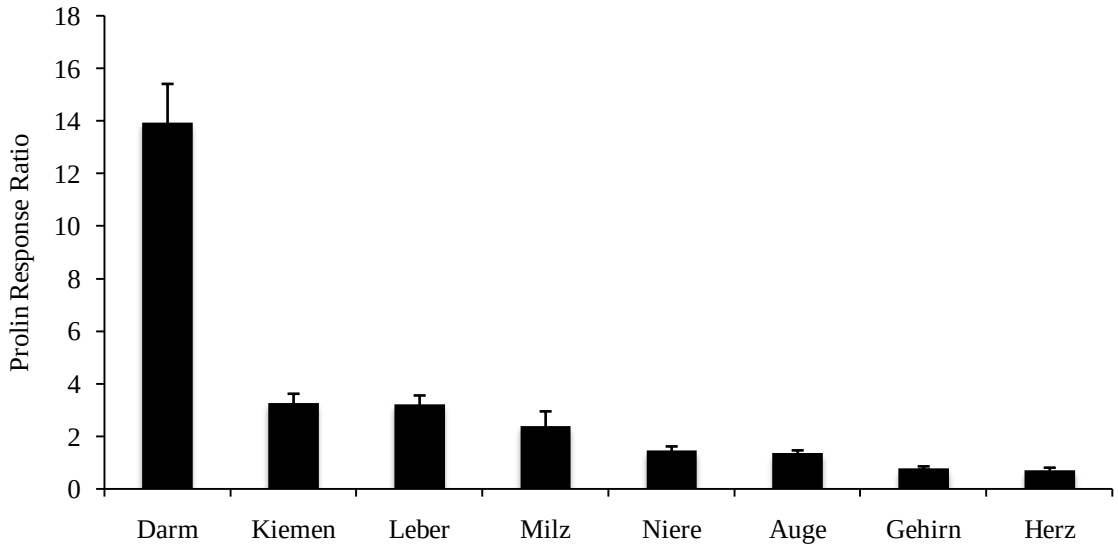


Abb. 23: Normierung der ET-Gehalte über Prolin
Der Prolingehalt verschiedener Organe wurde mittels LC-MS quantifiziert und durch den internen Standard dividiert, um die Response Ratio zu erhalten. Dieser Wert wurde verwendet, um die ET-Gehalte der Gewebe zu normieren, n = 9 (5 Männchen, 4 Weibchen).

In einem weiteren Experiment sollte getestet werden, ob der Prolingehalt mit dem Nassgewicht der Organe korreliert und ein Vergleich zwischen verschiedenen Organen möglich ist. Hierzu wurden drei adulte Fische getestet. Vor der Quantifizierung wurde das Gewicht der Organe bestimmt. Für das Gehirn und das Auge zeigte sich keine Korrelation des Prolingehalts mit dem Nassgewicht. Diese Organe besitzen für eine Korrelation einen zu hohen Wasseranteil. Für die anderen Organe besteht jedoch ein klarer Zusammenhang zwischen dem Nassgewicht und dem Prolingehalt (Abb. 24).

Somit scheint der Prolingehalt von Auge und Gehirn für eine Normierung und den Vergleich zwischen den Organen grundsätzlich besser geeignet zu sein als das Nassgewicht, da aufgrund ihrer hohen Wasseranteile der ET-Gehalt noch unterschätzt werden würde. Die Korrelation zwischen Prolingehalt und Nassgewicht erlaubt über dies hinaus den Vergleich der ET-Gehalte verschiedener Organe, wodurch eine erste Bewertung der Wichtigkeit als potentieller Wirkungsort möglich wird.

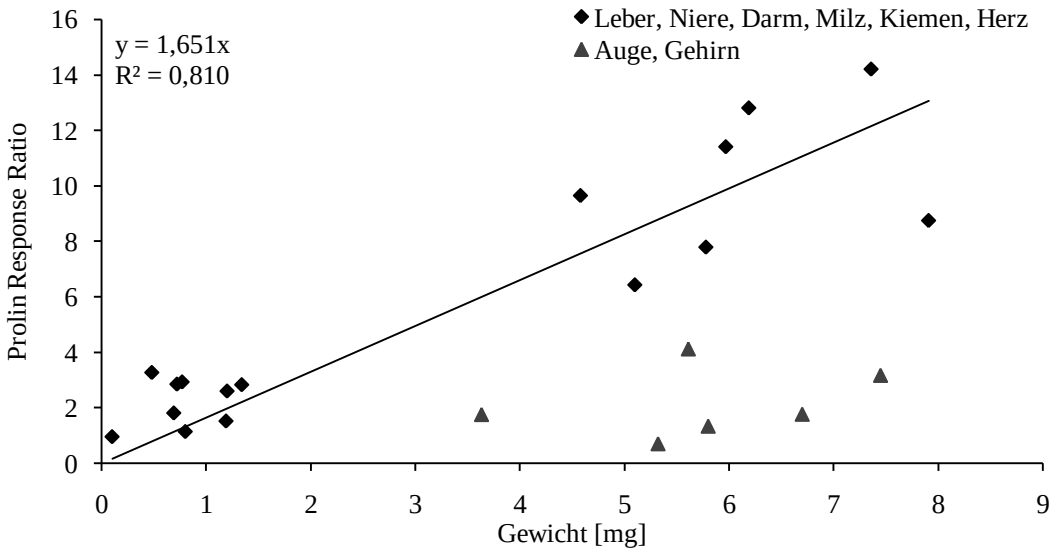


Abb. 24: Korrelation zwischen Prolingehalt und Organgewicht
Das Gewicht der Organe wurde vor der Quantifizierung des Prolingehalts bestimmt. Dargestellt sind die Werte von drei adulten Fischen. Die Werte für die Augen und das Gehirn zeigten keine Korrelation zwischen dem Nassgewicht und dem Prolingehalt und wurden bei der Berechnung ausgeschlossen.

Für die ersten Messungen der ET-Gehalte wurden adulte Fische des Tübingen-Stamms verwendet. Diese Fische wurden zweimal täglich mit Trockenfutter und einmal täglich mit Lebendfutter gefüttert. Nach der Isolation der Organe wurden diese, wie in 2.9.5 beschrieben, aufgearbeitet und der ET-Gehalt mittels LC-MS quantifiziert. Parallel wurde mit der gleichen Methode die Konzentration von Prolin für die Normierung bestimmt. Die höchsten Gewebekonzentrationen konnten in Auge, Darm, Gehirn und Niere nachgewiesen werden (Abb. 25). Die Lokalisation des DR2-Transporters mittels *in situ* Hybridisierung und RT-PCR führte zu den gleich Ergebnissen (siehe 3.3).

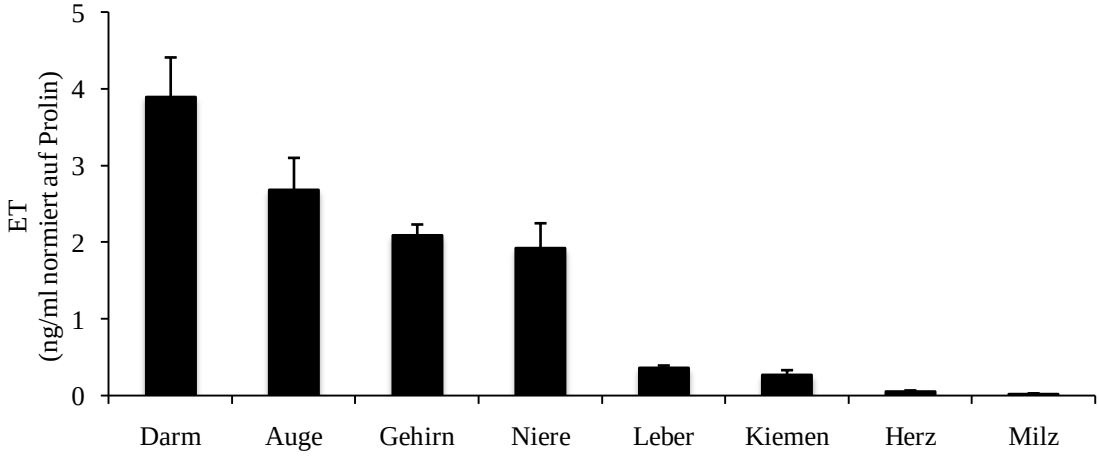


Abb. 25: ET-Gewebekonzentrationen
Dargestellt sind die ET-Gewebekonzentrationen in adulten Zebrafischen, normiert auf den Prolingehalt der Organe. Die Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS, n = 3.

3.4.1 *In vivo* Aktivität des DR2-Transporters

Durch die übereinstimmende Lokalisation von DR2-mRNA und ET, bestätigt sich die Hypothese, dass der Transporter für ET nicht nur im Menschen als molekularer Marker für die ET-Akkumulation und -Aktivität verwendet werden kann, sondern dass dies auch für den Zebrafisch zutrifft. Um die Aktivität des Transporters zusätzlich zu bestätigen, sollte der Transport von ET, vermittelt durch den DR2-Transporter, *in vivo* nachgewiesen werden. Für diesen Nachweis musste eine Methode gefunden und etabliert werden, die es ermöglicht ET zu dosieren und den Fischen gezielt zu applizieren. Da eine Inkubation in ET aufgrund der hohen Kosten nicht in Frage kam und zudem eine Aufnahme des ETs durch die Fische nicht sichergestellt werden konnte, musste eine andere Strategie verfolgt werden.

3.4.2 ET-Applikation

Die Applikation von ET über das Futter schien die aussichtsreichste und natürlichste Methode ET gezielt zu verabreichen. Für die Dosierung des ETs wurden verschiedene Kombinationen aus Trockenfutter und Lebendfutter (Artemien) mit ET versucht. Es ist jedoch nicht gelungen eine feste Zubereitung des ETs für die Applikation herzustellen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für die Applikation nach Alternativen gesucht.

Zu Beginn dieser Arbeit durchgeführte Versuche mit Zebrafischeiern hatten gezeigt, dass diese unspezifisch durch Inkubation mit hochmolaren ET-Lösungen (10 mM) ET aufnehmen können. Eine weitere Beobachtung war, dass die Elterntiere ihr eigenes Gelege fressen. Dieses Verhalten ist bei Aquarienfischen häufig zu beobachten und führte zu der Idee ET in Form von ET-beladenen Fischeiern zu verabreichen.

Da die ET-Aufnahme in das Ei nicht durch den DR2-Transporter vermittelt wird, sondern nur eine unspezifische Aufnahme in die Eihülle (Chorion) darstellt, musste sichergestellt werden, dass die ET-Konzentration während der Fütterung konstant blieb. Hierzu wurden verschiedene ET-Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet. Nach der anfänglichen Beladung mit ET wurden die Eier in einem großen Wasservolumen inkubiert, um den Efflux des ETs zu messen.

Abbildung 26 zeigt, dass sich nach einer Inkubation von 20 - 30 min eine Sättigung der unspezifischen ET-Aufnahme einstellt. Dieser Wert wurde daher in den folgenden Experimenten als maximale Inkubationszeit gewählt. Nach 10-minütigem Waschen in Aquariumwasser wurde eine Konzentration zwischen 10 - 15 ng/Ei erreicht, die innerhalb der nächsten 10 min nicht mehr abnahm. Dieses Zeitintervall wurde für die Fütterung gewählt. Aus jedem Gelege, das für Inkubationstest oder Fütterungen verwendet wurde, wurden mehrere Proben genommen und die Gesamtkonzentration des ETs bestimmt.

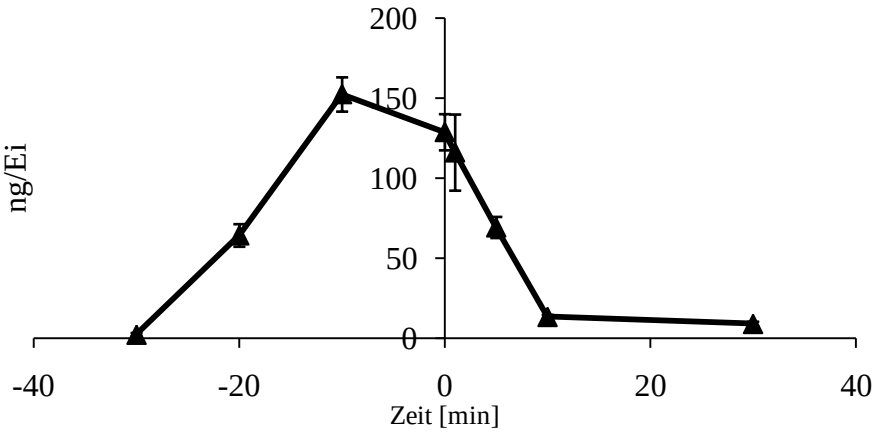


Abb. 26: Inkubation der Zebrafischeier in ET
Inkubation der Eier in einem 10 mM Überschuss ET für 30 min. Bei Zeitpunkt 0 wurden die Eier in ein großes Volumen Aquariumwasser gegeben und der Efflux für den angegebenen Zeitraum gemessen. Verwendet wurden Gelege von drei verschiedenen Elternpaaren, um Unterschiede in der Qualität auszuschließen.

In einem Versuch mit sechs adulten Fischen wurden jeweils drei Fische mit ET beladenen Eiern gefüttert, während die Kontrollfische die gleiche Anzahl unbehandelter Eier bekommen haben. Vor der ersten und nach der letzten Fütterung wurden die Fische für einen Zeitraum von 24 Stunden nicht gefüttert, um sicherzustellen, dass der Füllungszustand des Darms zu Beginn und nach dem Experiment identisch war. Reste des Darminhalts wurden vor der Lyse des Organs entfernt.

Abbildung 27 zeigt die Akkumulation von ET in verschiedenen Geweben im Vergleich zu den Kontrollfischen. Die applizierte Gesamtdosis lag bei 2,5 µg verteilt auf 2 Fütterungen täglich über 4 Tage. Eine deutliche Zunahme der ET-Konzentration findet man vor allem in Auge, Gehirn, Darm, Niere und Kiemen. Dies sind Organe, in denen die Expression des DR2-Transporters nachgewiesen werden konnte (Abb. 22). Mit diesem Experiment ist es erstmals gelungen die Aktivität eines ET-Transporters direkt *in vivo* und die Verteilung des ETs im Organismus zu messen. Da in diesem Versuch die natürliche Aufnahme des ETs

simuliert werden konnte, ist die gefundene Verteilung näher an der physiologischen Situation als es durch Injektion von ET in einem Tiermodell hätte nachgestellt werden können (z.B. intravenöse Gabe im Rattenmodell (Deiana et al., 2004)).

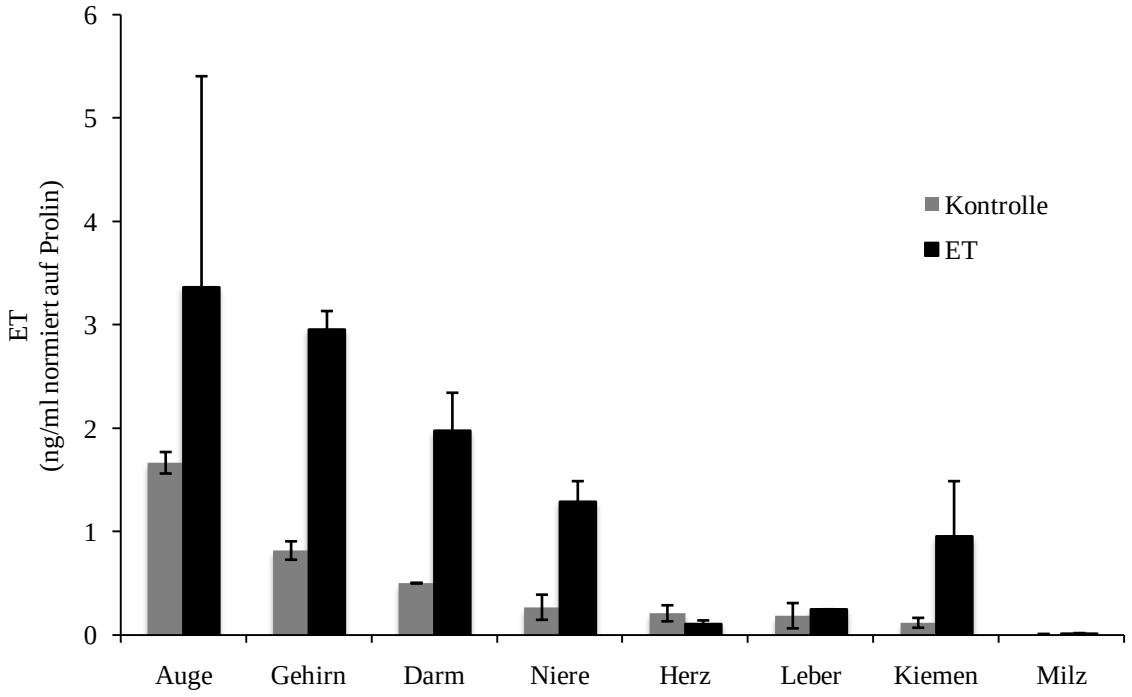


Abb. 27*: In vivo* Aufnahme von ET
Jeweils drei Fische wurden mit ET-beladenen und unbeladenen Eiern gefüttert. Die Gesamtdosis wurde mittels LC-MS bestimmt und lag bei 2,5 µg. Die applizierte Gesamtdosis wurde auf 2 Fütterungen täglich auf 4 aufeinanderfolgende Tage verteilt. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM.

3.5 Knockout-Fische

Nach der ausgiebigen Analyse der drei Kandidatengene und der *in vitro* und *in vivo* Bestätigung des DR2-Transporters als einziger orthologer ETT, konnte ein Knockout für diesen Transporter angestrebt werden. Da die Untersuchung eines ET-Mangels durch einen permanenten Knockout einem vorübergehenden Knockdown vorzuziehen ist, war die Verwendung von Morpholino-Oligonukleotiden nicht die Methode der ersten Wahl. Nach der Aufklärung des Zielgens wurde im Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK ein Antrag für die Herstellung einer Null-Mutante durch chemische Mutagenese gestellt. Da dieser Antrag bis zur Fertigstellung der Arbeit nicht erfolgreich bearbeitet wurde, wurde eine andere Strategie zur Etablierung des Knockout-Modells verfolgt.

Die US-amerikanische Firma Znomics (Portland, OR, USA) hat im Rahmen eines Mutagenese-Screens durch retrovirale Insertionen eine Bibliothek mit über 11000 einzelnen Insertionen im gesamten Fischgenom erzeugt (Amsterdam et al., 1999; Amsterdam et al., 2004; Golling et al., 2002). Eine Suche von D. Gründemann in der Insertions-Bibliothek (ZeneMark® Library) ergab, dass zwei Linien mit einer Insertion im ersten Exon des DR2-Transporters existieren (ZM_00007837 und ZM_00286085). Beide Insertionen, mit einer Länge von ca. 5,7 kb, befinden sich genau an der gleichen Position im Exon. Die Fischlinie mit der Bezeichnung ZM_00007837 wurde bestellt und von der Firma aus gefrorenem Fischsperma aufgezogen und über PCR bestätigt. Die Fische mit der Virusinsertion wurden erneut mit Wildtyp- (Ekk Will) Fischen verpaart und als zwei Tage alte Embryonen verschickt. Da die Fische mit Wildtyp-Fischen verpaart wurden und die Vererbung der Insertionen den Mendelschen Regeln unterliegt, waren von den 100 erhaltenen Embryonen nur 50 % als Merkmalsträger zu erwarten.

3.5.1 Genetische Charakterisierung

Nach der Aufzucht der erhaltenen Fische wurde der Genotyp der 27 Überlebenden (24 Weibchen und 3 Männchen) durch Schwanzflossenbiopsie, DNA-Isolation und anschließende PCR analysiert (siehe 2.9.3). Von den analysierten Fischen konnten 13 heterozygote Tiere identifiziert werden (3 Männchen, 10 Weibchen). Die exakte Position der Virusinsertion konnte durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden (Abb. 28). Diese befindet sich 346 bp vom Startcodon entfernt und trägt nach 171 bp ein Stopcodon (TGA), das den offenen Leserahmen unterbricht (siehe Anhang).

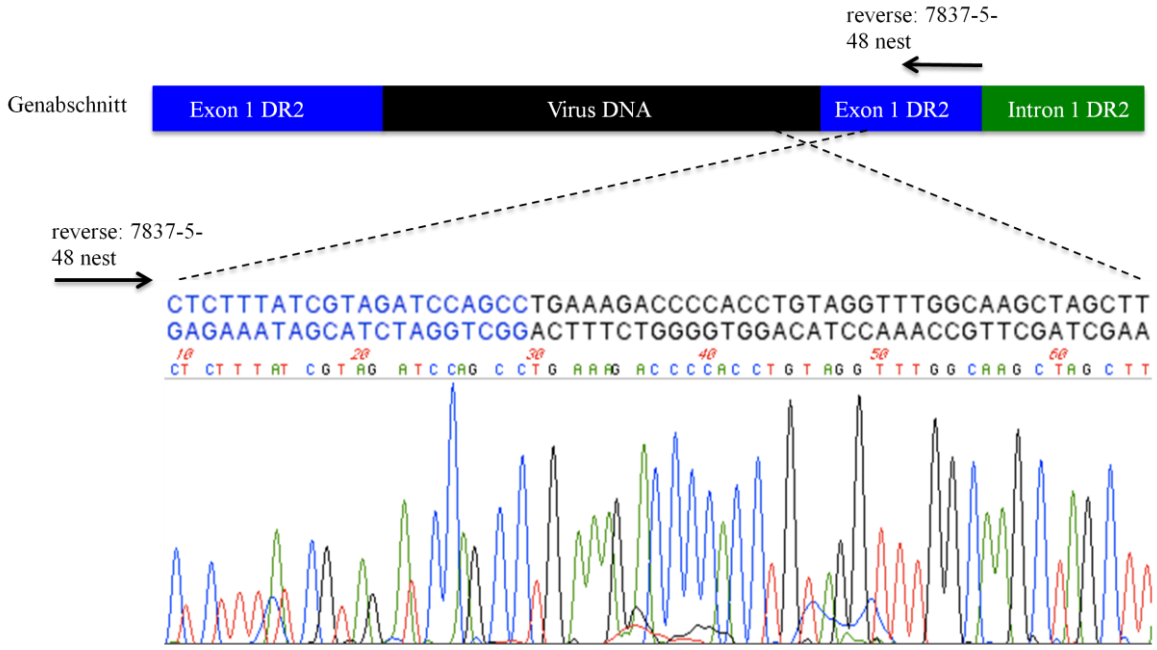


Abb. 28: Lokalisation der Virusinsertion

Die DNA wurde mittels Schwanzflossenbiopsie gewonnen und der Übergang von genomischer (blau) zu viraler DNA (schwarz) wurde per PCR amplifiziert. Zur Sequenzierung wurde der Primer reverse 7837-5-48 nest verwendet, der auch bei der Genotypisierung eingesetzt wurde. Dargestellt ist die erwartete Sequenz (oben) und die gefundene Sequenz, sowie die Signale des Sequencers (unten).

3.5.2 ET-Gewebekonzentration im Knockout-Fisch

Nachdem die heterozygoten ZM_00007837-Fische die Geschlechtsreife erreicht hatten, wurden diese untereinander verpaart, um homozygote Merkmalsträger ($DR2^{-/-}$) zu erhalten. Die Nachkommen der Fische wurden nach zwei Monaten auf ihren Genotyp hin analysiert und sortiert.

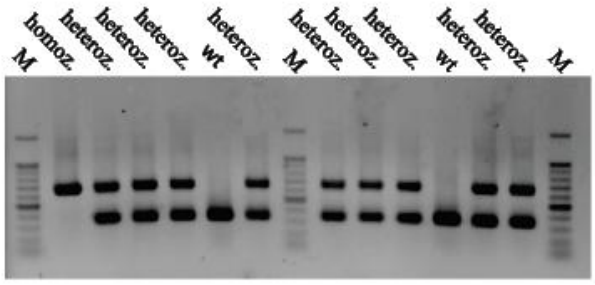


Abb. 29: Genotypisierung

Dargestellt sind die Genotypisierungen von 12 Fischen. homoz. = homozygot, heteroz. = heterozygot, M = 100 bp Marker

Die Primer wurden so gewählt, dass durch die PCR sowohl das Wildtyp-Allel als auch die Virusinsertion amplifiziert werden konnten. Die Bande mit einer Länge von 731 bp stammt aus der amplifizierten Virus-DNA, während die Bande mit 344 bp das Wildtyp-Allel zeigt (Abb. 29).

Um Zeit zu sparen, wurden alle Analysen der $DR2^{-/-}$-Fische, wenn nicht anders beschrieben, an Nachkommen von heterozygoten Elterntieren durchgeführt. Hierzu wurden über 250 Fische genotypisiert. Die Wildtyp-Fische aus den gleichen Gelegen dienten in allen nachfolgend beschriebenen Experimenten als Kontrolle. Nachdem die Fische ein Alter von 3 Monaten erreicht hatten, wurde getestet, ob die Fische in der Lage waren ET in den verschiedenen Geweben zu akkumulieren. Hierzu wurden 6 Wildtyp- und 9 $DR2^{-/-}$-Fische getestet. Bei der Quantifizierung des ET-Gehalts wurde nicht zwischen Männchen und Weibchen unterschieden, da aus den vorherigen Experimenten keine Unterschiede in der Gewebekonzentration ersichtlich waren.

Abbildung 30 zeigt den ET-Übergang m/z 127 eines repräsentativen Chromatogramms, wie es von dem Massenspektrometer aufgezeichnet wurde. Dargestellt sind die Daten von einem Wildtyp- und einem $DR2^{-/-}$-Fisch. Auf der X-Achse ist die Retentionszeit von ET mit dem verwendeten HPLC-Gradienten (siehe 2.6.1) und auf der Y-Achse die Intensität des Signals in Signale pro Minute (counts per minute) dargestellt. Als Kontrolle der Messung ist der interne Standard MPP^+ mit dem Übergang m/z 128 und als Kontrolle der Organgröße der Prolingehalt mit m/z 70 dargestellt. Im Darm des Wildtyp-Fischs ist ein deutliches Signal für ET bei einer Retentionszeit von 3 min zu erkennen, wie es auch in den zuvor beschriebenen Experimenten gefunden wurde. Der $DR2^{-/-}$-Fisch zeigt jedoch bei einer Retentionszeit von 3 min kein erkennbares Signal.

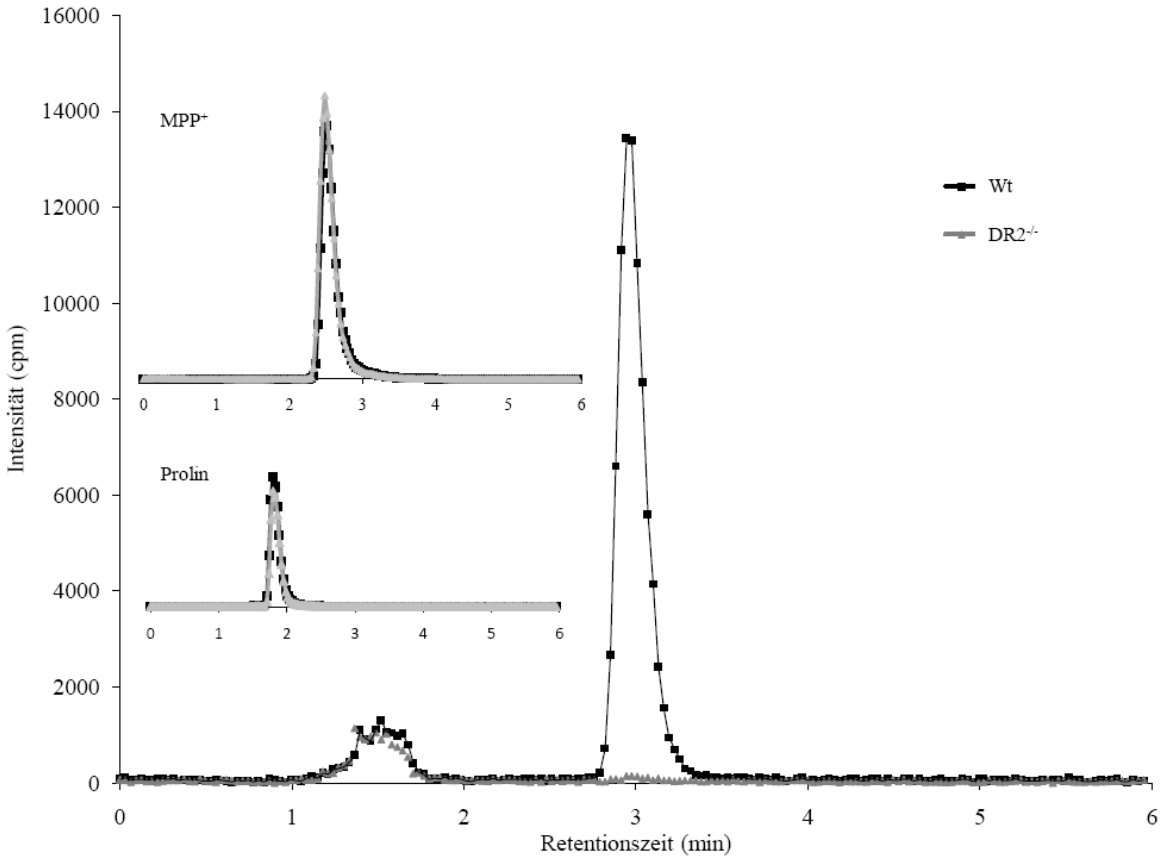


Abb. 30: Chromatogramme aus wildtypischem und homozygotem Fisch

Dargestellt sind die repräsentativen ET-Chromatogramme, aufgenommen mittels LC-MS. Für die Quantifizierung von ET wurde der Übergang m/z 127 verwendet. Die entsprechenden Chromatogramme für MPP^+ dienen als interner Standard zur Kontrolle der Messung und die Chromatogramme von Prolin m/z 70 zur Normierung der Organgröße. Alle drei Übergänge wurden in einem Chromatographielauf gemessen.

Die Auswertung der ET-Signale zeigte nach der Normierung über den Prolingehalt, dass es in keinem Organ der $DR2^{-/-}$-Fische zu einer Anreicherung von ET gekommen ist. Die Signale waren teilweise nicht mehr auswertbar, da die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen (0,5 ng/ml = 2,1 nmol/l, Abb. 31). Die Wildtyp-Fische zeigten eine ET-Verteilung, wie sie bereits in vorherigen Versuchen mit Fischen des Tübingen-Stamms gezeigt werden konnte.

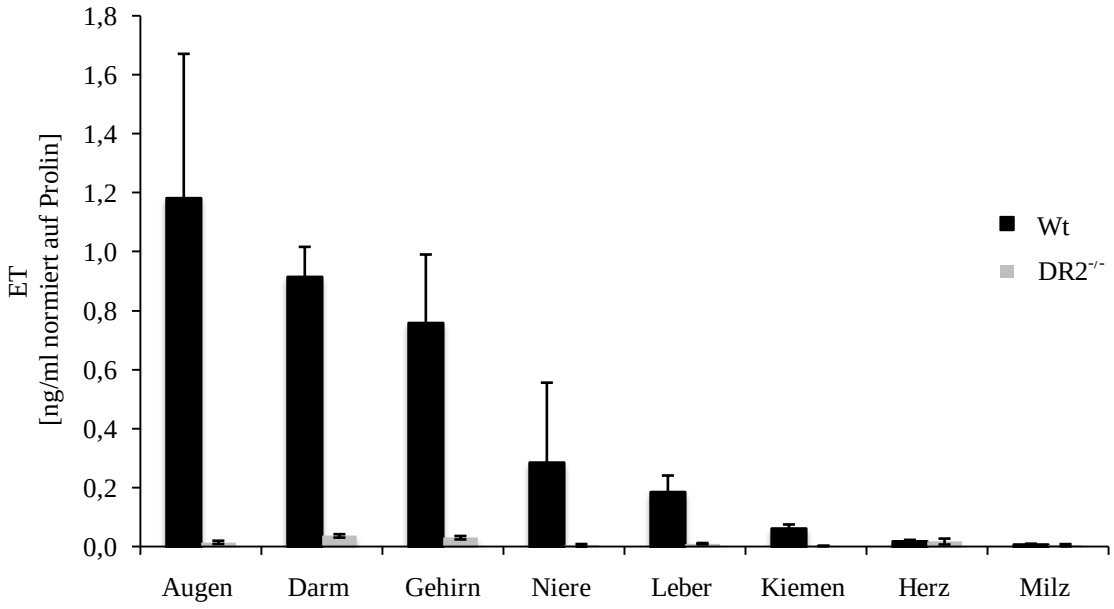


Abb. 31: ET-Gewebekonzentration von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen
Dargestellt sind die ET-Konzentrationen von 6 Wildtyp- und 9 DR2$^{-/-}$-Fischen, quantifiziert mittels LC-MS. Der Prolingehalt wurde parallel gemessen und zur Normierung der ET-Gehalte verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM.

Um sicherzustellen, dass sich ET in den DR2$^{-/-}$-Fischen nicht in anderen Geweben anreicherte, z.B. Muskel- oder Fettgewebe, wurde die ET-Konzentration im ganzen Fisch analysiert. Auch in diesem Versuch gelang es nicht in den DR2$^{-/-}$-Fischen ET nachzuweisen, während die Wildtyp-Fische ein deutliches Signal zeigten (Abb. 32).

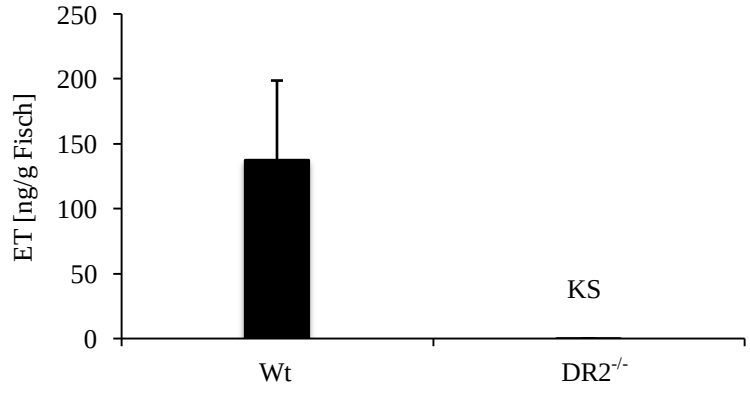


Abb. 32: ET-Gehalt von wildtypischen und homozygoten Fischen
ET-Gehalt gemessen in ganzen Fischen, normiert auf das Gesamtgewicht. KS = kein Signal. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n = 3.

Mit diesen Versuchen konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, dass die Inaktivierung des DR2-Transporters *in vivo* zu einem Mangel an ET führt.

3.6 Phänotypisierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Virusinsertion im ersten Exon des DR2-Gens in homozygoten Fischen einen völligen Verlust der ET-Aufnahme verursacht, stellte sich die Frage, ob der ET-Mangel oder die Virusinsertion selbst zu einem sichtbaren Phänotyp führen.

Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurden die homozygoten $DR2^{-/-}$-Fische *inter se* verpaart. Die Fische waren fertil und die Gelegegrößen entsprachen den wildtypischen Gelegen. Um Unterschiede und mögliche Fehler in der Embryonalentwicklung zu finden, wurde die Transparenz der Embryonen während der ersten Tage genutzt.

Die ersten Tage der Zebrafischentwicklung sind eine besonders kritische Phase, da bereits innerhalb von 72 Stunden alle Organe des adulten Fischs vollständig angelegt werden. Nach der Befruchtung der Eizelle schwillt das Chorion an. Durch Zytoplasmaströme sammelt es sich am animalen Pol, während sich am vegetativen Pol der granulierte Dotter befindet. Die erste meroblastische Zellteilung erfolgt nach ca. 45 min und wiederholt sich alle 15 min, wobei sich die ersten 64 Zellen nicht vollständig voneinander trennen, sondern durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden bleiben. Nach ca. 4 Stunden beginnt die Epibolie und nach ca. 4,5 Stunden hat sich die Blastodisc ca. 30 % um den Dotter bewegt (30 % Epibolie).

Die Entwicklung der Wildtyp- und der $DR2^{-/-}$-Embryonen innerhalb der ersten 5 Stunden verlief zeitgleich und ohne Auffälligkeiten (Abb. 33 A, D). Es konnte kein Unterschied in der Überlebensrate der Embryonen festgestellt werden. Im Epibolie-Stadium konnte erstmals die Expression des DR2-Transporters mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Abb. 19), aber auch in dieser Entwicklungsphase waren keine Unterschiede sichtbar (Abb. 33 B, E).

Nach Abschluss der Epibolie und Bildung der Schwanzknospe entstehen die ersten Somitenfurchen. Im 5-Somiten-Stadium ist das Primordium des Auges zu erkennen. Im 14-Somiten-Stadium beginnt die Ausdehnung des Dotterstiels, während sich im Kopf die Innenohrkapsel bildet und erste Segmente des Gehirns sichtbar werden.

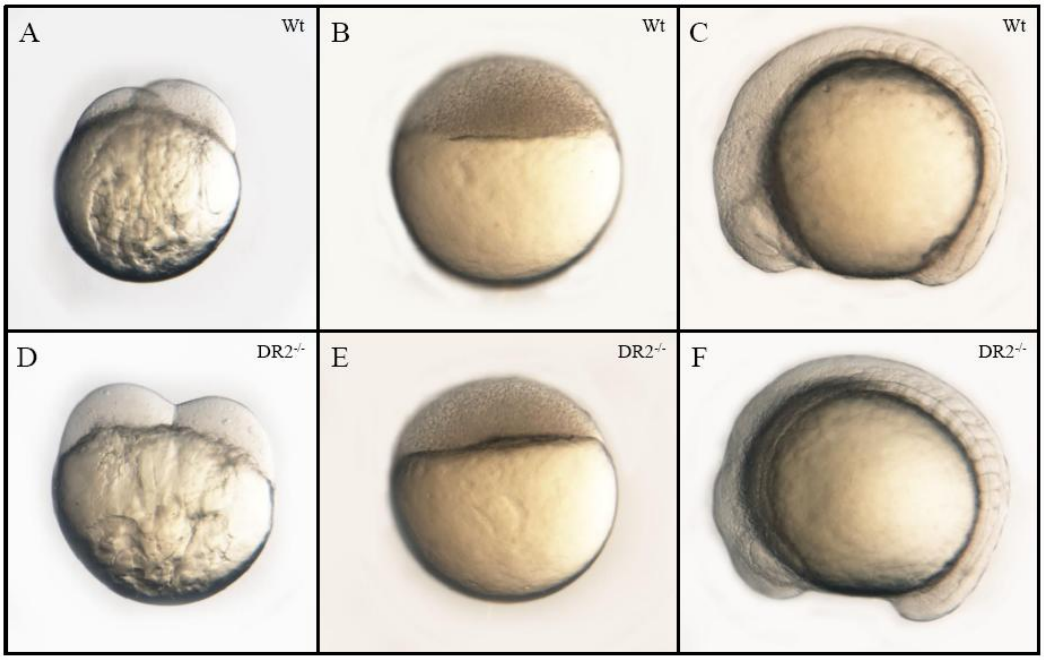


Abb. 33: Embryonalentwicklung von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen 0,75 - 16 hpf
Die Entwicklung fand bei 26 °C statt. Vor den Aufnahmen wurde das Chorion mechanisch entfernt. A) und D) 0,75 hpf, B) und E) 4,5 hpf, C) und F) 16 hpf

Aber auch zu diesem Zeitpunkt waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Embryonen zu erkennen (Abb. 33 C, F).

Nach 24 Stunden setzte die Pigmentierung der Haut ein. In dem Zeitraum zwischen 24 und 48 hpf begann das Herz zu schlagen und die Embryonen reagierten auf äußere Reize mit Muskelkontraktionen (z.B. Berührung mit einer Pinzette). Ab diesem Zeitraum kann man die Entwicklung der Fische durch den Kopf-Rumpf-Winkel (HTA, engl. head-trunk angle) vergleichen, der nach 24 Stunden bei ca. 120° liegt (Abb. 34 A, B).

Nach 48 hpf sind die Aortenbögen der Fische ausgebildet, führen jedoch noch kein Blut (Abb. 34 C, D). Am dritten Tag beginnen die Embryonen zu schlüpfen, die man nun als Larven bezeichnet (Abb. 34 E, F). Nach 72 hpf ist die Organogenese fast vollständig abgeschlossen, die Schwimmblase entfaltet sich und die Larve beginnt aktiv zu schwimmen und bewegt Augen, Kiefer und Kiemendeckel.

Beim Schlüpfen aller beobachteten Larven zeigten sich die typischen Unterschiede zwischen verschiedenen Gelegen aber es waren keine auffälligen Verzögerungen bei den DR2$^{-/-}$-Larven festzustellen. Nach 96 hpf zeigten die Larven deutliche Fluchtreflexe und erste Anzeichen der Futtersuche (Abb. 34 G, H).

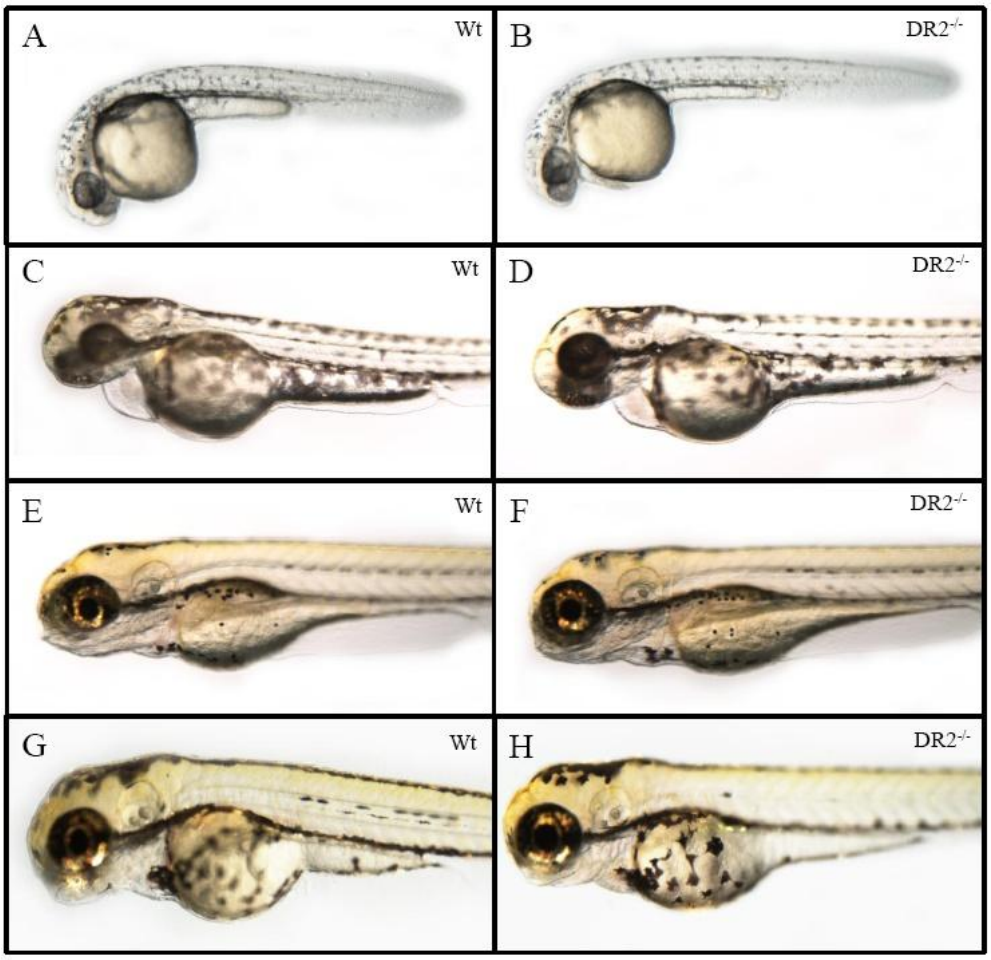


Abb. 34: Embryonalentwicklung von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen 24 - 96 hpf
Die Entwicklung fand bei 26 °C statt. Vor den Aufnahmen wurde das Chorion mechanisch entfernt. A) und B) 24 hpf, C) und D) 48 hpf, E) und F) 72 hpf, G) und H) 96 hpf

Im weiteren Verlauf bis zur Geschlechtsreife zeigten die Knockout-Fische keine Beeinträchtigung in der Entwicklung (Abb. 35). Weder die Größe noch das Gewicht zeigten zwischen gleichaltrigen Tieren signifikante Unterschiede (wt: 0,28 ± 0,02 g; DR2$^{-/-}$: 0,26 ± 0,04 g; n = 3). Auch die Geschlechtsreife erreichten sie ohne Verzögerung. Die Anzahl und die Überlebensrate der Nachkommen unterlagen den natürlichen Schwankungen nach dem ersten Ablaichen.

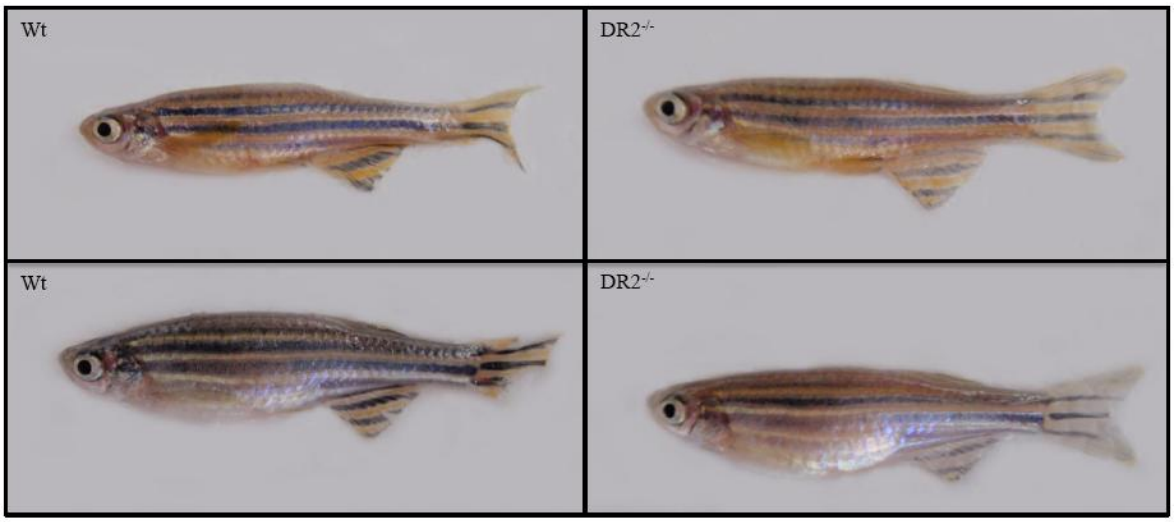


Abb. 35: Adulte Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fische
Abgebildet sind adulte Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fische, jeweils Männchen (oben) und Weibchen (unten). Alle Fische waren zum Zeitpunkt der Aufnahmen geschlechtsreif und konnten erfolgreich verpaart werden. Die Gesamtlänge aller Fische betrug ca. 3 cm.

3.6.1 Histologische Analyse

Die histologische Analyse der DR2$^{-/-}$-Fische erfolgte an Geweben, in denen die Expression des Transporters, bzw. in denen ET selbst nachgewiesen werden konnte. Zunächst wurden die Augen der Fische genau analysiert, da diese, wie die vieler anderer Spezies, einen hohen ET-Gehalt aufweisen (Shires et al., 1997). Eine schnelle und zuverlässige Aussage über den Zustand der Augenlinse lässt sich über die Bestimmung der Transparenz treffen. Dazu wurden die Fische mit Tricain getötet und die Linsen unmittelbar vor der Analyse präpariert und in Tyrode-Lösung überführt. Eine 30-minütige Inkubation in Tyrode-Lösung bei RT zeigte keine sichtbare Veränderung der Transparenz der Linse. Als Kontrolle wurde ein Fisch mit Eiswasser getötet, um in den Linsen künstlich einen Kältekatarakt zu induzieren (Loewenstein und Bettelheim, 1979; Mizuno et al., 1984).
Als Maß für die Transparenz der Linse wurde die Schärfe der Linien einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, zeigte die in eiskalter Tyrode-Lösung präparierte Linse eine deutliche Trübung, wohingegen die Transparenz der Linsen von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen, die in Tyrode-Lösung bei RT präpariert wurden, keine sichtbaren Unterschiede zeigten.

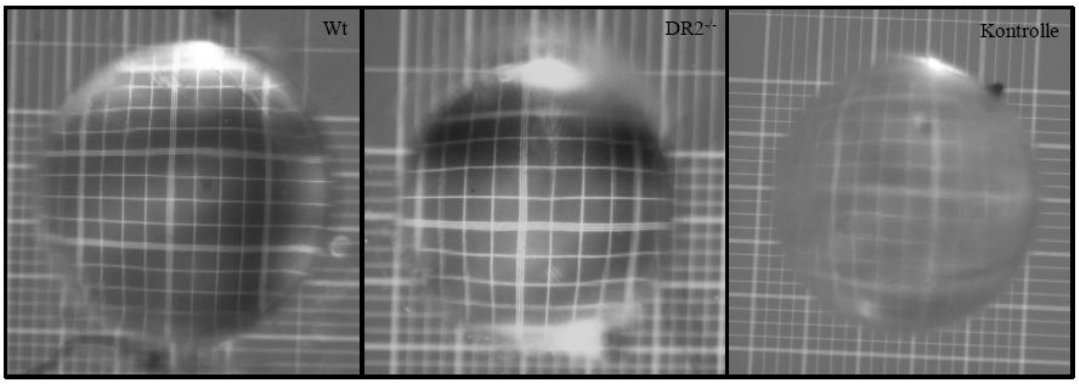


Abb. 36: Mikroskopische Analyse der Linsen
Die Linsen der Wildtyp- und der DR2$^{-/-}$-Fische wurden zwischen 24 – 28 °C und die Kontrolllinse bei 0 °C entnommen. Bei allen Aufnahmen wurden die Linien der Neubauer-Zählkammer durch die Linse scharfgestellt. Seitenlänge eines großen Quadrats: 0,2 mm.

Die histologische Analyse erfolgte an adulten Fischen, die zuvor in Paraffin fixiert wurden. Abbildung 37 zeigt transversale Schnitte durch das Auge von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen. In der Übersicht ist die Linse zu erkennen, die im Gegensatz zum Menschen nicht abgeflacht, sondern kugelig ist. Diese zeigte bei den Knockout-Fischen keine Veränderungen.

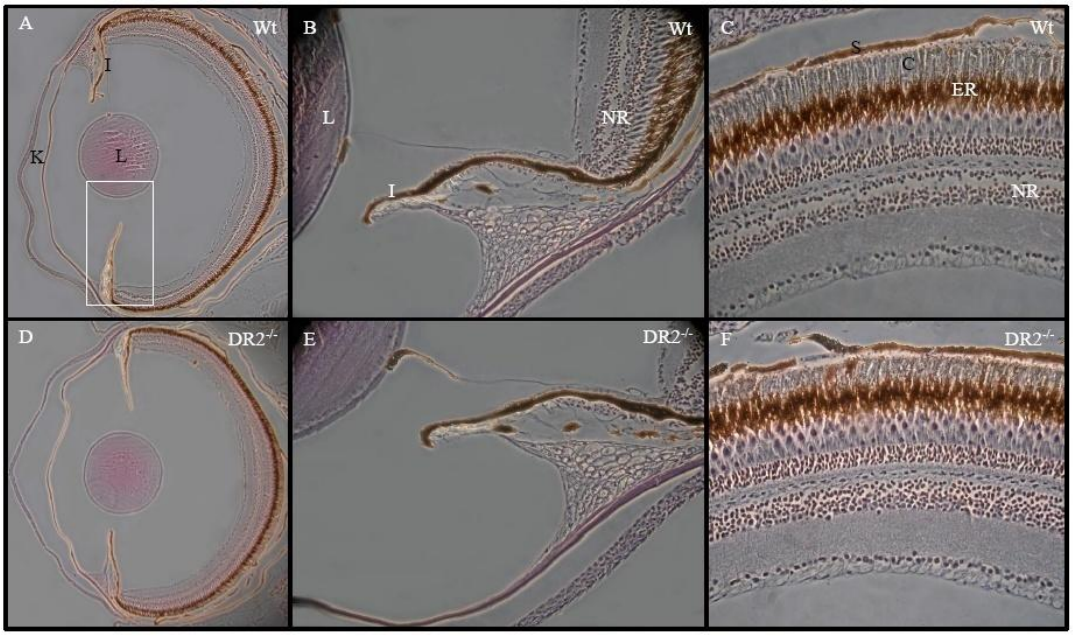


Abb. 37: Histologische Analyse des Auges
Transversale Schnitte durch das Auge eines Wildtyp- A), B), C) und DR2$^{-/-}$-Fischs D), E), F). Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin. B) und E) zeigen eine Vergrößerung des iridokornealen Winkels, die Position im Auge ist in A) gezeigt. Die Position der Hornhaut ist unten im Bild. C) und F) zeigen die Netzhaut mit den dahinter befindlichen Geweben, die Position der Linse ist unten. K = Kornea, L = Linse, I = Iris, NR = neuronale Retina, S = Sclera, C = Choroidea, RPE = retinales Pigmentepithel, Vergrößerung 100-fach (A und D) und 400-fach (B, C, D und F).

Die vergrößerte Darstellung des iridokornealen Winkels zwischen Iris und der Kornea zeigt keine Auffälligkeiten oder Fehlbildungen (Abb. 37 B, E). Auch die Retina ist normal strukturiert und die einzelnen Schichten Sclera, Choroidea und retinales Pigmentepithel lassen sich gut erkennen.

Gewebe, in denen ebenfalls der DR2-Transporter gefunden werden konnte, waren die Niere, das Gehirn und der Darm. Die Niere dient dem Zebrafisch nicht nur als Exkretionsorgan, sondern ist auch für die Blutbildung verantwortlich, die ab dem vierten Tag der Entwicklung einsetzt (Davidson und Zon, 2004). Daher findet man in der Niere neben den verschiedenen Tubuli auch die in der HE-Färbung blau bis rot angefärbten hematopoetischen Zellen (Abb. 38 C und G) (Davidson und Zon, 2004).

Die Schnittebene durch das Gehirn wurde auf der Höhe des Telencephalons gewählt, unmittelbar benachbart zum Tectum opticum. Das Gehirn des DR2$^{-/-}$-Fischs zeigte jedoch weder in diesem noch in einem anderen Bereich lichtmikroskopisch erkennbare Unterschiede (Abb. 38 D und H).

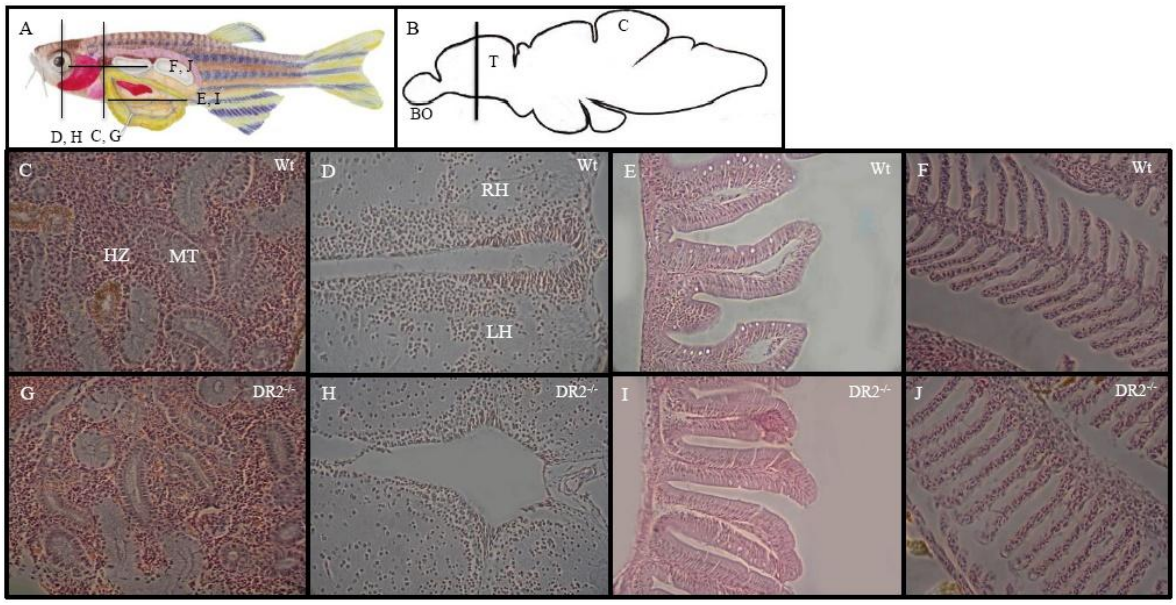


Abb. 38: Histologische Analyse von Niere, Gehirn, Darm und Kiemen

In A) und B) sind transversale und sagittale Schnittebenen der folgenden Abbildungen C) bis J) dargestellt. C) und G) zeigen einen Schnitt durch die Kopfniere, D) und H) durch das Gehirn, E) und I) durch den Darm und F) und J) durch die Kiemen. In der Niere sind die mesonephrischen Tubuli (MT) umgeben von blau und rot gefärbten hematopoetischen Zellen (HZ). Die Kiemen zeigen eine große Anzahl von Erythrozyten mit den blau gefärbten Zellkernen. BO = Bulbus olfactorius, C = Cerebellum, T = Telencephalon, RH = rechte Hemisphäre, LH = linke Hemisphäre.

Da entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn mit Einzelnukleotid-polymorphismen des ETTh in Verbindung gebracht werden konnten und der Darm auch im

Fisch der Resorption von ET dient, wurde dieser auf Merkmale von entzündlichen Erkrankungen hin untersucht. Der Darm von DR2$^{-/-}$-Fischen zeigte jedoch weder Wandverdickungen noch sonstige Läsionen, die auf eine Entzündung deuteten (Abb. 38 E und I).

Das letzte Organ, in dem ein Anstieg der ET-Konzentration nach Applikation von ET zu messen war und eine Expression des Transporters in Larven per *in situ* Hybridisierung gezeigt werden konnte, war die Kieme. Aufgrund der hohen Durchblutung der Kiemen ist es möglich, dass der Anstieg der ET-Konzentration auf einen erhöhten ET-Gehalt im Blut und nicht auf eine Einlagerung in das Kiemengewebe zurückzuführen ist. Dennoch unterliegen die Kiemen durch die hohen Sauerstoffkonzentrationen hohem oxidativem Stress, der die Anwesenheit eines Antioxidans sinnvoll macht. Aber auch in diesen Geweben war kein mikroskopischer Unterschied zwischen Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen zu erkennen (Abb. 38 F und J).

3.6.2 Analyse der Blutbildung und der Blutzellen

Da im Menschen eine hohe Konzentration von ET in Erythrozyten gefunden werden kann, stellte sich die Frage, ob ein ET-Mangel im Zebrafisch zu einer Abnahme der Blutzellen bzw. zu Veränderungen in deren Morphologie führt. Während der Embryonalentwicklung setzt die erste Blutbildung in der Intermediärzellmasse bereits nach 12 Stunden ein. Nach 26 Stunden beginnt das Herz des Embryos zu schlagen und die Blutzellen zu zirkulieren (Davidson und Zon, 2004). Durch die schnelle Entwicklung eignet sich der Zebrafisch hervorragend für die Analyse eines möglichen Einflusses des ET-Mangels auf die Blutbildung.

Da ein adulter Fisch nur zwischen 4 - 6 µl Blut besitzt, bedarf es einer Methode, um Blutzellen leicht zu identifizieren und zu isolieren. Hierzu wurden die DR2$^{-/-}$-Fische mit *gata*^{dsRED}-Fischen verpaart. Die Fische wurden uns freundlicherweise von Jean-Pierre Levraud zur Verfügung gestellt, die ursprünglich aus dem Labor von Leonard Zon stammten (Traver et al., 2003). Diese Fische exprimieren, unter der Kontrolle des Promotors des hematopoetischen Transkriptionsfaktors GATA-1, ein rot fluoreszierendes Protein. Dies ermöglicht eine schnelle und einfache mikroskopische Analyse des Gefäßsystems und der zirkulierenden Blutzellen.

Nach der Verpaarung der *gata*^{dsRED}- mit den DR2$^{-/-}$-Fischen wurde 48 hpf nach der dsRED-Fluoreszenz in den Embryonen gesucht. Positive Tiere wurden isoliert großgezogen und auf ihren Genotyp hin untersucht. Heterozygote DR2$^{+/-}$ *gata*^{dsRED}-Fische wurden erneut gekreuzt und genotypisiert, um homozygote DR2$^{-/-}$ *gata*^{dsRED}-Fische zu erhalten. Diese DR2$^{-/-}$ *gata*^{dsRED}-Fische zeigten gegenüber den wt-Fischen allerdings keine Auffälligkeiten in der Entwicklung des Gefäßsystems oder in den zirkulierenden Blutzellen (Abb. 39).

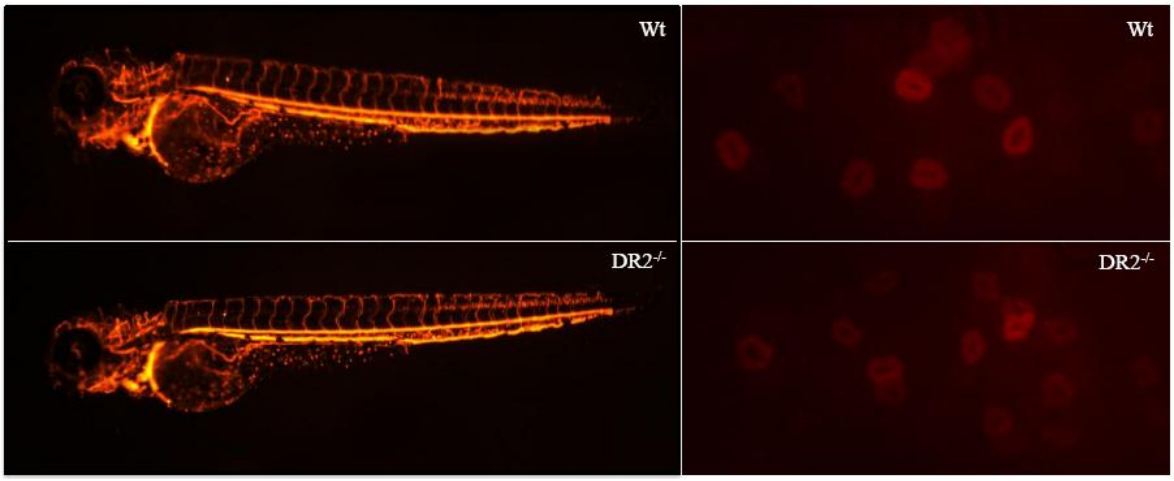


Abb. 39: Vergleich der Blutzirkulation in Larven
Dargestellt ist die Blutzirkulation von wt *gata*^{dsRED}- und DR2$^{-/-}$ *gata*^{dsRED}-Fischen. Die rechten Abbildungen zeigen die Fluoreszenz von reifen, zirkulierenden Blutzellen.

Zusätzlich wurden Blutausstriche angefertigt, die mit Hilfe einer Pappenheimfärbung analysiert wurden. Die Färbung zeigte den typischen Zellkern in reifen Erythrozyten des Fischs, den man in humanen Erythrozyten nicht findet. Ob in diesen Zellen der DR2-Transporter exprimiert wird konnte noch nicht geklärt werden.

Thrombozyten, Neutrophile und Leukozyten der DR2$^{-/-}$-Fische, die mit dieser Färbung eindeutig identifiziert werden konnten, zeigten keine Unterschiede zu den Blutzellen der wildtypischen Fische (Abb. 40). Auch das Verhältnis der einzelnen Blutzellen war identisch und es konnten keinerlei Hinweise auf einen entzündlichen Prozess gefunden werden (z.B. erhöhte Leukozytenzahlen).

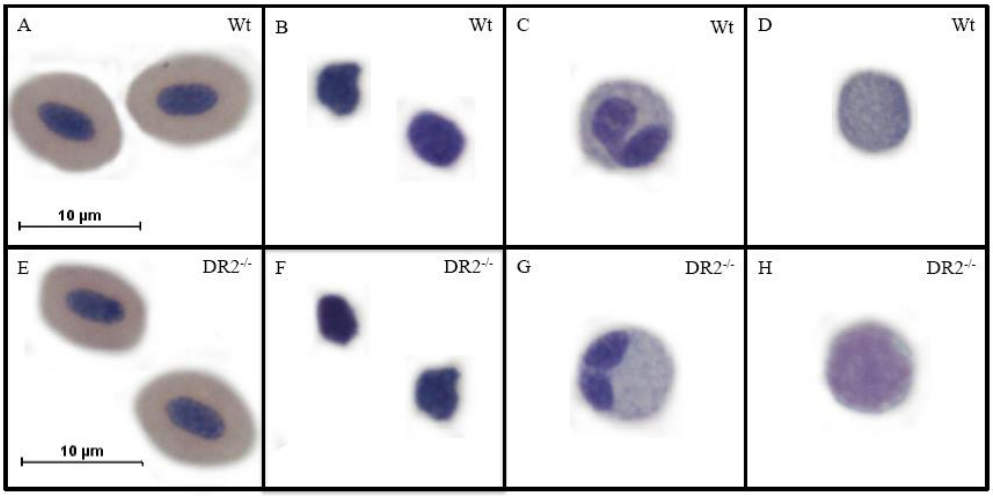


Abb. 40: Vergleich von reifen, zirkulierenden Blutzellen
Vergleich von peripheren reifen Blutzellen, gefärbt nach Pappenheim. Dargestellt sind in A) und E) Erythrozyten, in B) und F) Thrombozyten, in C) und G) Neutrophile und in D) und H) Lymphozyten.

3.7 Induktion von oxidativem Stress durch UV-Licht

Da bei der Analyse der DR2$^{-/-}$-Fische keine phänotypischen Unterschiede gefunden werden konnten, scheint ein ET-Mangel keine unmittelbar sichtbaren Auswirkungen zu haben. Aus diesem Grund wurde versucht durch Induktion von oxidativem Stress einen Phänotyp zu erzeugen. Da die Augen das am besten zugängliche Organ des Fischs darstellen und weil die Akkumulation von ET im Zebrafischauge mit der von verschiedenen Säugetieren übereinstimmt, wurde bei der weiteren Analyse mit diesem Organ begonnen (Shires et al., 1997). Der offensichtlichste oxidative Schaden, der den Augen widerfahren kann, wird durch UV-Licht induziert und führt in vielen Fällen zur Entstehung von grauem Star (Katarakt) (siehe 4.3.1). Da aus der Literatur keine nützlichen Daten über die Intensität der Bestrahlung für Zebrafische zu entnehmen war, um Katarakt zu induzieren, wurde in einem ersten Versuch die notwendige Bestrahlungsdauer ermittelt, die zu einer Trübung der Linse führt. Um die natürlichen Bedingungen so gut wie möglich nachzustellen, wurde die Bestrahlung in einem Wassertank durchgeführt und so auf eine Betäubung der Fische während des Vorgangs verzichtet. Bei allen Bestrahlungen wurde eine Wassertiefe von 2 cm verwendet. Für die Bestrahlung mit UVB-Licht (302 nm) lag die maximal mögliche Bestrahlungszeit bei zwei Stunden, bzw. zwei mal eine Stunde, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (siehe 2.11). Diese Dosis war für alle Fische letal und verursachte starke Verbrennungen der Haut und der Flossen. Nach der Bestrahlung mit

nicht letalen Dosen von 15 - 30 min wurden die Fische für eine Woche unter normalen Bedingungen gehalten, um die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Linse manifest werden zu lassen.

Bei der Bestrahlung zeigte sich dosisabhängig eine starke Trübung der Augenlinse, die sich als grauer Schleier von außen ringförmig nach Innen ausbreitete (Abb. 41 C, D). Für den Vergleich von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen wurde eine Bestrahlungsdauer von 15 min gewählt, da Wildtyp-Fische zu diesem Zeitpunkt noch keine Trübung der Linse zeigten. Die Fische wurden für diese Versuche gleichzeitig bestrahlt. Die Bestrahlung von Wildtyp- und DR2$^{-/-}$-Fischen verursachte in beiden Fällen keinen nennenswerten Schaden (Abb. 41 E und F).

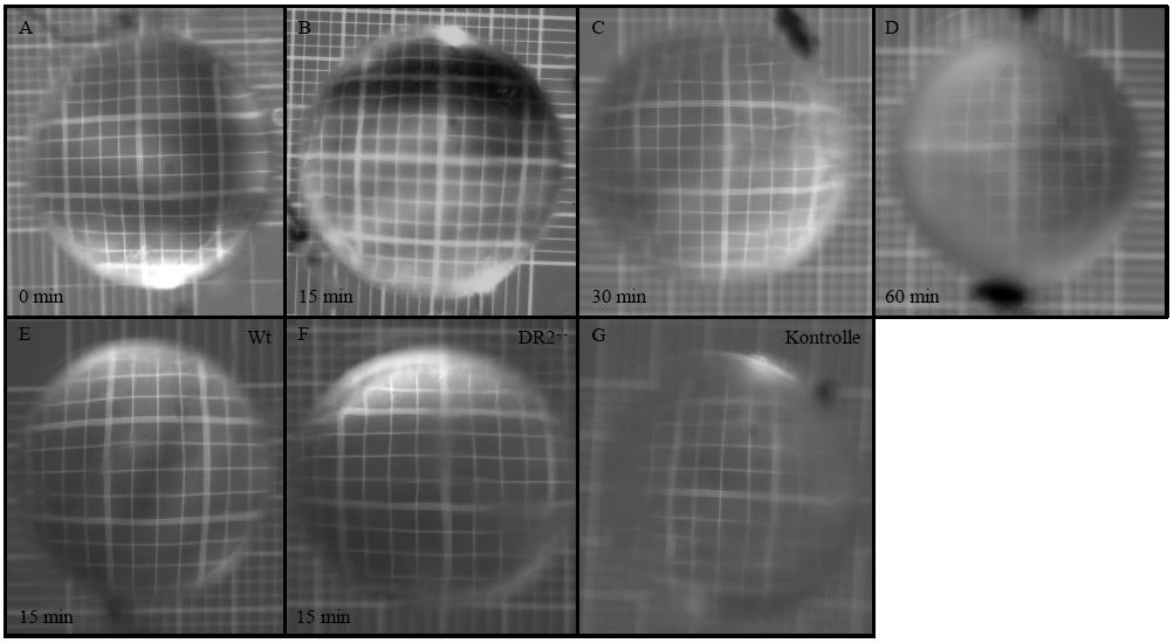


Abb. 41: Induktion von Katarakt durch UVB-Licht

Die Induktion der Linsentrübung wurde mit UVB-Licht (302 nm) durchgeführt. Die Linien der Neubauer-Zählkammer wurden für die Aufnahmen durch die Linse scharfgestellt. Bei der Analyse wurden immer beide Augenlinsen der Fische betrachtet, die vergleichbare Schäden aufwiesen. A) - D) zeigt eine dosisabhängige Trübung von Wildtyp-Linsen. E) und F) zeigen den direkten Vergleich einer Wildtyp- und einer DR2$^{-/-}$-Linse nach 15-minütiger Bestrahlung. G) Als Kontrolle wurde die Linse eines Wildtyp-Fischs bei 0 °C isoliert.

Aus der Literatur war bekannt, dass nicht nur das kurzwelligere und energiereichere UVB-Licht zu Schäden der Linse und der darin enthaltenen Makromoleküle führen kann, sondern dass auch UVA-Licht (365 nm) durch die Induktion von ROS schädlich sein kann. Um dies zu testen, wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen eine Bestrahlungszeit ermittelt, die eine Trübung der Linse verursachte. Es zeigte sich, dass

auch bei UVA-Strahlung eine zeitabhängige Trübung der Linse einsetzte, die sich als grauer Schleier auf der Linse darstellte (Abb. 42 A - D).

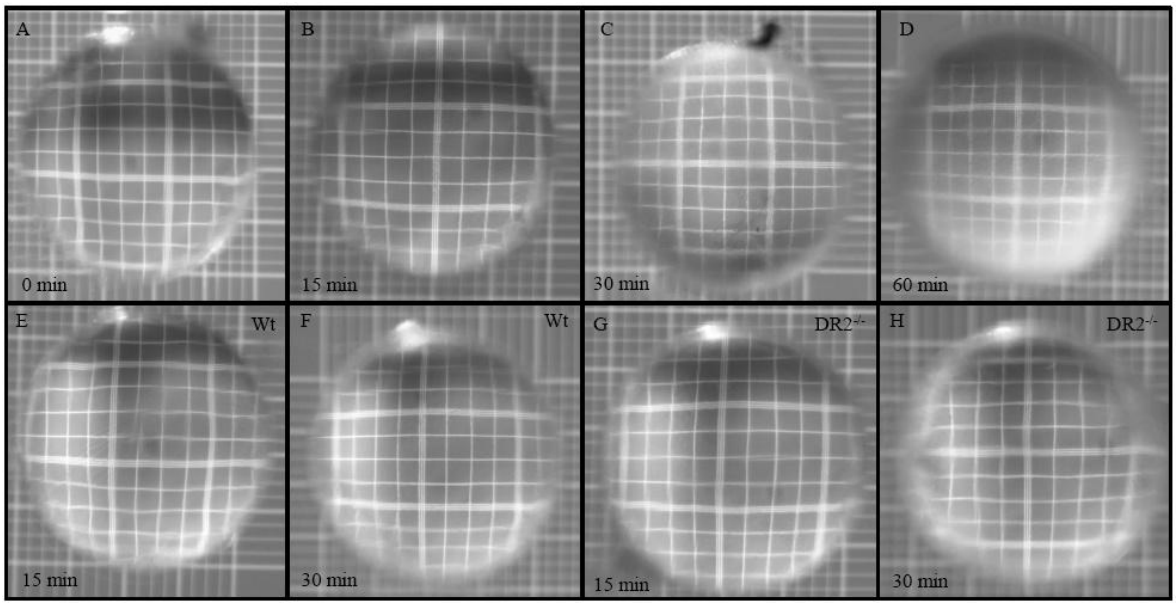


Abb. 42: Induktion von Katarakt durch UVA-Licht
Die Induktion der Linsentrübung wurde mit UVA-Licht (365 nm) durchgeführt. Die Linien der Neubauer-Zählkammer wurden für die Aufnahmen durch die Linse scharfgestellt. Bei der Analyse wurden immer beide Augenlinsen der Fische betrachtet, die vergleichbare Schäden aufwiesen. A) - D) zeigt eine dosisabhängige Trübung von Wildtyp-Linsen. E) und G) sowie F) und H) zeigen den direkten Vergleich zweier Wildtyp- und zweier $DR2^{-/-}$-Linse nach 15- bzw. 30-minütiger Bestrahlung.

3.8 Promotoranalyse durch Erzeugung einer transgenen eGFP-Fischlinie

Die Regulation des DR2-Transporters ist noch völlig unklar. Für eine genauere Analyse der zeitlichen und räumlichen Expression des Transporters sollte eine transgene Fischlinie etabliert werden.

Die Gene für die Transporter DR1 und DR2 befinden sich auf Chromosom 21 in direkter Nachbarschaft. Da die Gene einen 1,548 kb großen Bereich eingrenzen, wurde dieser als putativer Promotorbereich amplifiziert und für die Generierung einer transgenen Fischlinie getestet (siehe 2.9.7). Die Sequenz wurde unabhängig aus zwei Fischen des Tübingen-Stamms kloniert und sequenziert. Die vollständige Sequenz enthielt einige Abweichungen zu der bei Ensembl hinterlegten Sequenz (siehe Anhang).

Das Konstrukt, bestehend aus dem putativen Promotorbereich und eGFP, wurde flankiert von den Erkennungssequenzen für die Transposase aus Mais (*zea mays*). Das Plasmid und die mRNA der Transposase wurden parallel in befruchtete Eizellen im Einzellstadium injiziert. So konnte die Transposase die Exzision des Konstrukts aus dem Plasmid und die zufällige Integration in das Genom katalysieren. Das Plasmid und das Kontrollplasmid wurde uns freundlicherweise von Serguei Parinov überlassen (Emelyanov et al., 2006).
Als Kontrolle des Systems und der Injektionen wurde ein Plasmid verwendet, das den 2,25 kb langen Promotorbereich für das Gen *keratin 8* trägt, ein Faserprotein, das überwiegend in Epithelzellen der Haut aber auch in der Mukosa im Maul, im Pharynx, im Ösophagus und im Rektum exprimiert wird (Gong et al., 2002).

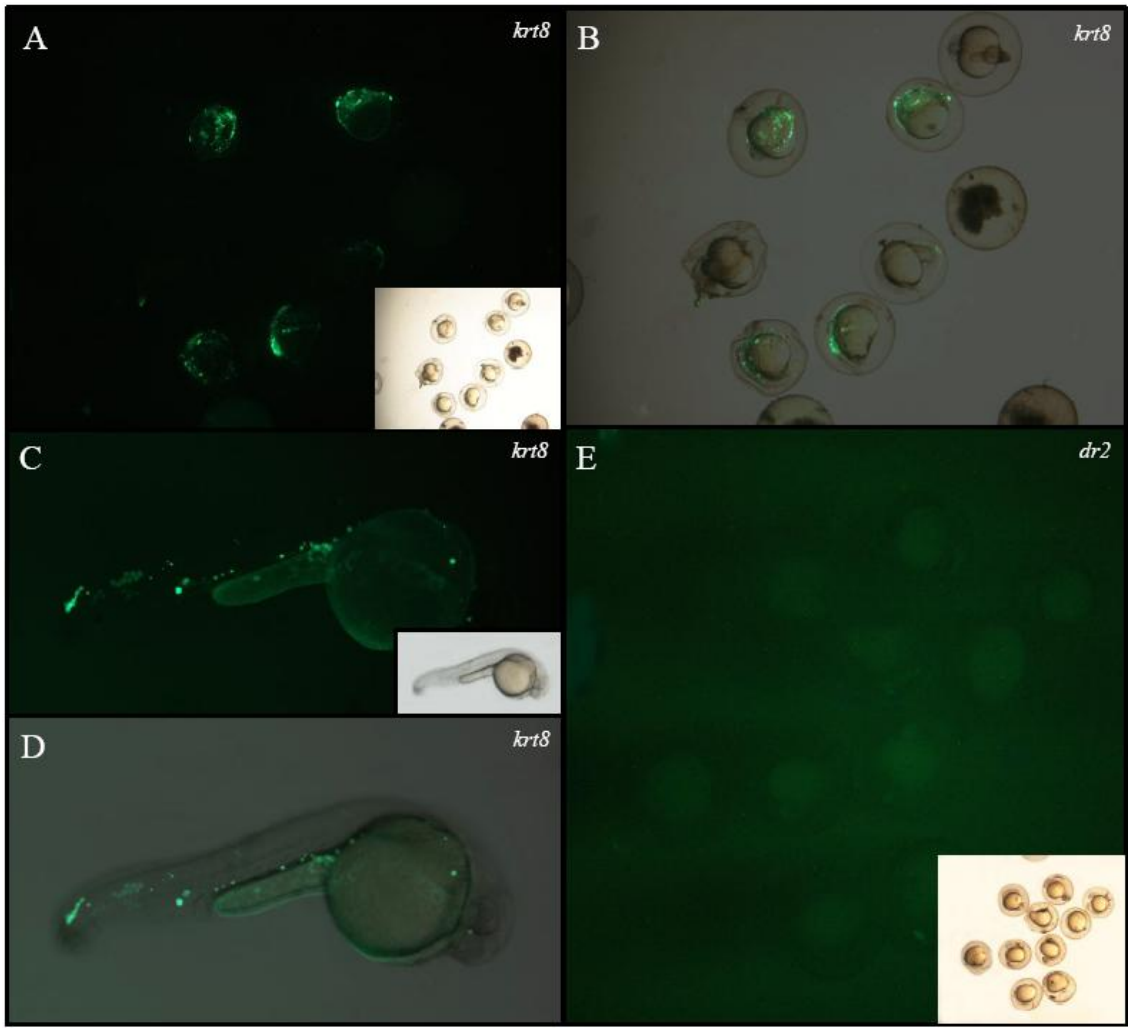


Abb. 43: Transgene Fischlinie
A) - D) 24 Stunden nach der Injektion des Kontrollplasmids pMDS(*krt8*)eGFP konnte ein Signal in den Epithelzellen der Fische detektiert werden. E) Die Injektion des Promotorkonstrukts des DR2-Transporters zeigte unter gleichen Bedingungen kein Signal.

Die Injektionen des Plasmids mit dem Promotorbereich des DR2-Transporters und der Kontrolle erfolgten immer in parallelen Ansätzen und in gleichen Gelegen. Fische, die mit dem Kontrollplasmid injiziert wurden, zeigten nach 24 Stunden eine deutliche, punktuelle Fluoreszenz in den Epithelzellen (Abb. 43 A - C). Nicht alle Fische zeigten ein Fluoreszenz-Signal, jedoch lag die Anzahl leuchtender Fische bei ca. 50 - 60 %. Die Injektion mit dem Konstrukt des Promotorbereichs des DR2-Transporters zeigte unter den gleichen Bedingungen jedoch kein sichtbares Fluoreszenzsignal nach 24 oder 48 Stunden. Die *in situ* Hybridisierungen zeigten jedoch, dass die Expression des Transporters bereits 6 Stunden nach der Befruchtung zu detektieren war und somit auch der Promotor aktiv sein müsste (Abb. 19).

4 Diskussion

Der ETT ist ein über verschiedene Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Schwein und Huhn) hochkonservierter Transporter, für den auch im Genom des Zebrafischs orthologe Kandidatengene gefunden werden konnten. Die physiologische Funktion des Transporters ist es das natürliche, hydrophile Antioxidans Ergothionein (ET) durch Biomembranen zu transportieren. Aufgrund hoher ET-Konzentrationen in einigen Geweben und des Expressionsmusters des Transporters scheint es eine spezifische Funktion dieser Verbindung zu geben (Gründemann et al., 2005). Trotz der starken Konservierung gibt es zwischen den einzelnen Geweben große Konzentrationsunterschiede und auch zwischen verschiedenen Spezies gibt es Unterschiede im Expressionsmuster (Hartman, 1990). So findet man z.B. in der humanen Leber keine Expression des Transporters, während man in der Leber der Ratte und der Maus die ETT-mRNA nachweisen kann (Tamai et al., 2000; Wu et al., 2000).

Bisherige Analysen zur Funktion von ET basieren überwiegend auf *in vitro* Experimenten. Die physiologische Funktion von ET konnte seit seiner Entdeckung 1909 noch nicht aufgeklärt werden, da *in vitro* Versuche immer nur einen Teil der möglichen Funktion abbilden und Tiermodelle (Knockout-Modelle) fehlen (Brummel, 1985, 1989). Direkte Symptome einer Mangelerscheinung bei ET-freier Ernährung sind noch nicht bekannt, weshalb ET noch nicht zu den Vitaminen gezählt wird. So wurden spätere Symptome eines ET-Mangels in Ratten und Kaninchen erst nach der Induktion von oxidativem Stress durch Injektion von Nitrit in Form von Methämoglobin sichtbar (Mortensen, 1953; Spicer et al., 1951).

Ziel dieser Arbeit war es den orthologen ETT im Zebrafisch zu identifizieren und ein vollwertiges Knockout-Modell für die weitere Funktionsanalyse von ET zu etablieren. Der Zebrafisch wird mittlerweile bei einer Vielzahl medizinischer Fragestellungen eingesetzt (Kari et al., 2007; Posner et al., 2008). So bietet er z.B. gegenüber der Maus einige Vorteile, die auch während der ersten Analyse der $DR2^{-/-}$-Fische genutzt wurden. Wegen der hohen Nachkommenzahl, der schnellen Entwicklung und der optimalen mikroskopischen Analysemöglichkeit ist der Zebrafisch ideal für die Fragestellung dieser Arbeit geeignet. Neben den generellen Vorteilen ist die Induktion von oxidativem Stress

für den weiteren Verlauf dieses Projekts von entscheidender Bedeutung. So ist es möglich den Zebrafisch, im Gegensatz zur Maus, in Lösungen zu inkubieren, die oxidativen Stress induzieren können. Für Verbindungen, die für eine Inkubation nicht geeignet sind (geringe Stabilität oder schlechte Resorption), besteht die Möglichkeit diese direkt in befruchtete Eier zu injizieren. Die Kosten solcher Experimente im Mausmodell wären um ein Vielfaches höher.

4.1 Identifikation des orthologen ETT im Zebrafisch

Die Suche nach dem Ortholog des ETT im Zebrafischgenom mit der Sequenz des humanen ETT als Konsensus-Sequenz lieferte drei Kandidatengene. Da der Fisch im Gegensatz zu den Mammalia im Verlauf der Evolution eine weitere Genomverdopplung durchlaufen hat, sind von den meisten Genen zwei Kopien vorhanden (Amores et al., 1998). Diese können jedoch während der Evolution auch wieder verloren gehen. Somit wurden theoretisch zwei Kandidaten für den ETT und zwei für den CTT erwartet, es wurden jedoch nur drei Kandidatengene gefunden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen dem humanen ETT und CTT war eine direkte Zuordnung der Kandidaten nicht möglich. Für eine eindeutige Zuordnung mussten alle drei Kandidaten kloniert und heterolog exprimiert werden, um eine funktionelle Verwandtschaftsanalyse durchführen zu können.

Die Aufnahmeversuche zeigten, dass nur der als DR2 bezeichnete Kandidat eine Aufnahme von ET in humane HEK-293-Zellen katalysiert, während der DR3-Transporter Carnitin transportiert. Die Anwesenheit eines Ergothionein- und eines Carnitin-Transporters, selbst im evolutionär zum Menschen weit entfernten Zebrafisch, deutet auf die Wichtigkeit dieser Transporter hin. Es kann nicht immer vorausgesetzt werden, dass die im menschlichen Genom gefundenen Gene auch im Zebrafisch vorhanden sind. So findet man für die humanen Transporter OAT1 und OAT3 im Genom der Knochenfische nur einen Kandidaten, der funktionelle Eigenschaften beider Transporter aufweist (Aslamkhan et al., 2006). Dies konnte auch für die humanen Transportproteine OCT1 (Organic Cation Transporter), OCT2 und EMT (Extraneuronal Monoamine Transporter) gezeigt werden. Im Menschen sind die drei Transporter funktionell klar voneinander zu unterscheiden (Gründemann et al., 1994; Gründemann et al., 2003; Gründemann et al., 1998; Koepsell et al., 2003). Im Zebrafisch gibt es jedoch nur einen Transporter, der

Aktivität für Verbindungen aus allen drei Substratspektren zeigt (Wiltzer, Manuskript in Vorbereitung).

Der erste Kandidat (DR1) zeigte weder für ET noch für Carnitin noch in der Differenz-Abtönung (Gründemann et al., 2005) eine Aktivität und war somit auch keinem Ortholog zuzuordnen. Da die Expression der Transporter in humanen Zelllinien durchgeführt wurde, musste für eine messbare Aktivität die korrekte Lokalisation der Proteine in der Plasmamembran mittels Konfokalmikroskopie sichergestellt werden. Trotz der fehlenden Aktivität des DR1-Transporters konnte die Lokalisation aller Kandidaten in der Plasmamembran bestätigt werden (Abb. 10).

Die weitere Analyse des DR2-Transporters und der direkte Vergleich mit dem humanen ETT zeigte eine hohe Übereinstimmung der Substratspektren mit einer deutlich ausgeprägten Präferenz für das physiologische Substrat ET (Abb. 17). Der K_m-Wert des DR2-Transporters für ET lag bei 116 µmol/l (95 % Konfidenzintervall: 110 - 133 µmol/l, Abb. 13), während die Affinität des humanen ETT bei 21 µmol/l liegt (Gründemann et al., 2005). Ohne den DR2-Transporter oder den ETT sind Zellen für ET praktisch impermeabel (Abb. 14). Bevor ET als physiologisches Substrat bekannt war, wurden TEA und Carnitin zur Charakterisierung des humanen ETT verwendet. Die K_m-Werte für TEA und Carnitin liegen jedoch im Vergleich zu ET bei lediglich 436 bzw. 413 µmol/l (Tamai et al., 1997; Xuan et al., 2003).

Weiterhin zeigte der DR2-Transporter, ebenso wie der ETTh, eine Abhängigkeit vom Na^+-Gradienten, sowie eine ähnlich hohe Akkumulation von ET im Zeitverlauf (Abb. 14 und 18). Während der ETTh in 60 min ET um den Faktor 80 im Vergleich zur extrazellulären Substratkonzentration anreichert, erreicht der DR2 eine Anreicherung um den Faktor 20.

Weiterhin konnte durch die Analyse der Transporter-mRNA im Zebrafisch mittels RT-PCR und *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass der DR2-Transporter, wie auch der ETTh, als molekularer Marker für ET genutzt werden kann. Die Quantifizierung der ET-Gewebekonzentrationen per LC-MS zeigte erstmals, dass der DR2-Transporter an der Aufnahme und der Verteilung von ET *in vitro* und *in vivo* beteiligt ist (Abb. 12 und 27). Durch die Charakterisierung konnte der DR2-Transporter eindeutig von den anderen Kandidaten abgegrenzt werden und zweifelsfrei seinem Ortholog, dem humanen ETT zugeordnet werden. Die Transporteffizienz, die Spezifität und die Verwendung des natürlichen Ionengradienten sprechen dafür, dass es sich bei ET um das natürliche Substrat des DR2-Transporters handelt. Aufgrund dieser Zuordnung sollte anstelle der

Arbeitsbezeichnung DR2-Transporter nun die von D. Gründemann vorgeschlagene Bezeichnung ETT auch für diesen Transporter verwendet und er nach der allgemein gültigen Zebrafisch-Nomenklatur als Ettzf (zf = zebrafish, Gensymbol: *slc22a4*) bezeichnet werden. Des Weiteren sollte der DR3-Transporter in Cttzf (Gensymbol: *slc22a5*) umbenannt werden.

4.2 Etablierung des Knockout-Modells

Bei der Wahl einer geeigneten Methode zur Etablierung eines ET-Mangel-Modells im Zebrafisch war es wichtig einen permanenten Knockout zu erzeugen, der die Analyse eines Phänotyps und eine weitere Untersuchung, z.B. durch Induktion von oxidativem Stress, zulässt. Eine häufig verwendete Methode in der Zebrafischgenetik ist die Injektion von Morpholino-Oligonukleotiden in befruchtete Eizelle, die den Knockdown eines Gens für einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen zulässt. Da nach dieser Zeit die Expression der Gene durch Verdünnung der Morpholino-Oligonukleotide wieder einsetzt, ist auch eine Aufnahme von ET wieder möglich. Somit ist diese Methode für eine Analyse älterer Fische nicht geeignet. Zwar sind bereits nach 24 Stunden alle Organe des Fischs angelegt (Kimmel et al., 1995), jedoch ist es möglich, dass die Auswirkungen eines ET-Mangels erst später in Erscheinung treten.

Um einen permanenten Knockout zu erzeugen gibt es zwei Möglichkeiten: die retrovirale Insertionsmutagenese oder das TILLING (targeting induced local lesions in genomes) mittels ENU-Mutagenese (ENU = N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) (Amsterdam et al., 1999; Driever et al., 1996; Golling et al., 2002; Wienholds et al., 2003). Nach der Aufklärung des Ettzf wurde im Sanger Institut ein Antrag zur Identifizierung einer Nullmutante gestellt. Diese Anfrage führte allerdings im Zeitraum dieser Arbeit zu keinem Ergebnis.

Die Suche von D. Gründemann in der ZeneMark® Bibliothek der Firma Znomics nach retroviralen Insertionen im Gen des Ettzf lieferte zwei Insertionen im ersten Exon (ZM_00007837 und ZM_00286085, Abb. 28). Nachdem der Ettzf als einziger ET-Transporter identifiziert worden war, stellten diese Fischlinien potentielle Knockout-Linien dar. Nach der Aufzucht, der Genotypisierung und der Rückkreuzung der Fischlinie ZM_00007837, war die Grundlage für jede weitere Analyse der Test, ob die Fische noch weiterhin in der Lage sind ET zu akkumulieren.

Durch die hochsensible Methode der LC-MS-Analytik (Nachweisgrenze: 0,5 ng/ml, 2,1 nmol/l) und die Etablierung geeigneter Aufarbeitungen der Proben (siehe 2.6 und 2.9.5) war es möglich die ET-Gehalte zwischen Wildtyp- und Ettzf-Knockout-Fischen (*ettzf*$^{-/-}$) zu vergleichen. Um Schwankungen im ET-Gehalt durch Unterschiede in den Größen der Fischorgane auszuschließen, wurde der Prolingehalt der Organe ebenfalls mittels LC-MS gemessen und für die Normierung der ET-Gehalte verwendet (siehe 3.4).
Die Virusinsertion im ersten Exon des Transporters führt zu einem stark verkürzten und somit inaktiven Protein (siehe Anhang). Der Vergleich der Wildtyp- und der *ettzf*$^{-/-}$-Fische zeigte, dass durch den Verlust des Transporters keine Akkumulation von ET mehr möglich war oder der Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze lag. Dies galt sowohl für die Organe, in denen der Transporter exprimiert wird, als auch für den gesamten Fisch (Abb. 31 und 32).

Um diesen Modellorganismus für die Analyse der ET-Funktion nutzen zu können, musste überprüft werden, ob die Virusinsertion oder der ET-Mangel einen Phänotyp verursacht. Hierzu wurde zuerst die Entwicklung der Fische untersucht. Die Fische zeigten keine Beeinträchtigung im Wachstum oder der Fertilität. Besonders die Organe, in denen die Ettzf-mRNA mittels *in situ* Hybridisierung oder RT-PCR gefunden wurde, und die Gewebe, in denen hohe ET-Konzentrationen gemessen werden konnten, wurden genauer analysiert. Aber auch die histologische Analyse der Gewebe zeigte keine sichtbaren Unterschiede (Abb. 36 - 38). Dies zeigt, dass die Virusinsertion, mit einer Größe von 5,729 kb, den gewünschten Effekt hat und den Ettzf inaktiviert ohne eine weitere Störung der Entwicklung oder der Fertilität zu verursachen. Für die Zukunft bedeutet dies, dass gefundene Unterschiede direkt auf den Mangel von ET zurückgeführt werden können. Des Weiteren zeigt die Phänotypisierung, dass der ET-Mangel unter Laborbedingungen nicht zu mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Gewebe oder der Blutzellen führt und keine erkennbaren Mangelsymptome bei den Fischen verursacht.
Um die genaue Lokalisation des Transporters untersuchen zu können, sollte ein transgener Fisch generiert werden, der unter der Kontrolle des *ettzf*-Promotors eGFP exprimiert. Mit diesem Fisch sollte es möglich sein ohne aufwendige Antikörperfärbungen die genaue Lokalisation des Ettzf zu bestimmen. Die Anordnung der Gene für den DR1 und den *ettzf* auf Chromosom 21 schienen einen putativen 1,548 kb langen Promotorbereich zu begrenzen. Trotz erfolgreicher Klonierung dieser Sequenz und Etablierung des Ac/Ds-Systems gelang es nicht eine transgene eGFP-Fischlinie zu etablieren (siehe 3.8).

Vermutlich ist der gewählte Promotorbereich für die Expression und die Regulation in den verschiedenen Geweben nicht ausreichend.

4.3 Lokalisation des Ettzf

Die Ettzf-mRNA kann bereits 6 Stunden nach der Befruchtung mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden. Für das Verständnis der Wirkung einer Verbindung ist die Lokalisation in einem Organismus von entscheidender Bedeutung. Das räumliche Expressionsprofil des Ettzf zeigt deutliche Gemeinsamkeiten zu dem des humanen ETT. Beide Transporter werden im Darm exprimiert, wo sie für die Resorption von ET verantwortlich sind, sowie in der Niere, wo ET aus dem Primärharn zurückgewonnen wird. Diese Expressionsorte scheinen in vielen Spezies konserviert zu sein und konnten auch im Schwein, in der Ratte und im Huhn durch eigene Daten bestätigt werden (Nikodemus et al. Manuskript in Vorbereitung).
Dass der Ettzf für die Akkumulation von ET zuständig ist, konnte nicht nur in Zellkultur, sondern auch *in vivo* am adulten Zebrafisch gezeigt werden (Abb. 27). Die Verteilung des ETs im Fisch ist an die Expression des Transporters gekoppelt. So konnte eine Anreicherung in den Augen, im Gehirn, und in der Niere gefunden werden. Der Anstieg der ET-Konzentration in den Kiemen ist vermutlich auf die erhöhte Konzentration im Blut (Zellen oder Plasma) zurückzuführen.

4.3.1 Mögliche Funktion von ET im Auge

Die Augen scheinen nicht nur im Menschen einen wichtigen Wirkungsort von ET darzustellen. So ist die hohe ET-Konzentration im Auge und in der Augenlinse über viele Spezies konserviert (Hartman, 1990; Shires et al., 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ettzf auch im Auge des Zebrafischs exprimiert wird und das Auge, im Vergleich zu anderen Organen, eine der höchsten ET-Konzentration aufweist (Abb. 25). In welchem Teil des Auges der Transporter bzw. das ET lokalisiert ist, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Wegen der geringen Wassertiefe der natürlichen Habitate des

Zebrafischs sind die Augen nicht vollständig vor UV-Strahlung geschützt. Somit ist ein Schutz vor UV-induzierten Schäden auch für den Fisch sinnvoll, vor allem vor dem Hintergrund, dass sein natürliches Verbreitungsgebiet sich auf asiatische Länder beschränkt, in denen die Sonneneinstrahlung sehr hoch ist (z.B. Pakistan, Bangladesch, Indien).

Die Anatomie des Zebrafischauges unterscheidet sich trotz der Anpassung an den Lebensraum nur geringfügig von der des Menschen, wodurch der Zebrafisch zunehmende Bedeutung bei der Untersuchung der Augenentwicklung und -krankheiten erlangt (Glass und Dahm, 2004). So findet man in der Fischlinse alle transparenten Kristalline, die man auch in der menschlichen Augenlinse findet. Obwohl es Unterschiede im Gehalt gibt, zeigt z.B. das Verhältnis von α-Kristallin zu den anderen Kristallinen, sowie deren chemische Modifikationen große Übereinstimmungen. Somit stellt der Zebrafisch für die Untersuchung der Pathogenese, z.B. von Katarakt, einen geeigneten Modellorganismus dar (Posner et al., 2008).

Katarakt ist die häufigste Ursache für Sehverlust und Grund für ca. 50 % der Erblindungen (ca. 17 Mio. Menschen) weltweit. Täglich werden ca. 28000 neue Fälle von Katarakt gemeldet (Spector, 2000). Das Hauptproblem bei der Untersuchung dieser Linsentrübung ist, dass der Verlust der Transparenz oft ein spätes oder sogar das letzte Ereignis einer Serie von Ereignissen darstellt. Somit ist bei der multifaktoriellen Entstehung von Katarakt der Bezug zum Auslöser der Erkrankung nicht immer einfach (Spector, 1995). Dennoch gilt als gesichert, dass neben Mangelernährung die Exposition durch UV-Licht maßgeblich an der Entstehung beteiligt ist und dass sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung Auslöser sein können (Abb. 44) (Brilliant et al., 1983; Burton et al., 1997; Taylor et al., 1988; Tuchinda et al., 2006). Während die energiereichere UVB-Strahlung direkt in der Lage ist z.B. DNA zu schädigen (Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere), entsteht die schädigende Wirkung der UVA-Strahlung, die 95 % des natürlichen Sonnenlichts ausmacht, durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese können verschiedene Makromoleküle, wie Proteine und DNA, aber auch Lipide angreifen. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Thiolverbindungen, unter anderem ET, in der Lage sind diese reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxide, Singulett-Sauerstoff, Peroxinitrit und Hydroxylradikale) abzufangen (Franzoni et al., 2006; Rougee et al., 1988; van den Broeke und Beyersbergen van Henegouwen, 1993).

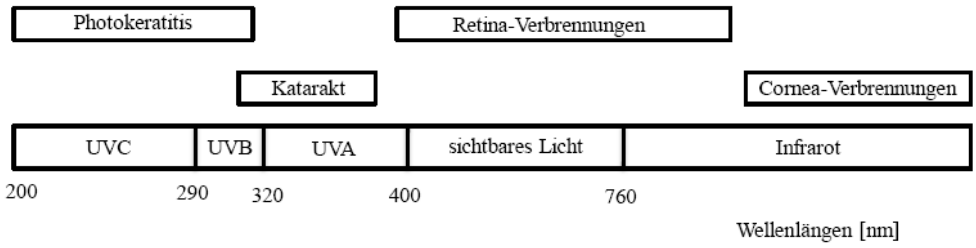


Abb. 44: Effekt des elektromagnetischen Spektrums auf das Auge
Dargestellt sind die Kernbereiche der Wellenlängen, bei denen Schäden der Augen auftreten können. Verändert nach Tuchinda et al., 2006.

Der *in vitro* Schutz von ET vor UV-induzierten Schäden, sowohl im UVA- als auch im sichtbaren Wellenlängenbereich, konnten bereits an Keratinozyten gezeigt werden. Die Vorbeladung der Zellen mit ET zeigte in der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) einen maximalen Schutz vor UV-induzierten DNA-Brüchen von 97,9 % im sichtbaren Wellenlängenbereich und 59,8 % im UVA-Bereich (Botta et al., 2008). Ein vergleichbarer Schutz vor UV-Licht ist auch im Auge denkbar.

Dass natürliche Verbindungen in der Lage sind Augenlinsen vor einer Trübung durch ROS zu schützen, konnte für Pyruvat und Koffein *in vitro*, sowie für Vitamin C und E *in vivo* an Ratten gezeigt werden (Ayala und Soderberg, 2004; Devamanoharan et al., 1991; Hegde et al., 2007; Mathew et al., 2003; Varma et al., 2008). Bei einem Mangel von Antioxidantien konnte im Fall von Vitamin E gezeigt werden, dass nach Induktion von oxidativem Stress die Schäden der Linse größer waren als bei Kontrolltieren (Wegener et al., 2002).

Auch für ET konnte man bei Patienten, die an Alterskatarakt erkrankt waren, mit zunehmendem Mangel eine Verstärkung der Linsentrübung beobachten (Shukla et al., 1981). Dass ET das Auge vor oxidativen Schäden schützen kann, konnte bereits im Rattenmodell gezeigt werden. Durch die Injektion des Glutamat-Agonisten N-Methyl-D-Aspartat in den Glaskörper von Ratten wurden durch die Überstimulation des Rezeptors vermehrt freie Radikale gebildet. Die Radikale konnten durch die Applikation von ET abgefangen und so die Retina geschützt werden (Moncaster et al., 2002).

In einem weiteren Experiment konnte eine protektive Wirkung von ET für die Augenlinse gezeigt werden. Durch die Injektion von Hydrokortison in Hühnereier konnte künstlich Katarakt erzeugt werden. Die Trübung der Linse konnte durch spätere Injektion von ET in das Hühnerei gemindert oder sogar ganz verhindert werden (Nishigori et al., 1984).

Die Befunde, dass ET im Auge verschiedener Spezies und auch im Auge der evolutionär weiter entfernten Zebrafische akkumuliert wird, zeigen, dass ET bei der Abwehr von UV-induziertem Stress eine Rolle spielen könnte. Diese Hypothese wird dahingehend bestätigt, dass nachtaktive Tiere, wie die Ratte, nach eigenen Daten nur eine sehr schwache Expression des ETT im Auge aufweisen. Das Schwein dagegen zeigt eine hohe Expression des Transporters (Nikodemus, Manuskript in Vorbereitung). Ein weiterer Faktor bei der Entstehung von Katarakt scheint mit zunehmendem Alter die verstärkte Lipidperoxidation zu sein (Kisic et al., 2009). Das Auge ist reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), die zunehmend durch ROS angegriffen werden (Stone et al., 1979).

Trotz der Vielzahl an Antioxidantien, die in der Augenlinse gefunden werden können, gibt es *in vivo* bei manchen Reaktionen für ET einen Vorteil gegenüber anderen Antioxidantien. Eine Oxidation von α-Keto-γ-Buttersäure (KMBA) durch Hydroxylradikale und Peroxinitrit konnte mittels ET besser abgefangen werden als durch GSH oder das Vitamin E Analogon Trolox (Franzoni et al., 2006).

Weiterhin scheint die Verfügbarkeit der Antioxidantien in der Linse zumindest bei älteren Patienten ein Problem darzustellen. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Synthese und der Metabolismus von GSH im Alter abnehmen, sondern dass auch die Verteilung von GSH vom Cortex zum Kern der Linse hin abnimmt. Dieser Bereich scheint dadurch besonders anfällig gegenüber oxidativen Schäden zu sein, was zu einer verstärkten Entstehung von Kernkatarakt führen kann (Sweeney und Truscott, 1998).

Diese Literaturdaten stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit gewonnen Ergebnissen bezüglich der hohen ET-Konzentration im Zebrafischauge. Dies führt zu der Hypothese, dass ET die Gruppe der Antioxidantien (Vitamin E, Glutathion, Ascorbinsäure) erweitert, für die bereits eine Schutzfunktion des Auges vor ROS und Lipidperoxidation nachgewiesen werden konnte.

4.3.2 Mögliche Funktion von ET im Gehirn

Ein anderer möglicher Wirkungsort von ET könnte das Gehirn sein, wo es ebenfalls vor oxidativem Stress schützt. Die Expression des Ettzf und die Anwesenheit von ET im Gehirn des Zebrafischs stimmen mit den Befunden im Menschen überein. Neurologische Gewebe wurden bisher nicht als Hauptwirkungsorte von ET angesehen, obwohl die

Expression des ETTh auch in verschiedenen Gehirnarealen mittels Realtime-PCR nachgewiesen werden konnte (Daten von S. Golz, Bayer Health Care, Abb. 45).

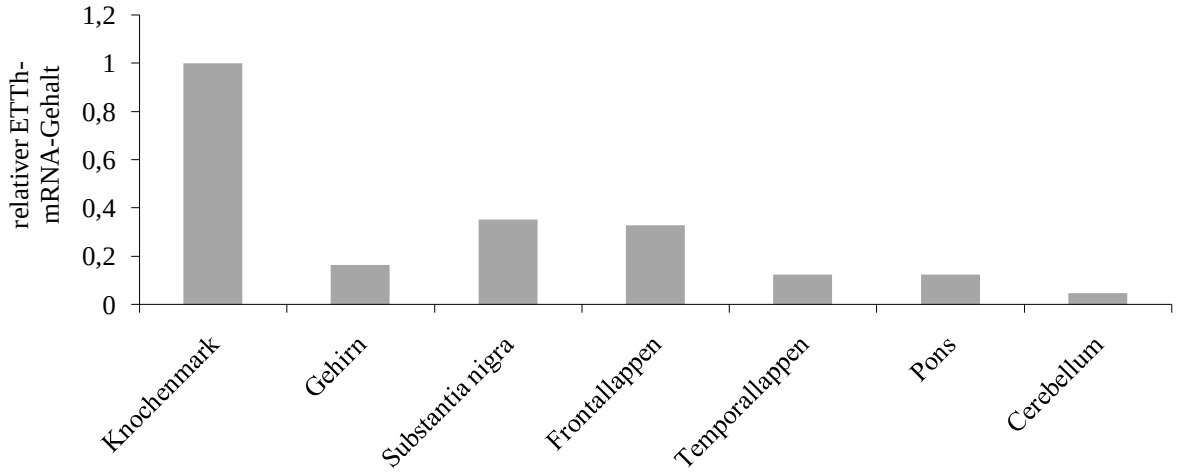


Abb. 45: Relative ETTh-Expression in neuronalen Geweben
Real-Time-PCR-Analyse nach dem TaqMan™ Verfahren. Die Daten wurden freundlicherweise von S. Golz (Bayer Health Care) zur Verfügung gestellt. Dargestellt ist der Gehalt der ETTh m-RNA relativ zum Gehalt des Knochenmarks.

Chronisch neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer werden mit einer erhöhten Anwesenheit von oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Eine häufige Hypothese zur Entstehung von Alzheimer ist die Bildung von Plaques, die durch fehlerhafte Prozessierung von Amyloid-Vorläuferproteinen (APP) zu einer Akkumulation von β-Amyloid führt (Quinn et al., 2001; Selkoe, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass β-Amyloid oxidative Schäden an Proteinen, DNA und Lipiden verursachen kann (Butterfield et al., 2001). Gerade die hohen Konzentrationen an Arachidonsäure und Docosahexaensäure im Gehirn sind mit ihren vielen Doppelbindungen anfällige Bestandteile der Membran-Phospholipide. Mehrere Studien konnten eine Abnahme dieser Lipide in Alzheimer Patienten zeigen (Nitsch et al., 1992; Prasad et al., 1998).

Die Beteiligung von oxidativem Stress an der Entstehung von Alzheimer konnte *in vivo* an der Ratte dahingehend bestätigt werden, dass durch die Injektion einer Einzeldosis Vitamin E in der Gegenwart von β-Amyloid der Verlust von neuronalen Zellen der Retina verhindert wurde (Jen et al., 1998). Aufgrund dieser Befunde wurden auch andere Antioxidantien auf die Fähigkeit hin getestet die β-Amyloid-induzierte Toxizität zu mindern. So konnten Jang und Mitarbeiter zeigen, dass ET in PC12-Zellen

(Phäochromozytom-Zelllinie) konzentrationsabhängig vor β-Amyloid-induzierter Apoptose schützen kann (Jang et al., 2004).

Aber nicht nur bei der Alzheimer-Krankheit, die überwiegend ältere Menschen betrifft, scheint oxidativer Stress beim Untergang neuronalen Gewebes verantwortlich zu sein, sondern auch bei der selteneren juvenilen Form der Demenz, Niemann-Pick Typ C (NPC). Aufgrund einer Mutation in dem Protein NPC1 kommt es zur Ansammlung von Sphingomyelin, Glycosphingolipiden und Cholesterin. Neuste Daten einer Pilotstudie, die uns freundlicherweise von J. Suh (Children's Hospital of Oakland Research Institute) zur Verfügung gestellt wurden, zeigen, dass auch bei NPC-Patienten eine starke Verminderung von Antioxidantien messbar ist. So beträgt z.B. die ET-Konzentration in den Erythrozyten nur noch 5 % der Konzentration gesunder Probanden (Abb. 5). Neben ET ist auch GSSG stark vermindert, während GSH nur leicht erniedrigt ist. Würde ein starker Verbrauch von GSH vorliegen, würde man einen Anstieg von GSSG erwarten. Dieser Zusammenhang kann aus den ersten vorliegenden Daten noch nicht geklärt werden. Dennoch scheint der Mangel von ET für die Anwesenheit von oxidativem Stress zu sprechen, wie es auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben wurde (Butterfield et al., 2001). Somit könnten die Lipidanreicherungen zur Schädigung weiterer Makromolekülen und somit zum Untergang von Neuronen führen.

Bei der histologischen Analyse der *ettzf*$^{-/-}$-Fische konnte lichtmikroskopisch keine Veränderung von neurologischem Gewebe festgestellt werden (Abb. 38 D und H). Dies liegt vielleicht an der Abwesenheit von krankheitsbedingtem oxidativem Stress, der einen Mangel von ET in Form von neuronalen Schäden sichtbar machen würde.

4.3.3 Mögliche Funktion von ET in Blutzellen

Eine besonders hohe Expression des humanen ETT findet man in einigen Blutzellen, wie den Monozyten, den reifen Makrophagen und vor allem in den Vorläuferzellen der Erythrozyten ($CD71^+$). Die Expression des ETT konnte ebenfalls in Erythrozyten-Vorläuferzellen der Maus nachgewiesen werden (Kobayashi et al., 2004). Seine Funktion in diesen Zellen ist noch unbekannt. Die Konzentration in reifen Erythrozyten wird mit 0,1 - 1,0 mmol/l angegeben (Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999).

Da der Fisch im Gegensatz zu den Mammalia kein Knochenmark besitzt, findet die Hämatopoese im adulten Fisch in der Niere statt (Ransom et al., 1996). Trotz der unterschiedlichen Orte der Blutbildung sind die genetische Regulation und die einzelnen Blutbestandteile zwischen Mensch und Fisch vergleichbar (Davidson und Zon, 2004; Shafizadeh und Paw, 2004). Sowohl der Ettzf als auch ET konnten in der Niere gefunden werden. Die Aufgabe des Transporters in der Niere ist vermutlich zum einen die Rückgewinnung von ET. Zum anderen ist es möglich, dass der Ettzf in der Niere, als Ort der Blutbildung, die Vorläuferzellen der Erythrozyten, analog zum humanen Transporter, mit ET belädt (siehe 1.3).

Eine mögliche Aufgabe in den Erythrozyten könnte der antioxidative Schutz von Hämoglobin sein. ET besitzt eine hohe Affinität zu Hämproteinen (Arduini et al., 1992; Mann und Leone, 1953). ET reagiert jedoch nicht mit nativem Hämoglobin ($HbFe^{II}$), sondern mit hypervalenten Eisenkomplexen (Ferrylhämoglobin bzw. Ferrylmyoglobin, $HbFe^{IV}$=O) (Arduini et al., 1990). Diese reaktiven Zwischenprodukte entstehen bei der autokatalytischen Reaktion von nativem Hämoglobin oder Methämoglobin ($HbFe^{III}$) mit Wasserstoffperoxid und sind ihrerseits wiederum an der Entstehung von Superoxidradikalen sowie Peroxinitrit beteiligt (Everse und Hsia, 1997; Lissi, 1998; Nagababu und Rifkind, 2000; Svistunenko et al., 1997). Wasserstoffperoxid wird unter physiologischen Bedingungen ständig in den Erythrozyten gebildet und entsteht bei der Autoxidation von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin (Everse und Hsia, 1997). Auch Nitrit, Kupfer oder Aminoverbindungen sind in der Lage die autokatalytische Oxidation zu Methämoglobin zu induzieren (Arduini et al., 1992; French et al., 1995; Smith et al., 1993). Übersteigt die Oxidation von Hämoglobin das natürliche Maß ist es möglich, dass die H_2O_2-Konzentration nicht mehr durch die Abbauwege (Katalase, Glutathionperoxidase) abgefangen werden kann und es zu einer Methämoglobinurie kommt. Bei dieser Reaktion wird als Zwischenprodukt Ferrylhämoglobin gebildet, das zur Zerstörung des Häms und zur Lipidoxidation führen kann (Everse und Hsia, 1997; Nagababu und Rifkind, 2000). ET ist in der Lage dieses reaktive Zwischenprodukt abzufangen und zu Methämoglobin zu reduzieren (Arduini et al., 1992). Eine mögliche Aufgabe von ET in den Erythrozyten könnte somit darin bestehen Hämoglobin vor Ferrylhämoglobin-induzierten Schäden zu schützen (Gründemann et al., 2005).

Der ETTh wird aber nicht nur in $CD71^+$-Vorläuferzellen der Erythrozyten, sondern auch in Monozyten ($CD14^+$) exprimiert (Tokuhiro et al., 2003). Welche Funktion ET in diesen

Zellen übernimmt ist noch unklar, jedoch ist ein Schutz von anderen Häm-Proteinen denkbar (Gründemann et al., 2005). Zur Lokalisation des Ettzf im Zebrafisch wurde die transgene Fischlinie *gata-1* etabliert und mit den *ettzf*$^{-/-}$-Fischen verpaart. Diese Fischlinie ermöglicht es in Zukunft aufgrund der dsRED-Fluoreszenz der Blutzellen diese aus Geweben oder dem zirkulierenden Blut zu isolieren und mittels Durchflusszytometrie (FACS Fluorescent-Activated Cell Sorting) in die verschiedenen Zelltypen zu trennen (Traver et al., 2003). Per PCR-Nachweis ist anschließend eine exakte Expressionsbestimmung in den verschiedenen Zelltypen und die Quantifizierung des ET-Gehalts mittels LC-MS möglich. Die Fische selbst zeigten durch den Mangel von ET keine Unterschiede in der Blutzirkulation oder den Blutzellen. Auch eine Analyse mittels Pappenheimfärbung zeigte keine Unterschiede oder Anzeichen einer chronischen Entzündung (z.B. erhöhte Leukozytenzahlen) (Abb. 40).

4.3.4 Mögliche Funktion von ET im Darm

Die Aufgabe des Ettzf besteht, analog zum Menschen, darin, ET aus dem Darm zu resorbieren und dem Organismus zuzuführen (Abb. 27). Ob die hohen ET-Konzentrationen nur durch die Aufnahme von ET zu erklären sind oder ob ET im Darmgewebe selbst protektive Funktionen hat, ist noch unklar. Gesichert ist, dass SNPs im humanen ETT mit chronischen Entzündungskrankheiten (Morbus Crohn, ulzerative Kolitis) in Verbindung gebracht werden können (Cucchiara et al., 2007; Gazouli et al., 2005; Torok et al., 2005; Waller et al., 2006). Wie die Mutation des Transporters die Entstehung begünstigt ist unbekannt. Analysen der Mutationen wurden mit dem nicht physiologischen Substrat TEA durchgeführt, das zwar als Substrat akzeptiert wird, aber durch seine deutlichen chemischen Unterschiede sowohl von dem ETTh als auch vom Ettzf nur ineffizient transportiert wird (Kawasaki et al., 2004) (Abb. 17). Eigene Messungen haben gezeigt, dass die Mutation L503F im humanen Transporter zu einer um den Faktor zwei höheren ET-Aufnahme im Vergleich zum Wildtyp-Transporter führt. Eine weitere natürlich vorkommende Mutation an Position G462E führt hingegen zum völligen Verlust der ET-Aufnahme (Bach et al., 2009 Manuskript eingereicht, siehe Anhang). Dieser SNP konnte jedoch aufgrund seiner Seltenheit nicht mit chronischen Erkrankungen in Verbindung

gebracht werden. Diese Positionen sind auch im Ettzf konserviert und scheinen für den Transport von ET eine entscheidende Bedeutung zu haben (Anhang, Abb. 48).

Die Funktion von ET im Darmgewebe könnte darin bestehen Peroxynitrit abzufangen. Bekannt ist, dass Peroxynitrit, das bei der Reduktion von Superoxid mit Stickstoffmonoxid entsteht, bei der Pathogenese chronischer Erkrankungen beteiligt sein kann (Dijkstra et al., 1998; Kruidenier et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass ET in physiologischen Konzentrationen in der Lage ist die Peroxinitrit-induzierte Nitrierung von Tyrosinresten sowie die oxidative Veränderung von Purin- und Pyrimidinbasen zu verhindern. (Aruoma et al., 1999; Aruoma et al., 1997; Bartosz, 1996).

An der Entstehung von chronischen Erkrankungen sind auch Entzündungsmediatoren maßgeblich beteiligt. Der NF-κB (nuclear-factor) stellt in der Therapie ein wichtiges Angriffsziel dar und führt bei einer Hemmung zu einer verminderten Ausschüttung von inflammatorischen Cytokinen (Hollenbach et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte ein antiinflammatorischer Effekt von ET nachgewiesen werden. Durch die Vorinkubation von A549-Zellen (human alveolar epithelial cells) mit ET konnten Rahman und Mitarbeiter zeigen, dass die Wasserstoffperoxid- und Tumornekrosefaktor-α- (TNF-α) vermittelte Aktivierung von NF-κB (nuclear-factor) und die Ausschüttung von proinflammatorischem Interleukin-8 (IL-8) vermindert werden kann (Rahman et al., 2003). Dieser Effekt war jedoch erst bei sehr hohen Konzentrationen zu beobachten (5 mM), vermutlich weil in dieser Zelllinie der ETT nicht nativ exprimiert wird.

Auch eine Schutzfunktion vor ROS-induzierter Lipidperoxidation im Darmgewebe ist denkbar. Durch das Abtrennen des Darms von der Blutversorgung in der Ratte konnte nach Reperfusion vermehrt oxidativer Stress erzeugt werden. Durch die Fütterung der Ratten vor dem Versuch mit ET konnte die Lipidperoxidation (gemessen am Marker MDA, Malondialdehyd) signifikant vermindert werden. Neben einer verminderten Lipidperoxidation konnte auch eine verminderte Ausschüttung von TNF-α sowie IL-1β (Interleukin-1) nachgewiesen werden (Sakrak et al., 2008). Dieser Effekt konnte auch in der Leber der Ratte gezeigt werden (Bedirli et al., 2004). Ob dieser Effekt in der menschlichen Leber zu finden ist, ist fraglich, da der ETTh aufgrund der Speziesunterschiede in der adulten Leber nicht exprimiert wird (Abb. 4).

4.4 Induktion von oxidativem Stress im *ettzf*$^{-/-}$-Modell

Der Befund, dass unter normalen Stoffwechselbedingungen ein ET-Mangel zu keinem sichtbaren Phänotyp führt, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist auch für andere Antioxidantien, wie z.B. die Ascorbinsäure, bekannt, dass der Phänotyp der Hypovitaminose erst Monate nach Beginn eines dauerhaften Mangels auftritt und sich in den typischen Symptomen des Skorbuts äußert.

Es ist denkbar, dass auch die Auswirkungen des ET-Mangels erst nach einiger Zeit in Erscheinung treten. Auch der mögliche Zusammenhang mit Katarakt, der beim Menschen vermehrt ab dem sechzigsten Lebensjahr auftritt, könnte sich im Fisch erst nach einiger Zeit manifestieren. Es ist bekannt, dass der antioxidative Schutz der Augenlinse durch Glutathion im Alter durch eine verminderte Syntheseaktivität der Gamma-glutamylcystein-Synthase und der Glutathion-Synthetase zunehmend abnimmt (Dovrat und Gershon, 1981; Harding, 1970; Rathbun und Bovis, 1986). Somit sind ältere Linsen vermutlich für Stress anfällig, der in jungen Augenlinsen keinen Effekt zeigt. Der Zeitraum, in dem die Fische zum Ende dieser Arbeit beobachtet werden konnten, betrug maximal 5 Monate. Die histologischen Analysen erfolgten an 3 - 4 Monate alten Fischen. Somit ist ein Auftreten einer Mangelerscheinung zu späteren Zeitpunkten durchaus möglich.

Zum anderen gibt es Erkrankungen, die völlig unauffällig sind, bis ein spezifischer äußerer Reiz einsetzt, der den Organismus belastet. Eine solche Krankheit ist z.B. der Favismus, bei dem eine Mutation zu einem Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (G6PD-Mangel) führt. Dieses Enzym synthetisiert den ersten Schritt im Hexosemonophosphat-Zyklus von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonolakton unter der Bildung von NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat). In Erythrozyten ist dieser Weg die einzige Synthesemöglichkeit für NADPH, das wiederum benötigt wird um oxidiertes Glutathion (GSSG) mit Hilfe des Enzyms Glutathion-Reduktase zu GSH zu reduzieren. Nehmen die Betroffenen Substanzen zu sich, die Wasserstoffperoxid bilden, wie z.B. Bohnen oder einige Medikamente (z.B. Acetylsalicylsäure), steht nicht genügend Glutathion zur Verfügung, um das Hämoglobin der Erythrozyten zu schützen. Die Folgen sind rezidivierende Hämolyse und chronische Anämie (WHO, 1989).

Ein solcher Fall ist auch für ET denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass der einfache ET-Mangel noch keine Auswirkungen auf den Zebrafisch hat oder diese in der beobachteten Zeit noch nicht sichtbar geworden sind. Die Induktion von oxidativem Stress könnte

jedoch einen für den ET-Mangel spezifischen Phänotyp im Blutbild, im Gehirn oder im Auge erzeugen.

Da die Induktion eines solchen Stresses auf viele Arten möglich ist, wurde in den ersten Versuchen die mögliche Schutzfunktion von ET im Auge getestet. Die Akkumulation von ET in den Augen ist hochkonserviert und wurde auch im Zebrafisch gefunden (Abb. 27) (Hartman, 1990; Shires et al., 1997). Des Weiteren lässt die exponierte Lage der Augen eine einfache Induktion des Stresses und eine schnelle Analyse zu. Da die Transparenz eine direkte Aussage über den Zustand der Augenlinse zulässt, wurde dieser Parameter genutzt, um die Auswirkungen des oxidativen Stresses zu beurteilen. Diese Methode wird häufig bei Analysen im Rattenmodell eingesetzt (Ayala und Soderberg, 2004; Hegde et al., 2007; Varma et al., 2008) und wurde an die Analyse der Zebrafischlinsen angepasst. Es ist bekannt, dass man in einigen Fischen durch Kälte Katarakt induzieren kann (Loewenstein und Bettelheim, 1979; Mizuno et al., 1984). Dies wurde auch erfolgreich für den Zebrafisch getestet und als Kontrolle für Katarakt verwendet (Abb. 36). Der häufigste und offensichtlichste Stress, dem die Augen unterliegen, wird durch UV-Strahlung hervorgerufen. Dies betrifft auch aquatisch lebende Tiere, wie den Zebrafisch, da der Lebensraum sich auf flache Gewässer beschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl UVB- (302 nm) als auch die energieärmere UVA-Strahlung (365 nm) dosisabhängig eine Trübung der Linse durch 2 cm tiefes Wasser verursachen können. Für den Vergleich zwischen Wildtyp- und *ettzf*$^{-/-}$-Fischen wurde eine Bestrahlungszeit gewählt, bei der die Wildtyp-Fische noch keine sichtbaren Veränderungen in der Linse zeigten. Für UVA- und UVB-Strahlung lag die Zeit der Bestrahlung bei 15 - 30 min. Die Linsen eines Augenpaares zeigten bei den Experimenten immer vergleichbare Schäden. Der Vergleich von Linsen aus Wildtyp- und *ettzf*$^{-/-}$-Fischen zeigte keine eindeutigen Unterschiede in der Transparenz der Linsen.

Neben der Trübung der Linse könnte für die weitere Analyse nach Parametern gesucht werden, um auch Unterschiede auf molekularer Ebene erfassen zu können. Die Augenlinsen sind z.B. reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die anfällig gegenüber Lipidperoxidation durch ROS sind. Eine Quantifizierung der Lipidperoxidation könnte somit als Indikator für den Zustand der Linse sensitiver sein.

4.5 Ausblick

Um einen möglichen Nutzen von ET bei der Therapie oder der Prophylaxe chronischer Entzündungserkrankungen abschätzen zu können, ist es notwendig die physiologische Funktion in den einzelnen Geweben zu verstehen. Mit der Etablierung eines Knockout-Fischs für den ETT ist es erstmals möglich *in vivo* nach den physiologischen Folgen eines ET-Mangels zu suchen. Aufgrund der Lokalisation des Transporters lassen sich die möglichen Wirkungsorte von ET eingrenzen. Da die Analyse keinen Phänotyp durch den ET-Mangel zeigte, ist es sinnvoll zu prüfen ob es in älteren Fischen einen Effekt gibt. So ist es möglich, dass ein Effekt z.B. im Auge erst in einer späteren Lebensphase eintritt, wie es auch beim humanen Alterskatarakt der Fall ist. Nach der erfolgreichen Etablierung eines UV-induzierbaren Kataraktmodells sind weitere Inkubationstest mit UV-Licht wichtig, bei denen auch die Netzhaut auf mögliche Schäden hin untersucht werden sollte.

Um die Aufgabe von ET in anderen Organen (Gehirn, Niere, Darm) weiter untersuchen zu können, ist die Induktion von oxidativem Stress notwendig. Hier zeigt sich der extreme Vorteil des Zebrafischs gegenüber anderen Modellorganismen. Vorstellbar ist z.B. die einfache Inkubation der Fische in Verbindungen, die in der Lage sind oxidativen Stress zu induzieren. Ein Stress, dem der Zebrafisch auch in seinem natürlichen Habitat ausgesetzt ist, ist z.B. Kupfer. Die Konzentrationen schwanken zwischen 0,2 - 30 µg/l und können in industriell stark verschmutzten Gebieten bis zu 200 mg/l erreichen (Craig et al., 2007). Kupfer ist in der Lage Hämoglobin zu oxidieren, was durch ET verhindert werden kann (Akanmu et al., 1991). Eine weitere Möglichkeit Stress zu induzieren besteht in der Inkubation mit Nitrit. Bei der autokatalytischen Oxidation entsteht Methämoglobin sowie das reaktive Intermediat Ferrylhämoglobin (Kosaka und Tyuma, 1987; Lissi, 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Kaninchen und Ratten, die ET-frei ernährt wurden, nach der Injektion von Nitrit signifikant mehr Methämoglobin gebildet wird als bei normaler Ernährung und dass man diesen Effekt durch die Applikation von ET umkehren kann (Mortensen, 1953; Spicer et al., 1951). Auch der Zebrafisch reagiert empfindlich auf Nitrit, das ständig durch bakterielle Abbauprozesse im Wasser gebildet wird. Nitrit führt auch im Zebrafisch zu einer vermehrten Methämoglobinbildung (Jensen, 2007). Methämoglobinurie kann zu Hypoxie und Hämolyse führen. Bei der Nitrit-induzierten autokatalytischen Oxidation von Hämoglobin wird auch immer Ferrylhämoglobin gebildet, das wiederum von ET abgefangen werden kann (Arduini et al., 1992).

Ein weiterer Parameter, der bei der Funktionsanalyse von ET berücksichtigt werden muss, ist die Lipidperoxidation. Werden die mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Radikale oxidiert entstehen Lipidperoxide, die bei ihrem Zerfall Malondialdehyd bilden. Dieser Marker der Lipidperoxidation kann aus Geweben isoliert und durch eine Farbreaktion photometrisch quantifiziert werden (Esterbauer et al., 1991). Weiterhin ist es möglich Lipidperoxidation z.B. durch Alloxan zu induzieren. In einem *in vitro* Experiment konnte so die Wirksamkeit von ET gezeigt werden, die Entstehung von MDA konzentrationsabhängig zu verhindern (Dong et al., 2007).

Die exakte Lokalisation des Ettzf ist für die weitere Analyse von besonderer Bedeutung. Die Generierung einer transgenen eGFP-Fischlinie ist für diese Fragestellung optimal geeignet und würde durch eine Verpaarung mit den *gata-1*^{dsRED}-Fischen sogar eine Lokalisation in verschiedenen Blutzellen zulassen. So könnten alle Blutzellen durch die dsRED-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie aus den Geweben isoliert werden und durch die eGFP-Fluoreszenz auf die Expression des Ettzf hin analysiert werden. Weiterhin wären wertvolle Einblicke in die zeitliche Regulation des Transporters möglich. Da der gewählte Promotorbereich scheinbar nicht alle notwendigen Elemente für die Expression beinhaltete, ist es notwendig den putativen Promotorbereich zu erweitern. Ausgehend von den erzeugten Konstrukten könnten PAC- (P1 artificial chromosome) oder BAC- (bacterial artificial chromosome) Bibliotheken mit genomischer Zebrafisch-DNA gescreent werden und positive Klone auf putative Promotorbereiche für den Ettzf hin getestet werden. Das verwendete Ac/Ds-System sollte eine schnelle Analyse verschiedener Klone zulassen (Emelyanov et al., 2006).

Sollte es nach der Induktion von oxidativem Stress einen Phänotyp geben, besteht die Möglichkeit mit der neu etablierten Methode ET gezielt zu applizieren und so zu testen, ob der induzierte Schaden vermindert werden kann (siehe 3.4.2). Diese Methode wird bei Mutationen des verwandten Carnitin-Transporters bereits angewendet. Der Carnitin-Mangel der primär systemischen Carnitin-Defizienz entsteht durch Mutationen im CTT (Nezu et al., 1999; Tang et al., 1999). Dieser Mangel kann durch die Applikation von Carnitin ausgeglichen werden (Wang et al., 1999).

5 Zusammenfassung

Ergothionein (ET) ist ein natürliches Antioxidans, das nur von Pilzen und einigen Mykobakterien synthetisiert werden kann. Aufgrund der permanenten Ladungen ist ET nicht in der Lage ohne die Hilfe eines Transporters eine intakte Biomembran nennenswert zu passieren. Dies ist die physiologische Aufgabe des Ergothionein-Transporters (ETT, Gensymbol *SLC22A4*). Genetische Varianten des ETT konnten mit chronischen Entzündungskrankheiten, wie Morbus Crohn oder ulzerativer Kolitis, assoziiert werden. Des Weiteren gibt es Anzeichen dafür, dass der Transporter bzw. ET bei der Entstehung von Typ I Diabetes sowie grauem Star (Katarakt) eine Rolle spielt. Die physiologische Bedeutung von ET ist noch unklar, jedoch deuten die chemischen Eigenschaften und die hohen Konzentrationen in bestimmten Geweben, die hohem oxidativem Stress ausgesetzt sind, auf einen antioxidativen Schutz hin.

Da bisherige Untersuchungen zur Funktion von ET überwiegend *in vitro* durchgeführt wurden, war es Ziel dieser Arbeit ein Zebrafisch-Knockout-Modell für den ETT zu etablieren. Mittels Sequenzanalyse konnten im Zebrafisch drei Kandidaten für einen orthologen ETT gefunden werden, die aufgrund der Sequenzidentität nicht eindeutig den humanen Transportern (ETT bzw. CTT, Gensymbol *SLC22A5*) aus der SLC22-Familie zugeordnet werden konnten. Nach der Klonierung und funktionellen Charakterisierung konnte genau ein ETT-Ortholog im Zebrafisch identifiziert werden. Die Analyse der Expression zeigte deutliche Gemeinsamkeiten zum humanen ETT und die *in vivo* Aktivität eines ETTs konnte im Zebrafisch mittels LC-MS gemessen werden.

Um den Effekt von ET auf den Organismus zu untersuchen, wurde eine Fischlinie etabliert, die den orthologen Ergothionein-Transporter aufgrund einer retroviralen Insertion im ersten Exon nicht mehr exprimiert. Diese *ettzf*$^{-/-}$-Fische (zf: zebrafish) sind nicht mehr in der Lage ET zu akkumulieren. Die Fische zeigen einen vollständigen ET-Mangel und ermöglichen erstmals Folgen dieses Mangels *in vivo* zu untersuchen. Die Phänotypisierung der Fische zeigte bisher unter normalen Laborbedingungen keine Mangelerscheinungen.

6 Abstract

Ergothioneine (ET) is a natural antioxidant which can be solely produced by fungi and certain mycobacteria. Due to its permanent charge ET is not able to penetrate a sound biomembrane in a considerable amount without help of a transport protein. Thus the Ergothioneine Transporter takes on the task of transporting ET (ETT, gene symbol: *SLC22A4*). Some Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) of the ETT can be associated with chronic inflammatory diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis. Furthermore, there is evidence of a relation between the development of diabetes type I or cataract and ETT or ET, respectively. Although the specific physiological function of ET is still unclear its chemical properties and the high concentrations of ET found in distinct tissues, which are particularly exposed to oxidative stress, suggest a pivotal role of ET in the protection against oxidative damage.

Since previous investigations of the specific function of ET had been conducted *in vitro* predominantly, the aim of this work was to establish a zebrafish knockout-model for the ETT. By analysing the zebrafish genome three candidate genes for the orthologue ETT could be made out, which could not be matched definitely to the human transport proteins of the SLC22-family (ETT vs. CTT, gene symbol: *SLC22A5*) simply based on their sequences. Subsequent to the cloning and the functional characterisation of all three candidates, it was possible to identify one as the orthologue of the human ETT. The analysis of the expression patterns of ETTh and Ettzf (zf, zebrafish) showed remarkable similarities and the *in vivo* activity of the Ettzf could be measured by means of LC-MS.

A fish line which does not express Ettzf in consequence of a retroviral insertion in the first exon was established to investigate the effect of ET on the organism. This *ettzf*$^{-/-}$-fish is not able to accumulate ET at all. The fish totally lacks ET and therewith enables to delve into the resulting sequels *in vivo* for the first time. Until now the phenotype showed no deficiency signs under standard laboratory conditions.

7 Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
ASF	Amphiphilic Solute Facilitator
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCA	Bicinchoninsäure
BES	2-(Bis-[2-hydroxyethyl]-amino)-ethansulfonsäure
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
c	Konzentration
cDNA	copied DNA
CE	Collision Energy
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonathydrat
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
CTT	Carnitin-Transporter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOPE	L-Dioleoylphosphatidylethanolamine
dpf	days post fertilization (Tage nach der Befruchtung)
DTT	Dithithreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Extraneuronaler Monoamin-Transporter

eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Extraneuronaler Monoamin-Transporter
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ET	Ergothionein
ETT	Ergothionein-Transporter
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
GSH	Glutathion
h	human
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-[4-(Hydroxyethylen)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HOX	Homöobox
hpf	hours post fertilization (Stunden nach der Befruchtung)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kb	Kilobasen
k_{cat}	Wechselzahl
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
KRH	Krebs-Ringer-Henseleit-Puffer
M	Mol
MDA	Malondialdehyd
MFS	Major Facilitator Superfamily
MPP^+	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
OCT	Organischer Kationen-Transporter
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
PAC	P1 Artificial Chromosome
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS + 0,1 % Tween
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PNK	Polynukleotidkinase
PUFA	Poly unsaturated fatty acids
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SCD	Systemische Carnitin-Defizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SLC	Solute Carrier
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB + 20 mM Glukose
SV40	Simianes 40 Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Transporteffizienz
TEA	Tetraethylammonium
TetR	Tetracyclin Repressor
T-Mix	Terminator-Mix
T_{total}	Anzahl aktiver Transporter
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v	Aufnahmegeschwindigkeit
V_{max}	Maximale Aufnahmegeschwindigkeit
v/S	Clearance
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8 Literaturverzeichnis

(1989). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. *Bull World Health Organ* **67**, 601-11.

Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I., and Halliwell, B. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* **288**, 10-6.

Amores, A., Force, A., Yan, Y. L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y. L., Westerfield, M., Ekker, M., and Postlethwait, J. H. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* **282**, 1711-4.

Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M., and Hopkins, N. (1999). A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2713-24.

Amsterdam, A., Nissen, R. M., Sun, Z., Swindell, E. C., Farrington, S., and Hopkins, N. (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12792-7.

Arduini, A., Eddy, L., and Hochstein, P. (1990). The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function for ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* **281**, 41-3.

Arduini, A., Mancinelli, G., Radatti, G. L., Hochstein, P., and Cadenas, E. (1992). Possible mechanism of inhibition of nitrite-induced oxidation of oxyhemoglobin by ergothioneine and uric acid. *Arch Biochem Biophys* **294**, 398-402.

Aruoma, O. I., Spencer, J. P., and Mahmood, N. (1999). Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food Chem Toxicol* **37**, 1043-53.

Aruoma, O. I., Whiteman, M., England, T. G., and Halliwell, B. (1997). Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 389-91.

Aslamkhan, A. G., Thompson, D. M., Perry, J. L., Bleasby, K., Wolff, N. A., Barros, S., Miller, D. S., and Pritchard, J. B. (2006). The flounder organic anion transporter fOat has sequence, function, and substrate specificity similarity to both mammalian Oat1 and Oat3. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R1773-80.

Ayala, M. N., and Soderberg, P. G. (2004). Vitamin E can protect against ultraviolet radiation-induced cataract in albino rats. *Ophthalmic Res* **36**, 264-9.

Bach, M., Grigat, S., Pawlik, B., Fork, C., Utermohlen, O., Pal, S., Banczyk, D., Lazar, A., Schömig, E., and Gründemann, D. (2007). Fast set-up of doxycycline-inducible protein expression in human cell lines with a single plasmid based on Epstein-Barr virus replication and the simple tetracycline repressor. *Febs J* **274**, 783-90.

Baldridge, R. C., and Lewis, H. B. (1953). Diet and the ergothioneine content of blood. *J Biol Chem* **202**, 169-76.

Bao, H. N., Ushio, H., and Ohshima, T. (2008). Antioxidative activity and antidiscoloration efficacy of ergothioneine in mushroom (Flammulina velutipes) extract added to beef and fish meats. *J Agric Food Chem* **56**, 10032-40.

Barger, G., and Ewins, A. J. (1913). The Identity of Trimethylhistidine (Histidine-Betaine) from Various Sources. *Biochem J* **7**, 204-6.

Bartosz, G. (1996). Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim Pol* **43**, 645-59.

Bedirli, A., Sakrak, O., Muhtaroglu, S., Soyuer, I., Guler, I., Riza Erdogan, A., and Sozuer, E. M. (2004). Ergothioneine pretreatment protects the liver from ischemia-reperfusion injury caused by increasing hepatic heat shock protein 70. *J Surg Res* **122**, 96-102.

Bondy, S. C. (1992). Ethanol toxicity and oxidative stress. *Toxicol Lett* **63**, 231-41.

Botta, C., Di Giorgio, C., Sabatier, A. S., and De Meo, M. (2008). Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J Photochem Photobiol B* **91**, 24-34.

Bremer, J. (1983). Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev* **63**, 1420-80.

Brilliant, L. B., Grasset, N. C., Pokhrel, R. P., Kolstad, A., Lepkowski, J. M., Brilliant, G. E., Hawks, W. N., and Pararajasegaram, R. (1983). Associations among cataract prevalence, sunlight hours, and altitude in the Himalayas. *Am J Epidemiol* **118**, 250-64.

Brummel, M. C. (1985). In search of a physiological function for L-ergothioneine. *Med Hypotheses* **18**, 351-70.

Brummel, M. C. (1989). In search of a physiological function for L-ergothioneine--II. *Med Hypotheses* **30**, 39-48.

Burton, M., Fergusson, E., Hart, A., Knight, K., Lary, D., and Liu, C. (1997). The prevalence of cataract in two villages of northern Pakistan with different levels of ultraviolet radiation. *Eye* **11 (Pt 1)**, 95-101.

Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C., and Castegna, A. (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* **7**, 548-54.

Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* **37**, 949-62.

Chen, J. N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., and Nusslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development* **123**, 293-302.

Craig, P. M., Wood, C. M., and McClelland, G. B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (Danio rerio). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R1882-92.

Cucchiara, S., Latiano, A., Palmieri, O., Staiano, A. M., D'Inca, R., Guariso, G., Vieni, G., Rutigliano, V., Borrelli, O., Valvano, M. R., and Annese, V. (2007). Role of

CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* **13**, 1221-9.

Cullen, J. J., Mitros, F. A., and Oberley, L. W. (2003). Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* **26**, 23-7.

Davidson, A. J., and Zon, L. I. (2004). The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* **23**, 7233-46.

Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Assunta Dessi, M., and Aruoma, O. I. (2004). L-ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clin Nutr* **23**, 183-93.

Devamanoharan, P. S., Henein, M., Morris, S., Ramachandran, S., Richards, R. D., and Varma, S. D. (1991). Prevention of selenite cataract by vitamin C. *Exp Eye Res* **52**, 563-8.

Dijkstra, G., Moshage, H., van Dullemen, H. M., de Jager-Krikken, A., Tiebosch, A. T., Kleibeuker, J. H., Jansen, P. L., and van Goor, H. (1998). Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol* **186**, 416-21.

Dong, K. K., Damaghi, N., Kibitel, J., Canning, M. T., Smiles, K. A., and Yarosh, D. B. (2007). A comparison of the relative antioxidant potency of L-ergothioneine and idebenone. *J Cosmet Dermatol* **6**, 183-8.

Dovrat, A., and Gershon, D. (1981). Rat lens superoxide dismutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase: studies on the catalytic activity and the fate of enzyme antigen as a function of age. *Exp Eye Res* **33**, 651-61.

Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., and Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37-46.

Emelyanov, A., Gao, Y., Naqvi, N. I., and Parinov, S. (2006). Trans-kingdom transposition of the maize dissociation element. *Genetics* **174**, 1095-104.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.

Everse, J., and Hsia, N. (1997). The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med* **22**, 1075-99.

Fishman, M. C., and Stainier, D. Y. (1994). Cardiovascular development. Prospects for a genetic approach. *Circ Res* **74**, 757-63.

Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A., Balbarini, A., Migliore, L., and Santoro, G. (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomed Pharmacother* **60**, 453-7.

French, C. L., Yaun, S. S., Baldwin, L. A., Leonard, D. A., Zhao, X. Q., and Calabrese, E. J. (1995). Potency ranking of methemoglobin-forming agents. *J Appl Toxicol* **15**, 167-74.

Fritz, I. B., and Yue, K. T. (1964). Effects of Carnitine on Acetyl-Coa Oxidation by Heart Muscle Mitochondria. *Am J Physiol* **206**, 531-5.

Gaillard, C., and Strauss, F. (1990). Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res* **18**, 378.

Garrett, Q., Xu, S., Simmons, P. A., Vehige, J., Flanagan, J. L., and Willcox, M. D. (2008). Expression and localization of carnitine/organic cation transporter OCTN1 and OCTN2 in ocular epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, 4844-9.

Gazouli, M., Mantzaris, G., Archimandritis, A. J., Nasioulas, G., and Anagnou, N. P. (2005). Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **11**, 7525-30.

Genghof, D. S., and Van Damme, O. (1968). Biosynthesis of ergothioneine from endogenous hercynine in Mycobacterium smegmatis. *J Bacteriol* **95**, 340-4.

Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **19**, 257-67.

Glass, A. S., and Dahm, R. (2004). The zebrafish as a model organism for eye development. *Ophthalmic Res* **36**, 4-24.

Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S. Y., Nissen, R. M., and Hopkins, N. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* **31**, 135-40.

Gong, Z., Ju, B., Wang, X., He, J., Wan, H., Sudha, P. M., and Yan, T. (2002). Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from keratin8. *Dev Dyn* **223**, 204-15.

Grigat, S., Fork, C., Bach, M., Golz, S., Geerts, A., Schomig, E., and Grundemann, D. (2009). The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *Drug Metab Dispos* **37**, 330-7.

Grigat, S., Harlfinger, S., Pal, S., Striebinger, R., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Schömig, E., and Gründemann, D. (2007). Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations. *Biochem Pharmacol* **74**, 309-16.

Gründemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M., and Koepsell, H. (1994). Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**, 549-52.

Gründemann, D., Hahne, C., Berkels, R., and Schömig, E. (2003). Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2). *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 810-7.

Gründemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A., and Schömig, E. (2005). Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5256-61.

Gründemann, D., Koster, S., Kiefer, N., Breidert, T., Engelhardt, M., Spitzenberger, F., Obermuller, N., and Schömig, E. (1998). Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem* **273**, 30915-20.

Gründemann, D., Liebich, G., Kiefer, N., Koster, S., and Schömig, E. (1999). Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* **56**, 1-10.

Gründemann, D., and Schömig, E. (1996). Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques* **21**, 898-903.

Guijarro, M. V., Indart, A., Aruoma, O. I., Viana, M., and Bonet, B. (2002). Effects of ergothioneine on diabetic embryopathy in pregnant rats. *Food Chem Toxicol* **40**, 1751-5.

Harding, J. J. (1970). Free and protein-bound glutathione in normal and cataractous human lenses. *Biochem J* **117**, 957-60.

Hartman, P. E. (1990). Ergothioneine as antioxidant. *Methods Enzymol* **186**, 310-8.

Hegde, K. R., Kovtun, S., and Varma, S. D. (2007). Induction of ultraviolet cataracts in vitro: prevention by pyruvate. *J Ocul Pharmacol Ther* **23**, 492-502.

Hollenbach, E., Neumann, M., Vieth, M., Roessner, A., Malfertheiner, P., and Naumann, M. (2004). Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J* **18**, 1550-2.

Horvath, G., Schmid, N., Fragoso, M. A., Schmid, A., Conner, G. E., Salathe, M., and Wanner, A. (2007). Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**, 53-60.

Jacob, C. (2006). A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Nat Prod Rep* **23**, 851-63.

Jang, J. H., Aruoma, O. I., Jen, L. S., Chung, H. Y., and Surh, Y. J. (2004). Ergothioneine rescues PC12 cells from beta-amyloid-induced apoptotic death. *Free Radic Biol Med* **36**, 288-99.

Jen, L. S., Hart, A. J., Jen, A., Relvas, J. B., Gentleman, S. M., Garey, L. J., and Patel, A. J. (1998). Alzheimer's peptide kills cells of retina in vivo. *Nature* **392**, 140-1.

Jensen, F. B. (2007). Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *J Exp Biol* **210**, 3387-94.

Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., and Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* **19**, 104-13.

Kari, G., Rodeck, U., and Dicker, A. P. (2007). Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* **82**, 70-80.

Karlsson, J., von Hofsten, J., and Olsson, P. E. (2001). Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar Biotechnol (NY)* **3**, 522-7.

Karpati, G., Carpenter, S., Engel, A. G., Watters, G., Allen, J., Rothman, S., Klassen, G., and Mamer, O. A. (1975). The syndrome of systemic carnitine deficiency. Clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features. *Neurology* **25**, 16-24.

Kawano, H., Otani, M., Takeyama, K., Kawai, Y., Mayumi, T., and Hama, T. (1982). Studies on ergothioneine. VI. Distribution and fluctuations of ergothioneine in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **30**, 1760-5.

Kawasaki, Y., Kato, Y., Sai, Y., and Tsuji, A. (2004). Functional characterization of human organic cation transporter OCTN1 single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. *J Pharm Sci* **93**, 2920-6.

Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., and Koul, H. K. (2009). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett*.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.

Kimmel, C. B., Warga, R. M., and Schilling, T. F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* **108**, 581-94.

Kisic, B., Miric, D., Zoric, L., Dragojevic, I., and Stolic, A. (2009). [Role of lipid peroxidation in pathogenesis of senile cataract]. *Vojnosanit Pregl* **66**, 371-5.

Kobayashi, D., Aizawa, S., Maeda, T., Tsuboi, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Tsuji, A., and Tamai, I. (2004). Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Exp Hematol* **32**, 1156-62.

Koepsell, H., Schmitt, B. M., and Gorboulev, V. (2003). Organic cation transporters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **150**, 36-90.

Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., and Timpl, R. (1997). Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* **414**, 557-61.

Kosaka, H., and Tyuma, I. (1987). Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Environ Health Perspect* **73**, 147-51.

Kosiniak, K. (1975). Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *J Reprod Fertil Suppl*, 59-61.

Kozak, M. (2004). How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs? *Gene* **343**, 41-54.

Kruidenier, L., Kuiper, I., Lamers, C. B., and Verspaget, H. W. (2003). Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* **201**, 28-36.

Lachmann, R. H., te Vruchte, D., Lloyd-Evans, E., Reinkensmeier, G., Sillence, D. J., Fernandez-Guillen, L., Dwek, R. A., Butters, T. D., Cox, T. M., and Platt, F. M. (2004). Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. *Neurobiol Dis* **16**, 654-8.

Lawson, A., Morley, H. V., and Woolf, L. I. (1950). The determination of ergothioneine; the non-occurrence of ergothioneine in urine. *Biochem J* **47**, 513-8.

Leone, E. (1954). Ergothioneine in the equine ampullar secretion. *Nature* **174**, 404-5.

Lever, M., Sizeland, P. C., Bason, L. M., Hayman, C. M., and Chambers, S. T. (1994). Glycine betaine and proline betaine in human blood and urine. *Biochim Biophys Acta* **1200**, 259-64.

Lissi, E. (1998). Autocatalytic oxidation of hemoglobin by nitrite: a possible mechanism. *Free Radic Biol Med* **24**, 1535-6.

Liu, B., Turley, S. D., Burns, D. K., Miller, A. M., Repa, J. J., and Dietschy, J. M. (2009). Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1-/- mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2377-82.

Liu, B., Xie, C., Richardson, J. A., Turley, S. D., and Dietschy, J. M. (2007). Receptor-mediated and bulk-phase endocytosis cause macrophage and cholesterol accumulation in Niemann-Pick C disease. *J Lipid Res* **48**, 1710-23.

Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., Schuchman, E. H., Galione, A., and Platt, F. M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* **14**, 1247-55.

Loewenstein, M. A., and Bettelheim, F. A. (1979). Cold cataract formation in fish lenses. *Exp Eye Res* **28**, 651-63.

Ma, Y., Ohmen, J. D., Li, Z., Bentley, L. G., McElree, C., Pressman, S., Targan, S. R., Fischel-Ghodsian, N., Rotter, J. I., and Yang, H. (1999). A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 271-8.

Mann, T., and Leone, E. (1953). Studies on the metabolism of semen. VIII. Ergothioneine as a normal constituent of boar seminal plasma; purification and crystallization; site of formation and function. *Biochem J* **53**, 140-8.

Mark, R. J., Blanc, E. M., and Mattson, M. P. (1996). Amyloid beta-peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **12**, 211-24.

Markova, N. G., Karaman-Jurukovska, N., Dong, K. K., Damaghi, N., Smiles, K. A., and Yarosh, D. B. (2009). Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med* **46**, 1168-76.

Martel, F., Vetter, T., Russ, H., Grundemann, D., Azevedo, I., Koepsell, H., and Schomig, E. (1996). Transport of small organic cations in the rat liver. The role of the organic cation transporter OCT1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**, 320-6.

Mates, J. M., Perez-Gomez, C., and Nunez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **32**, 595-603.

Mathew, J. P., Thomas, V. C., and Thomas, I. (2003). Selenite cataract and its attenuation by vitamin E in Wistar rats. *Indian J Ophthalmol* **51**, 161-70.

Mayumi, T., Kawano, H., Sakamoto, Y., Suehisa, E., Kawai, Y., and Hama, T. (1978). Studies on ergothioneine. V. Determination by high performance liquid chromatography and application to metabolic research. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **26**, 3772-8.

Melville, D. B. (1958). Ergothioneine. *Vitam. Horm.* **17**, 155-204.

Melville, D. B., Eich, S., and Ludwig, M. L. (1957). The biosynthesis of ergothioneine. *J Biol Chem* **224**, 871-7.

Mizuno, A., Ozaki, Y., Itoh, K., Matsushima, S., and Iriyama, K. (1984). Raman spectroscopic evidence for the microenvironmental change of some tyrosine residues of lens proteins in cold cataract. *Biochem Biophys Res Commun* **119**, 989-94.

Moncaster, J. A., Walsh, D. T., Gentleman, S. M., Jen, L. S., and Aruoma, O. I. (2002). Ergothioneine treatment protects neurons against N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in an in vivo rat retinal model. *Neurosci Lett* **328**, 55-9.

Mortensen, R. A. (1953). The effect of diet on methemoglobin levels of nitrite-injected rats. *Arch Biochem Biophys* **46**, 241-3.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.

Nagababu, E., and Rifkind, J. M. (2000). Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry* **39**, 12503-11.

Newman, B., Wintle, R. F., van Oene, M., Yazdanpanah, M., Owen, J., Johnson, B., Gu, X., Amos, C. I., Keystone, E., Rubin, L. A., and Siminovitch, K. A. (2005). SLC22A4 polymorphisms implicated in rheumatoid arthritis and Crohn's disease are not associated with rheumatoid arthritis in a Canadian Caucasian population. *Arthritis Rheum* **52**, 425-9.

Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Ohashi, R., Yabuuchi, H., Hashimoto, N., Nikaido, H., Sai, Y., Koizumi, A., Shoji, Y., Takada, G., Matsuishi, T., Yoshino, M., Kato, H., Ohura, T., Tsujimoto, G., Hayakawa, J., Shimane, M., and Tsuji, A. (1999). Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* **21**, 91-4.

Nishigori, H., Hayashi, R., Lee, J. W., and Iwatsuru, M. (1984). Effect of MPG on glucocorticoid-induced cataract formation in developing chick embryo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**, 1051-5.

Nitsch, R. M., Blusztajn, J. K., Pittas, A. G., Slack, B. E., Growdon, J. H., and Wurtman, R. J. (1992). Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1671-5.

Obayashi, K., Kurihara, K., Okano, Y., Masaki, H., and Yarosh, D. B. (2005). L-Ergothioneine scavenges superoxide and singlet oxygen and suppresses TNF-alpha and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *J Cosmet Sci* **56**, 17-27.

Ohashi, R., Tamai, I., Nezu Ji, J., Nikaido, H., Hashimoto, N., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., and Tsuji, A. (2001). Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. *Mol Pharmacol* **59**, 358-66.

Okumura, N., Tsuji, K., and Nakahata, T. (1992). Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood* **80**, 642-50.

Parks, J. E., and Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* **29**, 255-66.

Patterson, M. C., Vecchio, D., Prady, H., Abel, L., and Wraith, J. E. (2007). Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol* **6**, 765-72.

Peltekova, V. D., Wintle, R. F., Rubin, L. A., Amos, C. I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., Griffiths, A. M., St George-Hyslop, P. H., and Siminovitch, K. A. (2004). Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* **36**, 471-5.

Posner, M., Hawke, M., Lacava, C., Prince, C. J., Bellanco, N. R., and Corbin, R. W. (2008). A proteome map of the zebrafish (Danio rerio) lens reveals similarities between zebrafish and mammalian crystallin expression. *Mol Vis* **14**, 806-14.

Prasad, M. R., Lovell, M. A., Yatin, M., Dhillon, H., and Markesbery, W. R. (1998). Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* **23**, 81-8.

Quinn, J., Davis, F., Woodward, W. R., and Eckenstein, F. (2001). Beta-amyloid plaques induce neuritic dystrophy of nitric oxide-producing neurons in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **168**, 203-12.

Rahman, I., Gilmour, P. S., Jimenez, L. A., Biswas, S. K., Antonicelli, F., and Aruoma, O. I. (2003). Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 860-4.

Ransom, D. G., Haffter, P., Odenthal, J., Brownlie, A., Vogelsang, E., Kelsh, R. N., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Kane, D. A., Mullins, M. C., and Nusslein-Volhard, C. (1996). Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* **123**, 311-9.

Rathbun, W. B., and Bovis, M. G. (1986). Activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase in the human lens related to age. *Curr Eye Res* **5**, 381-5.

Rioux, J. D., Daly, M. J., Silverberg, M. S., Lindblad, K., Steinhart, H., Cohen, Z., Delmonte, T., Kocher, K., Miller, K., Guschwan, S., Kulbokas, E. J., O'Leary, S., Winchester, E., Dewar, K., Green, T., Stone, V., Chow, C., Cohen, A., Langelier, D., Lapointe, G., Gaudet, D., Faith, J., Branco, N., Bull, S. B., McLeod, R. S., Griffiths, A. M., Bitton, A., Greenberg, G. R., Lander, E. S., Siminovitch, K. A., and Hudson, T. J. (2001). Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* **29**, 223-8.

Rougee, M., Bensasson, R. V., Land, E. J., and Pariente, R. (1988). Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochem Photobiol* **47**, 485-9.

Sakrak, O., Kerem, M., Bedirli, A., Pasaoglu, H., Akyurek, N., Ofluoglu, E., and Gultekin, F. A. (2008). Ergothioneine modulates proinflammatory cytokines and heat shock protein 70 in mesenteric ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* **144**, 36-42.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

Santiago, J. L., Martinez, A., de la Calle, H., Fernandez-Arquero, M., Figueredo, M. A., de la Concha, E. G., and Urcelay, E. (2006). Evidence for the association of the

SLC22A4 and SLC22A5 genes with type 1 diabetes: a case control study. *BMC Med Genet* **7**, 54.

Schömig, E., Lazar, A., and Gründemann, D. (2006). Extraneuronal monoamine transporter and organic cation transporters 1 and 2: a review of transport efficiency. *Handb Exp Pharmacol*, 151-80.

Schömig, E., Russ, H., Staudt, K., Martel, F., Gliese, M., and Gründemann, D. (1998a). The extraneuronal monoamine transporter exists in human central nervous system glia. *Adv Pharmacol* **42**, 356-9.

Schömig, E., Spitzenberger, F., Engelhardt, M., Martel, F., Ording, N., and Gründemann, D. (1998b). Molecular cloning and characterization of two novel transport proteins from rat kidney. *FEBS Lett* **425**, 79-86.

Schulte-Merker, S., Ho, R. K., Herrmann, B. G., and Nusslein-Volhard, C. (1992). The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* **116**, 1021-32.

Selkoe, D. J. (1996). Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **271**, 18295-8.

Shafizadeh, E., and Paw, B. H. (2004). Zebrafish as a model of human hematologic disorders. *Curr Opin Hematol* **11**, 255-61.

Shires, T. K., Brummel, M. C., Pulido, J. S., and Stegink, L. D. (1997). Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **117**, 117-20.

Shukla, Y., Kulshrestha, O. P., and Khuteta, K. P. (1981). Ergothioneine content in normal and senile human cataractous lenses. *Indian J Med Res* **73**, 472-3.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.

Smith, R. C., Reed, V. D., and Webb, T. R. (1993). Reversal of copper(II)-induced methemoglobin formation by thiols. *J Inorg Biochem* **52**, 173-82.

Song, H. D., Sun, X. J., Deng, M., Zhang, G. W., Zhou, Y., Wu, X. Y., Sheng, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Jiang, C. L., Fan, H. Y., Zon, L. I., Kanki, J. P., Liu, T. X., Look, A. T., and Chen, Z. (2004). Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16240-5.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.

Spector, A. (1995). Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J* **9**, 1173-82.

Spector, A. (2000). Review: Oxidative stress and disease. *J Ocul Pharmacol Ther* **16**, 193-201.

Spicer, S. S., Wooley, J. G., and Kessler, V. (1951). Ergothioneine depletion in rabbit erythrocytes and its effect on methemoglobin formation and reversion. *Proc Soc Exp Biol Med* **77**, 418-20.

Stanley, C. A., Treem, W. R., Hale, D. E., and Coates, P. M. (1990). A genetic defect in carnitine transport causing primary carnitine deficiency. *Prog Clin Biol Res* **321**, 457-64.

Stone, W. L., Farnsworth, C. C., and Dratz, E. A. (1979). A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments. *Exp Eye Res* **28**, 387-97.

Svistunenko, D. A., Patel, R. P., Voloshchenko, S. V., and Wilson, M. T. (1997). The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. *J Biol Chem* **272**, 7114-21.

Sweeney, M. H., and Truscott, R. J. (1998). An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract. *Exp Eye Res* **67**, 587-95.

Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. (1998). Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* **273**, 20378-82.

Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J. I., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (2000). Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem* **275**, 40064-72.

Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (1997). Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett* **419**, 107-11.

Tang, N. L., Ganapathy, V., Wu, X., Hui, J., Seth, P., Yuen, P. M., Wanders, R. J., Fok, T. F., and Hjelm, N. M. (1999). Mutations of OCTN2, an organic cation/carnitine transporter, lead to deficient cellular carnitine uptake in primary carnitine deficiency. *Hum Mol Genet* **8**, 655-60.

Taylor, H. R., West, S. K., Rosenthal, F. S., Munoz, B., Newland, H. S., Abbey, H., and Emmett, E. A. (1988). Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. *N Engl J Med* **319**, 1429-33.

te Vruchte, D., Lloyd-Evans, E., Veldman, R. J., Neville, D. C., Dwek, R. A., Platt, F. M., van Blitterswijk, W. J., and Sillence, D. J. (2004). Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* **279**, 26167-75.

Thisse, C., and Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* **3**, 59-69.

Tischner, M., Kosiniak, K., and Bielanski, W. (1974). Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. *J Reprod Fertil* **41**, 329-35.

Tokuhiro, S., Yamada, R., Chang, X., Suzuki, A., Kochi, Y., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Ohtsuki, M., Ono, M., Furukawa, H., Nagashima, M., Yoshino, S., Mabuchi, A., Sekine, A., Saito, S., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., and Yamamoto, K. (2003). An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* **35**, 341-8.

Torok, H. P., Glas, J., Tonenchi, L., Lohse, P., Muller-Myhsok, B., Limbersky, O., Neugebauer, C., Schnitzler, F., Seiderer, J., Tillack, C., Brand, S., Brunnler, G., Jagiello, P., Epplen, J. T., Griga, T., Klein, W., Schiemann, U., Folwaczny, M.,

Ochsenkuhn, T., and Folwaczny, C. (2005). Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* **54**, 1421-7.

Traver, D., Paw, B. H., Poss, K. D., Penberthy, W. T., Lin, S., and Zon, L. I. (2003). Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat Immunol* **4**, 1238-46.

Treem, W. R., Stanley, C. A., Finegold, D. N., Hale, D. E., and Coates, P. M. (1988). Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle, and fibroblasts. *N Engl J Med* **319**, 1331-6.

Tuchinda, C., Srivannaboon, S., and Lim, H. W. (2006). Photoprotection by window glass, automobile glass, and sunglasses. *J Am Acad Dermatol* **54**, 845-54.

van den Broeke, L. T., and Beyersbergen van Henegouwen, G. M. (1993). Thiols as potential UV radiation protectors: an in vitro study. *J Photochem Photobiol B* **17**, 279-86.

Vanier, M. T., and Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet* **64**, 269-81.

Varma, S. D., Hegde, K. R., and Kovtun, S. (2008). UV-B-induced damage to the lens in vitro: prevention by caffeine. *J Ocul Pharmacol Ther* **24**, 439-44.

Walker, M. B., and Kimmel, C. B. (2007). A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotech Histochem* **82**, 23-8.

Waller, S., Tremelling, M., Bredin, F., Godfrey, L., Howson, J., and Parkes, M. (2006). Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut* **55**, 809-14.

Wang, Y., Ye, J., Ganapathy, V., and Longo, N. (1999). Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2356-60.

Wegener, A., Heinitz, M., and Dwinger, M. (2002). Experimental evidence for interactive effects of chronic UV irradiation and nutritional deficiencies in the lens. *Dev Ophthalmol* **35**, 113-24.

White, I. G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* **5**, 639-58.

Wienholds, E., van Eeden, F., Kosters, M., Mudde, J., Plasterk, R. H., and Cuppen, E. (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res* **13**, 2700-7.

Wu, X., George, R. L., Huang, W., Wang, H., Conway, S. J., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. (2000). Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim Biophys Acta* **1466**, 315-27.

Wu, X., Huang, W., Prasad, P. D., Seth, P., Rajan, D. P., Leibach, F. H., Chen, J., Conway, S. J., and Ganapathy, V. (1999). Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 1482-92.

Wu, X., Prasad, P. D., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. (1998). cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 589-95.

Xuan, W., Lamhonwah, A. M., Librach, C., Jarvi, K., and Tein, I. (2003). Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 121-8.

Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. (1999). Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 768-73.

Yates, J. L., Camiolo, S. M., and Bashaw, J. M. (2000). The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol* **74**, 4512-22.

Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**, 812-5.

Manuskripte in Vorbereitung oder eingereicht

Bach M, Grigat S, Wiltzer L, Lazar A, Schömig E, and Gründemann D, Functional characterization of natural mutants of the human ergothioneine transporter by use of transporter tandems

Bacher P, Giersiefer S, Bach M, Schömig E and Gründemann D, Substrate discrimination by ergothioneine transporter SLC22A4 and carnitine transporter SLC22A5: gain-of-function by interchange of selected amino acids.

Nikodemus D, Lazic D, Bach M, Wiltzer L, Lain E., Schömig E and Gründemann D, Specific expression of the ergothioneine transporter SLC22A4 in the reproductive tract of the boar accounts for accumulation of ergothioneine in seminal vesicles.

Wiltzer L, Bach M, Linde K, Dreiocker F, Schmalz H-G, Schömig E and Gründemann D Discovery of the OCT's orthologue in the zebrafish and finding cyclo-(Arg-Pro) as a novel substrate for OCT2h.

9 Anhang

Abb. 46: Sequenz des DR2-Transporters mit Virusinsertion

Sequenz des ersten Exons des DR2-Transporters (blau) und des Klonierungsprimers (schwarzer Pfeil). Die Virusinsertion befindet sich 346 bp vom Starcodon entfernt und beinhaltet nach 172 bp ein Stopcodon (fett). Im Einbuchstabencode ist unter der Sequenz die Aminosäuresequenz bis zum Abbruch in der Virusinsertion abgebildet.

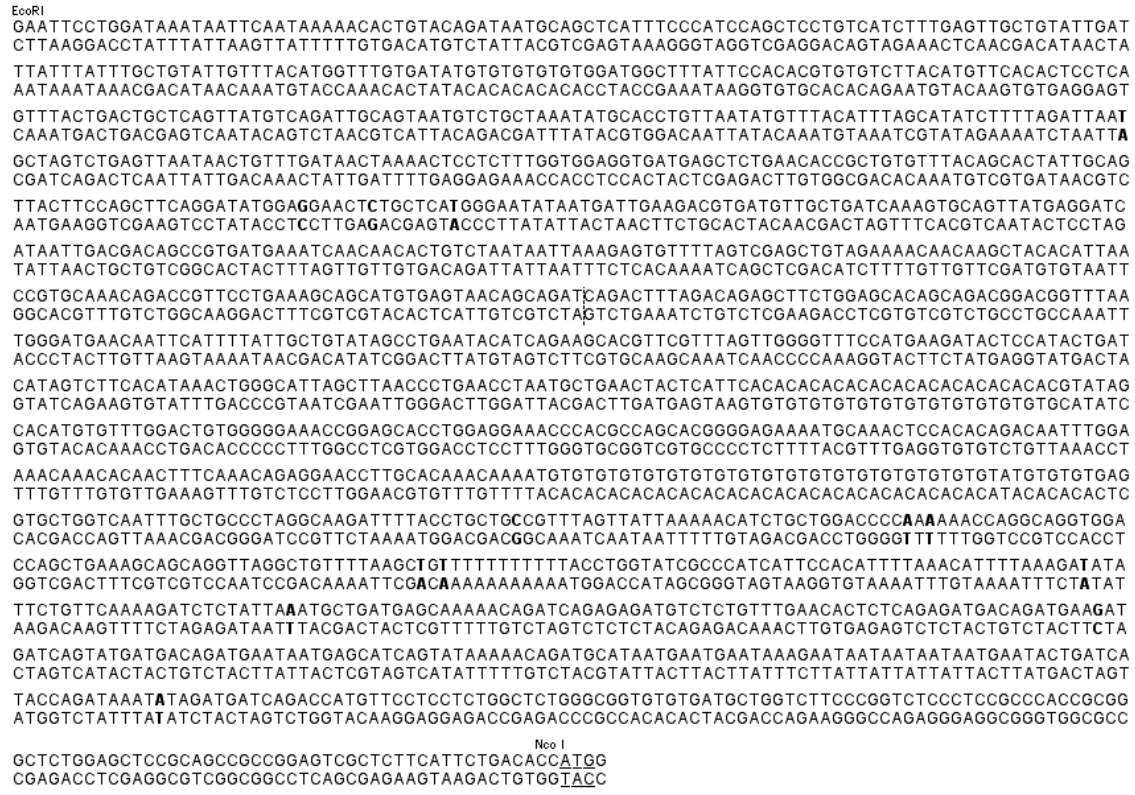
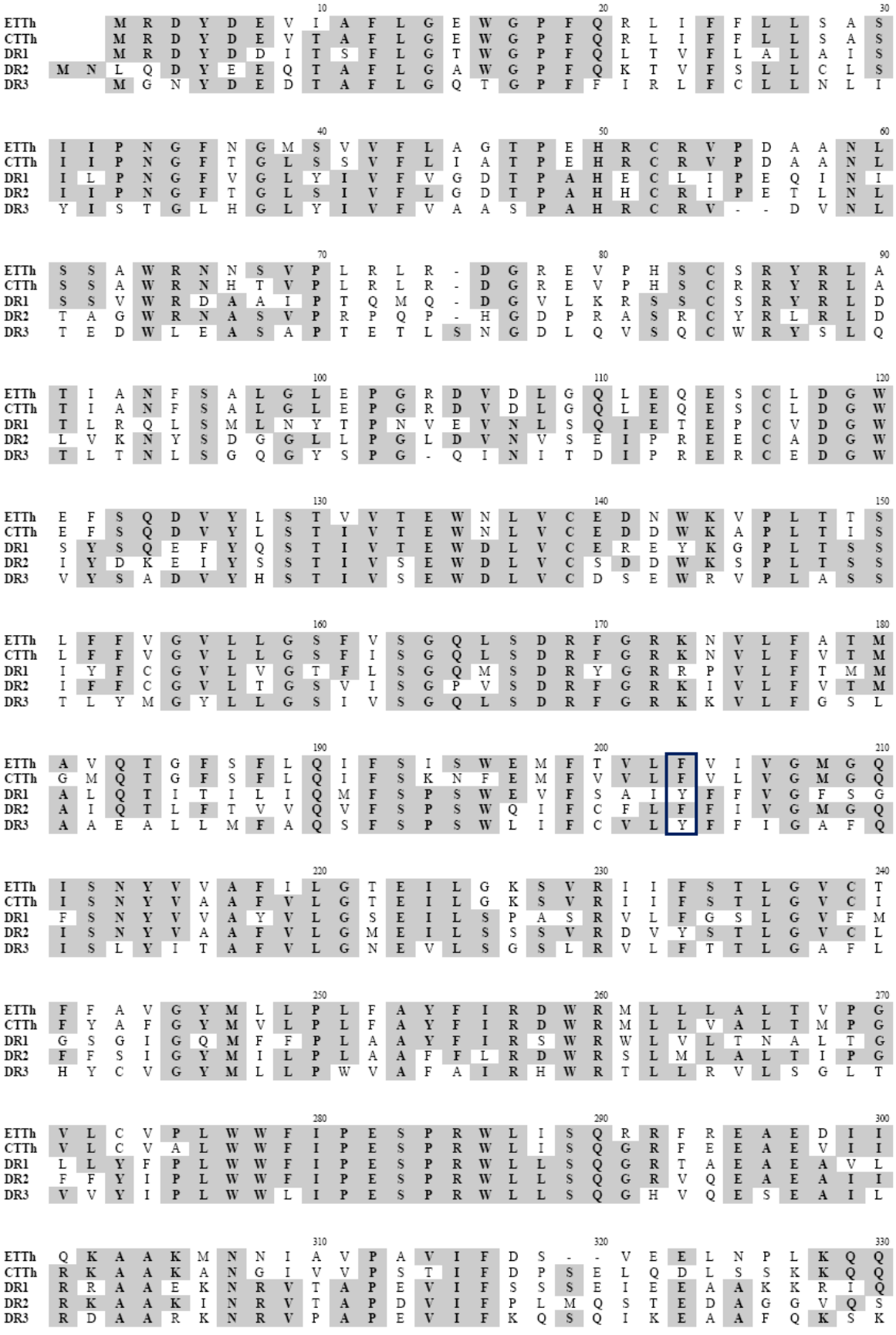


Abb. 47: Putativer Promotorbereich des DR2-Transporters

Sequenz des DR2-Promotors. Unterschiede zur Datenbanksequenz sind in fett dargestellt. Am 5‘ und 3‘-Ende sind die Schnittstellen für die Klonierung eingezeichnet. Das Startcodon des eGFPs ist unterstrichen.


10 20 30
ETTh M R D Y D E V I A F L G E W G P F Q R L I F F L L S A S
CTTh M R D Y D E V T A F L G E W G P F Q R L I F F L L S A S
DR1 M R D Y D D I T S F L G T W G P F Q L T V F L A L A I S
DR2 M N L Q D Y E E Q T A F L G A W G P F Q K T V F S L L C L S
DR3 M G N Y D E D T A F L G Q T G P F F I R L F C L L N L I
40 50 60
ETTh I I P N G F N G M S V V F L A G T P E H R C R V P D A A N L
CTTh I I P N G F T G L S S V F L I A T P E H R C R V P D A A N L
DR1 I L P N G F V G L Y I V F V G D T P A H E C L I P E Q I N I
DR2 I I P N G F T G L S I V F L G D T P A H H C R I P E T L N L
DR3 Y I S T G L H G L Y I V F V A A S P A H R C R V - - D V N L
70 80 90
ETTh S S A W R N N S V P L R L R - D G R E V P H S C S R Y R L A
CTTh S S A W R N H T V P L R L R - D G R E V P H S C R R Y R L A
DR1 S S V W R D A A I P T Q M Q - D G V L K R S S C S R Y R L D
DR2 T A G W R N A S V P R P Q P - H G D P R A S R C Y R L R L D
DR3 T E D W L E A S A P T E T L S N G D L Q V S Q C W R Y S L Q
100 110 120
ETTh T I A N F S A L G L E P G R D V D L G Q L E Q E S C L D G W
CTTh T I A N F S A L G L E P G R D V D L G Q L E Q E S C L D G W
DR1 T L R Q L S M L N Y T P N V E V N L S Q I E T E P C V D G W
DR2 L V K N Y S D G G L L P G L D V N V S E I P R E E C A D G W
DR3 T L T N L S G Q G Y S P G - Q I N I T D I P R E R C E D G W
130 140 150
ETTh E F S Q D V Y L S T V V T E W N L V C E D N W K V P L T T S
CTTh E F S Q D V Y L S T I V T E W N L V C E D D W K A P L T I S
DR1 S Y S Q E F Y Q S T I V T E W D L V C E R E Y K G P L T S S
DR2 I Y D K E I Y S S T I V S E W D L V C S D D W K S P L T S S
DR3 V Y S A D V Y H S T I V S E W D L V C D S E W R V P L A S S
160 170 180
ETTh L F F V G V L L G S F V S G Q L S D R F G R K N V L F A T M
CTTh L F F V G V L L G S F I S G Q L S D R F G R K N V L F V T M
DR1 I Y F C G V L V G T F L S G Q M S D R Y G R R P V L F T M M
DR2 I F F C G V L T G S V I S G P V S D R F G R K I V L F V T M
DR3 T L Y M G Y L L G S I V S G Q L S D R F G R K K V L F G S L
190 200 210
ETTh A V Q T G F S F L Q I F S I S W E M F T V L F V I V G M G Q
CTTh G M Q T G F S F L Q I F S K N F E M F V V L F V L V G M G Q
DR1 A L Q T I T I L I Q M F S P S W E V F S A I Y F F V G F S G
DR2 A I Q T L F T V V Q V F S P S W Q I F C F L F F I V G M G Q
DR3 A A E A L L M F A Q S F S P S W L I F C V L Y F F I G A F Q
220 230 240
ETTh I S N Y V V A F I L G T E I L G K S V R I I F S T L G V C T
CTTh I S N Y V A A F V L G T E I L G K S V R I I F S T L G V C I
DR1 F S N Y V V A Y V L G S E I L S P A S R V L F G S L G V F M
DR2 I S N Y V A A F V L G M E I L S S S V R D V Y S T L G V C L
DR3 I S L Y I T A F V L G N E V L S G S L R V L F T T L G A F L
250 260 270
ETTh F F A V G Y M L L P L F A Y F I R D W R M L L L A L T V P G
CTTh F Y A F G Y M V L P L F A Y F I R D W R M L L V A L T M P G
DR1 G S G I G Q M F F P L A A Y F I R S W R W L V L T N A L T G
DR2 F F S I G Y M I L P L A A Y F L R D W R S L M L A L T I P G
DR3 H Y C V G Y M L L P W V A F A I R H W R T L L R V L S G L T
280 290 300
ETTh V L C V P L W W F I P E S P R W L I S Q R R F R E A E D I I
CTTh V L C V A L W W F I P E S P R W L I S Q G R F E E A E V I I
DR1 L L Y F P L W W F I P E S P R W L L S Q G R T A E A E A V L
DR2 F F Y I P L W W F I P E S P R W L L S Q G R V Q E A E A I I
DR3 V V Y I P L W W L I P E S P R W L L S Q G H V Q E S E A I L
310 320 330
ETTh Q K A A K M N N I A V P A V I F D S - - V E E L N P L K Q Q
CTTh R K A A K A N G I V V P S T I F D P S E L Q D L S S K K Q Q
DR1 R R A A E K N R V T A P E V I F S S S E I E E A A K K R I Q
DR2 R K A A K I N R V T A P D V I F P L M Q S T E D A G G V Q S
DR3 R D A A R K N R V P A P E V I F K Q S Q I K E A A F Q K S K

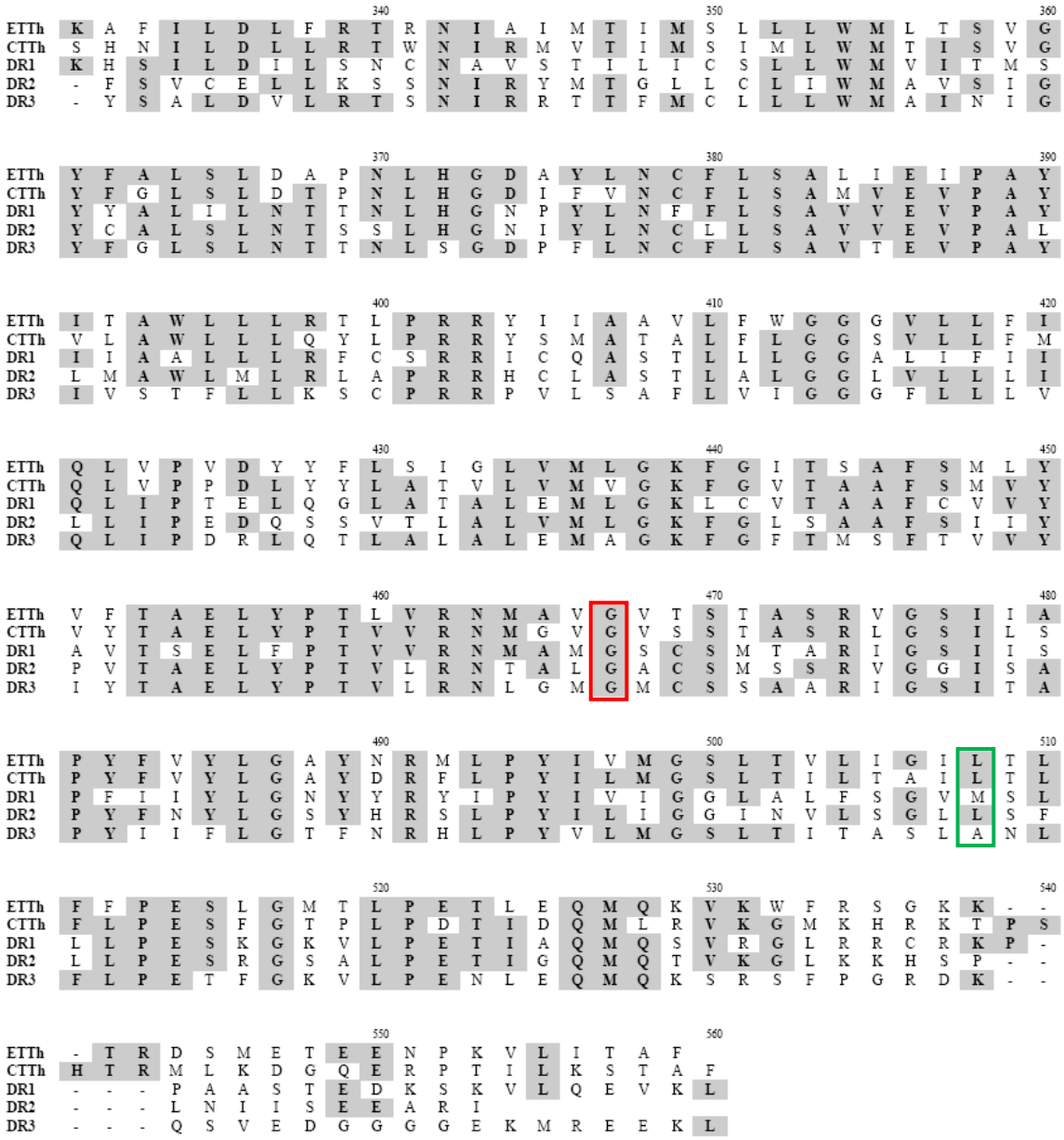


Abb. 48: Alignment der Transporter ETTh, CTTh, DR1, DR2 und DR3

Alignment der Aminosäuresequenzen. Die Positionen 200 (Na^+-Abhägigkeit; blau), 462 (Null-Mutante; rot) und 503 (erhöhte Transportleistung; grün) des humanen ETT sind durch Kästchen makiert.

„Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. Günter Schwarz betreut worden."

Köln, August 2009 _____

Markus Bach

Lebenslauf

Name	Bach
Vorname	Markus
Adresse	Wittgensteinstr. 31a 50931 Köln
Geburtsdatum	08.10.1980
Geburtsort	Stolberg
Nationalität	Deutsch
Familienstand	ledig
Schullaufbahn	1991-1997 Realschule I, Stolberg 1997-2000 Goethe-Gymnasium, Stolberg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium	Studium der Biologie, Universität zu Köln 10/2001-06/2006 Abschluss: Diplom Titel der Diplomarbeit: „Funktionelle Charakterisierung von Einzelnukleotidpolymorphismen des humanen Ergothionein-Transporters“ seit 06/2006 Promotionsstudiengang im Institut für Pharmakologie AG Professor Dr. Dirk Gründemann Abschluss: Dr. rer. nat. voraussichtlich 10/2009 Titel der Dissertation: „Identifizierung des orthologen Ergothionein-Transporters des Zebrafischs, Etablierung und Phänotypisierung eines Knockout-Modells“

Köln, August 2009 _____

Markus Bach