

**Identifizierung Ergothionein-haltiger Zellen im Zebrafisch  
*Danio rerio***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Veronika Zapilko**

aus Deggendorf

Köln

2014

Berichterstatter:  
(Gutachter)

Prof. Dr. Sigrun Korsching

Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 10. 2013

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Stellung des Themas, die Betreuung im Labor und die Diskussionen zu meiner Doktorarbeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meiner Promotionsbetreuerin Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching. Sie hat sich regelmäßig Zeit genommen, mit mir über meine Ergebnisse zu diskutieren und den Fortgang meines Projektes zu planen. Zudem möchte ich mich bei ihr für das Verfassen eines Gutachtens bedanken. Außerdem hat mir Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching ermöglicht, dass ich meine Doktorarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln einreichen konnte. Ihrem Doktoranden Gaurav Ahuja danke ich sehr für die Ratschläge bei der Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen.

Herrn Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt danke ich für die freundliche Bereitschaft ein Gutachten über diese Arbeit anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Raimund Wagener bedanke ich mich für die Ideen zu meiner Doktorarbeit. Seiner Mitarbeiterin Frau Birgit Kobbe danke ich sehr für das Teilen ihrer Erfahrungen bei der Herstellung polyklonaler Antikörper.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>A Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>A.1 Ergothionein</b> .....	<b>1</b>
<b>A.2 Der Ergothionein-Transporter</b> .....	<b>5</b>
A.2.1 Membrantopologie und Einordnung in die SLC-Gruppe .....	5
A.2.2 Hochspezifischer Na <sup>+</sup> -abhängiger Aufnahmetransporter für Ergothionein.....	6
A.2.3 Molekularer Marker für Ergothionein-Akkumulation/Aktivität .....	8
A.2.4 Lokalisation.....	8
A.2.4.1 Subzelluläre Lokalisation.....	8
A.2.4.2 Humanes Expressionsprofil.....	10
A.2.5 Expressionsprofil verschiedener Spezies im Vergleich.....	11
A.2.6 Assoziation mit chronischen Entzündungserkrankungen.....	12
<b>A.3 Der Zebrafisch <i>Danio rerio</i></b> .....	<b>14</b>
A.3.1 Modellorganismus .....	14
A.3.2 Identifizierung des orthologen Ergothionein-Transporters.....	14
A.3.3 Expressionsprofil des orthologen Ergothionein-Transporters .....	17
A.3.4 Der ET-defiziente <i>slc22a4<sup>ipk1Tg</sup></i> Zebrafisch.....	18
<b>A.4 Erzeugung von eGFP-Zebrafisch-Reporterlinien mit dem Tol2- Transposon-System</b> .....	<b>18</b>
<b>A.5 Ziel der Doktorarbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>B Material</b> .....	<b>22</b>
<b>B.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>22</b>
<b>B.2 Lösungen und Puffer</b> .....	<b>22</b>
<b>B.3 Enzyme und Reaktionssysteme</b> .....	<b>23</b>
<b>B.4 Nucleinsäuren</b> .....	<b>25</b>

B.4.1	Längenstandards .....	25
B.4.2	Oligonukleotide .....	26
B.4.3	Vektoren .....	29
<b>B.5</b>	<b>Antikörper .....</b>	<b>32</b>
<b>B.6</b>	<b>Bakterienstämme.....</b>	<b>33</b>
<b>B.7</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>34</b>
<b>B.8</b>	<b>Zebrabärblinge.....</b>	<b>34</b>
<b>C</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>34</b>
<b>C.1</b>	<b>DNS- und RNS-Techniken .....</b>	<b>34</b>
C.1.1	DNS-Techniken.....	34
C.1.1.1	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNS.....	34
C.1.1.2	Dephosphorylierung von DNS .....	35
C.1.1.3	Vervielfältigung von DNS mit Hilfe der PCR.....	35
C.1.1.4	Auftrennung von DNS im Agarosegel .....	36
C.1.1.5	Aufreinigung von DNS aus einem Agarosegel.....	37
C.1.1.6	DNS-Ligation.....	38
C.1.1.7	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	38
C.1.1.8	Ethanol-fällung von DNS.....	39
C.1.1.9	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration .....	39
C.1.1.10	Recombineering und FLP/FRT-Rekombination .....	39
C.1.1.10.1	Prinzip.....	39
C.1.1.10.2	Durchführung .....	41
C.1.1.10.2.1	Recombineering.....	41
C.1.1.10.2.2	FLP/FRT-Rekombination .....	42
C.1.1.11	Plasmid-DNS-Präparation .....	43
C.1.1.11.1	Minipräparation .....	43
C.1.1.11.2	Maxipräparation.....	44
C.1.1.12	DNS-Sequenzierung nach Sanger .....	45
C.1.1.13	cDNS-Synthese .....	46
C.1.1.14	5' RACE-PCR.....	46
C.1.1.15	Isolierung genomischer DNS .....	47
C.1.2	RNS-Techniken .....	48
C.1.2.1	Isolierung von Gesamt-RNS aus Gewebe .....	48
C.1.2.2	Isolierung von mRNS aus Gesamt-RNS.....	48
C.1.2.3	Fällung von RNS .....	48
C.1.2.4	Auftrennung von RNS im Agarosegel .....	48
<b>C.2</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>49</b>

C.2.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> .....	49
C.2.2	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> .....	49
C.2.3	Kultivierung transformierter <i>E. coli</i> .....	50
<b>C.3</b>	<b><i>In vivo</i>-Methoden am Zebraföhrbling</b> .....	<b>51</b>
C.3.1	Fischzucht und Fischhaltung .....	51
C.3.2	DNS/mRNS-Cytoplasmainjektion .....	52
C.3.2.1	Synthese der Tol2-mRNS .....	52
C.3.2.2	Cytoplasmainjektionen .....	52
<b>C.4</b>	<b>Zellkulturmethoden</b> .....	<b>53</b>
C.4.1	Stabile Transfektion von HEK-293-EBNA Zellen .....	53
C.4.2	Zellkultur von HEK-293-EBNA Zellen .....	53
<b>C.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>54</b>
C.5.1	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie .....	54
C.5.2	Proteinmengenbestimmung mit der BCA-Methode .....	55
C.5.3	Abspaltung N-glykosylierter Oligosaccharide von Proteinen mittels PNGase F .....	55
C.5.4	Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel .....	56
C.5.5	Coomassie-Färbung .....	57
C.5.6	Western-Blot und anschließender Immundetektion .....	57
C.5.7	Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper .....	58
C.5.8	Indirekter ELISA .....	59
<b>C.6</b>	<b>Histologische Methoden</b> .....	<b>60</b>
C.6.1	Antikörperfärbung (DAB-Färbung) an Zebraföhrbling-Larven .....	60
C.6.2	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	61
C.6.3	Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten .....	61
C.6.4	Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an HEK-293-EBNA-Zellen .....	62
<b>D</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>63</b>
<b>D.1</b>	<b>Herstellung der <i>Tg(sl22a4:eGFP)</i>-Linie</b> .....	<b>63</b>
D.1.1	Konstruktion des Tol2- <i>eGFP</i> -Transposonvektors .....	63
D.1.1.1	Modifizierung des Inserts des Fosmids CH1073-409B12 mit eGFP .....	66
D.1.1.1.1	Konstruktion der eGFP-Reportergenkassette .....	66
D.1.1.1.2	Austausch des kodierenden Bereichs des ersten Exons des <i>sl22a4</i> -Gens gegen die eGFP-Reportergenkassette .....	70
D.1.1.2	Umgeben der potentiellen <i>sl22a4:eGFP</i> -Expressionskassette mit Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase .....	73
D.1.1.2.1	Konstruktion des Retrieval-Vektors .....	73
D.1.1.2.2	Aufnahme der potentiellen <i>sl22a4:eGFP</i> -Expressionskassette in den Retrieval-Vektor mittels Recombineering .....	76
D.1.2	Test des Tol2- <i>eGFP</i> -Transposonvektors .....	78

D.1.2.1	Überprüfung der Tol2-mRNS .....	78
D.1.2.2	Injektion des Tol2-eGFP-Transposonvektors zusammen mit Tol2-mRNS.....	80
D.1.2.3	Untersuchung eines möglichen inhibitorischen Einflusses des Vektorrückgrats und der FRT-Stelle auf die eGFP-Expression .....	84
<b>D.2</b>	<b>Immunhistochemische Lokalisation des Ergothionein-Transporters.....</b>	<b>87</b>
D.2.1	Herstellung polyklonaler Antikörper .....	87
D.2.1.1	Produktion des Antigens und anschließende Immunisierung.....	88
D.2.1.2	Gewinnung und Aufreinigung.....	91
D.2.1.3	Titerbestimmung.....	93
D.2.1.4	Untersuchung der Spezifität.....	95
D.2.2	Immunhistochemische Lokalisation des Ergothionein-Transporters im adulten Zebrabärblinge.....	102
<b>E</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>112</b>
<b>E.1</b>	<b>Herstellung der <i>Tg(slca22a4:eGFP)</i>-Reporterlinie.....</b>	<b>112</b>
E.1.1	Die Transkription des <i>slca22a4</i> -Gens wird vermutlich von weit entfernten <i>cis</i> -regulatorischen Elementen beeinflusst .....	113
E.1.2	Vergleich unterschiedlicher Keimbahn-Transgenese-Methoden im Zebrabärbling.....	116
E.1.3	Herstellung von Knock-in-Linien im Zebrabärbling mittels TALENs-induzierter homologer Rekombination .....	117
<b>E.2</b>	<b>Immunhistochemische Lokalisation des Ergothionein-Transporters.....</b>	<b>120</b>
E.2.1	Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper .....	120
E.2.1.1	Die größte extrazelluläre Schleife als Antigen.....	120
E.2.1.2	Die polyklonalen K-anti-NES Antikörper erkennen den Slc22a4 spezifisch.....	121
E.2.2	Lokalisation des Ergothionein-Transporters im adulten Zebrabärbling .....	125
E.2.2.1	Der Ergothionein-Transporter ist vermutlich für die ET-Aufnahme und die ET-Retention in allen Vertebraten essentiell .....	126
E.2.2.2	Die Retina ist ein Wirkungsort von ET.....	127
E.2.2.3	Gewebespezifische Epitopzugänglichkeit des Ergothionein-Transporters .....	129
E.2.2.4	ET übernimmt vermutlich in Blutzellen aller Vertebraten eine Schutzfunktion ...	131
<b>E.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>133</b>
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>G</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>152</b>
<b>H</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>157</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thion-Thiol-Tautomerie-Gleichgewicht von ET (Imidazol-2-thion) .....	1
Abbildung 2: Membrantopologie der SLC22-Familie .....	6
Abbildung 3: Strukturformeln von Herzynin (links), Thiamazol (Mitte) und Tetraethylammonium (rechts) .....	7
Abbildung 4: Strukturformel von Carnitin (CT) .....	8
Abbildung 5: Gewebeverteilung der SLC22A4-mRNS .....	11
Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum der SLC22-Familie .....	15
Abbildung 7: Relative Transporteffizienz der Transporter-Kandidaten.....	16
Abbildung 8: Beispiel für einen Tol2-eGFP-Transposonvektor .....	19
Abbildung 9: Veränderter pCEPPu-Expressionsvektor .....	30
Abbildung 10: pEBTet-Expressionsvektor.....	31
Abbildung 11: Homologe Rekombination beim Recombineering in SW105-Zellen .....	41
Abbildung 12: Zirkularisierte partielle slc22a4-cDNS.....	47
Abbildung 13: Fosmid CH1073-409B12 .....	65
Abbildung 14: Schemazeichnung zur Konstruktion der eGFP-Reporterengkassette.....	69
Abbildung 15: Schemazeichnung zur Konstruktion des Vektors „Fosmid_slc22a4:eGFP_FRT“ .....	72
Abbildung 16: Schemazeichnung zur Konstruktion des Retrieval-Vektors.....	75
Abbildung 17: Schemazeichnung zur Konstruktion des Tol2-eGFP-Transposonvektors...	77
Abbildung 18: Tol2-mRNS-Test .....	80
Abbildung 19: Tol2-excision assay .....	82
Abbildung 20: eGFP-Detektion mittels DAB-Färbung in Zebrabärblingen, die mit dem Tol2-eGFP-Transposonvektor und mit Tol2-mRNS injiziert wurden .....	84
Abbildung 21: Injektion des Vektors „pBSK+_CMV:eGFP_FRT_iTol2Kan“ in Zebrabärblinge.....	86
Abbildung 22: Aminosäuresequenz des Antigens GES .....	89
Abbildung 23: SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zur Überprüfung der Integrität und der Reinheit der NES und der GES .....	90
Abbildung 24: Western-Blot mit anschließender Immundetektion zur Identifikation der GES und der NES .....	91
Abbildung 25: ELISA-Messungen zur Titerbestimmung .....	94

Abbildung 26: Detektion der eGFP-Fluoreszenz der slc22a4-eGFP- (A), slc22a5a-eGFP- (B) und slc22a5b-eGFP-exprimierenden (C) HEK-293-EBNA-Zellen .....	97
Abbildung 27: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen M-anti-GES Antikörper.....	98
Abbildung 28: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen K-anti-GES Antikörper .....	99
Abbildung 29: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen M-anti-NES Antikörper....	100
Abbildung 30: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen K-anti-NES Antikörper ...	101
Abbildung 31: Nachweis der slc22a4-mRNS in peripheren Blutzellen mittels RT-PCR.	103
Abbildung 32: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit K-anti-NES Antikörpern am Darm .....	106
Abbildung 33: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit K-anti-NES Antikörpern an der Körperform .....	108
Abbildung 34: Immunhistochemische Lokalisation des Slc22a4 Transporters in der Retina .....	110
Abbildung 35: TALENs-vermittelte gezielte Insertion großer DNS-Fragmente .....	119
Abbildung 36: partielle Sequenz des Tol2-eGFP-Transposonvektors „pBSK+_slc22a4:eGFP_FRT_iTol2Kan“ .....	157
Abbildung 37: Sequenzierungsdatensatz zur Bestimmung der 5' UTR der slc22a4-mRNS .....	158
Abbildung 38: Sequenz der slc22a4-cDNS .....	158
Abbildung 39: EcoRI-Restriktionsverdau der Konstrukte „pBSK+_1,6kbslc22a4:eGFP_FRT_iTol2Kan“ (links) und „pBSK+_fullslc22a4:eGFP_FRT_iTol2Kan“ (rechts).....	159
Abbildung 40: eGFP-Detektion mittels DAB-Färbung in Zebrabärblingen injiziert mit Tol2-eGFP-Transposonvektoren und Tol2-mRNS .....	159
Abbildung 41: AS-Sequenz des Slc22a4-Proteins .....	160
Abbildung 42: Alignment der größten extrazellulären Schleifen der Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b.....	160
Abbildung 43: Lokalisation der C-terminalen eGFP-Fusionen der Transporter Slc22a4 (DR2), Slc22a5a (Dr3) und Slc22a5b (DR1) .....	161

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AS-Identitäten der Kandidatenproteine mit ETTh bzw. CTTh (in %).....	15
Tabelle 2: DNS-modifizierende Enzyme .....	23
Tabelle 3: Enzyme für die PCR und die Sequenzierung .....	24
Tabelle 4: Enzyme für die RNS-Isolation und die cDNS-Synthese.....	24
Tabelle 5: N-Glykosidase .....	24
Tabelle 6: Reaktionssysteme .....	24
Tabelle 7: DNS- und RNS-Längenstandards .....	25
Tabelle 8: Primer I.....	26
Tabelle 9: Primer II.....	26
Tabelle 10: Primer III .....	26
Tabelle 11: Primer IV .....	27
Tabelle 12: Primer V .....	27
Tabelle 13: Primer VI.....	27
Tabelle 14: Primer VII.....	27
Tabelle 15: Primer VIII .....	28
Tabelle 16: Primer IX.....	28
Tabelle 17: Primer X .....	29
Tabelle 18: Antikörper.....	32
Tabelle 19: Antibiotika-Stammlösungen (1000x) .....	50
Tabelle 20: Antikörperkonzentrationen.....	93
Tabelle 21: Antikörpertiter .....	93
Tabelle 22: AS-Identitäten der größten extrazellulären Schleifen von Slc22a5a und Slc22a5b mit Slc22a4 in %.....	160

## Kurzzusammenfassung

Ergothionein ist eine natürlich vorkommende Aminosäure mit antioxidativen Eigenschaften *in vitro*. Der Mensch und andere Vertebraten synthetisieren Ergothionein nicht selbst, sondern können es nur über die Nahrung aufnehmen. Die physiologische Funktion von Ergothionein ist unbekannt. Cytoplasmamembranen sind für das hydrophile Ergothionein undurchlässig. Der Transport von Ergothionein in das Cytosol wird von einem hochspezifischen Transporter in der Plasmamembran, dem Ergothionein-Transporter, durchgeführt. Der Ergothionein-Transporter stellt den bis jetzt einzigen Biomarker für eine mögliche Ergothionein-Akkumulation/Aktivität dar.

Beim Menschen bewirkt dieser Transporter (Gensymbol *SLC22A4*) eine Anreicherung von Ergothionein z. B. in Vorläuferzellen der Erythrozyten, in Monozyten und daher vermutlich auch in Makrophagen, die aus Monozyten hervorgehen. Monozyten und Makrophagen sind an chronischen Entzündungsprozessen beteiligt. Dies deutet auf eine Rolle von Ergothionein im Immunsystem hin, wofür auch spricht, dass das Auftreten der chronischen Entzündungserkrankungen Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und rheumatoide Arthritis mit Varianten des Transportergens in Verbindung gebracht wurden. Ergothionein könnte daher möglicherweise in der Zukunft als neuer Wirkstoff bei der Prophylaxe oder bei der Therapie dieser Krankheiten zum Einsatz kommen.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Zebrafisch *Danio rerio* als Modellorganismus für die Untersuchung der physiologischen Funktion von Ergothionein zu etablieren. Hierfür ist es essentiell, die exakten Funktionsorte von Ergothionein zu bestimmen. Daher sollte hier ein Werkzeug zur Identifizierung Ergothionein-haltiger Zellen mit Einzelzellauflösung im Zebrafisch entwickelt werden.

Zu diesem Zweck wurde die Herstellung einer transgenen Reporterlinie angestrebt, in der die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) unter Promotor-Kontrolle des Ergothionein-Transporters steht. Trotz umfassender Bemühungen war es jedoch nicht möglich, eine Zebrafischlinie mit einem *eGFP*-Expressionsprofil, das dem des Transportergens (*slc22a4*) entspricht, zu etablieren. Möglicherweise wird die *slc22a4*-Transkription von weit entfernt liegenden *cis*-regulatorischen Elementen beeinflusst, die hier nicht identifiziert werden konnten.

Als Alternative wurde endogener Ergothionein-Transporter immunhistochemisch nachgewiesen. Hierzu wurden polyklonale Antikörper hergestellt, deren Spezifität mittels heterologer Expression gezeigt werden konnte. Der Slc22a4 Transporter konnte mit diesen

Antikörpern in den Bürstensäumen von Darm und Niere nachgewiesen werden, in denen Slc22a4 vermutlich die Aufgabe der Ergothionein-Absorption und Ergothionein-Retention übernimmt. Zudem konnten in der Retina einzelne Zellschichten als Wirkungsorte von Ergothionein plausibel gemacht werden. Demgegenüber konnte der Transporter in Haut und Gehirn nicht immunhistochemisch nachgewiesen werden, obwohl sowohl Ergothionein als auch *slc22a4*-mRNS in beiden Organen in hohem Maße vorhanden sind. Es wäre denkbar, dass die Epitope des Slc22a4 in der Haut und im Gehirn maskiert sind.

Als weitere Methode zur Lokalisierung des Slc22a4 Transporters wurde RT-PCR eingesetzt. Hierbei konnten Transkripte in peripheren Blutzellen des Zebrabärblings nachgewiesen werden. Die genaue Identität der *slc22a4*-positiven Zellen kann nun immunhistochemisch festgestellt werden. Falls wie beim Menschen der Ergothionein-Transporter in Monozyten und Makrophagen vorhanden ist, könnten die Folgen eines Ergothionein-Mangels im Immunsystem dann im Zebrabärbling untersucht werden. Damit kämen dann die weitreichenden experimentellen Vorteile des Zebrabärblings zum Tragen.

## Abstract

Ergothioneine is a naturally occurring amino acid with antioxidative properties *in vitro*. Humans and other vertebrates do not synthesise ergothioneine themselves and must absorb it through their diet. The physiological function of ergothioneine is unknown and cytoplasm membranes are impermeable to the hydrophilic ergothioneine. Ergothioneine is transported into the cytosol by a highly specific transporter in the plasma membrane, the ergothioneine transporter. The ergothioneine transporter represents the only current biomarker for possible ergothioneine accumulation/activity.

In humans this transporter (gene symbol *SLC22A4*) causes an accumulation of ergothioneine, e.g., in erythrocyte progenitor cells, in monocytes and therefore presumably also in macrophages, which develop from monocytes. Monocytes and macrophages are involved in chronic, inflammatory processes. This indicates that ergothioneine has a role in the immune system, which is supported by the fact that the occurrence of the chronic inflammatory diseases Crohn's disease, colitis ulcerosa and rheumatoid arthritis has been linked to variants of the transporter gene. Ergothioneine could therefore possibly have future application as a new drug in the prevention or treatment of these diseases.

The aim of this doctoral thesis was to establish the zebrafish *Danio rerio* as a model organism for the investigation of the physiological function of ergothioneine. This requires the exact place of function of ergothioneine, so it was intended to develop a tool for the identification of cells containing ergothioneine in zebrafish, with single-cell resolution.

It was aimed to produce a transgenic reporter line in which the expression of the green fluorescent protein eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) is under promoter control of the ergothioneine transporter. However, despite extensive effort it was not possible to establish a zebrafish line with an *eGFP*-expression profile that corresponds to that of the transporter gene (*slc22a4*). It is possible that *slc22a4*-transcription is affected by distant *cis*-regulatory elements, which were not identified here.

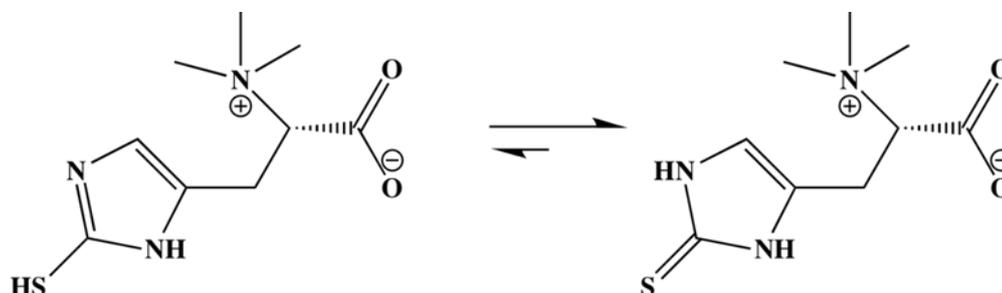
As an alternative, immunohistochemistry was used to show the presence of endogenous ergothioneine transporter. This involved the production of polyclonal antibodies and their specificity was shown by heterologous expression. These antibodies were used to show the presence of the Slc22a4 transporter in the brush borders of the intestines and kidneys, in which Slc22a4 presumably takes over the tasks of ergothioneine absorption and ergothioneine retention. In addition, it was possible to plausibly show individual cell layers in the retina as effective areas of ergothioneine. In contrast, it was not

possible to show evidence of the transporter in the skin and brain using histochemistry, although both ergothioneine and *slc22a4*-mRNS are present in both organs in large quantities. It is possible that the epitopes of Slc22a4 are masked in the skin and brain. RT-PCR was employed as a further method for the localisation of the Slc22a4 transporter. This showed the presence of transcripts in the peripheral blood cells of the zebrafish. It is now possible to positively identify *slc22a4*-positive cells using immunohistochemistry. If, as in humans, the ergothioneine transporter is present in monocytes and macrophages, it would be possible to examine the consequences of ergothioneine deficiency in the immune system in zebrafish. This would make use of the extensive experimental advantages of zebrafish.

## A Einleitung

### A.1 Ergothionein

Ergothionein (ET) wurde 1909 von Tanret entdeckt und nach dem Mutterkorn (Ergot; *Claviceps purpurea*), aus dem es 1911 erstmals isoliert wurde, benannt (Mann und Leone, 1953, Tanret, 1909). Chemisch gesehen ist ET ein Betain von L-Histidin, das eine Sulfhydrylgruppe an der zweiten Position des Imidazolrings trägt (Barger und Ewins, 1913) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Thion-Thiol-Tautomerie-Gleichgewicht von ET (Imidazol-2-thion)**  
Dargestellt sind die Thiol- (links) und Thion-Form (rechts) von ET.

Unter physiologischen Bedingungen liegt ET in einem Thion-Thiol-Tautomerie-Gleichgewicht vor, in dem die stabilere Schwefelharnstoff-analoge Thion-Struktur überwiegt (Hartmann, 1999) (siehe Abbildung 1). Daher hat ET andere Eigenschaften als die Thiole Cystein oder Glutathion (GSH). So neigt ET bei physiologischem pH-Wert zu keiner Autooxidation und fördert nicht die Entstehung von Hydroxylradikalen aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen (Fenton-Reaktion) (Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999, Gründemann, 2012).

ET wird ausschließlich von Pilzen (Speisepilze eingeschlossen), Cyanobakterien und einigen Mykobakterien synthetisiert und von höheren Pflanzen über die Wurzeln aufgenommen (Pfeiffer et al., 2011, Melville et al., 1955, Genghof und Vandamme, 1968, Melville et al., 1956, Hartman, 1990). Die Biosynthese erfolgt ausgehend von L-Histidin über das Zwischenprodukt Herzynin und dann durch den Einbau von Schwefel, der aus der Aminosäure Cystein stammt, zu ET (Heath und Wildy, 1956, Melville et al., 1957) (siehe Abbildung 3). Es ist nicht geklärt, zu welchem Zweck ET von Pilzen, Mykobakterien und Cyanobakterien produziert wird.

Der Mensch und andere Vertebraten nehmen ET ausschließlich über die Nahrung auf (Melville et al., 1957). Dennoch sind gegenwärtig keine Mangelerscheinungen bekannt. Als ein Bestandteil der menschlichen Nahrung ist ET sehr ungleichmäßig verteilt. Die mit Abstand höchsten Konzentrationen an ET wurden in Cyanobakterien (z. B. *Oscillatoria spec.*) (bis zu 1 mg/g Trockengewicht) und in Pilzen (Shiitake (*Lentinus edodes*), Austernpilz (*Pleurotus ostreatus*), Maitake (*Grifola frondosa*), Kräuterseitling (*Pleurotus eryngii*), Champignon (*Agaricus bisporus*); 1-2 mg/g Trockengewicht) gefunden (Melville, 1959, Pfeiffer et al., 2011, Dubost et al., 2006, Dubost et al., 2007). Nach der Absorption im Darm wird ET sehr schnell aus dem Blutkreislauf abgezogen und mit minimalem Metabolismus einbehalten (Gründemann, 2012). So sinkt der ET-Gehalt bei der Ratte unter ET-freier Ernährung erst nach einem Monat auf die Hälfte ab (Kawano et al., 1982). Untersuchungen humaner Gewebe haben große Unterschiede im ET-Gehalt ergeben. Hohe ET-Akkumulation wurde anfänglich für das Knochenmark, die Erythrozyten und das Auge gefunden (Hartman, 1990, Melville, 1959). Später wurde auch ein sehr hoher ET-Gehalt in Monozyten bestimmt (Harlfinger, 2005). Höchstwahrscheinlich befindet sich dann auch sehr viel ET in Makrophagen, die sich aus Monozyten entwickeln.

Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften ist das Zwitterion ET nicht in der Lage eine Biomembran zu passieren. Sein aktiver Transport ins Zellinnere wird durch einen hochspezifischen Transmembrantransporter (ET-Transporter), der in allen bis jetzt untersuchten Vertebraten (Säugetieren, Vögeln und Fischen) zu finden ist, bewerkstelligt (siehe A.2 und Abbildung 2). Invertebraten wie Insekten (*Drosophila*) und Nematoden (*Caenorhabditis*) besitzen im Gegensatz dazu keinen ET-Transporter (Gründemann 2012). Die Aminosäure (AS)-Identität der ET-Transporter von Mensch und Maus liegt bei 85,5 %. Die Ähnlichkeit der AS-Sequenz dieser Transporter liegt bei 89,1 % (Gründemann, 2012). Die Existenz eines evolutionär konservierten ET-Transporters impliziert eine sehr bedeutende Rolle von ET für den Organismus (Gründemann et al., 2005, Gründemann, 2012).

Obwohl ET seit über hundert Jahren bekannt ist, ist seine physiologische Funktion im Menschen noch immer nicht aufgeklärt (Tanret, 1909). Viele Wissenschaftler schreiben ET antioxidative Eigenschaften *in vitro* zu (Cheah und Halliwell, 2012). Die intrazelluläre ET-Konzentration ist in Erythrozyten mit 0,1-1,0 mmol/l etwa um den Faktor 10 niedriger als die Konzentrationen der ubiquitären hydrophilen Antioxidantien Ascorbat und GSH (Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999). Dies deutet darauf hin, dass ET einen speziellen Nutzen gegenüber Ascorbat und GSH haben muss. Es wird in der Literatur vielfach

beschrieben, dass Imidazol-2-thione wie ET in *in vitro*-Experimenten als Antioxidationsmittel wirken (Hartman, 1990, Aruoma et al., 1997, Akanmu et al., 1991, Aruoma et al., 1999, Dong et al., 2007, Arduini et al., 1990). Sie waren jedoch nicht wesentlich wirksamer als GSH und Ascorbat (Franzoni et al., 2006). Die Eigenschaft eines allgemeinen Antioxidans ist somit keine Besonderheit von ET. ET besitzt eine hohe Affinität für  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und bildet mit ihnen stabile Komplexe. Ein ET-Metallion-Komplex besteht aus zwei Molekülen ET pro zweiwertiges Metallkation. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch GSH und Cystein ähnlich stabile Komplexe bilden (Hanlon, 1971, Motohash.N et al., 1974). Möglicherweise liegt der einzigartige Nutzen von ET gegenüber GSH und Ascorbat in der Affinität für proteingebundene oxidierte Häm-Gruppen ( $\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Häm) begründet (Gründemann et al., 2005, Arduini et al., 1992). *In vitro*-Experimente deuten darauf hin, dass ET mit Ferrylhämoglobin ( $\text{HbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) reagieren kann, jedoch nicht mit Hämoglobin ( $\text{HbFe}^{\text{II}}$ ) oder Methämoglobin ( $\text{HbFe}^{\text{III}}$ ) (Engler et al., 1982). So reagiert Thiamazol, ein ET-Analagon und ein häufig therapeutisch eingesetztes Thyreostatikum, mit der oxidierten Häm-Gruppe (Compound II) der Schilddrüsen-Peroxidase, jedoch nicht mit der reduzierten Form (siehe Abbildung 3). Die Schilddrüsen-Peroxidase wird durch die vermutlich kovalente Bindung von Thiamazol inaktiviert (Engler et al., 1982). Im Gegensatz dazu kann GSH keine Inaktivierung der Schilddrüsen-Peroxidase bewirken (Engler et al., 1982). Das Ferrylhämoglobin entspricht genau dem Compound II (Nagababu und Rifkind, 2000). Ferrylhämoglobin ist ein hochreaktives Zwischenprodukt bei der autokatalytischen Oxidation von oxygeniertem Hämoglobin zu Methämoglobin (Alayash, 2004, Everse und Hsia, 1997). Die autokatalytische Oxidation kann durch Xenobiotika wie z.B. Nitrit und Aminophenole ausgelöst werden (Kosaka und Tyuma, 1987, Lissi, 1998). Methämoglobinämie verursacht Hämolyse, Hypoxie und Cyanose und kann zum Tod führen. Ferrylhämoglobin wird auch als Startpunkt für schädliche Radikalkettenreaktionen angesehen, die unter anderem zu einer Hämzerstörung führen können. Diese Kettenreaktionen laufen über Superoxidradikale, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit ab (Nagababu und Rifkind, 2000, Everse und Hsia, 1997). Eine mögliche physiologische Funktion von ET wäre demnach der Schutz von Erythrozyten vor Schädigungen, die auf Ferrylhämoglobin basieren (Gründemann et al., 2005). Es wäre denkbar, dass ET Ferrylhämoglobin abfängt, in dem es sich reversibel an dieses anlagert oder an dieses kovalent bindet. ET wird vermutlich in Erythrozyten regeneriert, wofür spricht, dass der ET-Gehalt im Laufe der Lebensdauer von Erythrozyten nur minimal abnimmt (Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999). Es konnte in der

Tat gezeigt werden, dass durch die Nahrung aufgenommenes ET eine durch Nitrit ausgelöste Methämoglobin-Bildung in Ratten und Kaninchen verhindern kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Ratten und Kaninchen, die ET-frei ernährt wurden, nach Applikation von Nitrit signifikant mehr Methämoglobin gebildet wird als unter normaler Ernährung (Spicer et al., 1951, Mortensen, 1953). Ein ET-Mangel verläuft daher wahrscheinlich phänotypisch still, bis der Körper mit einer starken Methämoglobin bildenden Verbindung wie Nitrit konfrontiert wird. Diese Hypothese kann erklären warum ET noch keinen Vitamin-Status erhalten hat (Gründemann et al., 2005).

Ein bekannter Fall einer Erkrankung, die zunächst ohne Symptome verlaufen kann, ist der Favismus. Bei betroffenen Personen führen Mutationen im *Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Gen (G6PD-Gen)* zu einer eingeschränkten Funktion des Enzyms. G6PD synthetisiert den ersten Schritt im Pentosephosphatweg von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonolakton unter der Bildung von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH). In Erythrozyten ist das die einzige Möglichkeit zur Synthese von NADPH, das für die Regeneration oxidierten GSHs mit Hilfe der Glutathion-Reduktase essentiell ist. Durch die geringe Restaktivität der G6PD kann nicht ausreichend NADPH zur Regenerierung des GSHs bereitgestellt werden. So ist der Schutz der Erythrozytenmembran und der Proteine vor oxidativen Verbindungen nicht mehr ausreichend gewährleistet. Bei der Aufnahme von Wasserstoffperoxid bildenden Substanzen, wie Favabohnen (auch Pferdebohne oder Saubohne genannt) und Acetylsalicylsäure, kann es daher zu rezidivierender Hämolyse und chronischer Anämie kommen (WHO, 1989).

Neben Erythrozyten ist ET in hohen Maßen in Monozyten und wahrscheinlich auch in Makrophagen vorhanden. Monozyten und Makrophagen besitzen kein Hämoglobin. Somit muss es in diesen Immunzellen ein anderes Ziel für ET geben. Ein mögliches Ziel wäre eine Peroxidase. Peroxidasen sind Hämproteine und mit Hämoglobin, welches eine Peroxidaseaktivität besitzt, strukturell und funktionell eng verwandt (Nagababu und Rifkind, 2000). Von Gründemann und Kollegen wurde anfangs die Myeloperoxidase in Betracht gezogen (Gründemann et al. 2005, Winterbourn et al. 2000). Die physiologische Bedeutung der Myeloperoxidase wird hauptsächlich in der Bereitstellung von hypochloriger Säure (HOCl) zur Abwehr von Bakterien gesehen (Winterbourn et al., 2000). Jedoch können die oxidativen Spezies, die von der Myeloperoxidase generiert werden, auch Gewebeschäden im Organsimus hervorrufen. Die Myeloidperoxidase wird mit dem Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht (Heinecke,

1999). Wie für Peroxidasen üblich reagiert die Myeloperoxidase mit  $H_2O_2$  zum Compound I und nachfolgend zum Compound II (Folkes und Candeias, 1997). Es wäre daher denkbar, dass ET, dem eine Affinität zu oxidierten Häm-Gruppen (Compound II) zugeschrieben wird (siehe oben), durch eine spezifische Wechselwirkung mit der Myeloperoxidase vor einer unphysiologischen Aktivität des Enzyms schützt, in dem es dieses inaktiviert. Jedoch handelt es sich bei der Myeloperoxidase um ein Enzym, das seinen Hauptexpressionsort nicht in Monozyten und Makrophagen, sondern in Neutrophilen hat (Winterbourn, 2000). Neutrophile exprimieren den ET-Transporter jedoch kaum und besitzen somit vermutlich auch nur sehr wenig ET (Gründemann et al. 2005) (siehe Abbildung 5 und A.2.3). Die Myeloperoxidase kann daher als Ziel ausgeschlossen werden. Vermutlich stellt eine andere Peroxidase das Ziel für ET in Monozyten und Makrophagen dar. Darauf, dass ET eine wichtige Schutzfunktion in Monozyten und Makrophagen übernimmt, deutet das Auftreten von Varianten des *ET-Transporter*-Gens bei den chronischen Entzündungserkrankungen rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa hin (Tokuhiro et al., 2003, Gazouli et al., 2005, Russell et al., 2006, Peltekova et al., 2004, Waller et al., 2006) (siehe A.2.6). Ein ET-Mangel, der vielleicht durch eine dieser Varianten oder durch die Ernährung hervorgerufen wird, könnte die Entstehung dieser Krankheiten begünstigen.

## A.2 Der Ergothionein-Transporter

### A.2.1 Membrantopologie und Einordnung in die SLC-Gruppe

Die *Solute Carrier* (SLC)-Gruppe von Transmembrantransportern umfasst 395 Mitglieder, die in 52 Familien unterteilt werden (Hediger et al., 2013). Der humane Ergothionein-Transporter (ETTh; Gensymbol *SLC22A4*; GenBank-Zugangsnummer: Y09881) ist 551 ASs lang und das vierte Mitglied der SLC22-Familie. Man unterscheidet in dieser Familie drei Untergruppen. Die Einteilung der Transporter basiert hierbei auf deren Substrate. So gibt es Transporter, die organische Zwitterionen (ETTh und der humane Carnitin (CT)-Transporter (CTTh; Gensymbol *SLC22A5*)), organische Kationen (*Organic Cation Transporter*, OCTs) oder organische Anionen transportieren (*Organic Anion Transporter*, OATs) (Koepsell, 2013).

Die Mitglieder der SLC22-Familie weisen große Gemeinsamkeiten in ihrer Topologie auf, die auf der Basis von Hydrophathieanalysen der AS-Sequenzen ermittelt wurde (Kyte und Doolittle, 1982). So sind vermutlich alle über 12  $\alpha$ -Transmembranhelices, die untereinander über hydrophile intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden

sind, in der Plasmamembran verankert. Sowohl der C- als auch der N-Terminus liegen wahrscheinlich im Cytosol. Die exakte 3D-Struktur ist jedoch unbekannt. Anzumerken ist, dass die größte extrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembranhelix potentielle N-Glykosylierungsstellen aufweist. Zudem besitzen die Transporter potentielle intrazelluläre Phosphorylierungsstellen (Gründemann, 2012) (siehe Abbildung 2).

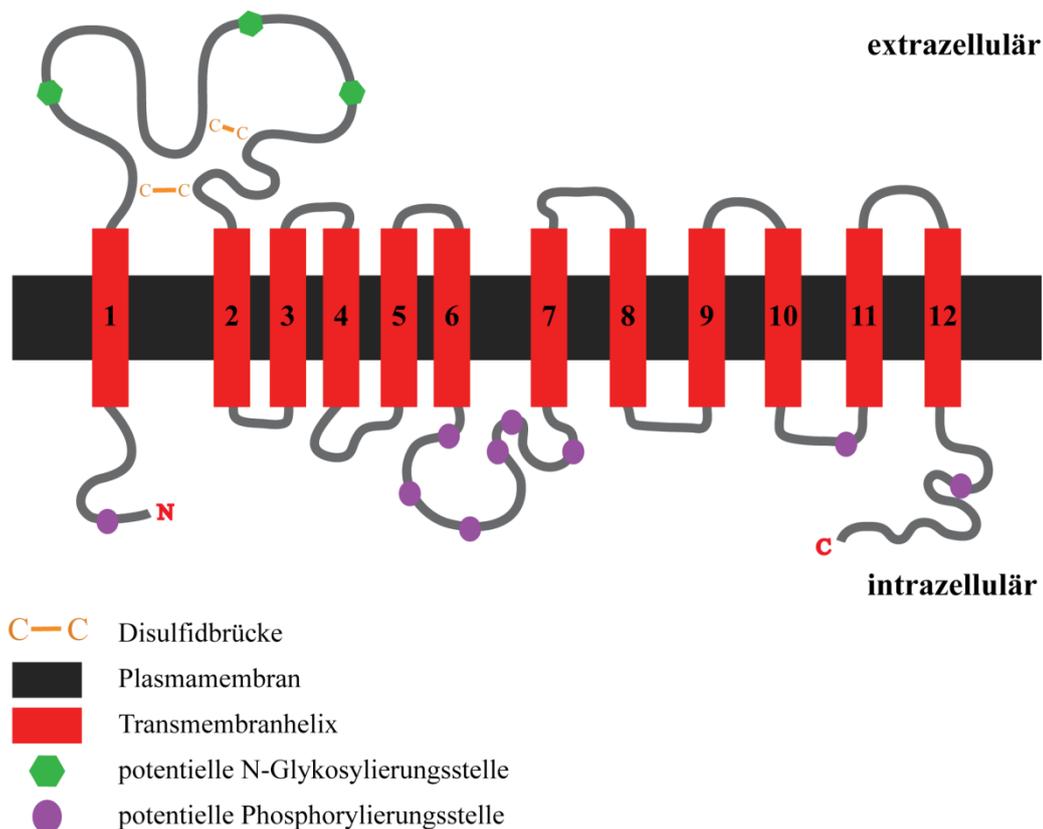


Abbildung 2: Membrantopologie der SLC22-Familie

### A.2.2 Hochspezifischer Na<sup>+</sup>-abhängiger Aufnahmetransporter für Ergothionein

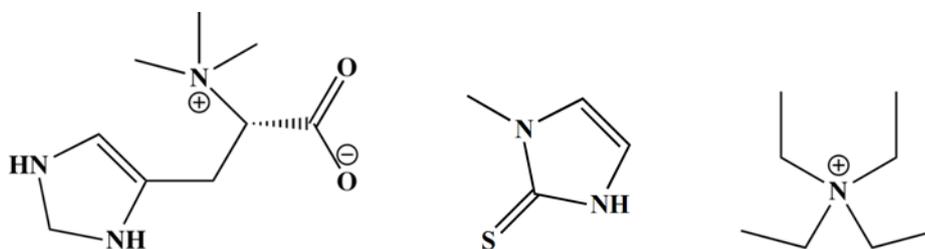
Das *SLC22A4*-Gen wurde erstmals 1997 aus der humanen fötalen Leber kloniert (Tamai et al., 1997).

Als Substrat für den ETTh wurde von Tamai et al. und Yabuuchi et al. zunächst das organische Kation Tetraethylammonium (TEA) vorgeschlagen, weshalb der ETTh zunächst als *Novel Organic Cation Transporter 1* (OCTN 1) bezeichnet wurde (Tamai et al., 1997, Yabuuchi et al., 1999) (siehe Abbildung 3). Später wurde zusätzlich auch CT, das Substrat des CTTh, als Substrat betrachtet. Diese Annahme beruhte auf der hohen AS-Sequenzhomologie des ETTh zu dem CTTh (Identität: 77 %; Ähnlichkeit: 82 %) (Tamai et al., 1998, Tamai et al., 2000, Gründemann, 2012).

Mittels LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)-Differenzabtönung wurde 2005 von der Gruppe um D. Gründemann jedoch ET als tatsächliches physiologisches Substrat für den ETTh identifiziert (Gründemann et al., 2005). Bei dem Verfahren der LC-MS-Differenzabtönung werden zunächst komplexe Substanzgemische durch die Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie zweidimensional (Zeitachse und m/z-Achse) aufgetrennt und detektiert (Siuzdak, 1994). So können z.B. die Lysate von HEK-293-Zellen mit und ohne heterologer Expression des zu untersuchenden Transporter-Proteins analysiert werden. Anschließend werden beide Datensätze durch einen in der Gruppe um D. Gründemann entwickelten Algorithmus miteinander verglichen, um Unterschiede zu finden (Gründemann et al., 2005).

Eine weitere Charakterisierung des ETTh bei heterologer Überexpression in HEK-293-Zellen hat bestätigt, dass es sich bei ET um das physiologische Substrat handelt. So wird ET ungefähr 100-mal effizienter als TEA und CT in das Cytosol transportiert. Die Transporteffizienz kann durch die *Clearance* (Entleerung) ( $v/S$ , Aufnahmegeschwindigkeit/Substratkonzentration) zum Ausdruck gebracht werden. Die *Clearance* ist das Volumen der extrazellulär angebotenen Substratlösung, das pro min pro mg Transporter-Protein [ $\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$ ] von dem Substrat befreit wird (Gründemann et al. 1999). Für die *Clearance* von ET wurden sehr hohe Werte im Bereich von 70-195  $\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$  ermittelt (Gründemann et al., 2005).

Der ETTh ist hochspezifisch für ET. So können die strukturverwandten Verbindungen Thiamazol und Herzynin, ein Zwischenprodukt in der ET-Biosynthese, das sich von ET lediglich durch den fehlenden Schwefelsubstituent unterscheidet, nicht nennenswert transportiert werden (Grigat et al., 2007) (siehe Abbildung 3 und A.1).



**Abbildung 3: Strukturformeln von Herzynin (links), Thiamazol (Mitte) und Tetraethylammonium (rechts)**

Es wurde entdeckt, dass der ETTh den ins Zellinnere gerichteten Natriumionengradienten als Triebkraft für einen ET/Na<sup>+</sup>-Kotransport in das Cytosol nutzt (Gründemann et al., 2005) (extrazellulär befinden sich zehnmal so viel Na<sup>+</sup>-Ionen wie intrazellulär).

Somit wird ET in Zellen, die den ETTh besitzen, in hohen Mengen angereichert. Wegen der niedrigen intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Ionen-Konzentration katalysiert der ETTh keinen wesentlichen Efflux von ET (Gründemann et al., 2005). Der CTTh katalysiert ebenfalls den Kotransport seines Substrats CT mit  $\text{Na}^+$ -Ionen (Tamai et al., 1998) (siehe Abbildung 4). Es muss angemerkt werden, dass Bacher und Mitarbeiter in einer HEK 293-Zellkultur gezeigt haben, dass der CTTh nicht ET transportieren kann (Bacher et al., 2009).

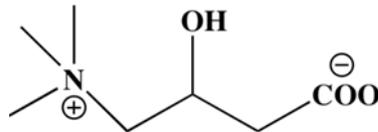


Abbildung 4: Strukturformel von Carnitin (CT)

### A.2.3 Molekularer Marker für Ergothionein-Akkumulation/Aktivität

Alle Zellen mit hoher Expression des *ET-Transporter*-Gens akkumulieren ET in hohen Maßen. Umgekehrt exprimieren alle bis jetzt bekannten Orte hoher ET-Akkumulation wie z.B. sich entwickelnde Erythrozyten (vermutlich alle Säugetiere), Bläschendrüsen (Schwein) und Haut (Zebrabärbling) das *ET-Transporter*-Gen (Gründemann et al., 2005, Melville, 1959, Nikodemus et al., 2011, Pfeiffer, 2013). Der ET-Transporter ist somit ein Biomarker für ET-Akkumulation/Aktivität. Nach heutigem Wissensstand gibt es in Vertebraten keinen Hinweis auf weitere Proteine, die ET in das Zellinnere befördern können. Zudem sind Lipiddoppelschichten aufgrund der hydrophilen Eigenschaften von ET nahezu undurchlässig für diese Substanz (Zwitterion; siehe Abbildung 1). Daher kann sogar angenommen werden, dass nur die Zellen, die das *ET-Transporter*-Gen exprimieren oder exprimiert haben, ET beinhalten. Somit ist es möglich, Zellen mit ET-Akkumulation/Aktivität über die Anwesenheit des Ergothionein-Transporters zu identifizieren. Der ET-Transporter wird auch in Zeiten, in denen der Organismus nicht über die Nahrung mit ET versorgt wird, synthetisiert (Gründemann, 2012).

### A.2.4 Lokalisation

#### A.2.4.1 Subzelluläre Lokalisation

Auf subzellulärer Ebene ist der ET-Transporter in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Diese Aussage stützt sich darauf, dass der ET-Transporter mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung polyklonaler Antikörper in dem apikalen

Membrankompartiment der Enterozyten des Dünndarms (Bürstensaum) des Menschen und der Maus detektiert werden konnte (Sugiura et al., 2010). Zusätzlich konnte der ET-Transporter mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung ebenfalls unter Verwendung polyklonaler Antikörper in dem apikalen Membrankompartiment der Epithelzellen der proximalen Tubuli (Bürstensaum) der Mausniere nachgewiesen werden (Tamai et al., 2004). Der ET-Transporter kann an diesen genannten Stellen ET aus der Nahrung absorbieren bzw. aus dem Urin bergen (Gründemann, 2012).

Die Arbeitsgruppe (AG) von D. Gründemann konnte mittels quantitativer *Real-time-PCR* zeigen, dass die mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*) des *ET-Transporters* des Schweins in den Zellen der Bläschendrüsen (*Glandula vesicularis*) des Ebers in großen Mengen vorliegt (Nikodemus et al., 2011). ET wurde neben den Bläschendrüsen auch in der Samenflüssigkeit nachgewiesen (Melville, 1959, Mann und Leone, 1953). Es wird angenommen, dass der ET-Transporter des Ebers in dem basolateralen Membrankompartiment der Zellen der Bläschendrüsen zu finden ist, damit mit Hilfe der Triebkraft des  $\text{Na}^+$ -Gradienten ET aus dem Blut aufgenommen werden kann (siehe A.2.2). Der anschließende Austritt von ET an der apikalen Membran in die Samenflüssigkeit läuft vermutlich über apokrine Sekretion ab (Nikodemus et al., 2011, Gründemann, 2012). Der ET-Transporter kann somit in apikalen oder basolateralen Stellen der Zellmembran zu finden sein, je nachdem welche Aufgabe er zu erfüllen hat (Gründemann, 2012).

2006 wurde von Lamhonwah und Tein angegeben, dass der ETTh, der von ihnen als N-terminales eGFP-Fusionsprotein in MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)-3T3-Zellen heterolog produziert wurde, in den Mitochondrien zu finden war. In diesem Fusionsprotein lag der ETTh jedoch stark verändert vor. So fehlten dem ETTh die ersten 34 N-terminalen ASs. Zudem besaß der ETTh am C-Terminus 36 zusätzliche ASs (Lamhonwah und Tein, 2006). Wegen dieser starken Veränderungen des ETTh ist es sehr wahrscheinlich, dass diese eGFP-ETTh-Fusion in den MEF-3T3-Zellen nicht mehr richtig lokalisiert werden konnte und die Ergebnisse von Lamhonwah und Tein daher falsch sind (Gründemann, 2012). In der Tat wurde durch eGFP-Fluoreszenz-Detektion gezeigt, dass eGFP-Fusionsproteine des ETTh, in denen der ETTh unversehrt vorliegt und sich das eGFP am C-Terminus befindet, bei heterologer Produktion in HEK-293-Zellen ausschließlich in der Cytoplasmamembran zu finden waren (Bacher et al., 2009, Gründemann, 2012).

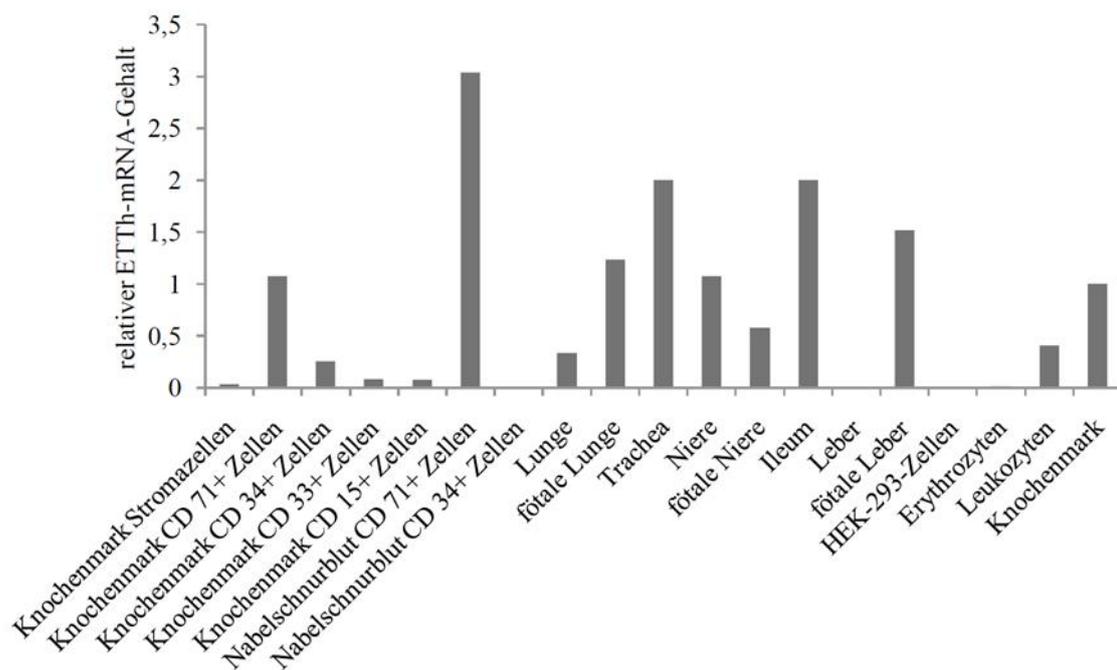
#### A.2.4.2 *Humanes Expressionsprofil*

Das Gen, das für den ETTh kodiert, wird im Menschen nicht ubiquitär exprimiert (Gründemann et al., 2005) (siehe Abbildung 5).

Im Folgenden wird auf ein *SLC22A4*-Expressionsprofil, das 2005 von Gründemann und Kollegen mittels quantitativer *Real-time*-PCR erstellt wurde, eingegangen (Gründemann et al., 2005) (siehe Abbildung 5): Es wurde ermittelt, dass das *SLC22A4*-Gen auffallend stark in CD71+ (*Cluster of Differentiation* 71+)-Zellen des Knochenmarks und des Nabelschnurblutes exprimiert ist. Das Oberflächenantigen CD71+ entspricht dem Transferrinrezeptor, der vor allem in Erythrozyten-Vorläuferzellen vorhanden ist, um Fe<sup>2+</sup>-Ionen für die Hämoglobinsynthese bereitzustellen (McAdams et al., 1998, Okumura et al., 1992). In reifen, kernlosen Erythrozyten konnte keine *SLC22A4*-mRNS mehr detektiert werden. Dennoch besitzen reife Erythrozyten ET. Die Konzentration liegt im Bereich von 0,1-1,0 mmol/l. Sie nimmt im Laufe der Lebensdauer von Erythrozyten nur minimal ab (Hartman, 1990, Chaudiere und Ferrari-Iliou, 1999). Im Gegensatz zu der fötalen Leber ist in der adulten Leber das *SLC22A4*-Gen nicht exprimiert. Vermutlich geht die starke *SLC22A4*-Transkription in der fötalen Leber, die das blutbildende Organ des Embryos ist, auf CD71+-exprimierende Zellen zurück. Im Vergleich zu CD71+-Zellen, konnten in CD15+-Zellen (Neutrophile und Eosinophile) und in CD34+-Zellen (Stammzellen und Blasten) des Knochenmarks nur wenige *SLC22A4*-Transkripte nachgewiesen werden. Ein eindeutigeres Signal konnte hingegen in peripheren Leukozyten detektiert werden. Tokuhiro und Kollegen konnten zeigen, dass *SLC22A4*-mRNS-Moleküle unter diesen in erster Linie in CD14+-Zellen vorkommen (Tokuhiro et al., 2003). Zu diesen CD14+-Zellen zählen Monozyten und Makrophagen. In Monozyten wurde ein hoher ET-Gehalt gemessen, woraus geschlossen werden kann, dass diese Immunzellen den ETTh exprimieren (Harlfinger, 2005) (siehe A.2.3). Für Makrophagen steht diese Messung noch aus. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass auch Makrophagen, die aus Monozyten heranreifen, den ETTh und somit auch ET besitzen (Gründemann et al., 2005). In der Trachea wurde ebenfalls eine hohe *SLC22A4*-Expression nachgewiesen. 2007 wurde von Horvath und Mitarbeitern, die indirekte Immunfluoreszenzfärbungen zur Detektion des ETTh an humanen Trachea-Gewebeschnitten durchgeführt hatten, angegeben, dass in das Trachea-Epithelium eingewanderte höchstwahrscheinlich inflammatorische Zellen den ETTh besitzen (Horvath et al., 2007). In Lymphknoten ist keine *SLC22A4*-mRNS vorhanden (nicht in Abbildung 5 gezeigt) (Gründemann et al., 2005). Eine hohe Expression des *SLC22A4*-Gens konnte neben den hier aufgeführten Blutzellen auch im

Dünndarm und in der Niere festgestellt werden. Dort ist der ETTh zur ET-Absorption bzw. ET-Retention dienlich (Gründemann, 2012). *SLC22A4*-mRNS ist auch im *Cerebellum* (nicht in Abbildung 5 gezeigt) und in der Lunge in hohen Mengen zu finden (Gründemann et al., 2005).

Von anderen Gruppen wurden zusätzlich das Herz, die Skelettmuskulatur und die Haut als *SLC22A4*-Expressionsorte beschrieben (Tamai et al., 1997, Markova et al., 2009). Von S. Golz, Mitarbeiter bei Bayer HealthCare, wurde ermittelt, dass das *SLC22A*-Gen im Gehirn nicht nur im *Cerebellum*, sondern auch in der *Substantia nigra*, im Frontallappen, im Temporallappen und in der *Pons* exprimiert ist (Bach, 2009).



**Abbildung 5: Gewebeverteilung der *SLC22A4*-mRNS**

Dargestellt ist der Gehalt der mRNS des *SLC22A4*-Gens in unterschiedlichen Zelltypen und Organen relativ zum Gehalt der mRNS des *SLC22A4* im Knochenmark. Die quantitative *Real-time*-PCR-Analyse wurde nach der TaqMan-Methode durchgeführt (Gründemann et al., 2005). Das Diagramm wurde aus der Doktorarbeit von Herrn M. Bach entnommen (Bach, 2009). Oberflächenantigenen: CD71+, Vorläuferzellen der Erythrozyten; CD33+, Promyelozyten; CD34+, Myeloblasten, CD15+, Neutrophile und Eosinophile

### A.2.5 Expressionsprofil verschiedener Spezies im Vergleich

Quantitative *Real-time*-PCR und indirekte Immunfluoreszenzfärbungen haben gezeigt, dass der ET-Transporter in der Niere und im Darm des Menschen, des Schweins, der Ratte, des Hühnchens, der Maus und des Zebrafischs exprimiert ist (Nikodemus et al., 2011, Pfeiffer, 2013, Tamai et al., 2004, Sugiura et al., 2010, Gründemann et al., 2005) (siehe

Abbildung 5). Dies deutet darauf hin, dass der ET-Transporter in allen Vertebraten die ET-Absorption und ET-Retention übernimmt. Die Expression des ET-Transporters in den Vorläuferzellen der Erythrozyten scheint ebenfalls - zumindest in allen Säugetieren - konserviert zu sein, was eine wichtige Rolle für ET in diesen impliziert (Gründemann, 2012).

Neben Gemeinsamkeiten gibt es aber auch große Unterschiede zwischen den Spezies. So konnte mittels quantitativer *Real-time-PCR* gezeigt werden, dass die *ET-Transporter*-mRNS in hohem Maße in der Leber der Ratte, nicht aber in der Leber des Menschen, des Schweins und des Zebrafischs vorhanden ist (siehe Abbildung 5) (Pfeiffer, 2013, Nikodemus et al., 2011, Gründemann et al., 2005). Zudem ist der Gehalt der *ET-Transporter*-mRNS im Auge des Schweins hoch, jedoch im Auge der Ratte sehr niedrig (Nikodemus et al., 2011). Weiter wurden speziesspezifische Unterschiede in den Bläschendrüsen entdeckt. So wurde mittels quantitativer *Real-time-PCR* ermittelt, dass der ET-Transporter in den Bläschendrüsen des Ebers auffallend hoch exprimiert ist, wohingegen in den Bläschendrüsen der Ratte keine *ET-Transporter*-mRNS detektiert werden konnte (Nikodemus et al., 2011). Diese Differenzen deuten drauf hin, dass die verschiedenen Spezies in unterschiedlichen Zusammenhängen von ET profitieren (Gründemann, 2012).

#### **A.2.6 Assoziation mit chronischen Entzündungserkrankungen**

Varianten des *SLC22A4*-Locus, der sich zusammen mit dem *SLC22A5*-Locus und dem hämatopoetischen Transkriptionsfaktor *RUNX1* (*Runt-related transcriptionfactor 1*) in dem Cytokin-Gencluster auf Chromosom 5q31 befindet, wurden mit den chronischen Entzündungserkrankungen rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht (Tokuhira et al., 2003, Gazouli et al., 2005, Russell et al., 2006, Peltekova et al., 2004, Waller et al., 2006). Für rheumatoide Arthritis wurde dieser Zusammenhang für eine japanische Kohorte, aber nicht für britische und spanische Kohorten, gefunden (Barton et al., 2005, Tokuhira et al., 2003, Martinez et al., 2006).

Die Assoziationen wurden aufgrund der Frequenz eines Einzelnukleotid-Polymorphismus im ersten Intron in Patienten mit rheumatoider Arthritis und aufgrund der Frequenzen eines exonischen Einzelnukleotid-Polymorphismus (1672C->T) in Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ermittelt (Tokuhira et al., 2003, Gazouli et al., 2005, Russell et al., 2006, Peltekova et al., 2004, Waller et al., 2006). Es ist nicht bekannt,

wie diese Mutationen im Transportergen zu der Entstehung dieser Erkrankungen beitragen können (Gründemann et al., 2005).

Der Einzelnukleotid-Polymorphismus in Intron 1 des *SLC22A4* befindet sich in der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor RUNX1. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass diese Mutation die Affinität des inhibitorischen RUNX1 Transkriptionsfaktors zur Bindungsstelle erhöht und so zu einer Erniedrigung der transkriptionellen Effizienz des *SLC22A4*-Gens führt. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus in dem *RUNX1*-Gen konnte in einer Fallkontrollstudie ebenfalls mit rheumatoider Arthritis assoziiert werden (Tokuhiro et al., 2003).

Die exonische Punktmutation an Position 1672 (C->T) führt zum Austausch von Leucin (503L) gegen Phenylalanin (503F) an der Position 503 (in der 11. Transmembranhelix) des Transporter-Proteins (siehe Abbildung 2). Die AS Leucin ist an dieser Position auch in den ET-Transportern der bis jetzt dahingehend untersuchten Spezies Maus (Isoleucin) und Zebrafisch vorhanden (Peltekova et al., 2004, Bach, 2009). Die evolutionäre Konservierung deutet darauf hin, dass dieses Leucin für die Funktion des ET-Transporters von großer Bedeutung ist. In der Tat wurde 2004 von Peltekova et al. berichtet, dass die 503F-Variante im Vergleich zur 503L-Variante in *in vitro*-Experimenten ein anderes Transportverhalten gegenüber den damals als Substrate betrachteten Substanzen TEA und CT aufwies. So wurde angegeben, dass die 503F-Variante das kationische Xenobiotikum TEA rund um den Faktor 4 besser transportierte. CT wurde hingegen rund um den Faktor 3 schlechter transportiert (Peltekova et al., 2004). Zudem wurde durch die 503F-Variante eine erhöhte Aufnahme einer Vielzahl weiterer kationischer Xenobiotika beobachtet (Peltekova et al., 2004). Das tatsächliche physiologische Substrat ET wurde erst 2005 entdeckt (Gründemann et al., 2005).

Die genaue Ursache von chronischen Entzündungserkrankungen ist unklar. Es wird davon ausgegangen, dass sie durch genetische Disposition zusammen mit äußeren Einflüssen erworben werden. An den chronischen Entzündungsprozessen dieser Erkrankungen sind Monozyten und Makrophagen beteiligt.

In Deutschland liegt die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr pro 100000 Einwohner für rheumatoide Arthritis bei 35-65, für Morbus Crohn bei 5,2 und für Colitis ulcerosa bei 3,0-3,9 und (Timmer, Breuer-Katschinski et al. 1999, Hermann 2000, Rosenbauer, Icks et al. 2002, Dignass, Preiss et al. 2011, Schneider, Lelgemann et al. 2011).

## A.3 Der Zebrabärbling *Danio rerio*

### A.3.1 Modellorganismus

Der Zebrabärbling, *Danio rerio* oder *Brachydanio rerio*, wurde erstmals 1822 von Hamilton beschrieben. Der Zebrabärbling ist ein tropischer Süßwasserfisch, der im Ganges und in dessen Zuflüssen beheimatet ist. Er gehört zu den karpfenartigen Fischen (*Cyprinidae*) (Hamilton, 1822). 1981 wurde von Georg Streisinger begonnen den Zebrabärbling als Modellsystem für die Wirbeltierentwicklung zu etablieren (Streisinger et al., 1981). Inzwischen wird der Zebrabärbling in vielen Wissenschaftsgebieten wie z.B. der Immunologie als wertvolles Modellsystem geschätzt (Lieschke und Trede, 2009, Yoder et al., 2002).

Der Zebrabärbling hat einige Vorzüge gegenüber anderen Vertebratenmodellen wie z. B. der Maus. So ist er wegen seiner geringen Größe (5-6 cm) einfach und kostengünstig zu halten, erzeugt viele Nachkommen (200-300 Eier/Weibchen/Woche) und seine Generationszeit ist mit drei Monaten sehr kurz. Wegen seiner schnellen, externen Entwicklung und seiner optischen Transparenz ist der Embryo perfekt geeignet, um die Bewegung, Wanderung und Morphologie von Zellen in Echtzeit und *in vivo* zu studieren. Bei Larven (ab 2 dpf, *days post fertilization*) kann die aufkommende Pigmentierung mit 1-Phenyl-2-thioharnstoff (PTU) unterdrückt werden. Aufgrund seiner externen Entwicklung ist der Zebrabärbling sehr zugänglich für genetische Manipulationen. So können mittels DNS (Desoxyribonukleinsäure)/mRNS-Mikroinjektionen in das Cytoplasma von Embryonen im Einzell-Stadium z. B. transgene Zebrabärbling-Reporterlinien hergestellt werden (siehe A.4). Überdies ist der sich entwickelnde Zebrabärbling in hohem Maße zugänglich für pharmakologische Manipulationen mittels Inkubation in Lösungen gewünschter Substanzen (Loynes et al., 2010).

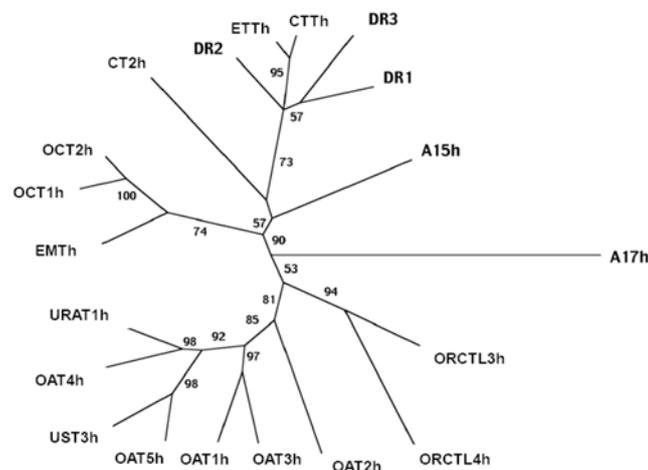
### A.3.2 Identifizierung des orthologen Ergothionein-Transporters

In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurde von M. Bach der ET-Transporter des Zebrabärblings identifiziert (Bach, 2009).

Hierfür wurde zunächst das Genom des Zebrabärblings nach Genen, die homolog zu den Genen der eng miteinander verwandten humanen Transporter ETT und CTT sind, durchsucht (siehe A.2.1). Es wurden drei Kandidatengene entdeckt, die zunächst als *dr1* (*Danio rerio*), *dr2* und *dr3* bezeichnet wurden. Diese Gene sind auf der Kopplungsgruppe

21 lokalisiert und direkt benachbart, wobei sich *dr1* 1544 bp stromaufwärts von *dr2* befindet („tail to head“-Orientierung) (Ensembl Danio rerio version – Zv9) (Bach, 2009).

Die Kandidatengene kodieren für Proteine mit einer Länge von 553 (DR1), 546 (DR2) und 549 (DR3) ASs. Der Stammbaum in Abbildung 6, der auf dem Alignment von AS-Sequenzen basiert, zeigt die Verwandtschaft der Kandidatenproteine mit den humanen Transportern der SLC22-Gruppe. Die Transporter DR1 und DR3 haben scheinbar einen gemeinsamen Ursprung, während sich der DR2 Transporter von diesen abgrenzt und enger mit dem ETTh verwandt zu sein scheint (Bach, 2009).



**Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum der SLC22-Familie**

Der Stammbaum, der von D. Gründemann erstellt und zur Verfügung gestellt wurde, basiert auf der Ähnlichkeit der AS-Sequenzen, die mit zunehmender Entfernung abnimmt. Die Kandidatenproteine für den orthologen ET-Transporter im Zebrafisch sind DR1, DR2 und DR3.

Die Transporter DR1, DR2 und DR3 weisen ähnlich hohe AS-Identitäten mit den Transportern ETTh und CTTh auf (siehe Tabelle 1). Deshalb konnten die Kandidatenproteine nicht sofort einem der humanen Transporter zugeordnet werden (Bach, 2009)

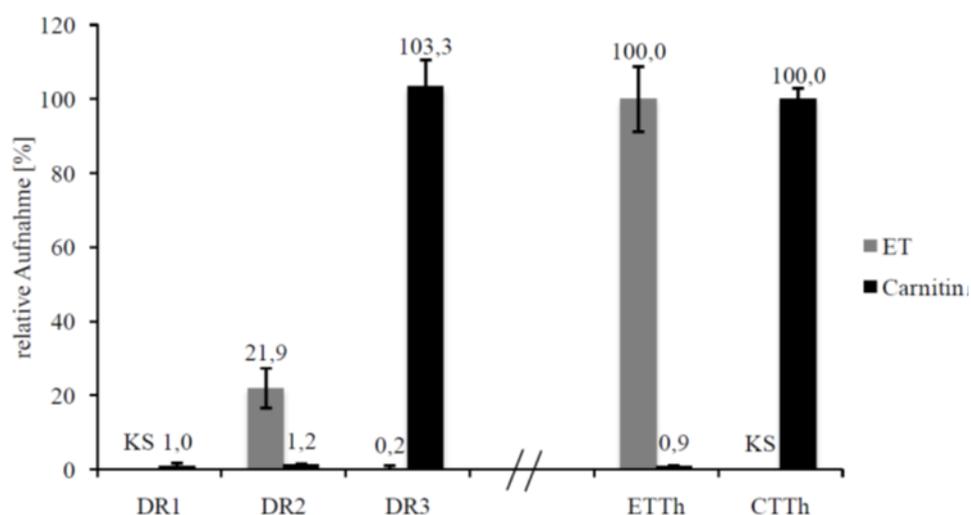
**Tabelle 1: AS-Identitäten der Kandidatenproteine mit ETTh bzw. CTTh (in %)**

	ETTh	CTTh
<b>Slc22a4</b>	65	64
<b>Slc22a5a</b>	58	58
<b>Slc22a5b</b>	60	61

Der ETTh und der CTTh besitzen trotz der hohen Verwandtschaft jeweils ein spezifisches Substrat, das der Andere nicht akzeptiert (siehe A.2.2). Durch diese

spezifischen Substrate konnten von M. Bach der orthologe ET-Transporter und der orthologe CT-Transporter des Zebrafischs identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte mittels heterologer Überexpression jeweils eines der drei Kandidatenproteine in HEK-293-Zellen und dem anschließenden Anbieten von ET bzw. CT als Substrat. Der DR2 Transporter konnte eindeutig als ET-Transporter des Zebrafischs identifiziert werden. Dieser Transporter wurde daher in dieser Arbeit als Slc22a4 Transporter bezeichnet. Das Kandidatenprotein DR3 wurde als der orthologe Transporter zu CTTh ausgemacht. Daher wurde der DR3 Transporter in dieser Arbeit als Slc22a5 Transporter bezeichnet. Das Protein DR1 transportiert weder ET noch CT (Bach, 2009) (siehe Abbildung 7). Bis heute konnte diesem Transporter kein Substrat zugeordnet werden. Da der DR1 Transporter enger mit dem DR3 Transporter als mit dem DR2 Transporter verwandt ist, wurde dieses Transporter-Protein als Slc22a5b Transporter bezeichnet (DR3 dann Slc22a5a) (siehe Abbildung 6). Eine Analyse der AS-Sequenzen der Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b ergab, dass diese eine zu dem ETTh und dem CTTh vergleichbare Membrantopologie besaßen (Bach, 2009) (siehe A.2.1). Die cDNS-Sequenzen der drei Transporter wurden noch nicht in die öffentlichen Datenbanken eingetragen.

Der ET-Transporter des Zebrafischs ist wie der ETTh  $\text{Na}^+$ -abhängig und stellt wie der ETTh einen Biomarker für ET dar (Bach, 2009) (siehe A.2.2 und A.2.3).



**Abbildung 7: Relative Transporteffizienz der Transporter-Kandidaten**

Dargestellt sind die relativen Transporteffizienzen von ET und CT durch die Transporter DR1 (Slc22a5b), DR2 (Slc22a4), DR3 (Slc22a5b), ETTh und CTTh in stabil transfizierten HEK-293-Zellen. Die spezifischen Transporteffizienzen der Zebrafischproteine wurden auf die Transporteffizienz von ET bzw. CT der humanen Transporter normiert (100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung des Mittelwerts (n=3). KS, Kein Signal (Die Abbildung und die Legende stammen aus (Bach, 2009).)

### A.3.3 Expressionsprofil des orthologen Ergothionein-Transporters

In zwei vorangegangenen Doktorarbeiten wurden von M. Bach und C. Pfeiffer *slc22a4*-Transkripte mittels quantitativer *Real-time*-PCR und RT (reverse Transkriptase)-PCR in der Haut, im Darm, in der Niere, im Auge und im Gehirn (Gehirn > Haut > Auge), nicht aber in der Leber, im Herz, im Muskel, in den Kiemen und in der Milz nachgewiesen. In allen Organen, in denen das *slc22a4*-Gen transkribiert wird, konnte mittels LC-MS/MS- (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*)-Techniken ET nachgewiesen werden. Den höchsten ET-Gehalt weist die Haut auf (Haut > Darm > Auge > Gehirn). In den Organen, die keine *slc22a4*-mRNS besitzen, wurde kein ET nachgewiesen (Pfeiffer, 2013, Bach, 2009).

Mittels mRNS *in situ* Hybridisierungen konnte von M. Bach gezeigt werden, dass das *slc22a4*-Gen von 6 hpf (*hours post fertilization*) bis einschließlich 24 hpf ubiquitär exprimiert wird. Erst ab 2 dpf konnte eine Zuordnung der Färbung zu bestimmten Geweben/Organen vorgenommen werden. So konzentrierte sich 2 dpf die Anfärbung auf den Kopfbereich und auf eine Zellanhäufung auf dem Dottersack (siehe Abbildung 20 C). 5 dpf konnte die *slc22a4*-mRNS im Darm und im Auge detektiert werden. Mittels *slc22a4*-mRNS *in situ* Hybridisierungen konnte jedoch keine Einzelzellauflösung erreicht werden, da das Signal zu schwach war. Im adulten Zebrabärbling konnte mittels mRNS *in situ* Hybridisierung keine Anfärbung erreicht werden, obwohl sowohl ET als auch *slc22a4*-mRNS in den Organen in hohem Maße vorhanden sind (Bach, 2009).

Um *slc22a4*-exprimierende und somit ET-haltige Zellen mit Einzelzellauflösung identifizieren zu können, wurde von M. Bach 2009 der Versuch unternommen, mit dem Ac/Ds (*Activator/Dissociation*)-Transposon-System eine *Tg(sl22a4:eGFP)*-Zebrabärblinglinie herzustellen (Emelyanov et al., 2006). In dieser Zebrabärblinglinie wären alle *slc22a4*-exprimierenden Zellen mit eGFP im Cytosol markiert. Der Promotor des *slc22a4*-Gens ist nicht bekannt. Als möglicher Promotor des *slc22a4*-Gens wurde zur Herstellung dieser Zebrabärblinglinie von M. Bach der 1544 bp (Basenpaare) lange Bereich zwischen dem *slc22a5b*-Gen und dem *slc22a4*-Gen gewählt und vor das *eGFP*-Gen in den Ac/Ds-Transposonvektor pMDS\_*eGFP* gesetzt (Emelyanov et al., 2006) (siehe A.3.2). Nach Injektion des konstruierten Transposonvektors in das Cytoplasma von Embryonen im Einzell-Stadium konnte jedoch keine eGFP-Fluoreszenz in den sich entwickelnden Zebrabärblingen detektiert werden. Daher wurde gefolgert, dass der

intergene Bereich nicht den vollständigen Promotor des *slc22a4*-Gens abbildet, der die *eGFP*-Expression antreiben hätte können. Es fehlten regulatorische Elemente. Um den Promotor des *slc22a4*-Gens vollständig abzubilden, muß der Bereich genomischer DNS um das ATG des *slc22a4*-Gens herum daher erweitert werden. Aus Zeitgründen konnte von M. Bach diese Erweiterung nicht durchgeführt werden und somit konnte von ihm keine transgene eGFP-Zebrabärbling-Reporterlinie etabliert werden (Bach, 2009).

#### A.3.4 Der ET-defiziente *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrabärbling

Die AG von D. Gründemann ist in Besitz von *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrabärblingen (*ipk*, Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln; *1Tg*, *first transgenic line*). In diesen Zebrabärblingen ist eine ca. 5,2 kb (Kilo-Basenpaare) lange Virusinsertion 351 bp vom Startcodon des *slc22a4*-Gens (in 3'-Richtung) entfernt in das Genom integriert. Diese Virusinsertion trägt nach 171 bp ein Stopcodon, das den offenen Leserahmen unterbricht (Amsterdam und Hopkins, 2006, Jao et al., 2008). Somit wird ein stark verkürzter Slc22a4 Transporter, der noch bis einschließlich zur 69. AS der größten extrazellulären Schleife translatiert wird, produziert (siehe Abbildung 2). Zusätzlich enthält dieses Proteinfsegment ASs, die auf die DNS-Sequenz des Virus zurückgehen. Da *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrabärblinge kein ET besitzen, kann angenommen werden, dass dieses verkürzte Protein nicht funktionsfähig ist und es sich bei dem Slc22a4 Transporter um den einzigen ET-Transporter im Zebrabärbling handelt. Die *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrabärblinge erscheinen äußerlich wie Wildtyp (Wt)-Zebrabärblinge (Bach, 2009).

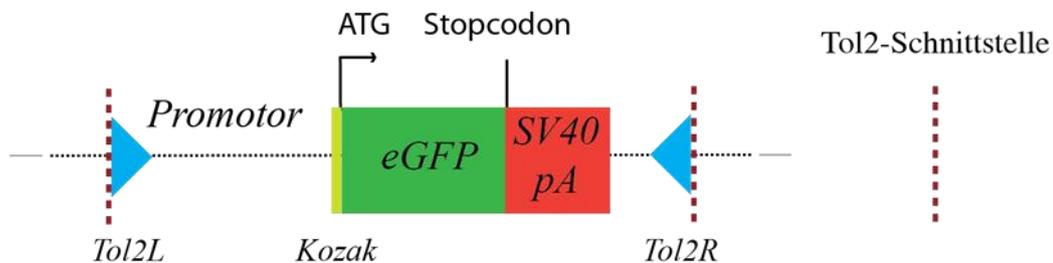
#### A.4 Erzeugung von eGFP-Zebrabärbling-Reporterlinien mit dem Tol2-Transposon-System

Mit einer eGFP-Reporterlinie kann die Expression eines gewünschten Gens im Organismus sichtbar gemacht werden.

Eine Möglichkeit zur Herstellung einer eGFP-Reporterlinie im Zebrabärbling bietet das Tol2-Transposon-System. Es basiert auf einem mobilen genetischen Element, dem Tol2-Transposon, das aus dem Reiskärpfling Medaka (*Oryzia latipes*) stammt (Koga et al., 1996, Urasaki et al., 2006). Das Tol2-Transposon gehört zu der Familie der *hAT* (*hobo/Ac/Tam3*)-Transposons (Koga et al., 1996).

Zur Etablierung einer stabil transgenen eGFP-Zebrabärbling-Reporterlinie mit dem Tol2-Transposon-System wird ein Tol2-*eGFP*-Transposonvektor benötigt, in dem sich das *eGFP*-Gen unter der Kontrolle des Promotors des gewünschten Gens befindet. Die

Elemente eines Promotors können weit verstreut über längere Distanzen (bis über 100 kb) liegen und können sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts des Gens lokalisiert sein (Zhang et al., 2007). Zudem müssen der Promotor und das *eGFP*-Gen von Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase flankiert sein (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Beispiel für einen Tol2-*eGFP*-Transposonvektor**

Dargestellt ist ein Beispiel für einen Tol2-*eGFP*-Transposonvektor. In diesem ist die Einheit aus Promotor, Kozak-Sequenz, *eGFP*-Gen und SV40 pA von Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase (Tol2R (150 bp), Tol2L (200 bp)) flankiert (Urasaki et al., 2006). pA, Polyadenylierungssignal; SV40, Simian-Virus 40; Tol2, Transposon *Oryzias latipes* 2; Tol2L, linkes Ende des *Tol2-Transposase*-Gens; Tol2R, rechtes Ende des *Tol2-Transposase*-Gens

Der Tol2-*eGFP*-Transposonvektor wird zusammen mit der *Tol2-Transposase*-mRNS in das Cytoplasma von Embryonen im Einzell-Stadium injiziert. Die im Cytosol synthetisierte Tol2-Transposase schneidet den Expressionsvektor an ihren Erkennungsstellen und katalysiert die ungerichtete Integration des Promotors zusammen mit dem *eGFP*-Gen in das Genom. Die *Tol2-Transposase*-mRNS wird nach einiger Zeit abgebaut und der Zebrafisch selbst besitzt keine Tol2-Transposase. So wird nach der Integration des Transgens dieses nicht wieder aus dem Genom entfernt. Falls sich das *eGFP*-Gen unter der Kontrolle eines vollständigen Promotors befindet, ist in den injizierten Embryonen eine mosaikartige cytosolische eGFP-Fluoreszenz, die in etwa das endogene Expressionsmuster des gewünschten Gens widerspiegelt, zu beobachten (transiente Transgenese). Die injizierten Embryonen werden großgezogen und mit Wt-Zebrafischen gekreuzt. Ist das Transgen in das Genom der Keimbahn integriert, zeigen die Nachkommen ein nicht-mosaikartiges eGFP-Fluoreszenzmuster (stabile Transgenese) (Suster et al., 2009a). Mit dem Tol2-Transposon-System kann eine Transgeneserate von über 50 % erreicht werden (Suster et al., 2011).

Beispiele für transgene Zebrafischlinien, die mit dem Tol2-Transposon-System hergestellt wurden, sind die *Tg(lysC:eGFP)*-, die *Tg(mpeg1:eGFP)*-, die *Tg(myd88:eGFP)*- und die *Tg(runx1P1:eGFP)*-Linie (*lysC*, Lysozym C; *mpeg1*, macrophage expressed gene 1; *myd88*, myeloid differentiation response gene 88; *runx1P1*,

---

*runt-related transcription factor 1-Promoter 1*) (Lam et al., 2009, Ellett et al., 2011, Hall et al., 2009, Hall et al., 2007).

## A.5 Ziel der Doktorarbeit

Obwohl ET bereits vor über hundert Jahren entdeckt wurde, konnte seine physiologische Rolle noch nicht aufgeklärt werden (Tanret, 1909). Der ETTh bewirkt eine Akkumulation von ET in hohen Maßen in Monozyten und daher vermutlich auch in Makrophagen, die aus Monozyten hervorgehen (siehe A.1 und A.2.4.2). Dies deutet auf eine bedeutende Rolle von ET im Immunsystem hin, wofür auch spricht, dass Varianten des *ET-Transporter*-Gens bei chronischen Entzündungserkrankungen auftreten können (siehe A.2.6).

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Zebrafisch *Danio rerio* als Modellorganismus für die Untersuchung der physiologischen Funktion von ET zu etablieren. Hierfür ist es essentiell, die exakten Funktionsorte von ET zu bestimmen. Für diese Bestimmung kann genutzt werden, dass der *Slc22a4* Transporter einen Biomarker für eine ET-Akkumulation/Aktivität darstellt (Gründemann, 2012) (siehe A.2.3). Bisher konnte die An- bzw. die Abwesenheit von ET im Zebrafisch direkt mittels LC-MS/MS-Messungen und indirekt durch den Nachweis von *slc22a4*-Transkripten mittels quantitativer *Real-time*-PCR und RT-PCR nur bezogen auf ganze Organe ermittelt werden (Bach, 2009, Pfeiffer, 2013) (siehe A.3.3). Deshalb sollte hier ein Werkzeug zur erstmaligen Erfassung ET-haltiger Zellen mit Einzelzellauflösung im Zebrafisch hergestellt werden. Mit diesem Werkzeug sollten anschließend die ET-haltigen Zellen im gesamten Zebrafisch identifiziert werden.

Zu diesem Zweck sollte eine transgene Zebrafisch-Reporterlinie erzeugt werden, die cytoplasmatisch lokalisiertes eGFP unter der Kontrolle des Promotors des *slc22a4*-Gens exprimiert (siehe A.4). In der Vergangenheit wurde bereits der Versuch unternommen diese *Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie herzustellen. Damals wurde ein 1544 bp langer Bereich, der sich unmittelbar stromaufwärts des Translationsstartpunkts des *slc22a4*-Gens befindet, als potentieller Promotor verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieses DNS-Stück den Promotor des *slc22a4*-Gens nicht vollständig abbildete und daher keine *eGFP*-Expression in Zebrafischen antreiben konnte (siehe A.3.3). Deshalb sollte in dieser Doktorarbeit als putativer Promotor ein größerer DNS Bereich, der das ATG des *slc22a4*-Gens umgibt, verwendet werden. Hierzu sollte mittels *Recombination-mediated genetic engineering (Recombineering)* das erste Exon des *slc22a4*-Gens des Inserts (36295

bp genomischer Zebrabärbling DNS) des Fosmids *CH1073-409B12* gegen eine *eGFP*-Reportergekassette ausgetauscht werden. Das Fosmid *CH1073-409B12* beinhaltet einen Teil des *slc22a4*-Gens und 26313 bp genomischer DNS, die sich stromaufwärts des Startcodons des *slc22a4*-Gens befinden. Das *Recombineering* sollte hier etabliert werden. Als Alternative zur *eGFP*-Reporterlinie sollten ET-haltige Zellen durch den immunhistochemischen Nachweis des Slc22a4 Transporters identifiziert werden. Die hierfür benötigten Antikörper sollten hier produziert werden.

Falls entdeckt wird, dass der ET-Transporter wie beim Menschen in Monozyten und Makrophagen vorhanden ist, können dann in nachfolgenden Arbeiten die Folgen eines ET-Mangels in diesen Immunzellen im Zebrabärbling untersucht werden. Die Zebrabärbling-Larve eignet sich aufgrund ihrer optischen Klarheit und geringen Größe perfekt dazu, um in ihr das Verhalten von Makrophagen und Monozyten *in vivo* zu beobachten. In Larven einer *Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie könnte dieses Verhalten mittels Zeitrafferaufnahmen unter Verwendung eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops festgehalten werden (siehe A.3.1). Derartige intravitale Zeitrafferaufnahmen sind in anderen Vertebratenmodellen wie z. B. der Maus nur sehr schwer möglich. Es besteht die Möglichkeit, dass ein ET-Mangel in Monozyten und Makrophagen erst sichtbar wird, wenn ein entsprechender Stress ein Eingreifen von ET notwendig macht (siehe A.1). Für diesen Fall können die Zebrabärbling-Larven Stress ausgesetzt werden, indem diese einfach in Lösungen schädlicher Substanzen inkubiert werden (siehe A.3.1) (Loynes et al., 2010). In anderen Vertebratenmodellen wie z. B. der Maus Stress zu induzieren, wäre viel aufwendiger.

## **B Material**

### **B.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Die hier aufgeführten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in Analysequalität von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Glas- und Plastikgefäße wurden von den Firmen Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und VWR International (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Spritzenvorsatzfilter zur Sterilfiltration wurden von der Firma VWR International (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Alle Materialien wurden vor dem Gebrauch unter 1,2 bar bei 121 °C in Wasserdampf für 20 min in einem Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland) autoklaviert. Alle Glasgefäße wurden vor dem Gebrauch 4 h in einem Heißluftsterilisator (Typ T12, Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland) bei 200 °C gehalten.

### **B.2 Lösungen und Puffer**

Sämtliche Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit hochentsalztem MilliQ-Wasser (Labor-Ultrareinstwasser-Reinigungsanlage, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) angesetzt.

#### **10 x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)**

NaCl	100 mM
KCl	19,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	59 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11 mM

Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

**PBT (phosphatgepufferte Tween®20-haltige Salzlösung)**

0,1 % Tween in 1 x PBS

**10 x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)**

NaCl 1,5M

Tris-HCl 500mM

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

**TBT (Tris-gepufferte Triton™X-100-haltige Salzlösung)**

0,1 % Triton™X-100 in 1 x TBS

**16 % PFA (Paraformaldehyd; Stammlösung)**

16 % PFA (w/v) in PBS

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert. Die Lösung ist ca. zwei Wochen haltbar. Um 4 %iges PFA herzustellen, wurde die 16 %-Stammlösung mit dem entsprechenden Volumen an 1 x PBS verdünnt.

Sonstige Puffer und Lösungen sind am Ende der jeweiligen Methode aufgeführt (siehe C).

**B.3 Enzyme und Reaktionssysteme**

*Tabelle 2: DNS-modifizierende Enzyme*

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase (CIAP, <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> )	Promega, Madison, WI, USA
T4-DNS-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
T4-RNS-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen, die im Folgenden aufgelistet sind, wurden von MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland) bezogen: BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, NheI, NotI, SacII, SacI, XhoI

*Tabelle 3: Enzyme für die PCR und die Sequenzierung*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
High fidelity PCR-Mix	MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
BigDye® Terminator Mix v 1.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

*Tabelle 4: Enzyme für die RNS-Isolation und die cDNS-Synthese*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
RNSase-Inhibitor	MBI-Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

*Tabelle 5: N-Glykosidase*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
PNGase F (Protein N-Glykosidase F)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

*Tabelle 6: Reaktionssysteme*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, St. Leon Rot, Deutschland
NucleoBond®Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit	Ambion, Darmstadt, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Oligotex Direct mRNS-Kit	Qiagen Hilden, Deutschland
BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
5'-Race Core Set-Kits	TaKaRa Bio Inc. Otsu, Shiga, Japan

---

## B.4 Nukleinsäuren

### B.4.1 Längenstandards

*Tabelle 7: DNS- und RNS-Längenstandards*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
GeneRuler™ 1kb DNS Marker (DNS-Leiter) (250 bp-10 kb)	Promega, Madison, WI, USA
RNS-Längenstandard (0,5 bp-110 kb)	Carlsbad, CA, USA

---

## B.4.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen, in MilliQ-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 8: Primer I**

Primer zur Sequenzierung des intergenen Bereichs zwischen <i>slc22a5b</i> und <i>slc22a4</i>	
Sequenzierprimer I	5' cttaggctgaggag 3'
Sequenzierprimer II	5' caacactgtctaataattaa 3'
Sequenzierprimer III	5' ctgctgccgttag 3'

**Tabelle 9: Primer II**

Primer zur Amplifikation des Bereichs zwischen <i>slc22a5b</i> und <i>slc22a4</i>	
Vwpr.-1 (bindet in <i>slc22a5b</i> )	5' gttctgcaggaag 3'
440 bp	
Rwpr.-1	5' atattcccatgagc 3'
Vwpr.-2 (Komplement zu Rwpr.-1)	5' gctcatgggaatat 3'
1160 bp	
Rwpr.-2 (bindet in <i>slc22a4</i> )	5' ctccaggactac 3'

Vwpr., Vorwärtsprimer; Rwpr., Rückwärtsprimer

**Tabelle 10: Primer III**

Primer zur Amplifikation der homologen Arme zur Konstruktion des „pCS2+_h.5'Arm_eGFP_FRTKanFRT_h.3'Arm“	
Vwpr.-h. 5'-Arm mit HindIII	5' agaaagcttgatgaagatgatcagtat 3'
261 bp	
Rwpr.-h. 5'-Arm mit EcoRI	5' tcggaattcagcagccgaatgaagagc 3'
Vwpr.-h. 3'-Arm mit SacII	5' agagggcccgtgcgtgtctgcggttat 3'
285 bp	
Rwpr.-h. 3'-Arm mit KpnI	5' tgcggtaccgctgatctcacatacatg 3'

**Tabelle 11: Primer IV**  
**Primer zur Sequenzierung von**  
**„Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRTKanFRT“**

5' gaacactctcagagatg 3'

**Tabelle 12: Primer V**  
**Primer zur Amplifikation der homologen Arme zur Konstruktion des**  
**„pBSK+\_h.3'Arm\_h.5'Arm\_iTol2Kan“**

Vwpr.-h. 5'-Arm mit NotI	5' agagcggccgcgcggaagccatcatca g 3'	293 bp
Rwpr.-h. 5'-Arm mit BamHI	5' tgcggatcccacgacctgcgtattgtcc 3'	
Vwpr.-h. 3'-Arm mit SacI	5' agagagctcgtgctgaagccgttc 3'	296 bp
Rwpr.-h. 3'-Arm mit NotI	5' agagcggccgcaagagccgtttgac 3'	

**Tabelle 13: Primer VI**  
**Primer zur Sequenzierung von**  
**„pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT“**

5' cagtgaattgtaatacgac 3'

**Tabelle 14: Primer VII**  
**Primer für den Tol2-excision assay**

Vwpr. PCR	5' agccgaactgttcgcca 3'	492 bp
Rwpr. PCR	5' ccatctgttcaatcatgcg 3'	
Vwpr. zum Vektornachweis	5' gccgtgatgaaatcaacaac 3'	313 bp
Rwpr. zum Vektornachweis	5' taggttcagggttaagc 3'	

**Tabelle 15: Primer VIII**  
**Primer zur Amplifikation des/der**

<b><i>slc22a4</i>-cDNS-Fragments</b>		
Vwpr.- <i>slc22a4</i>	5' gtcagcgggtggagggtgc 3'	413bp
Rwpr.- <i>slc22a4</i>	5' ctgacctcgcactctctgga 3'	
<b><i>β-Aktin</i>-cDNS-Fragments</b>		
Vwpr.- <i>β-Aktin</i>	5' ggcatcctcacctgaagta 3'	203 bp
Rwpr.- <i>β-Aktin</i>	5' ggggtgtgaaggctcaaa 3'	
<b><i>cDNS der größten extrazellulären Schleife des slc22a4</i></b>		
Vwpr. mit <b>NheI</b>	5' cccgctagcggccatcactgccgga 3'	313 bp
Rwpr. mit <b>XhoI</b>	5' tccctcgagcagtggagattccag 3'	
<b><i>cDNS der größten extrazellulären Schleife des slc22a5a</i></b>		
Vwpr. mit <b>NheI</b>	5' agagctagcggctcacgagtgtctg 3'	315 bp
Rwpr. mit <b>XhoI</b>	5' agactcgagggtgagcgggccttatact 3'	
<b><i>cDNS der größten extrazellulären Schleife des slc22a5b</i></b>		
Vwpr. mit <b>NheI</b>	5' agagctagcggcgcaccgctgccgtg 3'	307 bp
Vwpr. mit <b>XhoI</b>	5' agactcgagcaacgggaccctccac 3'	

**Tabelle 16: Primer IX**  
**Primer zur Amplifikation des sCMV IE94-Promotors**

Vwpr. mit <b>SacI</b>	5' cgaattggacgaccatagccaatt 3'	1005bp
Rwpr. mit <b>EcoRI</b>	5' agatgaattcgttcctaaacgagcat 3'	

**Tabelle 17: Primer X**  
**Primer für die 5'RACE-PCR**

Phosphorylierter Primer	5' cgaacacaccaagtc 3'	
1. Vwpr.	5' gagacgctgaacctgacg 3'	
		447 bp
1. Rwpr.	5' gtcaccaggaacacgatgg 3'	
2. Vwpr. mit <b>NotI</b>	5' agagcggccgctgacggcgggctggagaaacgcgtctg 3'	
		336 bp
2. Rwpr. mit <b>XhoI</b>	5' agactcgagcaggaacgcggttgc 3'	
Sequenzierprimer	5' agagcggccgctgacggcgggctggagaaacgcgtctg 3'	

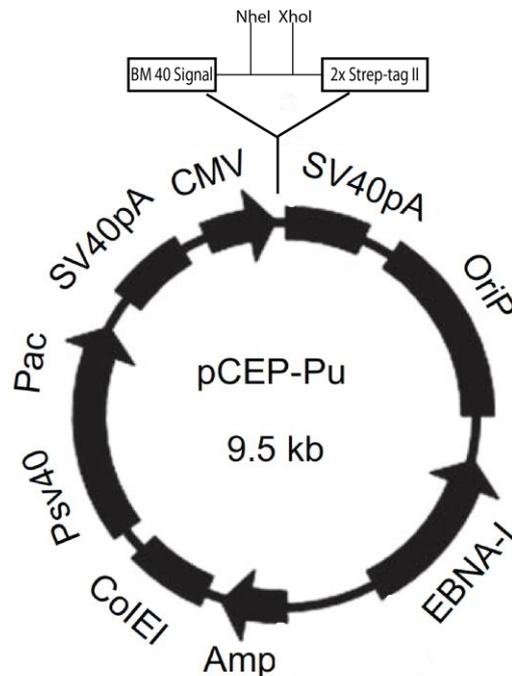
### B.4.3 Vektoren

#### pBSK+ (pBlueskriptII-SK+)

Dieser Vektor wurde von Stratagene (Cedar Creek, Texas, USA) gekauft. Dieser Vektor ist wegen seiner großen Polylinkerregion ein beliebter Klonierungsvektor. Der pBSK+-Vektor besitzt ein *Ampicillinresistenzgen*.

#### pCEPPu\_BM40SP\_C-2x-Strep-Tag II

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. R. Wagener zur Verfügung gestellt. Der Vektor pCEPPu\_BM40SP\_C-2x-Strep-Tag II ist ein eukaryotischer Expressionsvektor mit konstitutiv-aktivem-Promotor, der eine Polylinkerregion beinhaltet, die 5'-terminal von der kodierenden Sequenz für das BM40-Signalpeptid (BM40SP) und 3'-terminal von der kodierenden Sequenz für den 2x-Strep-Tag II eingeschlossen ist. Dieser Vektor ermöglicht die Überexpression und das anschließende Ausschleusen von C-terminalen 2x-Strep-Tag II-Fusionsproteinen aus z. B. HEK-293-EBNA-Zellen (siehe B.7). Hierfür muss zuvor das gewünschte Gen in die Polylinkerregion eingefügt werden. Der Vektor besitzt ein *Kanamycinresistenzgen* und ein *Puromycinresistenzgen* (Gara et al., 2008, Kohfeldt et al., 1997, Gebauer et al., 2008) (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Veränderter pCEPPu-Expressionsvektor**

(Abbildung wurde aus (Sun et al., 2009) entnommen und verändert.)

#### **pcmlc2:eGFP (pDestTol2CG)**

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. Löhner aus der AG von Prof. Dr. M. Hammerschmidt zur Verfügung gestellt. Der Vektor beinhaltet eine *cmlc2:eGFP*-Expressionskassette. Diese Kassette umfasst einen 900 bp großen Enhancer-Promotor des *cardiac myosin light chain (cmlc2)*-Gens, der die Expression cytoplasmatischer eGFPs in sich entwickelnden Herzmuskelzellen des Zebrafisches antreibt. Diese Kassette ist von *Tol2*-Erkennungsstellen flankiert. Der Vektor enthält ein für diese Arbeit nicht relevantes Insert. Der Vektor besitzt ein *Ampicillinresistenzgen* (Kwan et al., 2007, Huang et al., 2003, Auman et al., 2007).

#### **pCS2+<sub>2</sub>eGFP**

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von der AG von Prof. Dr. M. Leptin zur Verfügung gestellt. Der Vektor pCS2+<sub>2</sub>eGFP beinhaltet das *eGFP*-Gen (mit vorangestellter Kozak-Sequenz: GCCACC) das 5'-terminal von einer Polylinkerregion und 3'-terminal von einem SV40-Polyadenylierungssignal (SV40 pA) eingeschlossen ist. Auf das SV40-pA folgt eine weitere Polylinkerregion. Auf die 5' terminale Polylinkerregion folgt ein *simian CMV (Cytomegalievirus; sCMV) IE94*-Promotor. Der Vektor besitzt ein *Ampicillinresistenzgen* (Dieser Vektor basiert auf dem Vektor pCS2+ (Rupp et al., 1994)).

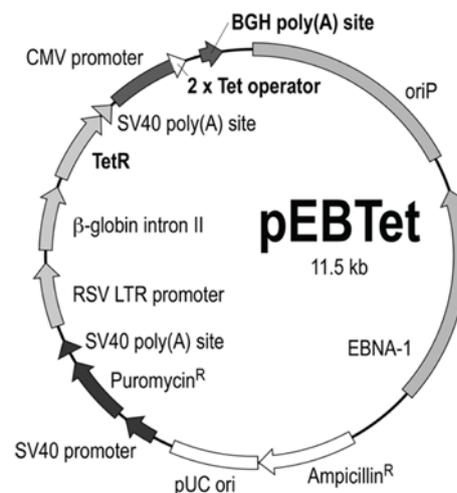
### pDB600

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. S. Ekker zur Verfügung gestellt. Der Vektor pDB600 beinhaltet das *Tol2-Transposase*-Gen gefolgt von einem SV40-pA. Dieser Vektor ermöglicht nach einer Linearisierung mit XbaI die *in vitro*-Transkription der *Tol2*-mRNS mit der SP6-RNS-Polymerase (siehe C.1.1.1 und C.3.2.1). Der Vektor besitzt ein *Ampicillinresistenzgen* (Balciunas et al., 2006).

### pEBTetD\_*slc22a4-eGFP*, pEBTetD\_*slc22a5a-eGFP* und pEBTetD\_*slc22a5b-eGFP*

(Diese Vektoren sind in der AG von D. Gründemann konstruiert worden.)

Diese Vektoren sind eukaryotische und episomale Expressionsvektoren, die die Gene für die C-terminalen eGFP-Fusionsproteine der Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b z. B. in HEK-293-EBNA-Zellen exprimieren können. Die Expression wird von einem CMV-Promotor angetrieben und muss mit der Substanz Doxzyklin induziert werden (Bach et al., 2007, Bach, 2009) (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: pEBTet-Expressionsvektor**

Dargestellt ist eine Schemazeichnung des Expressionsvektors pEBTet. Die funktionellen Elemente und deren Orientierung sind mit Pfeilen dargestellt. Der pEBTetD-Expressionsvektor unterscheidet sich von dem pEBTet-Expressionsvektor durch das Fehlen der BGH-pA. Die Abbildung wurde aus der Doktorarbeit von M. Bach entnommen und verändert (Bach, 2009). BGH, *bovine growth hormone*

### pIGCN21

Dieser Vektor ist wurde von Neal Copeland, *Frederick National Laboratory for Cancer research*, Maryland, USA

(<http://ncifrederick.cancer.gov/research/brb/recombineeringInformation.aspx>) erhalten.

Dieses Plasmid besitzt ein *Kanamycinresistenzgen*, das von FRT (*FLP(Flippase)-Recognition Target*)-Stellen flankiert ist. Zusätzlich besitzt dieser Vektor ein *Ampicillinresistenzgen* (Lee et al., 2001).

### pCR8GW\_TOPO\_iToL2Kan

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. K. Kawakami zur Verfügung gestellt. Der Vektor beinhaltet ein *Kanamycinresistenzgen* flankiert von invertierten Erkennungsstellen (Tol2L und Tol2R; iToL2Kan-Kassette) für die Tol2-Transposase. Zusätzlich besitzt dieser Vektor ein *Spectinomycinresistenzgen* (Suster et al., 2009b) (siehe Abbildung 16).

Die Namen aller Vektoren, die in dieser Doktorarbeit konstruiert wurden, wurden in Anführungszeichen gesetzt.

## B.5 Antikörper

**Tabelle 18: Antikörper**

Antikörper	Einsatz	Verdünnung	Bezugsquelle
M-anti-GES	IHC an Ze./G.	1: 1000/1:5000-1:50	eigene Herstellung/Pineda Antikörper Service
K-anti-GES	IHC an Ze./G.	1: 7000/1:5000-1:50	eigene Herstellung/Pineda Antikörper Service
M-anti-NES	IHC an Ze./G.	1:3000/1:5000-1:50	eigene Herstellung/Pineda Antikörper Service
K-anti-NES	IHC an Ze./G.	1:3000/1:400	eigene Herstellung/Pineda Antikörper Service
HRP Ma-anti-Strep-Tag II	WB	1:500	Dako Cytomation
K-anti-GFP	IHC	1:400	Prof. Dr. S. Korsching/Invitrogen
Alexa 594 Z-anti-K-IgG	IHC	1:700	Invitrogen
Alexa 594 Z-anti-M-IgG	IHC	1:1000	Invitrogen
HRP K-anti-M-IgG	ELISA	1:10000	Sigma-Aldrich
HRP S.-anti-K-IgG	ELISA/IHC	1:2000	Dako Cytomation

ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; G., Gewebeschnitt; HRP, *Horseradish Peroxidase*; IHC, Immunhistochemie; K, Kaninchen; M, Meerschweinchen; Ma, Maus; S., Schwein; WB, Western-Blot; Z, Ziege; Ze., Zellkultur

## B.6 Bakterienstämme

Es wurden folgende *E.coli*-Stämme verwendet:

### DH 10B

Diese Bakterien wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) gekauft.

Genotyp: *F-mcrA-(mrr-hsRMS-, mcrBC)-80dlacZ-M15-lacX74 deoR recA1 endA1 araD139-(ara, leu)7649 ga/Uga/K rspL nupG*; (Liu et al., 2003).

### SW105

Diese Bakterien wurden von Neal Copeland, *Frederick National Laboratory for Cancer research*, Maryland, USA

(<http://ncifrederick.cancer.gov/research/brb/recombineeringInformation.aspx>) erhalten.

Diese Bakterien besitzen im Genom einen defekten  $\lambda$  Prophagen ( $\lambda$ -Miniphage), der die *red*-Rekombinationsgene (*exo*, *bet* und *gam*) besitzt. Die Transkription dieser Gene wird von dem temperatursensitiven Repressor *cI857* kontrolliert. Zusätzlich kann in diesen Bakterien die Expression des *Flippase (FLP)*-Gens mittels Arabinose induziert werden (siehe C.1.1.10).

Genotyp: *F- mcrA Delta (mrr-hsdRMS-mcrBC) Phi 80dlacZ M15 Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Delta (ara, leu) 7649 galU galK rspL nupG [lambda cI857 (cro-bioA) <> araC-PBADflpe]*; (Warming et al., 2005).

### EPI300

Diese Bakterien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. T. Hoppe gestellt. Diese Bakterien besitzen keine *red*-Rekombinationsgene und werden daher zur Langzeitlagerung von großen DNS-Konstrukten, die zu ungewünschten Rekombinationen neigen, verwendet.

Genotyp: *F- mcrA Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) Phi80dlacZDeltaM15 Delta-lacX74 recA1 endA1 araD139 Delta(ara, leu)7697 galU galK lambda- rpsL nupG trfA tonA*; (Tursun et al., 2009).

## **B.7 Zelllinien**

### **HEK (*Human Embryonic Kidney*)-293-EBNA (*Epstein-Barr Nucleare Antigen*)-Zellen**

(American Tissue Type Culture Collection 1988, ATCC CRL-1573) (Diese Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R. Wagener zur Verfügung gestellt.) HEK-293-EBNA Zellen enthalten das Gen, das für das Epstein-Barr nukleare Antigen 1 (EBNA1) kodiert. Dieses Antigen ermöglicht die Replikation und damit die episomale Erhaltung von eingebrachten Plasmiden, die den Replikationsursprung oriP besitzen (Yates et al., 1985).

## **B.8 Zebrabärblinge**

In der vorliegenden Arbeit wurden Zebrabärblinge des Wt-Köln-Stamms verwendet. Die Zebrabärblinge wurden freundlicherweise von der AG von Prof. Dr. M. Leptin zur Verfügung gestellt. Die Fische wurden bei 28 °C und bei einem 14 h Licht/10 h Dunkelheit-Zyklus gehalten.

## **C Methoden**

Die Experimente wurden in dem Institut für Pharmakologie in der AG von D. Gründemann durchgeführt. Für die Fischzucht, die Fischhaltung und die DNS/mRNS-Mikroinjektionen in Zebrabärbling-Embryonen wurden Einrichtungen und Geräte im Institut für Genetik von der AG von Frau Prof. Dr. M. Leptin und im Institut für Biochemie II von der AG von Herrn Prof. Dr. R. Wagener genutzt.

### **C.1 DNS- und RNS-Techniken**

#### **C.1.1 DNS-Techniken**

##### ***C.1.1.1 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNS***

Plasmid-DNS wird zur Analyse und Präparation mit Restriktionsenzymen inkubiert. Diese Endonukleasen erkennen spezifische Basenfolgen in der DNS und führen dort durch die Lösung der Phosphodiesterbindung zu einer Unterbrechung des DNS-Doppelstrangs.

Zwischen 2 U (*Units*) und 12 U an Restriktionsendonuklease wurden hier bis zu 24 h bei 37 °C im entsprechenden Restriktionsenzym-Puffer inkubiert. Für den analytischen Verdau wurden bis zu 1 µg DNS, für den präparativen Verdau 5-10 µg DNS verwendet.

Der Anteil an Endonuklease soll 10 % des Gesamtvolumens der Reaktion nicht übersteigen, da in der Enzym-Stammlösung vorhandenes Glycerin die Enzymaktivität und -spezifität beeinträchtigt.

Soll eine DNS mit mehreren Restriktionsenzymen verdaut werden, die in unterschiedlichen Puffern aktiv sind, wird die DNS nach Spaltung mit dem ersten Restriktionsenzym durch Fällung gereinigt und umgesalzt (siehe C.1.1.8). Da bei der DNS-Fällung nie das gesamte Salz entfernt werden kann, sollte die DNS vorzugsweise zuerst mit dem Enzym gespalten werden, dessen Puffer einen niedrigeren Salzgehalt aufweist.

### ***C.1.1.2 Dephosphorylierung von DNS***

Um eine Selbstligation von geschnittenen Vektoren eines präparativen Restriktionsansatzes zu vermeiden, werden die 5'-terminalen Phosphatreste an den geschnittenen DNS-Enden entfernt.

Dazu wurde hier die DNS mit 2 U an alkalischer Phosphatase und mit 1/10 des Ansatzvolumens an Dephosphorylase-Puffer versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNS-Lösung einer Phenol-Chloroform-Extraktion, auf die eine Ethanolfällung folgte, unterzogen und für die Ligation eingesetzt (siehe C.1.1.7 und C.1.1.8).

### ***C.1.1.3 Vervielfältigung von DNS mit Hilfe der PCR***

(nach (Saiki et al., 1985))

Zur Amplifikation von DNS-Fragmenten mit bekannten Endsequenzen kann die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden. Dieser Vorgang besteht aus drei Reaktionsschritten: Denaturierung, Primer-Anlagerung und Strang-Verlängerung.

Die hierzu verwendeten Primer (mit oder ohne eingefügte Restriktionsenzymchnittstellen) waren zwischen 20-30 bp lang. Die Primer waren identisch zu dem 5'-Ende des Sense-Strangs bzw. zu dem 5'-Ende des Antisense-Strangs. Im ersten Schritt wurde die Matrizen-DNS zusammen mit den Primern bei 95 °C für 1 min denaturiert. Dadurch brachen Sense- und Antisense-Strang der zu amplifizierenden DNS auseinander. Beim folgenden Abkühlen hybridisierten die Primer aufgrund ihres großen Überschusses an ihre Zielsequenzen. Im dritten Schritt wurden die Primer durch die temperaturunempfindliche Polymerase des High Fidelity-PCR-Mix zu einem der Matrize entsprechenden DNS-Strang verlängert. Die Wiederholung (30-35mal) dieser Dreischritt-

Reaktion führte zur exponentiellen Anreicherung des von den Primern begrenzten DNS-Bereiches.

Zu Beginn dieser Zyklusperiode wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der DNS zu gewährleisten. Während dieser Zeit wurde die DNS-Polymerase zusammen mit ihrem Puffer zugegeben. Nach Beendigung der Zyklen wurde der DNS-Polymerase die Möglichkeit gegeben für 10 min bei 72 °C die unvollständigen DNS-Enden aufzufüllen. Danach wurde die Reaktion auf 8 °C abgekühlt, um Nebenreaktionen der DNS-Polymerase zu vermeiden.

Ein Aliquot des Ansatzes wurde anschließend gelelektrophoretisch auf das Vorhandensein von DNS-Banden gewünschter Größe analysiert. Bei erfolglosen PCR-Reaktionen wurde versucht die Amplifikation durch sukzessives Absenken oder Anheben der Anlagerungstemperatur in 1-3 °C-Schritten zu optimieren.

Zur Klonierung des amplifizierten Fragments wurde der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe C.1.1.4). Die gewünschte Bande wurde aus dem Gel isoliert, mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und in einen Vektor ligiert (siehe C.1.1.5, C.1.1.1 und C.1.1.6).

#### **PCR-Standardreaktionsansatz**

DNS-Matrize	1-10 µg/µl
dNTPs	200-300 µM
Vwpr.	25 pmol
Rwpr.	25 pmol
10 x Reaktionspuffer	5 µl
High Fidelity PCR-Mix	2-5 U
MilliQ-H <sub>2</sub> O	ad. 50 µl

#### ***C.1.1.4 Auftrennung von DNS im Agarosegel***

DNS-Moleküle sind aufgrund ihres Phosphatrückgrats negativ geladen. Sie bewegen sich daher in einem elektrischen Feld zum positiven Pol. Auf diese Weise können DNS-Fragmente in polymerisierter Agarose elektrophoretisch nach ihrer Länge aufgetrennt werden. Fragmente größerer Länge laufen in dem elektrischen Feld langsamer in Richtung des positiv geladenen Poles, als solche mit geringerer Anzahl an Basenpaaren, da die Vernetzung des Agarosepolymeres diesen weniger Widerstand entgegensetzt.

Diese Technik fand Anwendung bei der Identifizierung bestimmter DNS-Moleküle durch ihr spezifisches Fragmentmuster, das sie nach analytischem Verdau erhalten hatten, und bei der Isolierung gewünschter DNS-Fragmente aus einem präparativen Verdau oder einer PCR (siehe C.1.1.1 und C.1.1.3).

Je nach Länge der zu erwartenden DNS-Fragmente wurden 0,6 bis 1,5 % (w/v) Agarose/1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in einen horizontalen Gelträger gegossen. Mit einem eingesetzten Plastikkamm, der nach Erstarren des Gels entfernt wurde, wurden Taschen ausgespart. Anschließend wurde das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet und die DNS-Proben, versetzt mit 1/10 des Ansatzvolumens an Gel-Ladepuffer, in die Taschen gefüllt. Bei einer Spannung von 80-120 V wurde die DNS elektrophoretisiert, wodurch sich die DNS-Fragmente gemäß ihrer Größe entlang des elektrischen Feldes auftrennten. Zur Sichtbarmachung der DNS wurde das Gel für 30 min in einer EtBr (Ethidiumbromid)-Lösung (200 µg/ml in 1 x TAE-Puffer) inkubiert. Das EtBr interkalierte in die DNS und fluoreszierte bei UV-Licht einer Wellenlänge von 320 nm. Über eine parallel elektrophoresierte Referenz mit DNS-Fragmenten bekannter Größe konnte die Fragmentgröße restriktionsverdauter Plasmide durch Vergleich ermittelt werden (siehe B.4.1).

#### **10 x TAE-Puffer**

Tris-Acetat	5 M
EDTA	50 mM
(Ethylendiamintetraacetat)	

#### **Gel-Ladepuffer**

Glycerin	30 % (v/v)
EDTA	0,25 % (v/v)
Xylencyanol FF	0,25 % (w/v)

#### ***C.1.1.5 Aufreinigung von DNS aus einem Agarosegel***

Um aus einem präparativen Restriktionsverdau oder aus einer fertigen PCR-Reaktion einzelne DNS-Fragmente zu isolieren, wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen (siehe C.1.1.1, C.1.1.3 und C.1.1.4). Zur Reinigung des DNS-Fragments aus dem Gel wurde das Reaktionssystem „GeneJET Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe Tabelle 6). Hierbei wurde das Agarosestück aufgelöst und die DNS nach dem Prinzip des „NucleoBond® Xtra Maxi Kit“ isoliert (siehe Tabelle 6 und

C.1.1.11.2). Die DNS wurde in 30 µl Wasser eluiert und gegebenenfalls spektralphotometrisch vermessen (siehe C.1.1.9).

#### ***C.1.1.6 DNS-Ligation***

Um DNS-Fragmente mit kompatiblen Enden zu einem Vektor zu verknüpfen, wurden diese in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit 7,5 U T4-DNS-Ligase und 1/10 des Ansatzvolumens an Ligations-Puffer über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wurden Vektor-DNS und Insert(s) vom äquimolaren Verhältnis bis zu einem fünffachen Überschuß an Insert(s) eingesetzt. Das molare Verhältnis von Insert(s) zu Vektor wurde zuvor in einem Agarosegel abgeschätzt (siehe C.1.1.4). Der Ligationsansatz wurde anschließend mittels einer Ethanol-fällung von Salzen befreit. Das Pellet wurde in 10 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O gelöst (siehe C.1.1.8). 5 µl des gefällten Ligationansatzes wurden anschließend in Bakterien elektroporiert (siehe C.2.2). Der restliche Ligationsansatz wurde bei 4 °C gelagert.

#### ***C.1.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion***

Um Proteine aus DNS-Lösungen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde die DNS-Lösung mit 1 x Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) (25:24:1) gemischt und 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige, DNS-haltige Phase wurde mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Extraktion wurde mit 0,5 x Volumen MilliQ-H<sub>2</sub>O wiederholt. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (CIA) (24:1) zu der wässrigen DNS-Lösung hinzugegeben, geschüttelt und 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die obere DNS-haltige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluß wurde diese DNS-Lösung durch eine Ethanol-fällung aufkonzentriert (siehe C.1.1.8).

##### **CIA (24:1)**

1 x Volumen Isoamylalkohol

24 x Volumen Chloroform

##### **PCI (25:24:1)**

1 x Volumen MilliQ-H<sub>2</sub>O

1 x Volumen CIA (24:1)

### **C.1.1.8 Ethanolfällung von DNS**

Um DNS-Lösungen aufzukonzentrieren und von Salzen zu befreien, wurde die DNS mit Ethanol (EtOH) gefällt. Hierzu wurde die DNS-Lösung mit 0,1 Volumen 5 M NH<sub>4</sub>-Acetat pH 5,4, 2,5 Volumen 100 % EtOH und 4 µl linearem Polyacrylamid (Fällhilfe) gemischt (Gaillard und Strauss, 1990). Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das DNS-Pellet wurde mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen (10 min 13000 x g). Das 70 %ige EtOH wurde verworfen und das DNS-Pellet bei 60 °C getrocknet (Gaillard und Strauss, 1990). Abschließend wurde das DNS-Pellet in dem gewünschten Volumen MilliQ-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **C.1.1.9 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration**

Bei der Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen macht man sich die spektralphotometrischen Eigenschaften der Nukleinsäurebausteine zu Nutze. Diese Aromaten absorbieren Licht im UV-Bereich zwischen 220 und 320 nm. Durch Messen der OD (optische Dichte) bei 260 nm kann die Nukleinsäure-Konzentration bestimmt werden. Als Faustformel gilt, dass 50 µg DNS oder 40 µg RNS, gelöst in einem ml, bei 260 nm eine OD von 1 aufweisen. Da das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren von Proteinen bei 280 nm liegt, kann durch Messung der OD bei 260nm und 280 nm die Verunreinigung der Lösung mit Protein bestimmt werden. Die ausreichende Reinheit der DNS bzw. RNS für weiter führende Experimente ist durch einen Wert größer als 1,8 für den Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> gegeben. Die Messungen wurden an einem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) der AG von Prof. Dr. S. Herzig am Institut für Pharmakologie vorgenommen.

### **C.1.1.10 Recombineering und FLP/FRT-Rekombination**

(nach (Liu et al., 2003, Warming et al., 2005, Copeland et al., 2001, Lee et al., 2001)).

Für die Erzeugung der Tol2-*eGFP*-Transposonvektoren wurde das Prinzip des *Recombineering* (*Recombination-mediated genetic engineering*) verwendet, da eine klassische Neukombination der DNS aufgrund einer ungünstigen Konstellation von Restriktionsenzymchnittstellen nicht möglich war.

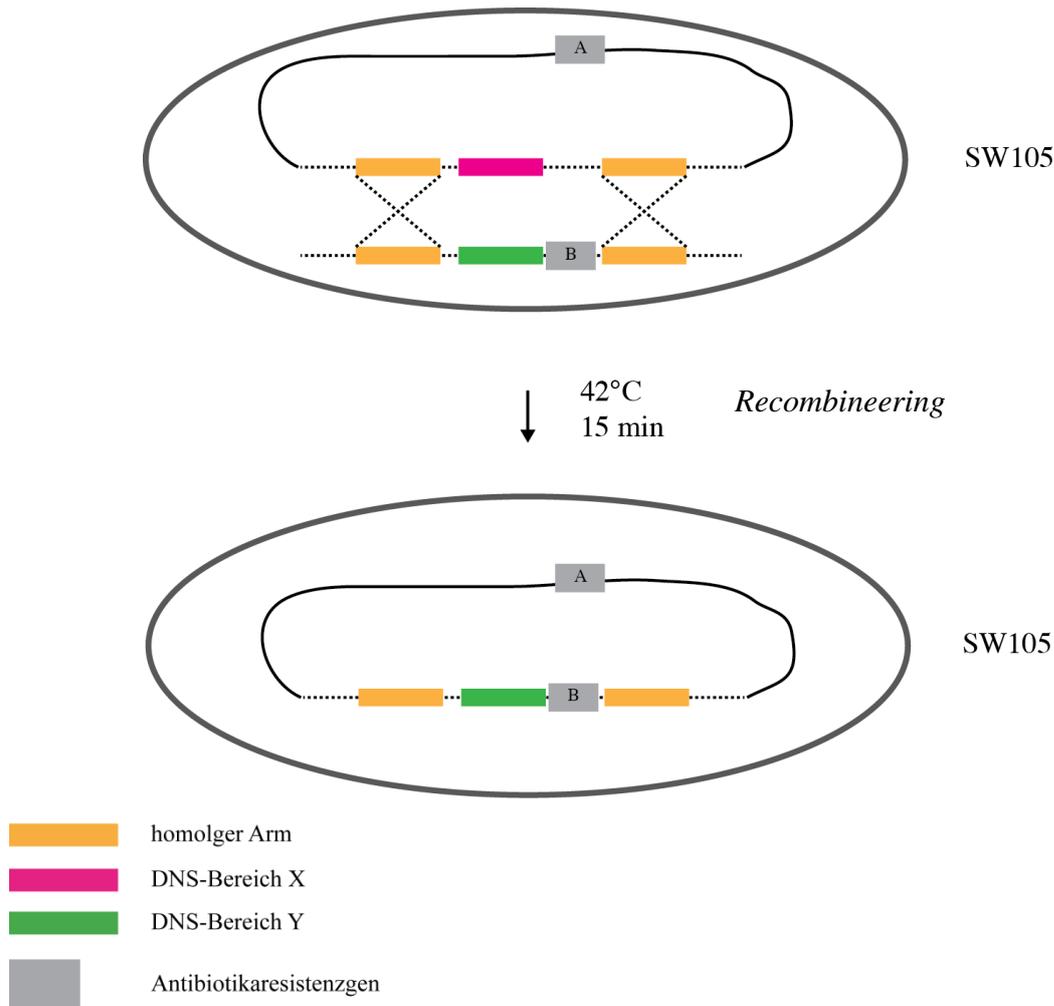
#### **C.1.1.10.1 Prinzip**

Die *Recombineering* Methode basiert auf homologer Rekombination in *E.coli*, wodurch DNS-Moleküle wie z.B. Fosmid- oder BAC-Klone (im Allgemeinen alle

Einzelkopie-Vektoren) verändert werden können. Die homologe Rekombination ist ein Prozess, bei dem DNS-Fragmente zwischen zwei DNS-Molekülen ausgetauscht werden.

Beim *Recombineering* wird lineare und zirkuläre DNS verwendet, wobei beide über eine unterschiedliche Resistenzgenkassette verfügen. Zusätzlich sind zwei Homologien (homologer 5'-Arm und homologer 3'-Arm; ca. 50-250 bp) auf beiden DNS-Molekülen enthalten. Das lineare DNS-Molekül wird in kompetente SW105-Zellen, die bereits das zirkuläre DNS-Molekül enthalten, elektroporiert, wo zwischen ihnen eine homologe Rekombination stattfindet (siehe B.6). Die Regionen zwischen den homologen Armen werden hierbei gegeneinander ausgetauscht (siehe Abbildung 11).

Die homologe Rekombination wird durch die Red-Proteine des Bakteriophagen  $\lambda$  vermittelt. Der Bakteriophage  $\lambda$  ist in einer defekten Form (defekter  $\lambda$ -Miniphage), die keine Elemente zur Amplifikation besitzt, in das Chromosom des *E. coli*-Stamms SW105 integriert (siehe B.6). Der defekte  $\lambda$ -Miniphage besteht aus einem Operator und einem Promotor, der die Transkription der drei *red*-Gene, *gam*, *bet* und *exo*, antreibt. Zusätzlich verfügt der defekte  $\lambda$ -Miniphage über den temperatursensitiven Repressor, cI857. Dieser temperatursensitive Repressor liegt bei 32 °C in seiner aktiven Form vor und bindet an den Operator, wodurch verhindert wird, dass es zur Expression von *gam*, *bet* und *exo* kommt. Die Expression der *red*-Gene wird mit einem Hitzeschock bei 42 °C für 15 min eingeleitet. Der temperatursensitive cI857-Repressor wird inaktiv und kann nicht mehr an den Operator binden. Die Gene *exo*, *gam* und *bet* werden exprimiert und vermitteln den Prozess der homologen Rekombination (siehe Abbildung 11). Das Gen *exo* kodiert für eine 5'-3'-Exonuklease. Das Protein Bet bindet an einzelsträngige DNS-Moleküle. Das Protein Gam verursacht einen Defekt in der ATP-abhängigen Exonuklease RecBCD von SW105-Zellen, die die Funktion besitzt, die Instabilisierung von fremden DNS-Fragmenten hervorzurufen (Yu et al., 2003) (siehe B.6).



**Abbildung 11: Homologe Rekombination beim Recombineering in SW105-Zellen**  
 Schematische Darstellung der homologen Rekombination beim *Recombineering*. Hierbei kommt es zu dem Austausch von DNS-Fragmenten zwischen linearer und zirkulärer DNS, die sich innerhalb der homologen Arme befinden. Die homologe Rekombination läuft in SW105-Bakterien ab und wird über Red-Proteine des defekten  $\lambda$ -Miniphagen vermittelt. Die Expression der Gene, die für die Red-Proteine kodieren, wird durch Hitze induziert (42 °C, 15 min). Um Bakterien mit der neukombinierten DNS identifizieren zu können, wird durch den DNS-Austausch ein neues Antibiotikaresistenzgen, das sich von dem des Einzelkopievektors unterscheidet, eingefügt.

Zusätzlich zu dem defekten  $\lambda$ -Miniphagen besitzen die SW105-Zellen ein L-Arabinose-induzierbares Gen für die Flippase. SW105-Zellen können somit dazu verwendet werden, um von FRT-Stellen flankierte DNS-Bereiche (z.B. Antibiotikaresistenzgene) aus Plasmiden auszuschneiden (siehe B.6 und C.1.1.10.2.2).

#### C.1.1.10.2 Durchführung

##### C.1.1.10.2.1 Recombineering

Es wurden 5 ml einer Übernachtskultur von SW105-Zellen, die den zu modifizierenden Einzelkopievektor besitzen, hergestellt. Die SW105-Zellen wurden hierfür bei 32 °C und

200 Upm (Umdrehungen pro Minute) gehalten (siehe C.2.3). Diese Bakterienkultur wurde 1:50 (500 µl in 25 ml) in LB (Luria-Bertani)-Medium mit passendem Antibiotikum verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 bei 32 °C und 200 Upm weiter kultiviert (siehe C.2). Anschließend wurden 10 ml dieser Bakterienkultur als Negativkontrolle weiterhin bei 32 °C gehalten. In weiteren 10 ml der Bakterienkultur wurde die Expression der Red-Proteine in den SW105-Zellen mittels Hitzeschock bei 42 °C für exakt 15 min im sich schüttelnden Wasserbad eingeleitet. Die Negativkontrolle und die Bakterienkultur, in der die Expression der Red-Proteine in den Zellen eingeleitet wurde, wurden dann für 10 min auf Eis gehalten. Dann wurden die Bakterien dieser Kulturen elektrokompent gemacht und jeweils mit linearisierter DNS (5 µl) mit entsprechenden homologen Armen von ca. 50-250 bp transformiert (siehe C.1.1.1, C.2.1 und C.2.2). Die Bakterien wurden in je 500 µl LB-Medium aufgenommen und für 3 h bei 32 °C und 200 Upm kultiviert. Während dieser Zeit fand der Austausch der DNS-Fragmente zwischen dem Einzelkopievektor und dem linearen DNS-Molekül in den SW105-Zellen, die die Red-Proteine besaßen, statt. Der Einzelkopievektor hatte durch diese homologe Rekombination ein Antibiotikaresistenzgen neuerworben. Daher konnte für Bakterien mit der gewünschten neukombinierten DNS auf Agarplatten mit dem Antibiotikum, für das ein Resistenzgen hinzugewonnen wurde, selektiert werden. Es wurden hierzu je 200 µl der Kulturen ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 32 °C für 18-24 h inkubiert. Von der Agarplatte mit den SW105-Zellen, in denen die Expression der Red-Proteine induziert wurde, wurden fünf Kolonien gepickt und die darin enthaltenen Einzelkopievektoren mittels Restriktionsanalyse auf ihre Richtigkeit hin untersucht (siehe C.1.1.1 und C.1.1.11.1). Auf der Platte mit der Negativkontrolle wuchsen keine Kolonien.

#### *C.1.1.10.2.2 FLP/FRT-Rekombination*

Die Transkription des *flp*-Gens wurde in einer 5 ml-Bakterienkultur von SW105-Zellen, die den zu verändernden Einzelkopievektor besaßen, mit 0,1 % (w/v) L-Arabinose bei 32 °C und 200 Upm für 4 h induziert. Das zwischen den *FRT*-Stellen liegende DNS-Fragment des Vektors wurde von der FLP herausgeschnitten. Bei diesem DNS-Fragment handelte es sich in dieser Arbeit um ein *Kanamycinresistenzgen*. Zurückblieb eine *FRT*-Stelle. Da der hier veränderte Vektor noch über ein *Chloramphenicolresistenzgen* verfügte, konnte für SW105-Zellen, die diesen neukombinierten Vektor enthielten, auf Agarplatten mit Antibiotikum selektiert werden. So wurden hier zunächst 200 µl der Bakterienkultur auf Agarplatten mit Chloramphenicol ausplattiert und zu isolierten Kolonien

herangezogen. Anschließend wurden die Kolonien mit einem Stempel auf eine Agarplatte mit Kanamycin übertragen. Die Kolonien, die auf der Platte mit Kanamycin nicht wuchsen, besaßen höchstwahrscheinlich die neukombinierte DNS. Die Vektoren von fünf Kolonien wurden mittels Restriktionsanalysen auf ihre Richtigkeit hin überprüft (siehe C.1.1.1 und C.1.1.11.1).

Es musste daraufgeachtet werden, dass die Agarplatten bei 32 °C gehalten wurden. Bei höheren Temperaturen wäre es zur Expression der Red-Proteine gekommen, die dann möglicherweise zu ungewünschten Rekombinationsereignissen geführt hätten.

### ***C.1.1.11 Plasmid-DNS-Präparation***

#### *C.1.1.11.1 Minipräparation*

(Alle hierfür verwendeten Puffer stammen aus dem „NucleoBond®Xtra Maxi Kit“ (siehe Tabelle 6 und C.1.1.11.2).)

Um die korrekte Konstruktion eines bestimmten Plasmids zu überprüfen, wurden transformierte Bakterien isolierter Klone in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert (siehe C.2.3). Aus diesen Bakterienkulturen wurde nach Lyse plasmidische DNS isoliert und über Restriktionsverdau charakterisiert (siehe C.1.1.1).

Im Folgenden ist die Plasmid-Isolierung aus einer 5 ml-Bakterienkultur dargestellt: 1,5 ml einer 5 ml-Bakterienkulturen wurden für 30 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl 4 °C kaltem Resuspensionspuffer resuspendiert. Die in dem Resuspensionspuffer enthaltene RNSase A (Ribonuklease A) verdaute dabei die bakterielle RNS. Anschließend wurde die Suspension mit 200 µl alkalischem Lysepuffer versetzt, um die bakteriellen Lipidmembranen aufzulösen. Nach der Zugabe von 200 µl Neutralisationspuffer und erneutem Mischen fiel aus der ursprünglich klaren Suspension der so denaturierte bakterielle Proteinanteil in weißen Flocken aus. Dieser wurde durch 10-minütiges zentrifugieren bei 13000 x g pelletiert und der DNS-haltige Überstand anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNS wurde der Überstand mit 2/3 des Ansatzvolumens an Isopropanol versetzt und 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen und vor der Aufnahme in 20 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O unter dem Abzug getrocknet, da EtOH die Enzymaktivität beeinträchtigt. Diese Methode lieferte ca. 5-10 µg Plasmid-DNS. Durch analytische Restriktionsverdau wurden die Bakterienkulturen mit korrekt kloniertem Plasmid identifiziert (siehe C.1.1.1).

#### C.1.1.11.2 Maxipräparation

Um große Mengen an einer bestimmten Plasmid-DNS zu erhalten, wurde diese aus das Plasmid tragenden Bakterien, die in einem großen Volumen an Nährmedium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert wurden, isoliert (siehe C.2.3). Die Isolierung erfolgte über Austauschchromatographie mit Hilfe des Reaktionssystems „NucleoBond®Xtra Maxi Kit“ (siehe Tabelle 6).

Hierzu wurden hier Bakterien einer 200 ml-Kultur bei 5000 x g in einer 4 °C kalten Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 12 ml Resuspensionspuffer (im Puffer enthaltene RNSase A bewirkte den Verdau der bakteriellen RNS-Moleküle) vollständig resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 12 ml alkalischem Lysepuffer (anfängliches vorsichtiges Invertieren des Reaktionsgefäßes (5-10-mal) und anschließendes ruhen lassen) 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Dabei entwich die Plasmid-DNS aus den Bakterienzellen in das Medium. Anschließend wurde das Lysat mit 12 ml Neutralisationspuffer neutralisiert (heftiges Schütteln), wodurch denaturierte bakterielle Proteine als weiße Flocken koagulierten. Um die Proteine zu entfernen, wurde das Gemisch 30 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend auf eine mit 25 ml Äquilibrationspuffer äquilibrierte Säule gegeben. Die an die stationäre Phase der Chromatographie Säule gebundene DNS wurde zweimal mit 25 ml Hochsalz-Waschpuffer gewaschen, um restliche Nukleotide und Proteine zu entfernen, bevor sie mit 15 ml Niedrigsalz-Elutionspuffer von der Säule gelöst wurde. Anschließend wurde die DNS durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol unter kräftigem Schütteln gefällt und mittels 30-minütiger Zentrifugation bei 13000 x g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNS-Pellet mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen. Bevor die pelletierte DNS in 200 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen wurde, wurde sie mindestens 20 min bei Raumtemperatur getrocknet, um EtOH-Reste zu entfernen. Dann wurde die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt und diese anschließend auf 1 µg/µl eingestellt (siehe C.1.1.9). Zur Verifizierung des isolierten Plasmids wurden analytische Restriktionsverdaue durchgeführt (siehe C.1.1.1). Die DNS kann über mehrere Jahre bei – 20 °C gelagert werden.

<b>Resuspensionspuffer</b>		<b>Lysepuffer</b>	
Tris-HCl	50mM, pH 8,0	NaOH	200 mM
EDTA	10mM	SDS	1 %
RNSase A	100 µg/ml	EDTA	50 mM, pH 8,0
<b>Äquilibrationspuffer</b>		<b>Waschpuffer</b>	
NaCl	750 mM	NaCl	1,0 M
MOPS	50 mM, pH 7,0	MOPS	50 mM, pH 7,0
Isopropanol	10 %	Isopropanol	15 %
Triton X-100	0,15 %		
<b>Elutionspuffer</b>			
NaCl	1,25 M		
Tris-HCl	50 mM, pH 8.5		
Isopropanol	15 %		

#### ***C.1.1.12 DNS-Sequenzierung nach Sanger***

Um die DNS-Sequenz eines Plasmids zu ermitteln, wurde das BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit nach Herstellerangaben verwendet (siehe Tabelle 6). Die Sequenzier-Methode beruht hierbei auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977).

Die Sequenzier-PCR lief in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf, Deutschland) folgendermaßen ab:

<b>PCR-Ansatz</b>		<b>Amplifikationsprogramm</b>	
Plasmid-DNS	200 ng	1.	94 °C 5 min
Primer	2 pmol	Pause: Zugabe des Terminator Mix	
5 x Puffer	2 µl	2.	94 °C 30 sec
Terminator Mix	2 µl	3.	50 °C 30 sec
		4.	62 °C 4 min
		5.	62 °C 10 min

30 Zyklen

Die Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte von Frau Regina Baucks im Institut für Pharmakologie mit Hilfe eines 16 Kapillarsequenzier (ABI Prism<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Abfolge der Farbsignale gab die Sequenz wieder. Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit dem Programm MacVector<sup>®</sup>.

#### ***C.1.1.13 cDNS-Synthese***

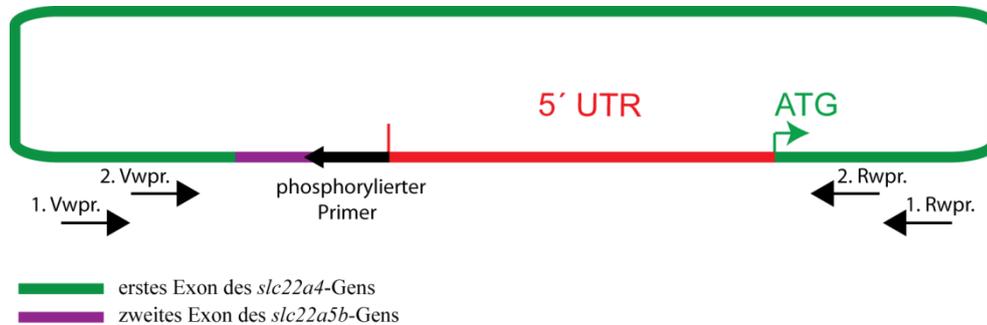
Die Synthese von cDNS (komplementäre DNS) mittels reverser Transkription wurde nach Herstellerangaben mit der SuperScript II Reverse Transkriptase von Invitrogen durchgeführt. Als Primer wurde ein Random-Hexamer-Mix (Sigma-Aldrich) benutzt. Im Anschluss an die Transkription wurde die verbliebene mRNA mittels RNase H-Verdau (5 U, 1 h, 37 °C) entfernt.

#### ***C.1.1.14 5' RACE-PCR***

Eine 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)-PCR wird im Allgemeinen durchgeführt, um die Sequenz der untranslatierten Region (UTR, *Untranslated Region*) am 5'-Ende eines mRNA-Moleküls zu ermitteln und somit den Transkriptionsstartpunkt eines Gens zu bestimmen. Hier wurde eine 5' RACE-PCR durchgeführt, um zudem Gewissheit darüber zu erhalten, dass der von M. Bach vermutete kodierende Teil des ersten Exons des *slc22a4*-Gens wirklich nicht durch Spleißen aus der prä-mRNA entfernt wird (Bach, 2009).

Für die 5' RACE-PCR wurden *slc22a4*-mRNA-Moleküle, die sich in einem Pool aus mRNA-Molekülen befanden, mit einem spezifischen phosphorylierten Primer, der in Gegenrichtung an einen Teil des 5'-Bereichs des potentiellen zweiten Exons des *slc22a4*-Gens binden kann, revers transkribiert. Diese cDNS-Moleküle ließen sich, dank des verwendeten phosphorylierten Primers, mit der T4-RNA-Ligase zu einem Ring schließen (zirkularisierte partielle *slc22a4*-cDNS-Moleküle). Nur wenn diese cDNS-Moleküle den vermuteten kodierenden Teil des ersten Exons des *slc22a4*-Gens enthalten, liefert eine *nested*-PCR mit Primern, die in diesem Bereich binden können, ein Amplifikationsprodukt. Die Bindungsstellen und die Orientierung dieser Primer sind in Abbildung 12 gezeigt. Dieses Amplifikationsprodukt würde Teile der potentiellen zweiten und ersten Exons und die vollständige 5' UTR enthalten (siehe Abbildung 12). Durch die Anwesenheit von Restriktionsenzymststellen in den Primern für die zweite Runde der *nested*-PCR könnte das mögliche PCR-Fragment in den „pBSK+“-Vektor kloniert und anschließend sequenziert werden (siehe B.4.3 und C.1.1.12). Es war vorgesehen, für die Sequenzierung den Vorwärtsprimer (2. Vwpr.) der zweiten Runde der *nested*-PCR zu

verwenden (siehe Abbildung 12). Die 5' RACE-PCR und die anschließende *nested*-PCR wurden unverändert nach dem Protokoll des 5'-Race Core Set-Kits durchgeführt (siehe Tabelle 6). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 17 aufgelistet.



**Abbildung 12: Zirkularisierte partielle *slc22a4*-cDNS**

Dargestellt ist eine Schemazeichnung der möglichen zirkularisierten partiellen *slc22a4*-cDNS. Die Bindungspositionen der zwei Primerpaare für die *nested*-PCR sind schematisch eingezeichnet (Pfeile). Die Pfeilköpfe geben die Orientierungen der Primer an.

#### C.1.1.15 Isolierung genomischer DNS

Um genomische DNS aus einem einzelnen Zebrafisch-Embryo zu isolieren, wurde dieser in 50  $\mu$ l Lysepuffer für 3 -5 h bei 55 °C zersetzt. Anschließend wurde die genomische DNS mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion aus dem Gemisch gewonnen (siehe C.1.1.7). Das Pellet genomischer Zebrafisch-DNS wurde in 30  $\mu$ l MilliQ-H<sub>2</sub>O resuspendiert und photometrisch vermessen (siehe C.1.1.9).

#### Lysepuffer

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	100 mM, pH 8,0
SDS	0,5 %
Proteinase K	200 $\mu$ g/ml

Wurde der Lysepuffer für den *Tol2-excision assay* verwendet, wurde in diesen kein SDS zugesetzt.

## **C.1.2 RNS-Techniken**

### ***C.1.2.1 Isolierung von Gesamt-RNS aus Gewebe***

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus Zebrafisch-Embryonen erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz von Invitrogen. Das Protokoll zur RNS-Isolation wurde ohne Änderungen übernommen. Das Pellet der Gesamt-RNS wurde in 20 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen und photometrisch vermessen (siehe C.1.1.9).

### ***C.1.2.2 Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNS***

Die Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNS erfolgte mit dem Oligotex Direct mRNA-Kit von Qiagen. Das Spin-Column-Protokoll wurde ohne Änderungen übernommen. Hierbei wurden die mRNA-Moleküle aufgereinigt, indem ihre Poly-A-Schwänze an dT-Oligomere einer Säulenmatrix hybridisiert wurden. rRNA- und tRNA-Spezies, die keine Poly-A-Schwänze besitzen, banden nicht an die dT-Oligomere und konnten leicht gewaschen werden. Die isolierten mRNA-Moleküle wurden zur Aufkonzentration einer Natriumacetat-Präzipitation unterzogen (siehe C.1.2.3). Das Pellet wurde in 20 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen, photometrisch vermessen und für die 5' RACE-PCR verwendet (siehe C.1.1.14).

### ***C.1.2.3 Fällung von RNS***

Analog zur Fällung von DNS wurde RNS ebenfalls durch Aussalzen aufkonzentriert und gereinigt (siehe C.1.1.8). Hierzu wurde die RNS-haltige Lösung mit 3 Volumen 100 % EtOH, 1/10 Volumen 3M Na-Acetat pH 5,2 und 4 µl linearem Polyacrylamid gemischt und 60 min bei -20 °C inkubiert. Die gefällte RNS wurde 15 min bei 13000 x g bei 4 °C pelletiert und anschließend mit 1 ml 70 % (v/v) EtOH gewaschen (15 min, 13000 x g, 4 °C). Das RNS-Pellet wurde 15 min auf Eis getrocknet, in dem gewünschten Volumen MilliQ-H<sub>2</sub>O gelöst und entweder sofort verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

### ***C.1.2.4 Auftrennung von RNS im Agarosegel***

Das Prinzip der Auftrennung von RNS in einem Agarosegel entspricht dem Prinzip der Auftrennung von DNS im Agarosegel (siehe C.1.1.4).

Um RNAsen zu entfernen wird die Gelkammer vor dem Gießen des Gels mit Seife gewaschen und mit hochentsalztem Wasser (Milli-Q) ausgespült. Ansonsten wird wie bei DNS-Agarosegelen verfahren. Es werden 0,8 % (w/v) Agarosegele verwendet, denen bereits vor dem Laden der RNS für 30 min eine Spannung von 80V angelegt wird, damit

eventuell vorhandene RNAsen herauswandern. RNS-Proben von 1  $\mu\text{l}$  werden in 4  $\mu\text{l}$  Formamid-haltigen RNS-Ladepuffer (Ambion) aufgenommen und vor dem Einfüllen in das Gel 10 min auf 90 °C erhitzt. So wird verhindert, dass RNS-Sekundärstrukturen das Laufverhalten beeinflussen.

## C.2 Mikrobiologische Methoden

Die hier verwendeten Lösungen und Medien sind am Ende des Kapitels C.2 aufgeführt.

### C.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* des DH 10B-Stammes wurde eine Kolonie dieser Bakterien in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 200 Upm und 37 °C kultiviert. 4 ml dieser Vorkultur wurden dann in 200 ml LB-Medium resuspendiert und weitere 2,5 h bei 37 °C bei 200 Upm inkubiert. (Hier wurde eingestiegen, wenn elektrokompetente SW105-Zellen für das *Recombineering* hergestellt wurden (siehe C.1.1.10).) Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 ml (beim *Recombineering* 10 ml) eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerol im Eiswasserbad vorsichtig durch Schütteln resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet schließlich in 500  $\mu\text{l}$  (beim *Recombineering* in 200  $\mu\text{l}$ ) 10 %igem (v/v) Glycerol aufgenommen, je zu 25  $\mu\text{l}$  aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder sofort verwendet.

### C.2.2 Elektrotransformation von *E. coli*

Für die Elektroporation wurde 1  $\mu\text{l}$  (1-20 ng) DNS mit 25  $\mu\text{l}$  der elektrokompetenten Zellen vermischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit der DNS in eine bereits vorgekühlte Küvette (1 mm Elektrodenabstand, Biorad, München, Deutschland) pipettiert. Ein optimales Transformationsergebnis erhielt man bei einem Widerstand von 200  $\Omega$ , einer Kapazität von 200  $\mu\text{F}$  und einer Spannung von 1,6 kV mittels eines Gene-Pulsers der Firma Bio-Rad (München, Deutschland). Bei diesen Einstellungen sollte eine Zeitkonstante von < 5 ms nicht überschritten werden. Nach dem Impuls wurden die Bakterien sofort mit 1 ml LB-Medium gemischt und für 1 h bei 200 Upm und 37 °C inkubiert (Inkubationsschüttler Minitron HT, Infors AG, Bottmingen, Deutschland). Während dieser Zeit konnten die *E.coli* ihre Antibiotikaresistenz, die sie

durch das aufgenommene Plasmid erhielten, ausbilden. Im Anschluss wurden 200 µl der Bakterienkultur auf einer Agarplatte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf dem Selektionsmedium wuchsen Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, zu isolierten Kolonien heran. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Agarplatten mit den Bakterienkolonien mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert.

### C.2.3 Kultivierung transformierter *E. coli*

Eine mit einem Plasmid transformierte Bakterienkolonie wurde zur Amplifikation des Plasmids mittels einer autoklavierten Pipettenspitze von der LB-Agarplatte in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in ein Reagenzglas übertragen. Anschließend wurde dieses Medium über Nacht bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler bei 200 Upm geschüttelt. Daraufhin konnten die Plasmide aus den Bakterien extrahiert werden (siehe C.1.1.11.1).

Um größere Mengen an Plasmid zu erhalten, wurden 200 µl der 5 ml-Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in einem Erlenmeyerkolben übertragen und erneut für 12 h bei 37 °C bei 200 Upm geschüttelt. Daraufhin konnten die Plasmide aus den Bakterien extrahiert werden (siehe C.1.1.11.2).

**Tabelle 19: Antibiotika-Stammlösungen (1000x)**

<b>Ampicillin (Amp.)</b> 100 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz	<b>Chloramphenicol (Chl.)</b> 12,5 mg/ml Chloramphenicol in EtOH
<b>Kanamycin (Kan.)</b> 30 mg/ml Kanamycin	

Die Lösungen wurden steril filtriert (0,22 µm), aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### **LB-Medium**

Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Bei Bedarf wurden Amp., Kan. bzw. Chl. in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, 30 mg/ml, bzw. 12,5 µg/ml zugesetzt.

**LB-Agar(-Amp./-Kan./-Chl.)**

BactoTrypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

Die Lösung wurde aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Amp., Kan. bzw. Chl. wurden in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, 30 µg/ml bzw. 12,5 µg/ml zugegeben und der Agar in Petrischalen gegossen. Die Agarplatten wurden luftdicht verpackt und bei 4 °C gelagert.

**C.3 *In vivo*-Methoden am Zebrafärbling****C.3.1 Fischzucht und Fischhaltung**

Die Fischhaltung erfüllte den Zweck, sich entwickelnde Embryonen und adulte Zebrafärblinge für Experimente zur Verfügung zu stellen.

Um Embryonen zu gewinnen, wurden die Zebrafärblinge in Einzelpaaren, wobei das Weibchen und das Männchen durch eine Plastikscheibe physikalisch getrennt waren, am Vorabend zusammengesetzt. Am darauffolgenden Morgen wurde zu Beginn der Lichtphase die Trennung aufgehoben und die Gelege konnten ca. 15 min später eingesammelt werden. Die Embryonen wurden in Petrischalen in Embryo-Medium bei 28 °C in einem Inkubator gehalten. Die Stadieneinteilung erfolgte nach Kimmel et al. (Kimmel et al., 1995). Wenn notwendig, wurden die Zebrafärbling-Larven nach fünf Tagen in die Fischanlage überführt, um sie zur Aufrechterhaltung der Zucht großzuziehen. Die Tötung adulter Zebrafärblinge erfolgte durch Inkubation in Eiswasser für 15 min. Die Tötung von Embryonen und Larven erfolgte durch Inkubation in 4 % PFA (siehe B.2).

**Embryo-Medium**

NaCl	5 mM
KCl	0,17 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,33 mM
CaCl	0,33 mM

### C.3.2 DNS/mRNS-Cytoplasmainjektion

(nach (Ekker et al., 1995, Suster et al., 2009a))

#### C.3.2.1 *Synthese der Tol2-mRNS*

Hier wurde der „*pDB600*“, der das Gen für die Tol2-Transposase, welches am 5'-Ende von einem Phagenpromotor und am 3'-Ende von einer Polyadenylierungssequenz flankiert ist, mit XbaI 3' von der Polyadenylierungssequenz linearisiert (siehe C.1.1.1). Der linearisierte Vektor wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und photometrisch vermessen (siehe C.1.1.5 und C.1.1.9). Die DNS-Lösung wurde auf die Konzentration 1 µg/µl eingestellt. Die *in vitro*-Transkription wurde mit Hilfe des Reaktionssystems „mMessage mMachine® SP6 Kit“ nach Angaben des Herstellers mit der SP6-Polymerase in folgendem Ansatz für 2-3 h bei 37 °C durchgeführt (siehe Tabelle 6):

#### Transkriptionsansatz

2 x rNTP/CAP	10 µl
10 x SP6-Polymerase Reaktionspuffer	2 µl
linearisierte Matrizen-DNS (1 µg/µl)	6 µl
Enzym-Mix (SP6)	2 µl

Anschließend wurde die Matrizen-DNS durch Zugabe von 1,5 µl RNSase-freie DNSaseI (1 U/µl) bei 37 °C für 20 min abgebaut. Die synthetisierte *Tol2*-mRNS wurde dann mit dem Reaktionssystem „RNeasy Mini Kit“ nach Angaben des Herstellers über Säulenchromatographie gereinigt, bei der sich die unterschiedlichen Bindungskonstanten von mRNS an Siliziumoxid unter Hoch- und Niedrigsalz-Bedingungen zu Nutze gemacht wurden. Die *Tol2*-mRNS wurde hierbei in 50 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert (siehe Tabelle 6). Die Unversehrtheit der synthetisierten *Tol2*-mRNS wurde gelelektrophoretisch überprüft und ihre Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (siehe C.1.2.4 und C.1.1.9). Die synthetisierte *Tol2*-mRNS ist bei -80 °C Monate lang stabil.

#### C.3.2.2 *Cytoplasmainjektionen*

Für die Cytoplasmainjektionen wurden Zebraquärling-Embryonen im Einzell-Stadium in einem Agaroseträger (1,5 % Agarose in Embryo-Medium in einer Petrischale), der durch Einsatz eines Kamms während des Gießens Aussparungen in Größe der Embryonen aufweist, aufgereiht. Der Agaroseträger war mit Embryo-Medium überschichtet (siehe

B.8). Die *Tol2*-mRNS wurde zusammen mit einem *Tol2-eGFP*-Transposonvektor in eine gezogene Glaskapillar-Nadel gefüllt, die in einen Mikromanipulator eingespannt wurde. Unter einem Binokular wurde mit dieser Nadel zunächst das Chorion und dann die Zellmembran eines Embryos im Einzell-Stadium durchstoßen und die DNS (50-200 ng/μl)/*Tol2*-mRNS (50 ng/μl)-Lösung (in MilliQ-H<sub>2</sub>O mit 0,3 % Phenolrot (w/v)) durch Luftdruck (erzeugt durch einen Mikroinjektor) in das Cytoplasma injiziert. Das Injektionsvolumen machte 1/10 des Cytoplasma-Volumens des Embryos aus. Nach der Injektion wurden die Embryonen in dem Agarose-Träger räumlich möglichst weit getrennt, um durch gleichmäßige Sauerstoffzufuhr eine synchrone Entwicklung zu ermöglichen. Die Embryonen wurden bei 28 °C inkubiert, bis sie das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht hatten (Kimmel et al., 1995).

## C.4 Zellkulturmethoden

### C.4.1 Stabile Transfektion von HEK-293-EBNA Zellen

Die Transfektion wurde in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit dem TurboFect-Reagenz (Lösung eines kationischen Polymers in Wasser; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Eine Selektion der transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen erfolgte mit Selektions-Vollmedium (siehe C.4.2).

### C.4.2 Zellkultur von HEK-293-EBNA Zellen

Transfizierte HEK-293-EBNA Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)-Zellkulturmedium (Life Technologies, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % (v/v) FCS (*Fetal Calf Serum*; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) 1 % (v/v) L- Glutamin und 5 mg/ml Puromycin (Selektions-Vollmedium; Gesamtvolumen: 15 ml) bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gehalten. Bei 70-90 % Konfluenz wurde die Zellkultur auf weitere Flasche verteilt. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt, durch 5 ml 0,05 % (v/v) Trypsin/EDTA ersetzt und für 10 min bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert, um die angehefteten HEK-293-EBNA-Zellen von dem Boden der Flasche zu lösen. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit 15 ml Selektions-Vollmedium vermischt. So wurde die Wirkung des Trypsins aufgehoben. In je eine der frischen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden 2 ml der Zellsuspension gegeben, die anschließend mit 13 ml Selektions-Vollmedium vermischt wurde. Die Zellsuspension, die nicht verwendet wurde, wurde verworfen.

Zur Überproduktion von rekombinanten Proteinfragmenten, die große Mengen an transfizierten Zellen erfordert, wurden zur Kultivierung Triple-Flaschen (500 cm<sup>2</sup>) verwendet (siehe C.5.1). In diesen Flaschen war die Zellkultur mit 30 ml Selektions-Vollmedium überschichtet.

Nichttransfizierte Zellen wurden in Vollmedium (Selektions-Vollmedium ohne Puromycin; Gesamtvolumen: 15 ml) kultiviert.

## C.5 Proteinbiochemische Methoden

### C.5.1 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Bindung eines Stoffes an einen Bindungspartner, der kovalent an eine Säulenmatrix gebunden ist.

Hier wurde diese Methode verwendet, um rekombinante Proteine, die in HEK-293-EBNA-Zellen heterolog überexprimiert wurden, aus dem Zellkulturüberstand zu extrahieren. Die Proteine waren C-terminal mit einem Doppel-Strep-Tag II (2x-Strep-Tag II) versehen und konnten deshalb mittels einer 1 ml Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säule (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland), die hochaffin die Strep-Markierung bindet, folgendermaßen aufgereinigt werden (Schmidt et al., 1996): 500 ml des Zellkulturüberstands, der das rekombinante Protein enthielt, wurden 45 min bei 10000 x g zentrifugiert, um eventuelle HEK-293-EBNA-Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand über Nacht bei 4 °C mit Hilfe einer Schlauchpumpe mehrfach über die Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säule geleitet. Die Säule wurde danach mit 150 ml Waschpuffer gereinigt. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit 20 ml Elutionspuffer, der Desthiobiotin enthält, das den 2x-Strep-Tag II von seiner Bindungsstelle in der Säulenmatrix verdrängt, eluiert. Der Durchlauf wurde in 20 1 ml-Aliquots gesammelt. Das Säulenmaterial wurde mit 10 Säulenvolumen Regenerationspuffer von Desthiobiothin befreit und abschließend mit 50 Säulenvolumen Waschpuffer regeneriert. Die Proteinkonzentration jedes Aliquots wurde mit der BCA (*Bichinonic Acid*)-Methode bestimmt (siehe C.5.2). Die Aliquots, die Protein enthielten, wurden mittels SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (siehe C.5.4 und C.5.5). Zudem wurden diese Aliquots mittels SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot und darauffolgender Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen den 2x-Strep-Tag II analysiert (siehe C.5.6).

**Waschpuffer**

Tris-HCl 100 mM  
 NaCl 150 mM  
 pH 8,0

**Elutionspuffer**

Desthiobiotin 2,5 mM  
 pH 8,0

**Regenerationspuffer**

Tris-HCl 100 mM  
 NaCl 150 mM  
 HABA (2-(4-Hydroxyazobenzol)-Benzoessäure) 1 mM  
 pH 8,0

**C.5.2 Proteinmengenbestimmung mit der BCA-Methode**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen kann mit der BCA (*Bichinonic Acid*)-Methode durchgeführt werden. Diese Methode beruht auf der Formation eines  $\text{Cu}^{2+}$ -Proteinkomplexes unter alkalischen Bedingungen, der zu einer Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  führt. Die Menge der Reduktion ist proportional zur anwesenden Proteinmenge. BCA formt unter alkalischen Bedingungen einen blauen Komplex mit  $\text{Cu}^+$ , der photometrisch bei 568 nm vermessen werden kann.

In dieser Arbeit wurde die BCA-Methode mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 568 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers (Thermo Max Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) gemessen.

**C.5.3 Abspaltung N-glykosylierter Oligosaccharide von Proteinen mittels PNGase F**

Die PNGase F (Protein N-Glykosidase F) spaltet N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide von Proteinen ab, indem es das Amid der Asparagin-Seitenkette hydrolysiert.

Die enzymatische Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (siehe Tabelle 5). Die Abspaltung der Kohlenhydratseitenketten wurde per SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (siehe C.5.4 und C.5.5).

#### C.5.4 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

(nach (Laemmli, 1970))

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes können Proteine in einem Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel nach ihrer Länge und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, PAGE). Polyacrylamid, das durch Polymerisierung von N,N'-Methylenbisacrylamid und Acrylamid entsteht, dient hierbei als molekulares Sieb. Die Porengröße wird durch den prozentualen Gehalt an Acrylamid bestimmt. Die Polyacrylamidgele bestehen aus einem großporigen, sauren Sammelgel (pH 6,8) und einem engporigen, basischen Trenngel (pH 8,8). Die Unterschiede in dem pH-Wert und der Porengröße zwischen Sammelgel und Trenngel dienen der notwendigen Konzentrierung der Proteine an der Trenngelfront. Bevor die Proteine in die Taschen des Sammelgels gefüllt werden, werden sie durch die Zugabe von SDS negativ geladen.

Die Elektrophorese erfolgte hier in einem vertikalen Gelelektrophorese-System (Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra System, Bio-Rad, München, Deutschland). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit SDS-Proteinladepuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde parallel zu den Proben ein gefärbter Molekulargewichtsmarker (PageRuler<sup>™</sup>Plus, Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Das Gel wurde in SDS-Laufpuffer einem elektrischen Feld ausgesetzt (120 mA). Nach ausreichender Auftrennung der Proteine wurde das Gel entweder für eine Coomassie-Färbung oder einen Western-Blot weiter verwendet (siehe C.5.5 und C.5.6).

<b>6 x SDS-Proteinladepuffer</b>		<b>Elektrophoresepuffer</b>	
SDS	2 % (w/v)	SDS	0,1 % (w/v)
Glycerin	10 % (v/v)	Glycin	400 mM
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)	Tris-Base	50 mM
Tris-HCl	80 mM		
$\beta$ -Mercaptoethanol	4 % (v/v)		
<b>4 %iges Sammelgel (10 ml)</b>		<b>16 %iges Trenngel (10 ml)</b>	
30 % Acrylamid/Bis (37,5:1)	1,7 ml	30% Acrylamid/Bis (37,5:1)	5,3 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	1, 5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 $\mu$ l	10 % (w/v) SDS	100 $\mu$ l
10 % (w/v) APS	100 $\mu$ l	10 % (w/v) APS	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	TEMED	4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6,8 ml	H <sub>2</sub> O	2 ml

### C.5.5 Coomassie-Färbung

Um Proteine in einem Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, werden diese mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 unspezifisch angefärbt. Coomassie Brilliant Blue R-250 lagert sich an die basischen Seitenketten der ASs an.

Das zu färbende Gel wurde hierfür in einer Coomassie-Färbelösung über Nacht unter leichtem schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gel wurde anschließend in MilliQ-H<sub>2</sub>O überführt und unter wiederholtem Aufkochen, begleitet von Wasserwechseln, von Hintergrundfärbungen befreit.

#### Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,2 % (w/v)
Methanol (MeOH)	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

### C.5.6 Western-Blot und anschließender Immundetektion

Der spezifische Nachweis von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel kann mittels Western-Blot erfolgen. Dazu werden die Proteine von dem SDS-Polyacrylamidgel mittels

Elektrophorese auf eine Membran übertragen (siehe C.5.4). Anschließend werden die Zielproteine mit spezifischen Antikörpern detektiert (Immundetektion).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Proteine von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Bio-Rad; aktiviert in MeOH 30 sec, anschließend 2 min gewaschen in MilliQ-H<sub>2</sub>O) bei 350 mA für 60 min in Transferpuffer in einem Tankblot (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde mit 3 % Milchpulver in TBT unter Schütteln geblockt. Anschließend erfolgte bei 4 °C über Nacht die Inkubation mit HRP (*Horseradish Peroxidase*)-gekoppelten Antikörpern, die in 3 % Milchpulver/TBT entsprechend verdünnt wurden (siehe Tabelle 18). Am folgenden Tag wurde die Membran 3 x 15 min in TBT gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. (Ab hier wurde in einer Dunkelkammer gearbeitet.) Anschließend erfolgte für 5 min eine Inkubation mit dem ECL (*Enhanced Chemoluminescence*)-Reagenz (Pierce ECL Plus Western-Blotting Substrate, Thermo Scientific, St. Leon Rot, Deutschland), das ein Substrat für HRP darstellt. Die resultierende Chemolumineszenz an den Stellen, an denen sich der HRP-gekoppelte Antikörper und somit das Zielprotein befindet, wurde zur Belichtung eines Kodak-Films genutzt. Abschließend erfolgte die Entwicklung des Films mit Kodak-Reagenzien nach dem Herstellerprotokoll.

### **Transferpuffer**

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
MeOH	10 % (v/v)

### **C.5.7 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper**

(Die Aufreinigung erfolgte bei 4 °C in einem Kühlraum.)

Um polyklonale Antikörper aus einem Serum (5 ml) aufzureinigen, wurde dieses zunächst durch Zentrifugation (1 h, 16000 x g, 4 °C) von Schwebstoffen befreit und 1:10 mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 verdünnt. Um spätere Kreuzreaktionen der polyklonalen Antikörper zu verwandten Proteinen zu vermeiden, wurde das verdünnte Serum zunächst über eine CNBr (Cyanogenbromid)-Sephharose<sup>TM</sup> 4B-Säule (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Schweden), an die die verwandten Proteine gekoppelt waren, geleitet (Depletion). Das Serum wurde anschließend über Nacht über eine mit dem Antigen gekoppelte CNBr-

Sepharose™ 4B-Säule geleitet. Die nun mit den polyklonalen Antikörpern beladene Säule wurde anschließend mit 5 Säulenvolumen 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Die Antikörper wurden schließlich in 1 ml-Schritten mit 0,1 M Glycin pH 2,5 eluiert und durch sofortige Zugabe von 15 µl 3 M Tris-HCl pH 8,8 und 20 µl 5 M NaCl neutralisiert. Die CNBr-Sepharose™ 4B-Säule wurde unmittelbar nach der Elution mit alternierenden Waschschritten mit 0,1 M Tris-HCl pH 8,0/ 0,5 M NaCl und 0,1 M NaAc pH 4,0/ 0,5M NaCl regeneriert. Die mit Protein gekoppelten Säulen können 2-3 Monate unter Luftausschluß bei 4 °C gelagert werden.

Die Kopplung der Proteine an die aktivierte CNBr-Sepharose™ 4B erfolgte unverändert nach Herstellerangaben.

### C.5.8 Indirekter ELISA

Mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) können Antikörper nachgewiesen werden. Hierfür wird das Antigen an den Wänden der Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wird der Antikörper in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die an das Antigen gebundenen Antikörper mit HRP-markierten Zweitantikörpern und einer darauffolgenden Farbreaktion photometrisch nachgewiesen.

Hier wurden die Wände der Vertiefungen einer MAXISORP-Immunoplatte (96-Well Immuno Plate, MAXISORP, Nunc™, Dänemark) mit dem Antigen beschichtet. Hierzu wurden 100 µl einer Antigen-Konzentration von 5 µg/ml in TBS in die Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde bei 4 °C über Nacht stehen gelassen. Nicht angeheftetes Protein wurde mit 3 x 5 min Waschen mit TBT (je 200 µl) entfernt. Die noch freien Proteinbindungsstellen wurden 1 h mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBT geblockt. Das Milchpulver wurde mit 3 x 5 min Waschen mit TBT (je 200 µl) entfernt. Die affinitätsgereinigten Primärantikörper (siehe C.5.7) wurde in verschiedenen Verdünnungen je 100µl für 1 h in 5 % (w/v) Milchpulver in TBT zugegeben (siehe Abbildung 25). Ungebundene Primärantikörper wurde durch 3 x 5 min Waschen mit TBT (je 200 µl) entfernt. Die gebundenen Primärantikörper wurden mit HRP-markierten Sekundärantikörpern (Verdünnung nach Herstellerangaben; siehe Tabelle 18), die gegen die konstante Domäne des Primärantikörpers gerichtet waren, in 5 % (w/v) Milchpulver in TBT (je 100 µl) für 1 h bei RT nachgewiesen. Nach 3 x 5 min Waschen mit TBT (je 200 µl) wurde die Farbreaktion mit je 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Färbelösung ausgelöst. Die Farbreaktion wurde nach 5 min mit je 100 µl 20 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

gestoppt. Es erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Proben wurden photometrisch in einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

### **TMB-Färbelösung**

NaAc (Natriumacetat), pH 6,0	1 ml
TMB (10 mg/ml in DMSO (Dimethylsulfoxid))	62,5 µl
30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 µl
H <sub>2</sub> O	9 ml

## **C.6 Histologische Methoden**

### **C.6.1 Antikörperfärbung (DAB-Färbung) an Zebrabärbling-Larven**

Der spezifische Nachweis von Proteinen in Zellen ganzer Zebrabärbling-Larven kann mittels indirekter DAB (3, 3'-Diaminobenzidin)-Färbung erbracht werden. Hierbei werden durch die Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern Zellen, in denen sich das Zielprotein, das zuvor mit spezifischen Primärantikörpern markiert wurde, befindet, durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

Im ersten Schritt wurden die Zebrabärbling-Larven in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert. Die PFA-Lösung wurde anschließend mit 3 x 5 min Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurden die unspezifischen Proteinbindestellen für 60 min mit 1 % (v/v) Ziegen Serum in PBS (Blockingpuffer) abgesättigt. Dann wurden die Zebrabärbling-Larven für weitere 60 min mit den spezifischen Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung in Blockingpuffer inkubiert (siehe Tabelle 18). Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch Waschen entfernt (3 x 5 min PBT). Die Zebrabärbling-Larven wurden schließlich mit den entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern in entsprechender Verdünnung in Blockingpuffer inkubiert (siehe Tabelle 18). Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch Waschen entfernt (3 x 5 min PBT) und die Larven in 0,03 % DAB in PBS für 30 min im Dunkeln inkubiert. Zur Färbung wurden die Larven in eine frisch angesetzte DAB-HRP-Substrat-Lösung überführt. In den Zellen mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper bildete sich ein brauner Niederschlag. Während der Farbreaktion wurden die Zebrabärbling-Larven im Dunkeln gehalten. Die Farbreaktion wurde nach ca. 15 min durch Überführung der Zebrabärbling-Larven in PBS gestoppt.

Die Bilder der Zebrabärbling-Larven wurden im Institut für Biochemie II mit einem Binokular und einer Kamera der Firma Nikon (Nikon SMZ1500, Objektiv P-HR Plan Apo 1,6 x WD24, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) der AG von Herrn Prof. Dr. R.

Wagener aufgenommen. Zur Darstellung und Bearbeitung der Bilder wurden die Programme NIS Elements BR Version 3.00 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und Adobe Photoshop CS5 verwendet.

### **DAB-HRP-Substrat-Lösung**

1 % DAB	250 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,3 %
PBS	5ml

### **C.6.2 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Zur Gewebeerhaltung wurden die Zebrabärbling-Organen über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA (oder in 95 % Ethanol für 20 min bei Raumtemperatur, oder in Aceton für 10 min bei -20 °C) fixiert. Anschließend wurden die Organe in 30 % Saccharose in PBS eingelegt, bis sie auf den Boden des Gefäßes gesunken waren (4 °C). So wurde das Gewebe vor Kälte-induzierten Schäden geschützt. Darauf folgend wurden die Organe in Plastikförmchen in Einbettmedium-Medium (Jung, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) ausgerichtet und bei -20 °C (im Kryostat) für 15 min eingefroren. Mit einem Kryostat (Leica CM1900) wurden anschließend 10 µm dicke Feinschnitte, die mit einem Pinsel auf Objektträgern (adhäsiv; 75 x 25 mm; Th Geyer Gruppe, Renningen, Hamburg) gesammelt wurden, angefertigt. Die Schnitte wurden 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für indirekte Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt (siehe C.6.3).

### **C.6.3 Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an Gefrierschnitten**

Der spezifische Nachweis von Proteinen in Gefrierschnitten von Organen des Zebrabärblings wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen erbracht (siehe C.6.2). Durch die Verwendung von Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern kann das Zielprotein, das zuvor mit spezifischen Primärantikörpern markiert wurde, sichtbar gemacht werden.

Im ersten Schritt wurde das Einbettmedium von den Feinschnitten mit 3 x 5 min Waschen in TBS entfernt (siehe C.6.2). Anschließend wurden die unspezifischen Proteinbindestellen für 60 min mit 1 % (v/v) Ziegen Serum in TBS (Blockingpuffer) abgesättigt. Dann wurden die Gefrierschnitte für weitere 60 min mit den Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung in Blockingpuffer inkubiert (siehe Tabelle 18). Nicht

gebundene Primärantikörper wurden durch Waschen entfernt (3 x 5 min TBT). Die Gefrierschnitte wurden schließlich mit den entsprechenden Sekundärantikörpern in entsprechender Verdünnung in Blockingpuffer mit 1 µg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) für 60 min inkubiert (siehe Tabelle 18). Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurde zur Markierung der DNS der Zellkerne verwendet. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch Waschen entfernt (3 x 5 min TBT) und die Schnitte in Aqua Poly/Mount (Polycineces, Warrington USA) eingedeckelt. Das Fluorochrom Alexa 594 wurde bei einer Wellenlänge von 590 nm angeregt. DAPI wurde bei einer Wellenlänge von 364 nm angeregt. Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Leica DM L Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland; PL APO 63x/1,32 Öl-Immersions-Objektiv) und der Kamera AxioCam MRc von Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Zur Darstellung und Bearbeitung der Bilder wurden die Programme ZEN 2011 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und Adobe Photoshop CS5 verwendet.

#### **C.6.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an HEK-293-EBNA-Zellen**

Um die Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b in HEK-293-EBNA-Zellen theoretisch immunhistochemisch nachweisen zu können, wurden die Zellen mit den Plasmiden pEBTetD-*slc22a4-eGFP*, pEBTetD-*slc22a5a-eGFP* und pEBTetD-*slc22a5b-eGFP* transfiziert und anschließend auf Deckgläschen (18 x 18 mm, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland), die mit Poly-L-Ornithin beschichtet wurden (2 ml, 20 min, Raumtemperatur), in Polysterol-Schälchen ausgesät. Die Expression der Transporter-Chimären wurde 20 h vor Beginn der Immunfluoreszenzfärbungen mit 1 µg/ml Doxyzyklin, das in das Zellkulturmedium zugesetzt wurde, induziert (siehe B.4.3). Die Zellen wurden anschließend mit 4 % PFA fixiert. Die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden dann wie die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen an Gewebeschnitten durchgeführt. Es wurden jedoch anstatt TBS und TBT, PBS und PBT verwendet (siehe C.6.3 und B.2).

##### **Poly-L-Ornithin-Lösung**

Poly-L-Ornithin	0,1 g/l
Borsäure	150 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

## D Ergebnisse

Mit der Entdeckung des ET-Transporters, der den bis jetzt einzigen Biomarker für ET darstellt, hat sich die Möglichkeit eröffnet, ET indirekt über die Anwesenheit des Transporter-Proteins nachzuweisen (Gründemann et al., 2005) (siehe A.2.2 und A.2.3). Hier sollte ein Werkzeug zur direkten oder indirekten Lokalisation des *Slc22a4* Transporters entwickelt werden, das eine Identifikation ET-haltiger Zellen mit Einzelzellauflösung im Zebrafisch *Danio rerio* ermöglicht. Mit diesem sollten anschließend zum ersten Mal die ET-haltigen Zellen in dem gesamten Zebrafisch kartiert werden.

### D.1 Herstellung der *Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie

Zu diesem Zweck sollte hier mit Hilfe des Tol2-Transposon-Systems eine transgene eGFP-Reporterlinie, die alle *slc22a4*-exprimierenden Zellen mittels cytoplasmatischer eGFP-Fluoreszenz sichtbar macht, etabliert werden (*Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie). Hierzu musste ein Tol2-*eGFP*-Transposonvektor, der die Transkription des *eGFP*-Gens unter der Kontrolle des Promotors des *slc22a4*-Gens ermöglicht, konstruiert werden (siehe A.4 und D.1.1). Der Promotor des *slc22a4*-Gens ist nicht bekannt (siehe A.4). Anschließend musste dieser Tol2-*eGFP*-Transposonvektor stabil in das Zebrafischgenom der Keimbahn integriert werden (siehe A.4 und D.1.2).

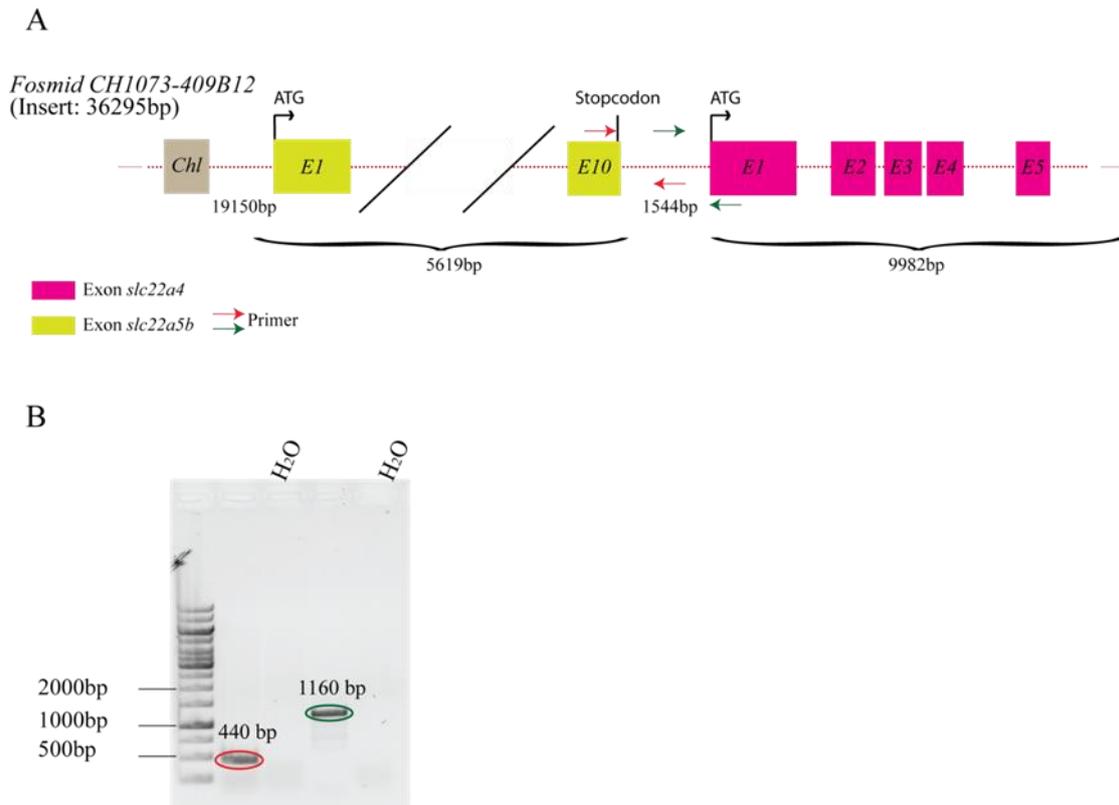
#### D.1.1 Konstruktion des Tol2-*eGFP*-Transposonvektors

Als Grundlage für die Konstruktion des Tol2-*eGFP*-Transposonvektors wurde das Fosmid *CH1073-409B12* verwendet. Es wurde von dem BACPAC Resources Center (BPRC) des Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI) bezogen (Bibliothek: CHORI-1073; GenBank-Zugangsnummer: CU469525). Das Insert dieses Fosmids umfasst laut dem Datenbankeintrag ein 36295 bp langes Stück genomischer Zebrafisch-DNS. Diese genomische DNS beinhaltet die ersten fünf Exons des *slc22a4*-Gens (das vollständige *slc22a4*-Gen umfasst zehn Exons) und das gesamte stromaufwärts gelegene *slc22a5b*-Gen. Zwischen den Genen liegen 1544 bp. Die genomische DNS des Fosmids beinhaltet zudem 19150 bp, die stromaufwärts an das Startcodon des *slc22a5b*-Gens angrenzen (siehe Abbildung 13 A). Es wurde gehofft, dass das Insert des Fosmids *CH1073-409B12* den Promotor des *slc22a4*-Gens vollständig abbildet. Das Rückgrat des Fosmids bildet der Vektor pCC1FOS-CHA, der ein *Chloramphenicolresistenzgen* trägt

(siehe Abbildung 13 A). Daten zu der Sequenz des pCC1FOS-CHA-Vektors waren nicht erhältlich.

Das Fosmid *CH1073-409B12*, das von dem BPRC in Form einer Stichagarkultur geliefert wurde, wurde zunächst isoliert und verifiziert. Mittels eines Verdünnungsausstrichs wurden hierzu die Bakterien auf einer Agarplatte mit Chloramphenicol vereinzelt. Fünf Bakterienkolonien (Nummer 1 bis 5) wurden gepickt und deren Fosmide isoliert (siehe C.1.1.11.1). Mittels Sequenzierung wurde gezeigt, dass die Sequenz des intergenen Bereichs mit dem Datenbankeintrag des Fosmids in allen dieser isolierten Konstrukte übereinstimmte. Die Korrektheit des Übergangs von dem letzten Exon des *slc22a5b*-Gens zu dem intergenen Bereich und die Korrektheit des Übergangs von dem intergenen Bereich zu dem ersten Exon des *slc22a4*-Gens wurde hierbei ebenfalls bestätigt (siehe C.1.1.12). Die zur Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Es wurde hier mit dem Fosmid der Bakterienkolonie Nummer 1 gearbeitet.

Anschließend wurde überprüft, ob das Insert des Fosmids auch wirklich der Situation im Zebrafisch-Genom entspricht. Hierfür wurden zwei Primerpaare designt, die laut Datenbankeintrag des Inserts des Fosmids, die Amplifikation des intergenen Bereichs mittels PCR in zwei sich überlappenden Fragmenten ermöglicht (siehe Tabelle 9). Als PCR-Matrize wurde genomische Zebrafisch-DNA verwendet (siehe C.1.1.15). Die PCR-Reaktionen lieferten die nach dem Datenbankeintrag errechneten Banden der Längen (siehe Abbildung 13). Somit entspricht die Zusammenstellung des Inserts des Fosmids vermutlich der genomischen Situation.



**Abbildung 13: Fosmid CH1073-409B12**

In A ist das Fosmid *CH1073-409B12* schematisch dargestellt. Von dem *slc22a5b*-Gen sind zur Vereinfachung der Abbildung nur das erste und das zehnte Exon eingezeichnet. In B ist die Auftrennung von zwei PCR-Reaktionen im Agarosegel dargestellt. Als Matrize für die PCR-Reaktionen wurde genomische DNS verwendet. Die Positionen der hierfür verwendeten Primer sind in der Schemazeichnung des Fosmids *CH1073-409B12* eingezeichnet. Der Vorwärtsprimer des 5' liegenden Fragments bindet im letzten Exon des *slc22a5b*-Gens. Der Rückwärtsprimer des 3' liegenden Fragments bindet im ersten Exon des *slc22a4*-Gens. Die PCR-Reaktionen lieferten die nach dem Datenbankeintrag errechneten Banden der Längen von 440 bp (rote Umrandung) und 1160 bp (grüne Umrandung). H<sub>2</sub>O: Kontrolle ohne genomische DNS  
*Chl*, Chloramphenicolresistenzgen; *E*, Exon

Im Folgenden ist ein Überblick über die Konstruktion des Tol2-*eGFP*-Transposonvektors gegeben: Um das *eGFP*-Gen unter die Kontrolle des potentiellen Promotors des *slc22a4*-Gens zu bringen, wurde der kodierende Teil des ersten Exons des *slc22a4*-Gens des Fosmids *CH1073-409B12* mittels *Recombineering* gegen eine *eGFP*-Reportergen-kassette (*Kozak\_eGFP\_SV40pA\_FRTKanFRT*) ausgetauscht (Modifizierung des Inserts des Fosmids *CH1073-409B12* mit *eGFP*) (siehe C.1.1.10, D.1.1.1 und Abbildung 15). Die *eGFP*-Reportergen-kassette wurde hier zusammengestellt (siehe D.1.1.1.1 und Abbildung 14). Das *eGFP*-Gen besitzt ein Stopcodon, das zu einem Kettenabbruch bei einer möglichen Proteinbiosynthese führt. Um das *eGFP*-modifizierte Insert des Fosmids mit Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase einzufassen, wurde es in einen pBSK+-Vektor, der eine iTol2*Kan* (invertierte Tol2-Erkennungsstellen, die ein

*Kanamycinresistenzgen* flankierten)-Kassette beinhaltete, mittels *Recombineering* eingebracht (siehe B.4.3, C.1.1.10, D.1.1.2 und Abbildung 17). Der dafür benötigte *Retrieval*-Vektor wurde hier konstruiert (siehe D.1.1.2.1 und Abbildung 16).

Die *slc22a4*-cDNS wurde in einer vorangegangenen Doktorarbeit von M. Bach kloniert und sequenziert (Bach, 2009). Die ermittelte *slc22a4*-cDNS-Sequenz zeigt, dass der DNS-Bereich, der hier gegen die *eGFP*-Reporterengenkassette ausgetauscht werden sollte, nicht aus der präRNS gespleißt wird. Hier wurde dies mittels einer 5' RACE-PCR nochmals bestätigt. Zusätzlich wurde mit dieser durchgeführten 5' RACE-PCR die 57 bp lange 5' UTR (5' GCCCACC GCGGGCTCTGGAGCTCCGCAGCCGCCGGAGTCGCTCTTCATTCGGCTGCT 3') der *slc22a4*-mRNS und somit der Transkriptionsstartpunkt identifiziert (siehe C.1.1.14, Abbildung 12, Abbildung 37 und Abbildung 38).

#### **D.1.1.1 Modifizierung des Inserts des Fosmids CH1073-409B12 mit eGFP**

Die hier beschriebene Modifizierung des Inserts des Fosmids *CH1073-409B12* mit dem *eGFP*-Gen und alle hier verwendeten Abkürzungen sind in der Abbildung 14 und in der Abbildung 15 schematisch dargestellt bzw. erläutert.

Um das *eGFP*-Gen unter die Kontrolle des Promotors des *slc22a4*-Gens zu bringen, wurde der kodierende Teil des ersten Exons des *slc22a4*-Gens des Inserts des Fosmids *CH1073-409B12*, mittels *Recombineering* gegen eine *eGFP*-Reporterengenkassette ausgetauscht (siehe C.1.1.10 und Abbildung 15). Die *eGFP*-Reporterengenkassette musste hierzu mit DNS-Sequenzen flankiert sein, die homolog zu den Bereichen waren, die den kodierenden Bereich des ersten Exons des *slc22a4*-Gens flankieren (siehe C.1.1.10 und Abbildung 14 III).

##### **D.1.1.1.1 Konstruktion der eGFP-Reporterengenkassette**

Zur Konstruktion der *eGFP*-Reporterengenkassette *Kozak\_eGFP\_SV40pA\_FRTKanFRT*, die mit DNS-Bereichen (homologer (h.) 5'-Arm und h. 3'-Arm) flankiert war, die homolog zu den DNS-Bereichen waren, die den kodierenden Bereich des ersten Exons des *slc22a4*-Gens umgeben, wurden ein h. 5'- und ein h. 3'- Arm und ein *Kanamycinresistenzgen*, das von zwei FRT-Stellen umgeben war (FRTKanFRT), in den pCS2+*eGFP*-Vektor eingefügt (siehe B.4.3 und Abbildung 14). Die homologen DNS-Bereiche wurden für das *Recombineering* benötigt (siehe C.1.1.10 und Abbildung 15). Das *Kanamycinresistenzgen* wurde als Selektionsmarker benötigt

(siehe D.1.1.1.2). Die FRT-Stellen waren für die spätere Entfernung des *Kanamycinresistenzgens* erforderlich (siehe C.1.1.10 und Abbildung 15).

Die genaue Vorgehensweise der Konstruktion ist im Folgenden dargestellt: Im ersten Schritt wurde der h. 3'-Arm in den pCS2+*\_eGFP*-Vektor eingefügt. Mittels PCR wurde hierfür zunächst der 285 bp lange h. 3'-Arm, der mit dem DNS-Bereich identisch war, der sich unmittelbar stromabwärts des kodierenden Teils des ersten Exons des *slc22a4*-Gens befindet, amplifiziert. Als Matrize diente das Fosmid *CH1073-409B12*. In den Vorwärtsprimer war eine Schnittstelle für SacII und in den Rückwärtsprimer war eine Schnittstelle für KpnI integriert (siehe C.1.1.3, Abbildung 14 I. und Tabelle 10). Daher konnte der amplifizierte h. 3'-Arm mit SacII und KpnI verdaut und anschließend in den pCS2+*\_eGFP*-Vektor, der mit SacII und KpnI geöffnet wurde, ligiert werden. Es entstand der Vektor „pCS2+*\_eGFP*\_h.3'Arm“ (siehe C.1.1.1, C.1.1.6 und Abbildung 14 I.). Die Richtigkeit des Vektors wurde mittels einer Restriktionsanalyse bestätigt (siehe C.1.1.1). Mögliche PCR-bedingte Fehler in dem h. 3'-Arm konnten anschließend mittels Sanger-Sequenzierung ausgeschlossen werden. Es wurden hierzu zwei Sequenzierreaktionen mit jeweils einem der Primer, die zur Amplifikation des h. 3'-Arms verwendet wurden, durchgeführt (siehe C.1.1.12 und Tabelle 10).

Im nächsten Schritt wurde ein *Kanamycinresistenzgen*, das von FRT-Stellen flankiert war, in den Vektor „pCS2+*\_eGFP*\_h.3'Arm“ eingebaut. Hierzu wurde mit SacII ein DNS-Fragment, das ein von zwei FRT-Stellen flankiertes *Kanamycinresistenzgen* enthielt, aus dem Vektor pIGCN21 ausgeschnitten und in den Vektor „pCS2+*\_eGFP*\_h.3'Arm“, der mit SacII geöffnet wurde, ligiert. Es entstand der Vektor „pCS2+*\_eGFP*\_FRT*Kan*FRT\_h.3'Arm“ (siehe B.4.3, C.1.1.1, C.1.1.6 und Abbildung 14 II.). Die Richtigkeit des Vektors wurde mittels einer Restriktionsanalyse bestätigt (siehe C.1.1.1).

Im letzten Schritt wurde der h. 5'-Arm in den Vektor „pCS2+*\_eGFP*\_FRT*Kan*FRT\_h.3'Arm“ eingefügt. Hierzu wurde der 261 bp lange h. 5'-Arm, der mit dem DNS-Bereich identisch war, der sich unmittelbar stromaufwärts des Startcodons des *slc22a4*-Gens befindet, mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente das Fosmid *CH1073-409B12*. In den Vorwärtsprimer war eine Schnittstelle für HindIII und in den Rückwärtsprimer war eine Schnittstelle für EcoRI eingefügt (siehe B.4.3, C.1.1.3, Abbildung 14 III. und Tabelle 10). Daher konnte der amplifizierte h. 5'-Arm mit HindIII und EcoRI verdaut und anschließend in den Vektor „pCS2+*\_eGFP*\_FRT*Kan*FRT\_h.3'Arm“, der mit HindIII und EcoRI geöffnet wurde,

---

ligiert werden. Es entstand der Vektor „pCS2+\_h.5'Arm\_eGFP\_FRTKanFRT\_h.3'Arm“, der die fertige *eGFP*-Reportergen-kassette enthielt (siehe C.1.1.1, C.1.1.6 und Abbildung 14 III.). Die Verifizierung des Vektors wurde analog zu Verifizierung des Vektors „pCS2+\_eGFP\_h.3'Arm“ durchgeführt.

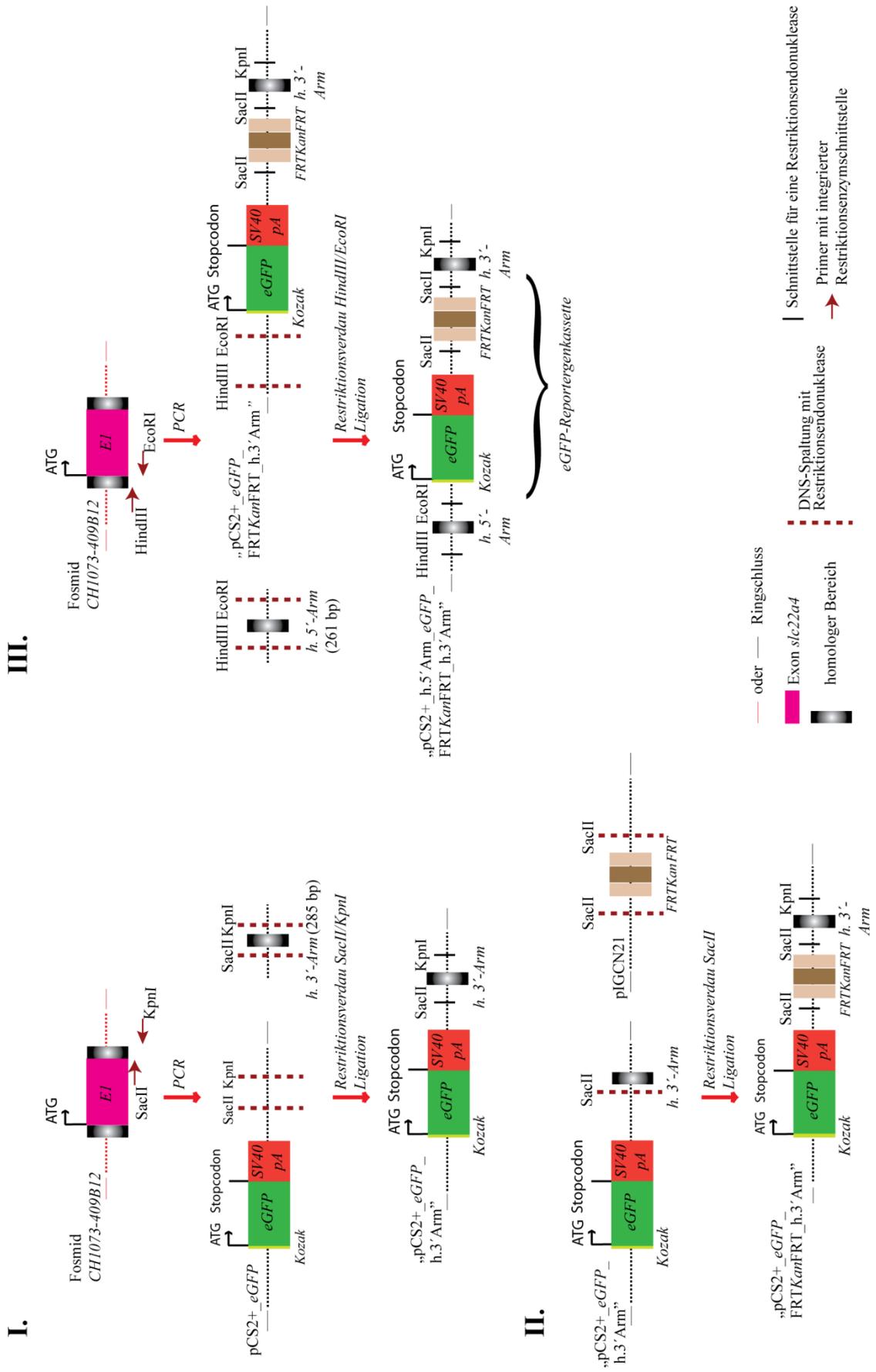


Abbildung 14: Schemazeichnung zur Konstruktion der eGFP-Reportergen-kassette (Legende siehe Seite 70)

Legende zu Abbildung 14:

Von dem Fosmid *CH1073-409B12* ist nur der kodierende Bereich des ersten Exons des *slc22a4*-Gens abgebildet. Eine Beschreibung der Konstruktion befindet sich im Text (siehe D.1.1.1.1). E, Exon; FRT, FLP-Recognition Target; FLP, Flippase; h, homologer; Kan, Kanamycinresistenzgen

#### D.1.1.1.2 Austausch des kodierenden Bereichs des ersten Exons des *slc22a4*-Gens gegen die *eGFP*-Reporterengenkassette

Um den kodierenden Teil des ersten Exons des *slc22a4*-Gens gegen die *eGFP*-Reporterengenkassette auszutauschen, wurde die *Recombineering*-Methode angewandt. Hierzu wurde der Vektor „pCS2+\_h.5'Arm\_*eGFP*\_FRTKanFRT\_h.3'Arm“ mit HindIII linearisiert (siehe C.1.1.1, C.1.1.10 und Abbildung 15). Dieser linearisierte Vektor mit der *eGFP*-Reporterengenkassette wurde mittels Elektroporation in SW105-Zellen eingebracht, die das Fosmid *CH1073-409B12* enthielten und in denen die Synthese der Rekombinationsproteine des defekten  $\lambda$ -Miniphagen mittels Hitzeschock (42 °C, 15 min) induziert worden war (siehe C.2.2 und C.1.1.10). In diesen Zellen wurde nun mittels homologer Rekombination der kodierende Teil des ersten Exons des *slc22a4*-Gens gegen die *eGFP*-Reporterengenkassette ausgetauscht. Es entstand das neukombinierte Konstrukt „Fosmid\_*slc22a4:eGFP\_FRTKanFRT*“ (siehe C.1.1.10 und Abbildung 15). Für Bakterien mit dem Konstrukt „Fosmid\_*slc22a4:eGFP\_FRTKanFRT*“ wurde auf einer Agarplatte mit Kanamycin, für das das Resistenzgen neu hinzugewonnen worden war, und Chloramphenicol selektiert. Mittels einer Restriktionsanalyse wurde die Richtigkeit der Konstrukte der Klone (fünf untersuchte Kolonien) ermittelt (siehe C.1.1.1 und Abbildung 15). Zudem wurde der Austausch des kodierenden Teils des ersten Exons des *slc22a4*-Gens gegen die *eGFP*-Reporterengenkassette mittels Sequenzierung in allen untersuchten Konstrukten bestätigt. Zur Sequenzierung wurde ein Primer verwendet, der stromaufwärts des h. 5'-Arms band. Die Sequenzierreaktion lief über den h. 5'-Arm in die *eGFP*-Reporterengenkassette hinein (siehe C.1.1.12, Tabelle 11 und Abbildung 15; Sequenzierungsdatensatz).

Da im nächsten Konstruktionsschritt erneut ein *Kanamycinresistenzgen* zur Selektion eingeführt wurde, musste das *Kanamycinresistenzgen* des Konstrukts „Fosmid\_*slc22a4:eGFP\_FRTKanFRT*“ entfernt werden (siehe D.1.1.2). Dies geschah über eine L-Arabinose-induzierbare FLP/FRT-Rekombination in SW105 *E. coli*-Zellen, die das Konstrukt „Fosmid\_*slc22a4:eGFP\_FRTKanFRT*“ enthielten (siehe C.1.1.10). In dem neukombinierten Fosmid sollte nur noch eine FRT-Stelle von dem *Kanamycinresistenzgen* zeugen, das zuvor von zwei FRT-Stellen flankiert worden war. Dieses Konstrukt wurde

daher als „Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRT“ bezeichnet (siehe Abbildung 15). SW105-Zellen mit dem Konstrukt „Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRT“ wuchsen auf Agarplatten mit Chloramphenicol, aber nicht auf Agarplatten mit Kanamycin, und konnten so identifiziert werden. Die Richtigkeit der Konstrukte der Klone (es wurden fünf Bakterienkolonien untersucht) wurde mittels einer Restriktionsanalyse ermittelt (siehe C.1.1.1 und Abbildung 15).

Das mit *eGFP*-modifizierte Insert des Konstrukts „Fosmid\_slc22a4:eGFP-FRT\_iTol2Kan“ wurde im Folgenden als potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette (*slc22a4:Kozak\_eGFP\_SV40pA\_FRT*) bezeichnet.

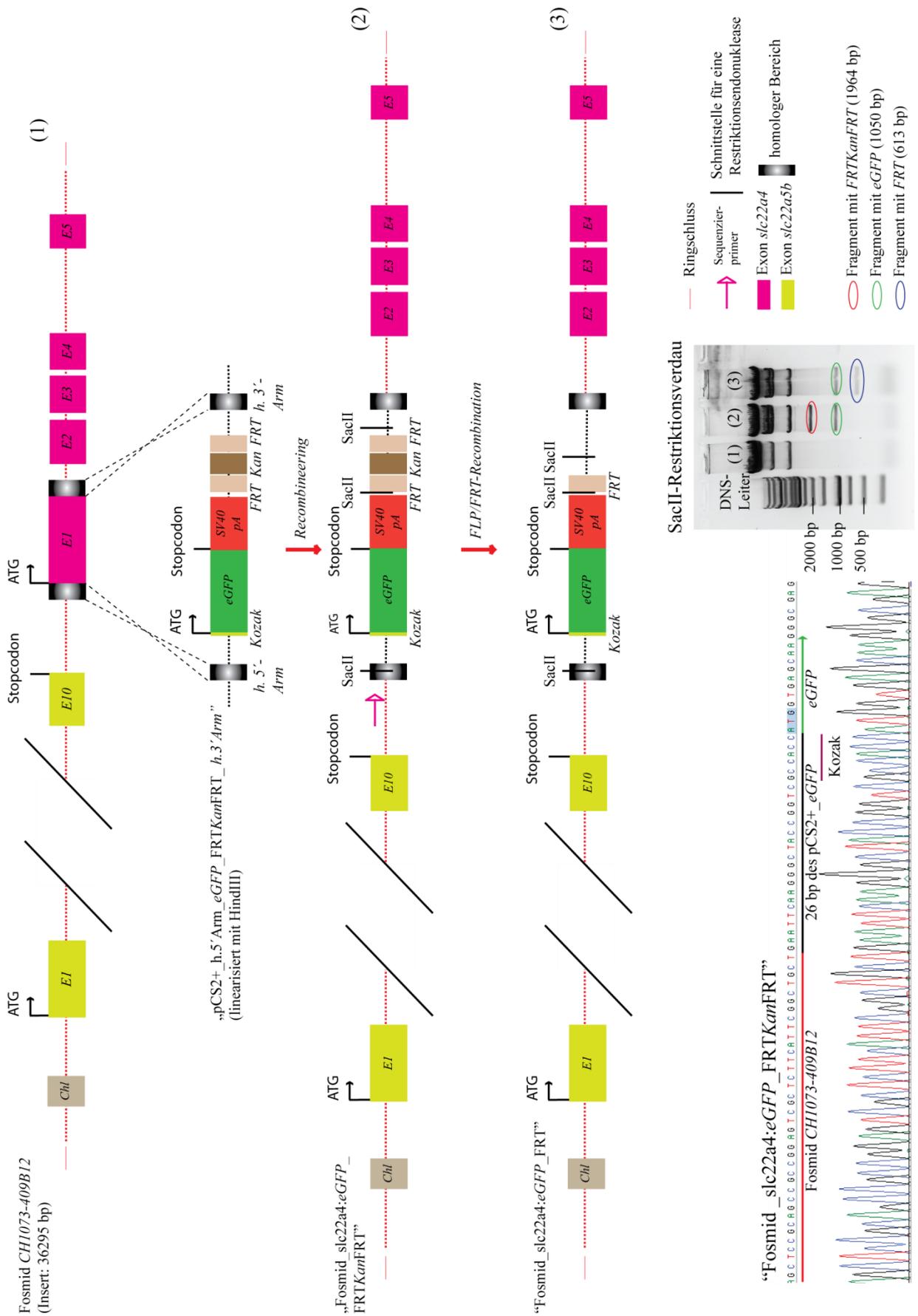


Abbildung 15: Schemazeichnung zur Konstruktion des Vektors „Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRT“ (Legende siehe Seite 73)

Legende zu Abbildung 15:

Eine Beschreibung der Konstruktion befindet sich im Text (siehe D.1.1.1.2).

Der Sequenzierungsdatensatz des Konstrukts „Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRTKanFRT“ zeigt, dass das erste Exon des *slc22a4*-Gens gegen die *eGFP*-Reporterengenkassette ausgetauscht wurde.

Zwischen dem ATG (blau unterlegt) des *eGFP*-Gens und der möglichen Promotorregion des *slc22a4*-Gens liegen zusammen mit der Kozak-Sequenz (GCCACC) 26 bp des pCS2+\_*eGFP*-Vektors (siehe B.4.3).

Das Gelbild zeigt eine Restriktionsanalyse des Fomids *CH1073-409B12* (1), des Konstrukts „Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRTKanFRT“ (2) und des Konstrukts „Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRT“ (3) mit SacII. Es wurden die erwarteten Bandenmuster erhalten: Nach dem *Recombineering*-Schritt ((1)->(2)) wurden zusätzliche Banden detektiert. Die grüne Umrandung in (2) markiert das zusätzliche DNS-Fragment mit dem *eGFP*-Gen. Die rote Umrandung in (2) markiert das zusätzliche DNS-Fragment mit dem *Kanamycinresistenzgen*, das von FRT-Stellen flankiert ist. Die FLP/FRT-Rekombination ((2)->(3)) führte zu einem Wegfall des DNS-Fragments mit dem von FRT-Stellen flankierten *Kanamycinresistenzgen*. Es kam zu einem Zugewinn eines DNS-Fragments mit einer einzelnen FRT-Stelle (blaue Umrandung). Die grüne Umrandung in (3) markiert das DNS-Fragment mit dem *eGFP*-Gen. *chl*, *Chloramphenicolresistenzgen*; E, Exon; FRT, FLP-Recognition Target; FLP, Flippase; h. homologer; *Kan*, *Kanamycinresistenzgen*

#### ***D.1.1.2 Umgeben der potentiellen slc22a4:eGFP-Expressionskassette mit Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase***

Der hier beschriebene Ablauf des Einfassens der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette mit Tol2-Erkennungsstellen ist in der Abbildung 16 und in der Abbildung 17 schematisch dargestellt.

Um die potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette des Konstrukts „Fosmid\_slc22a4:eGFP\_FRT“ mit Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase zu flankieren, wurde sie in einen pBSK+-Vektor, der eine iTol2*Kan*-Kassette beinhaltetete (*Retrieval*-Vektor), mittels *Recombineering* eingebracht. Hierfür musste dieser Vektor über DNS-Bereiche (h. 5'- und h. 3'-Arm) verfügen, die homolog zu den Enden der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette waren (siehe B.4.3, C.1.1.10, D.1.1.1, Abbildung 15 und Abbildung 17).

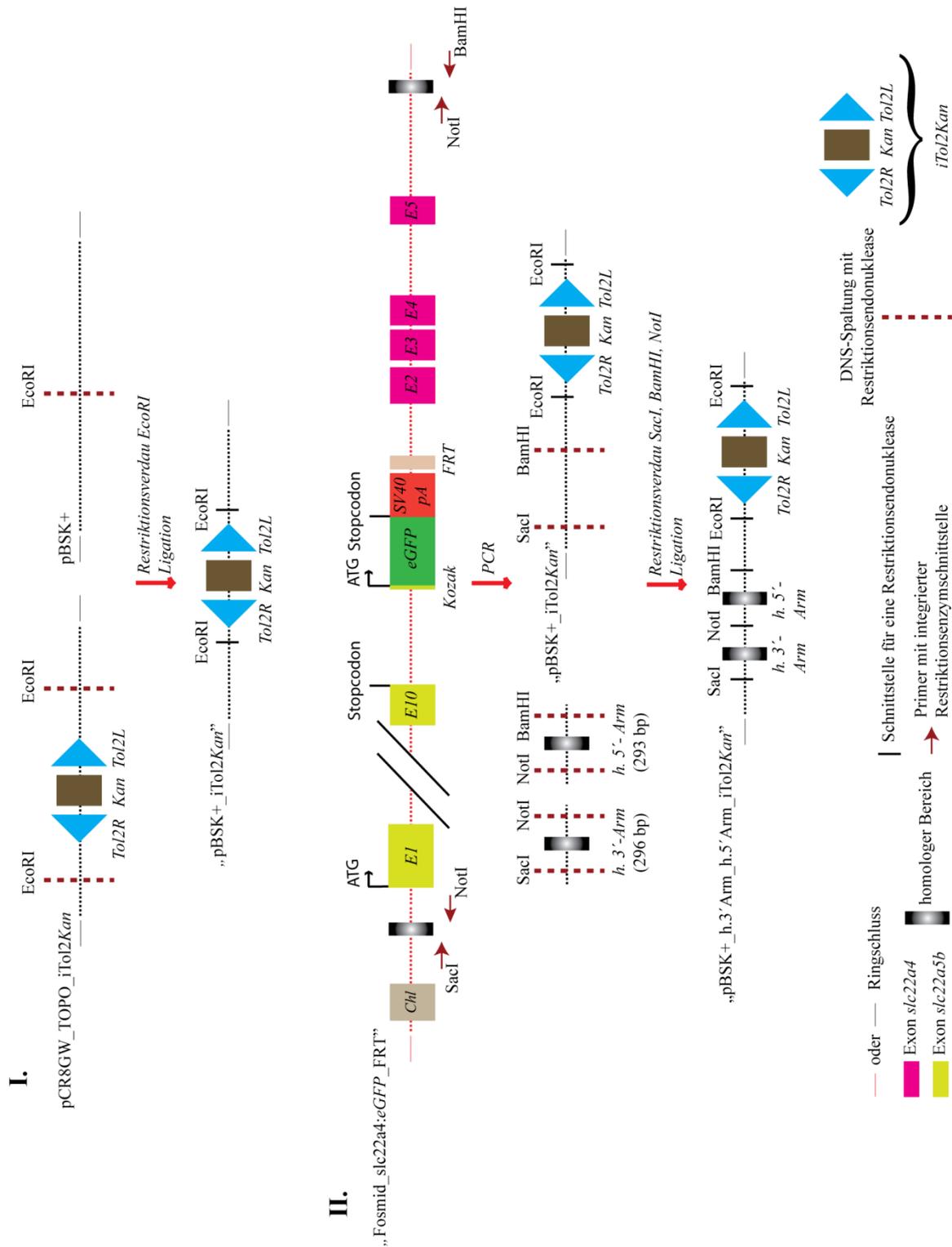
##### ***D.1.1.2.1 Konstruktion des Retrieval-Vektors***

Für die Herstellung des *Retrieval*-Vektors „pBSK+\_h.3'Arm\_h.5'Arm iTol2*Kan*“ wurden ein h. 5'- und ein h. 3'-Arm und eine iTol2*Kan*-Kassette, in den pBSK+-Vektor eingebaut. Die homologen Arme wurden für das *Recombineering* benötigt (siehe B.4.3, C.1.1.10, Abbildung 16 und Abbildung 17). Die Tol2-Erkennungsstellen wurden für die spätere Tol2-Transposase-vermittelte Integration der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette in das Genom des Zebrafischblümlings benötigt (siehe A.4). Das von den

invertierten Tol2-Erkennungssequenzen eingeschlossene *Kanamycinresistenzgen* diente als Selektionsmarker (siehe D.1.1.2.2).

Die genaue Vorgehensweise der Konstruktion ist im Folgenden beschrieben: Im ersten Schritt wurde die iTol2*Kan*-Kassette in den pBSK+-Vektor eingeführt. Dazu wurde aus dem Vektor pCR8GW\_TOPO\_iTol2*Kan* mit EcoRI ein Fragment, das die iTol2*Kan*-Kassette enthielt, ausgeschnitten und in den mit EcoRI geöffneten pBSK+-Vektor ligiert (siehe B.4.3, C.1.1.1 und C.1.1.6). Es entstand der Vektor „pBSK+\_iTol2*Kan*“ (siehe Abbildung 16 I.). Die Richtigkeit des Vektors wurde mit einer Restriktionsanalyse bestätigt (siehe C.1.1.1).

Im zweiten Konstruktionsschritt wurden der h. 5'- und der h. 3'-Arm gleichzeitig in den „pBSK+\_iTol2*Kan*“-Vektor eingesetzt. Hierzu wurde der 293 bp lange h. 3'-Arm, der mit dem DNS-Bereich identisch war, der sich am 5' Ende der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette befand, mittels PCR amplifiziert. In den Vorwärtsprimer war eine SacI-Schnittstelle eingefügt. In den Rückwärtsprimer war eine NotI-Schnittstelle eingebaut. Als Matrize diente das Konstrukt „Fosmid\_*slc22a4:eGFP*-FRT“ (siehe C.1.1.3, Tabelle 12 und Abbildung 16 II.). Der 296 bp lange h. 5'-Arm, der mit dem DNS-Bereich identisch war, der sich am 3'-Ende der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette befand, wurde mittels PCR amplifiziert. Für die PCR-Amplifikation wurden ein Vorwärtsprimer mit integrierter NotI-Schnittstelle und ein Rückwärtsprimer mit eingefügter BamHI-Schnittstelle verwendet. Als Matrize diente das Konstrukt „Fosmid\_*slc22a4:eGFP*-FRT“ (siehe C.1.1.3, Tabelle 12 und Abbildung 16 II.). Anschließend wurde der h. 5'-Arm mit NotI und BamHI verdaut. Der h. 3'-Arm wurde einem NotI/SacI-Restriktionsverdau unterzogen. Die verdauten homologen Arme wurden in den Vektor „pBSK+\_iTol2*Kan*“, der mit SacI und BamHI geöffnet wurde, gerichtet ligiert. Es entstand der *Retrieval*-Vektor „pBSK+\_h.3'Arm\_h.5'Arm\_iTol2*Kan*“. Der h. 5'- und der h. 3'-Arm waren auf diesem Vektor nur durch die NotI-Schnittstelle getrennt (siehe C.1.1.1, C.1.1.6 und Abbildung 16 II.). Um zu überprüfen, ob die homologen Arme PCR-bedingte Sequenz-Fehler aufwiesen, wurden diese mit dem Vorwärtsprimer des h. 3'-Arms und parallel mit dem Rückwärtsprimer des h. 5'-Arms nach Sanger sequenziert (siehe C.1.1.12 und Tabelle 12). Es wurden keine Sequenzfehler detektiert.



**Abbildung 16: Schemazeichnung zur Konstruktion des Retrieval-Vektors**

Eine detaillierte Beschreibung der Konstruktion befindet sich im Text (siehe D.1.1.2.1). *Chl*, Chloramphenicolresistenzgen; E, Exon, h. homologer; iToI2Kan; invertierte Tol2-Erkennungsstellen, die ein Kanamycinresistenzgen flankierten; FRT, FLP-Recognition Target; FLP, Flippase; Kan, Kanamycinresistenzgen

#### D.1.1.2.2 Aufnahme der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette in den Retrieval-Vektor mittels Recombineering

Um die potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette in den *Retrieval*-Vektor einzubringen, wurde das *Recombineering* angewandt (siehe C.1.1.10). Hierfür wurde der Vektor „pBSK+\_h.3'Arm\_h.5'Arm\_iTol2Kan“ mit NotI verdaut (siehe C.1.1.1, Abbildung 16 und Abbildung 17). Dieser linearisierte Vektor wurde mittels Elektroporation in SW105-Zellen, die das Konstrukt „Fosmid\_*slc22a4:eGFP\_FRT*“ enthielten und in denen die Expression der *red*-Gene des defekten  $\lambda$ -Miniphagen mittels Hitzeschock (42 °C, 15 min) induziert worden waren, eingebracht. In diesen Zellen wurde nun mittels homologer Rekombination zwischen den homologen Bereichen die potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette in den *Retrieval*-Vektor „pBSK+\_h.3'Arm\_h.5'Arm\_iTol2Kan“ aufgenommen. Es entstand der Tol2-*eGFP*-Transposonvektor „pBSK+\_*slc22a4:eGFP\_FRT\_iTol2Kan*“, in dem die potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette von Tol2-Erkennungsstellen flankiert war (siehe C.1.1.10 und Abbildung 17). SW105-Zellen, in denen diese homologe Rekombination stattgefunden hatte, haben ihre Chloramphenicolresistenz verloren, aber eine Kanamycinresistenz neuerworben. Für diese Zellen wurde auf Agarplatten mit Kanamycin selektiert. Die Richtigkeit der Konstrukte der Klone (es wurden fünf Bakterienkolonien untersucht) wurde mit einem EcoRI-Restriktionsverdau überprüft und bestätigt (siehe C.1.1.1 und Abbildung 17). Zusätzlich wurde das Konstrukt mit einem Primer, der stromaufwärts des h. 3'-Arms im pBSK+-iTol2Kan-Vektorrückgrat bindet sequenziert. Die Sequenzierreaktion lief über den h. 3'-Arm in die restliche potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette hinein (siehe C.1.1.12 und Tabelle 13). Es wurde damit bestätigt, dass die potentielle Expressionskassette in den *Retrieval*-Vektor aufgenommen wurde.

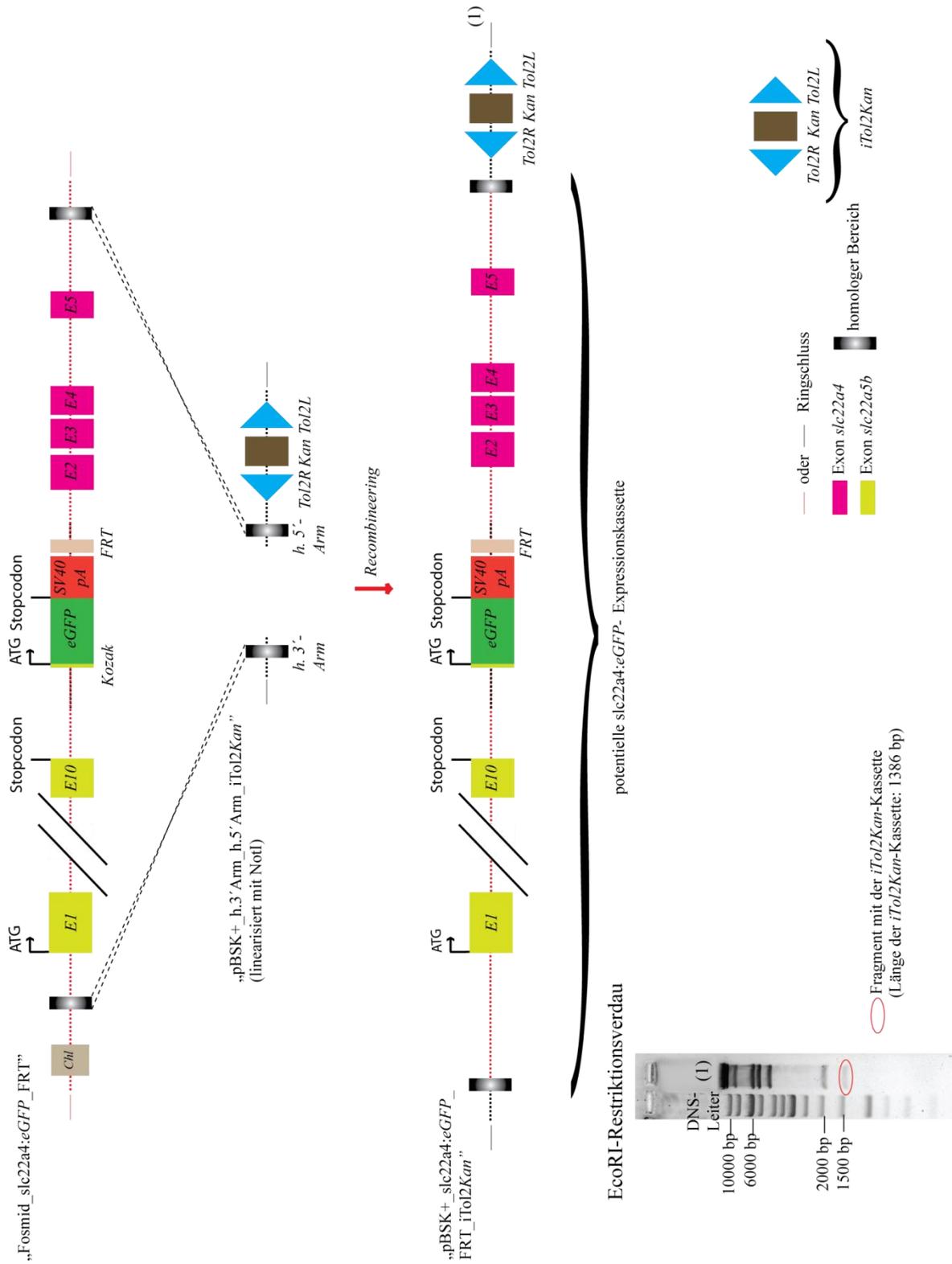


Abbildung 17: Schemazeichnung zur Konstruktion des Tol2-eGFP-Transposonvektors (Legende siehe Seite 78)

Legende zu Abbildung 17:

Eine Beschreibung der Konstruktion befindet sich im Text (siehe D.1.1.2.2).

Das Gelbild zeigt einen Restriktionsverdau des finalen Tol2-*eGFP*-Transposonvektors „pBSK+\_slc22a4:*eGFP*\_FRT\_iTol2*Kan*“ mit EcoRI. Es wurde das erwartete Bandenmuster erhalten. Die rote Umrandung markiert das DNS-Fragment mit der iTol2*Kan*-Kassette. *chl*, *Chloramphenicolresistenzgen*; E, Exon, h. homologer; iTol2*Kan*; invertierte Tol2-Erkennungsstellen, die ein *Kanamycinresistenzgen* flankierten; FRT, FLP-Recognition Target; FLP, Flippase; *Kan*, *Kanamycinresistenzgen*

## D.1.2 Test des Tol2-*eGFP*-Transposonvektors

Um zu testen, ob sich auf der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette der vollständige Promotor des *slc22a4*-Gens befindet, wurde der Tol2-*eGFP*-Transposonvektor „pBSK+\_slc22a4:*eGFP*\_FRT\_iTol2*Kan*“ zusammen mit der *Tol2*-mRNS in das Cytoplasma von Zebrafisch-Embryonen im Einzell-Stadium injiziert (siehe C.3.2.1, C.3.2.2, und Abbildung 17 und Abbildung 20). Falls der Promotor des *slc22a4*-Gens in der potentiellen Expressionskassette vollständig abgebildet war und zusammen mit dem *eGFP*-Gen ins Genom integrierte, konnte eine *eGFP*-Fluoreszenz erwartet werden, die annähernd das endogene Expressionsmuster des *slc22a4*-Gens widerspiegelte (siehe A.4).

### D.1.2.1 Überprüfung der *Tol2*-mRNS

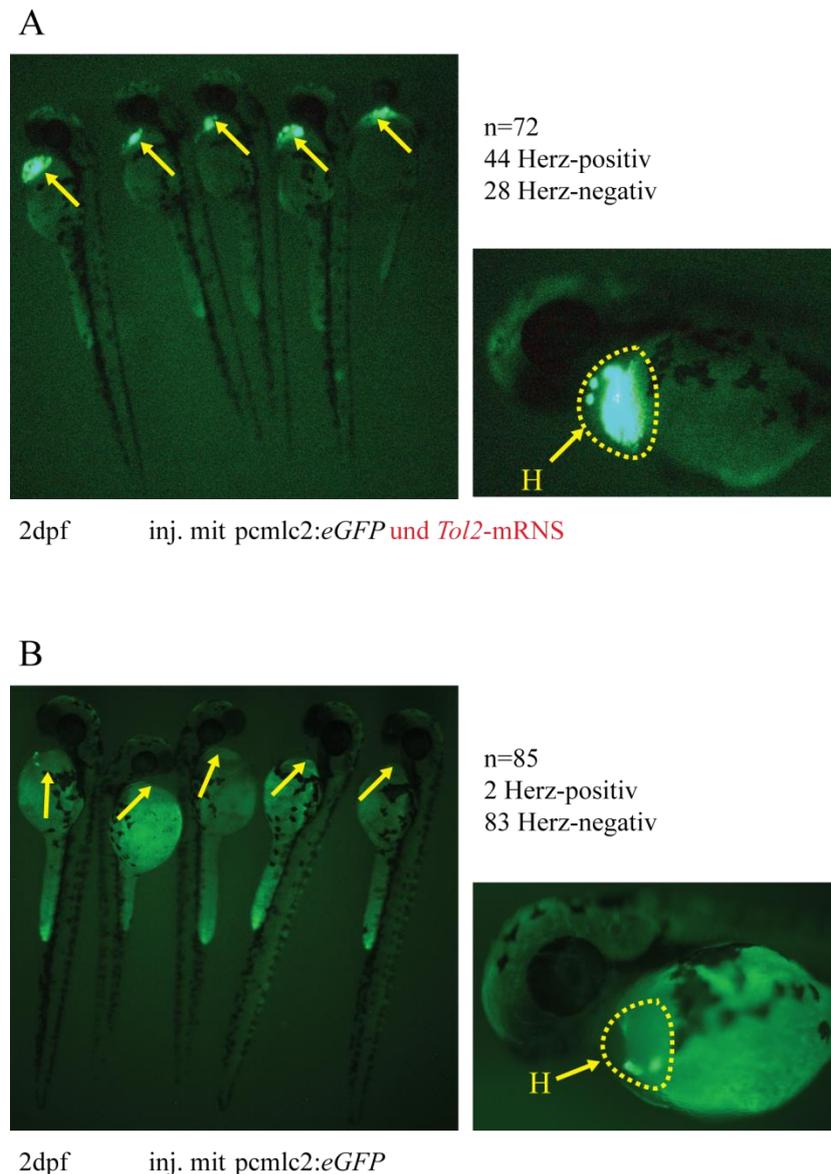
Vor der Injektion des Tol2-*eGFP*-Transposonvektors „pBSK+\_slc22a4:*eGFP*\_FRT\_iTol2*Kan*“ wurde überprüft, ob die hier transkribierte *Tol2*-mRNS eine Matrize für die Synthese einer funktionsfähigen Tol2-Transposase darstellte (siehe A.4, C.3.2.1, Abbildung 17 und Abbildung 18). Eine Tol2-Transposase ist funktionsfähig, wenn sie die Integration von Transgenen, die von Tol2-Erkennungsstellen flankiert sind, in das Genom vermittelt (siehe A.4).

Hierfür wurde der Vektor *pcmlc2 (cardiac myosin light chain 2):eGFP* (50 ng/μl), der eine *cmlc2:eGFP*-Expressionskassette enthielt, die von Tol2-Erkennungsstellen flankiert war, einmal mit und einmal ohne *Tol2*-mRNS (50 ng/μl) in Zebrafische im Einzell-Stadium injiziert (siehe B.4.3, C.3.2.2 und Abbildung 18).

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Injektion des Vektors *pcmlc2:eGFP* die Synthese cytoplasmatischen *eGFP*s in Herzmuskelzellen sich entwickelnder Zebrafisch-Larven bewirkt (Kwan et al., 2007) (siehe B.4.3). Die Synthese des cytoplasmatischen *eGFP*s konnte von Kwan und Kollegen durch die Injektion des Vektors *pcmlc2:eGFP* zusammen mit *Tol2*-mRNS gesteigert werden. Die erhöhte *eGFP*-Produktion wurde durch die stärkere *eGFP*-Fluoreszenz in den einzelnen Zellen, durch die

---

gestiegene Anzahl an eGFP-positiven Zellen in einer Zebrafisch-Larve und durch die höhere Zahl an fluoreszierenden Larven deutlich. Der Grund für die verstärkte eGFP-Synthese war die höhere Anzahl an *cmlc2:eGFP*-Expressionskassetten, die in das Genom integrierten. Diese erhöhte Integrationsrate wurde durch die Tol2-Transposase bewerkstelligt (Kwan et al., 2007) (siehe A.4). Dieser Befund konnte hier nachgestellt werden. So besaßen zwei von 85 Larven, die nur mit dem Vektor *pcmlc2:eGFP* injiziert worden waren, sehr schwache eGFP-Fluoreszenz in sehr wenigen Herzmuskelzellen. Im Gegensatz dazu besaßen 44 von 72 Larven, die mit dem Vektor *pcmlc2:eGFP* und der hier synthetisierten *Tol2*-mRNS injiziert worden waren, starke eGFP-Fluoreszenz in vielen Herzmuskelzellen. Damit wurde gezeigt, dass die hier synthetisierte *Tol2*-mRNS eine Matrize für die Synthese einer funktionsfähigen Tol2-Transposase war (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18: *Tol2-mRNS*-Test**

Dargestellt sind Zebrafärblich-Larven 2 dpf, die mit dem Vektor *pcmlc2:eGFP* (50 ng/ $\mu$ l) und mit der *Tol2-mRNS* (50 ng/ $\mu$ l) (A) bzw. nur mit dem Vektor *pcmlc2:eGFP* (50 ng/ $\mu$ l) (B) injiziert wurden. Die Larven in A zeigen eine deutliche eGFP-Fluoreszenz in den Herzmuskelzellen. Die Larven in B zeigen keine eGFP-Fluoreszenz oder sehr schwache eGFP-Fluoreszenz in sehr wenigen Herzmuskelzellen. Sowohl in A als auch in B ist links eine Zusammenstellung von 5 Larven, die mit dem Kopf nach oben ausgerichtet sind, und rechts eine Vergrößerung einer Larve, die mit dem Kopf nach links ausgerichtet ist, dargestellt. Die Pfeile zeigen auf die Herzregionen. In den zwei Detail-Aufnahmen sind die Herzregionen gestrichelt umrandet. *cmlc2*, *cardiac myosin light chain 2*; H, Herz; inj., injiziert

#### **D.1.2.2 Injektion des *Tol2-eGFP*-Transposonvektors zusammen mit *Tol2-mRNS***

Um zu testen, ob sich auf der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette der vollständige Promotor des *slc22a4*-Gens befand, wurde der *Tol2-eGFP*-Transposonvektor „pBSK+\_*slc22a4:eGFP\_FRT-iTol2Kan*“ in den Konzentrationen 50 ng/ $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l bzw.

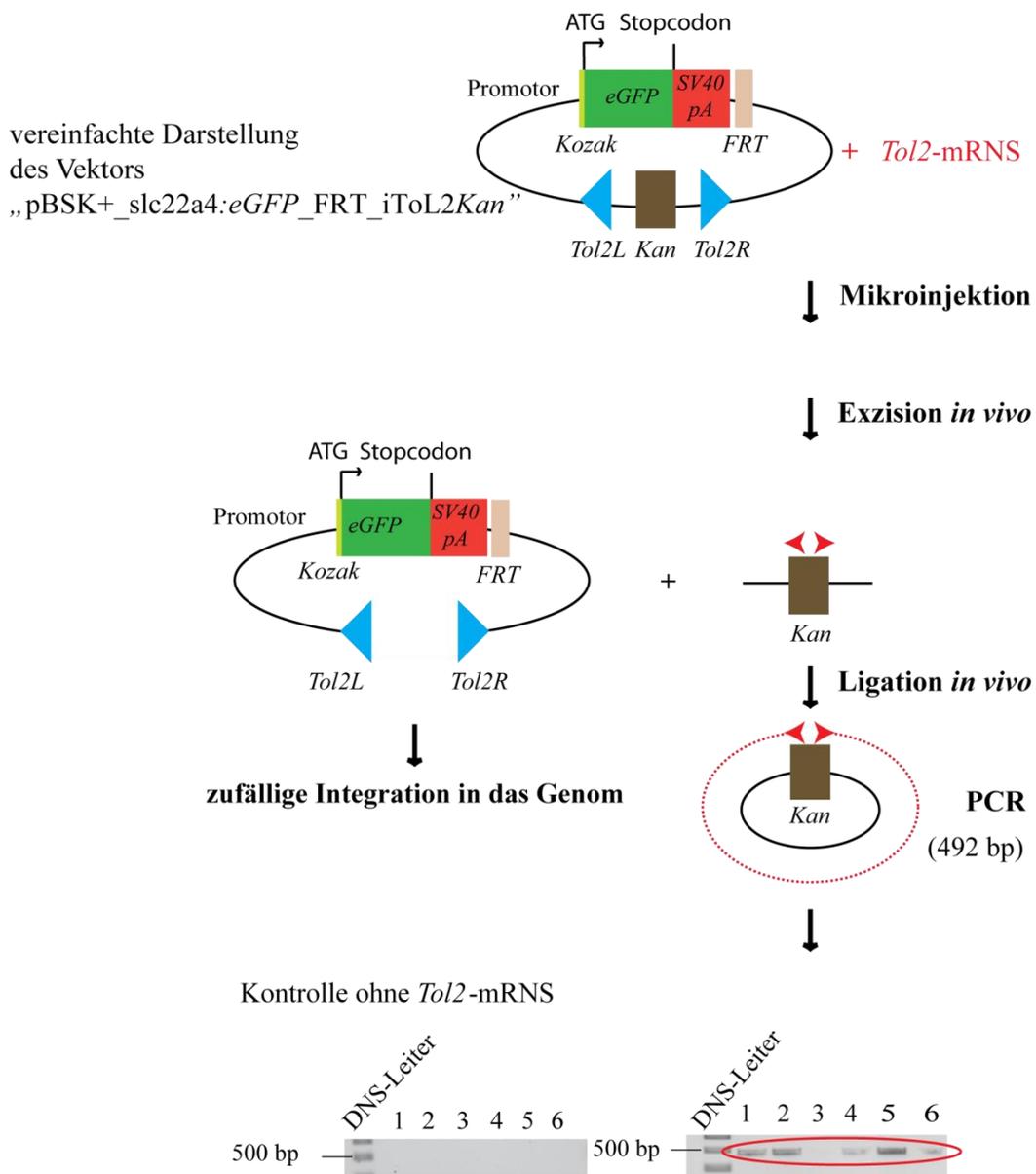
200 ng/μl zusammen mit der zuvor überprüften *Tol2*-mRNS (50-65 ng/μl) in das Cytoplasma von je 200 Zebrabärbling-Embryonen im Einzell-Stadium injiziert (siehe A.4, C.3, D.1.2.1, Abbildung 17 und Abbildung 20 A).

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die *Tol2*-Transposase an dem hier konstruierten *Tol2-eGFP*-Transposonvektor angreifen konnte und ob die potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette ins Genom eingebaut wurde, wurde jeweils an sechs der je 200 injizierten Embryonen ein *Tol2-excision assay* durchgeführt (Kawakami und Shima, 1999).

Im Folgenden wird der Ablauf eines dieser *Tol2-excision assays* beschrieben (siehe Abbildung 19): Die *Tol2-Transposase*-mRNS diente im Cytosol als Matrize für die Synthese von aktiven *Tol2*-Transposase-Proteinen. Falls die *Tol2*-Transposase an ihren Erkennungsstellen im *Tol2-eGFP*-Transposonvektor „pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT\_iTol2Kan“ angreifen konnte, schnitt sie das DNS-Fragment, das sich als *Spacer* zwischen den invertierten *Tol2*-Erkennungsstellen befand und das *Kanamycinresistenzgen* enthielt, aus dem Vektor heraus. Der so linearisierte Vektor wurde vermutlich von der *Tol2*-Transposase ungerichtet und stabil in das Genom eingebaut. Das DNS-Fragment mit dem *Kanamycinresistenzgen* schloss sich zu einem Ring. Nachdem sich die sechs Embryonen für 10 h entwickelt hatten, wurden aus jedem einzelnen unter Verwendung des Lysepuffers, der auch zur Gewinnung genomischer Zebrabärbling-DNS eingesetzt wurde, die möglichen zirkulären DNS-Stücke isoliert (siehe C.1.1.15). Mittels PCR wurden anschließend diese möglichen zirkulären DNS-Stücke, deren Anwesenheit auf eine Integration der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette in das Genom hindeuteten, nachgewiesen (siehe Abbildung 19, rechtes Gelbild: rot umrandete Banden von je 492 bp). Als Negativkontrolle wurden sechs Embryonen, die mit dem *Tol2-eGFP*-Transposonvektor, aber nicht mit der *Tol2*-mRNS, injiziert worden waren, mitgeführt (siehe Abbildung 19, linkes Gelbild). Mittels PCR wurde nachgewiesen, dass der Vektor tatsächlich in den zuletzt genannten Embryonen anwesend war. Die für den *Tol2-excision assay* verwendeten Primer sind in Tabelle 14 aufgelistet. Ein *Tol2-excision assay* wurde als positiv gewertet, wenn mindestens in drei der sechs untersuchten Embryonen das beschriebene zirkuläre DNS-Stück nachgewiesen wurde.

Da der jeweilige *Tol2-excision assay* für alle Injektionen positiv ausfiel, wurde angenommen, dass bei den meisten Zebrabärblingen eine Transponierung der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette in das Zebrabärbling-Genom stattgefunden hatte (siehe Abbildung 19). Für den Fall, dass der Promotor des *slc22a4*-Gens in der potentiellen

Expressionskassette vollständig abgebildet war, konnte daher erwartet werden, dass die injizierten Zebrafisch-Larven eine mosaik eGFP-Expression, die annähernd das endogene *slc22a4*-Expressionsmuster widerspiegelte, aufwiesen (siehe A.4 und Abbildung 20 C).



►Primer

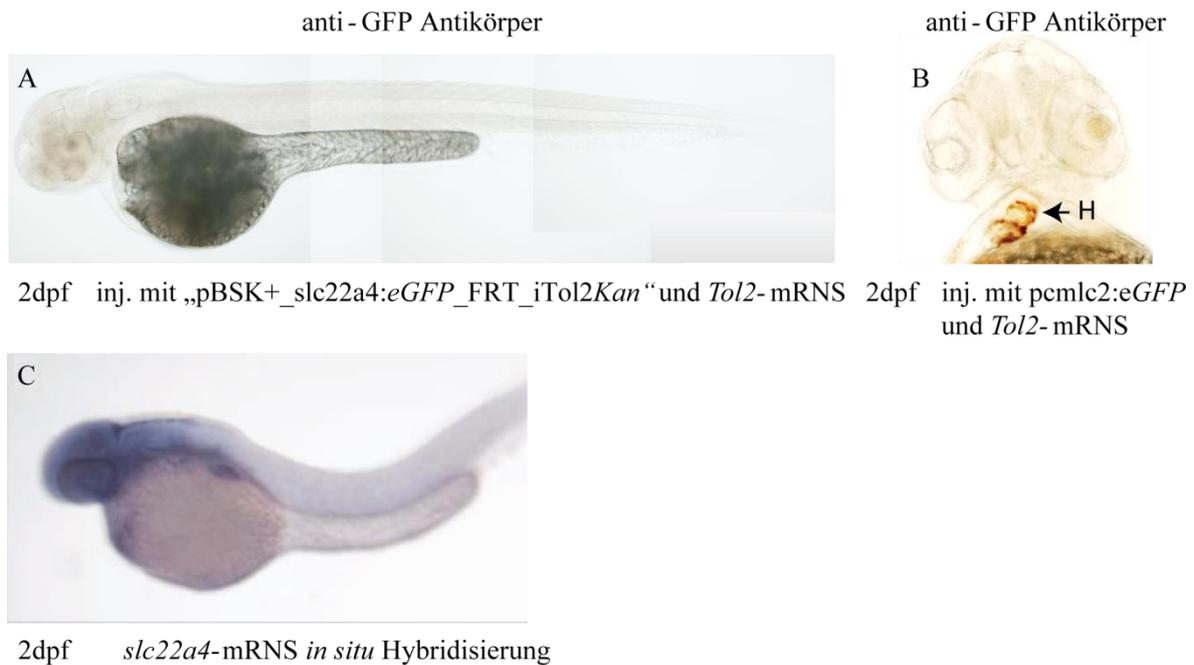
**Abbildung 19: Tol2-excision assay**

Dargestellt ist der Ablauf und das Ergebnis des *Tol2-excision assays*, der an sechs Embryonen durchgeführt wurde, die mit dem Vektor „pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT\_iToL2Kan“ (200 ng/μl) zusammen mit der *Tol2*-mRNS (65 ng/μl) injiziert wurden. In fünf von sechs Embryonen wurden zirkularisierte *Kanamycinresistenzgene* mittels PCR nachgewiesen (rechtes Gelbild). Eine

---

Beschreibung befindet sich im Text (siehe D.1.2.2). Kan, *Kanamycinresistenzgen*; PK, Positivkontrolle

Von mRNA *in situ* Hybridisierungen ist unter anderem bekannt, dass das *slc22a4*-Gen in Zebrabärblingen 2 dpf im Kopfbereich und in einer Zellanhäufung auf dem Dottersack exprimiert wird (Bach, 2009) (siehe Abbildung 20 C). Jedoch konnte in keinem der injizierten Embryonen das eGFP-Protein weder direkt über dessen Fluoreszenz noch indirekt mittels sensitiverer Antikörperfärbung (DAB-Färbung; durchgeführt an jeweils 30 Stück der injizierten Zebrabärblinge) 2 dpf nachgewiesen werden (siehe C.6.1 und Abbildung 20 A). Die injizierten Zebrabärblinge wurden noch bis einschließlich 7 dpf regelmäßig unter einem Fluoreszenzbinokular auf eGFP-Fluoreszenz hin untersucht. Es konnte keine eGFP-Fluoreszenz detektiert werden. Aus den genannten Befunden wurde gefolgert, dass das eGFP-Protein vermutlich nicht exprimiert wurde. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass sich nicht alle regulatorischen Elemente zur Kontrolle der Transkription des *slc22a4*-Gens auf der potentiellen *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette des Tol2-*eGFP*-Transposonvektors „pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT\_iTol2Kan“ befinden (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 20: eGFP-Detektion mittels DAB-Färbung in Zebrabärblingen, die mit dem *Tol2*-eGFP-Transposonvektor und mit *Tol2*-mRNS injiziert wurden**

In A ist eine laterale Ansicht eines Zebrabärblings 2 dpf, der mit dem *Tol2*-eGFP-Transposonvektor „pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT\_iTol2Kan“ (200 ng/μl) zusammen mit *Tol2*-mRNS (65 ng/μl) injiziert wurde, dargestellt. Mittels DAB-Färbung konnte kein eGFP detektiert werden. In B ist eine ventrale Ansicht des Kopf-Herz-Bereichs eines Zebrabärblings 2 dpf dargestellt, der mit dem Vektor *pcmlc2:eGFP* (50 ng/μl) und mit *Tol2*-mRNS (50 ng/μl) injiziert wurde. Mittels DAB-Färbung wurde eGFP wie erwartet im Herzmuskel detektiert (braune Anfärbung). Diese DAB-Färbung war die Positivkontrolle für die in A durchgeführte DAB-Färbung. In C ist eine *slc22a4*-mRNS *in situ* Hybridisierung an einem Zebrabärbling 2 dpf gezeigt (laterale Aufnahme). Das Bild der *slc22a4*-mRNS *in situ* Hybridisierung wurde aus der Dissertation von M. Bach entnommen (Bach, 2009).

### **D.1.2.3 Untersuchung eines möglichen inhibitorischen Einflusses des Vektorrückgrats und der FRT-Stelle auf die eGFP-Expression**

In der Vergangenheit wurden Expressionsvektoren, die FRT-Stellen, *iTol2Kan*-Kassetten und Teile des pBSK+-Vektors besaßen, erfolgreich zur Herstellung transgener eGFP-Reporterlinien im Zebrabärbling verwendet (Suster et al., 2011, Higashijima et al., 2000, Langenau et al., 2004). Die hier verwendete Konstellation aus der FRT-Stelle, der *iTol2Kan*-Kassette und dem pBSK+-Vektor wurde jedoch noch nie eingesetzt (siehe Abbildung 17).

Um auszuschließen, dass die Konstellation aus den genannten DNS-Fragmenten einen inhibitorischen Einfluss auf eine mögliche eGFP-Expression ausgeübt hatte, wurde hier untersucht, ob sie die eGFP-Expression, die von einem bekannten Promotor getrieben wird, negativ beeinflusst. Hierfür wurde der Vektor „pBSK+\_CMV:eGFP\_FRT\_iTol2Kan“

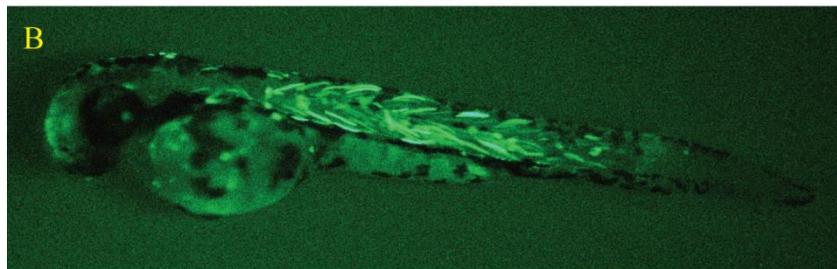
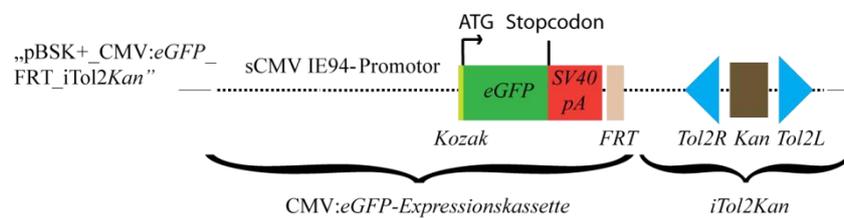
konstruiert und zusammen mit der *Tol2*-mRNS in Zebrabärbling-Embryonen injiziert (siehe Abbildung 21).

Der Vektor „pBSK+\_CMV:*eGFP*\_FRT\_ iTol2*Kan*“ entspricht bis auf die potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette, die durch eine CMV:*eGFP*-Expressionskassette (CMV:Kozak\_*eGFP*\_SV40pA\_FRT) ersetzt wurde, dem Tol2-*eGFP*-Transposonvektor „pBSK+\_slc22a4:*eGFP*\_FRT\_ iTol2*Kan*“ (siehe Abbildung 17 und Abbildung 21). Die CMV:*eGFP*-Expressionskassette besitzt einen *simian* (s)CMV IE94-Promotor, der die transiente Expression des *eGFP*-Gens in injizierten Zebrabärbling-Larven 2 dpf ermöglichen kann. So wurde dieser Promotor in der Vergangenheit schon mehrere Male dazu benutzt transiente ubiquitäre Reporter-Expression in injizierten Zebrabärbling-Larven bereitzustellen (Hieber et al., 1998, Koster und Fraser, 2001, Kaley-Zylinska et al., 2002).

Zur Konstruktion des „pBSK+\_CMV:*eGFP*\_FRT\_ iTol2*Kan*“-Vektors wurden der sCMV IE94-Promotor, das Kozak\_*eGFP*\_SV40pA-Fragment und die FRT-Stelle gleichzeitig in den „pBSK+\_ iTol2*Kan*“-Vektor gesetzt (siehe Abbildung 16 und Abbildung 21). Hierfür wurde zunächst der sCMV IE94-Promotor mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente der „pCS2+\_*eGFP*“-Vektor (siehe B.4.3 und C.1.1.3). In den Vorwärtsprimer war eine SacI- und in den Rückwärtsprimer war eine EcoRI-Restriktionsenzymstrecke integriert (siehe Tabelle 16). Das PCR-Produkt wurde mit SacI und EcoRI gespalten. Anschließend wurde aus dem Vektor „pBSK+\_slc22a4:*eGFP*\_FRT\_ iTol2*Kan*“ das Kozak\_*eGFP*-SV40pA-Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI ausgeschnitten (siehe C.1.1.1 und Abbildung 17). Aus dem Vektor „pBSK+\_slc22a4:*eGFP*\_FRT\_ iTol2*Kan*“ wurde auch die FRT-Stelle mittels SacII-Verdau erhalten. Abschließend wurde der Vektor „pBSK+\_ iTol2*Kan*“ mit SacI und SacII geöffnet und mit dem sCMV IE94-Promotor-PCR-Fragment, dem Kozak\_*eGFP*\_SV40pA-Fragment und der FRT-Stelle ligiert (siehe Abbildung 16 und Abbildung 21). Die richtige Orientierung der FRT-Stelle (d. h. gleiche Orientierung wie in dem Tol2-*eGFP*-Transposonvektor) wurde mittels Restriktionsverdau bestätigt. Um zu untersuchen, ob der sCMV IE94-Promotor in dem entstandenen „pBSK+\_CMV:*eGFP*\_FRT\_ iTol2*Kan*“-Vektor PCR-bedingte Sequenz-Fehler aufwies, wurde dieser mit den zu seiner PCR-Amplifikation verwendeten Primern in zwei parallel laufenden Ansätzen nach Sanger sequenziert (siehe C.1.1.12 und Tabelle 16). Es waren keine Fehler in der Sequenz anwesend.

Die Injektion des Vektors „pBSK+\_CMV:eGFP\_FRT iTol2Kan“ (50 ng/μl) zusammen mit der mRNA für die Tol2-Transposase (50 ng/μl) führte zu einer mosaiken, transienten eGFP-Expression in zwei Tage alten Zebrafärblingen (siehe C.3.2.2 und Abbildung 21). Die FRT-Stelle und Teile des Vektorrückgrats („pBSK+\_iTol2Kan“) hatten somit nicht die eGFP-Expression, die von dem sCMV IE94-Promotor kontrolliert wurde, unterdrückt. Diese Konstellation der DNS-Fragmente hatte daher vermutlich auch keine inhibitorische Wirkung auf eine mögliche eGFP-Expression in Zebrafärbling-Larven, die mit dem Tol2-eGFP-Reportergenkonstrukt „pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“ und mit der Tol2-mRNA injiziert worden waren, ausgeübt (siehe C.3.2.2 und Abbildung 21).

A



2 dpf

inj. mit „pBSK+\_CMV:eGFP\_FRT iTol2Kan“ und Tol2-mRNA

**Abbildung 21: Injektion des Vektors „pBSK+\_CMV:eGFP\_FRT iTol2Kan“ in Zebrafärblinge**  
 In A ist eine Schemazeichnung des Vektors „pBSK+\_CMV:eGFP\_FRT iTol2Kan“ dargestellt. In B ist eine laterale Ansicht einer Zebrafärbling-Larve 2 dpf, die mit dem Vektor „pBSK+\_CMV:eGFP\_FRT iTol2Kan“ (50 ng/μl) zusammen mit Tol2-mRNA (50 ng/μl) injiziert wurde, dargestellt. inj., injiziert

In dieser Doktorarbeit wurden analog zu dem hier dargestellten Tol2-eGFP-Transposonvektor „pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“ zwei weitere potentielle Expressionsvektoren zur Herstellung der *Tg(slac22a4:eGFP)*-Linie auf Basis des Fosmids *CHI073-409B12* konstruiert (siehe D.1.1). Als putative Promotorregionen dienten hierbei das eine Mal der intergene Bereich („pBSK+\_1,6kbslc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“) und das andere Mal der intergene Bereich zusammen mit der gesamten DNS-Sequenz, die sich unmittelbar stromabwärts des ersten Exons des *slc22a4*-Gens befindet („pBSK+\_fullslc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“) (siehe Abbildung 13). (Gelbilder der

EcoRI-Restriktionsverdauung dieser Konstrukte sind im Anhang gezeigt (siehe Abbildung 39).) Auch diese putativen Promotoren konnten eine eGFP-Expression in Zebrafisch-Embryonen nicht ermöglichen. Die Herstellung und Injektionen dieser beiden Vektoren erfolgte vor der Konstruktion und Injektion des Vektors

„pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT\_iTol2Kan“. Mit dem Vektor

„pBSK+\_slc22a4:eGFP\_FRT\_iTol2Kan“ wurde schließlich die gesamte genomische Zebrafisch-DNA ausgeschöpft, die zur notwendigen vollständigen Abbildung des Promotors des *slc22a4*-Gens für diese Arbeit zur Verfügung stand (siehe A.4).

## D.2 Immunhistochemische Lokalisation des Ergothionein-Transporters

In dieser Arbeit sollte ein Werkzeug zur Identifizierung ET-haltiger Zellen im Zebrafisch mit Einzelzellauflösung hergestellt werden. Deshalb wurde zunächst versucht eine transgene Zebrafisch-Reporterlinie zu etablieren, die alle *slc22a4*-exprimierenden Zellen mit eGFP-Fluoreszenz im Cytosol markiert. Da die Herstellung dieser Linie fehlschlug, wurden hier polyklonale Antikörper gegen den Slc22a4 geschaffen (siehe D.1 und D.2.1). Mit Hilfe dieser Antikörper wurde der Slc22a4 Transporter im Zebrafisch lokalisiert (siehe D.2.2).

### D.2.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Im Folgenden ist der Ablauf der Produktion der polyklonalen Antikörper gegen den Slc22a4 Transporter dargestellt: Es wurden je 400 µg der größten extrazellulären Schleife des Slc22a4 Transporters, die am C-Terminus mit einem 2x-Strep-Tag II markiert war, im N-glykosylierten (GES)- bzw. im nicht-N-glykosylierten (NES)-Zustand in ein Meerschweinchen und ein Kaninchen injiziert. Die größte extrazelluläre Schleife mit C-terminalem 2x-Strep-Tag II wurde hier in HEK-293-EBNA-Zellen heterolog produziert (siehe D.2.1.1). Die injizierten Tiere bildeten in einer Immunreaktion polyklonale Antikörper, die mittels Affinitätschromatographie aus den Sera isoliert wurden (siehe D.2.1.2). Mittels indirekter ELISAs wurden die Antikörper anschließend nachgewiesen und ihre Titer bestimmt (siehe D.2.1.3). Die Spezifität der hergestellten polyklonalen Antikörper wurde immunhistologisch an HEK-293-EBNA-Zellen, die entweder den Slc22a4 oder einen seiner zwei engen Verwandten (Slc22a5a, Slc22a5b) als C-terminale eGFP-Fusionsproteine heterolog exprimierten, überprüft (siehe D.2.1.4).

### ***D.2.1.1 Produktion des Antigens und anschließende Immunisierung***

Die größte extrazelluläre Schleife des Slc22a4 Transporter wurde als Antigen verwendet. Sie befindet sich zwischen der ersten und zweiten Transmembranhelix (siehe Abbildung 2). Ein AS-Sequenzenvergleich der größten extrazellulären Schleifen der homologen Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b ergab, dass der ET-Transporter des Zebrafisches vermutlich über drei N-Glykosylierungsstellen verfügt (siehe Abbildung 22 und Abbildung 42). Eine N-Glykosylierung der größten extrazellulären Schleife wird für alle Transporter der SLC22-Familie vorgeschlagen (Gründemann, 2012). Zudem ergab der Sequenzvergleich, dass die Tertiärstruktur der größten extrazellulären Schleife des Slc22a4 Transporters vermutlich durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken geformt und stabilisiert wird (siehe Abbildung 22 und Abbildung 42). Die Anwesenheit von zwei intramolekularen Disulfidbrücken in der größten extrazellulären Schleife wird für alle Mitglieder der SLC22-Familie vorgeschlagen (Prof. Dr. D. Gründemann; siehe A.2.1 und Abbildung 2).

Das Antigen wurde mit der humanen Zelllinie HEK-293-EBNA produziert, um die korrekte Faltung und posttranslationale Modifikation zu gewährleisten. Zur Reinigung und zur Identifizierung im Western-Blot wurde die größte extrazelluläre Schleife am C-Terminus mit einem 2x-Strep-Tag II markiert (siehe C.4, C.5.1, C.5.6 und Abbildung 22).

Für die Herstellung der GES in humanen HEK-293-EBNA-Zellen wurde als erstes die cDNS, die für die größte extrazelluläre Schleife kodiert, in den eukaryotischen und episomalen Expressionsvektor pCEPPu\_BM40SP\_C-2x-Strep-Tag II eingefügt (Gebauer et al., 2008, Kohfeldt et al., 1997, Gara et al., 2008) (siehe B.4.3). Hierfür wurde sie mittels PCR mit Primern, die 5'-terminal eine NheI-Schnittstelle und 3'-terminal eine XhoI-Schnittstelle in das Fragment einfügten, aus dem Vektor pEBTetD\_slc22a4-eGFP, der die vollständige *slc22a4*-cDNS enthält, amplifiziert (Bach, 2009) (siehe B.4.3, C.1.1.3 und Tabelle 15). Anschließend wurde das PCR-Produkt mit NheI und XhoI verdaut und in den pCEPPu\_BM40SP\_C-2x-Strep-Tag II, der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen gespalten wurde, ligiert (siehe C.1.1.1 und C.1.1.6). Es entstand der Vektor „pCEPPu\_GES“. In diesem Konstrukt befindet sich stromaufwärts der inserierten cDNS die Sequenz für das BM40-Signalpeptid (BM40SP). Stromabwärts der inserierten cDNS befindet sich die Sequenz für den 2x-Strep-Tag II. Damit die drei Sequenzen in einem gemeinsamen Leserahmen zu liegen kamen, wurde bei der Amplifikation der cDNS, die für die größte extrazelluläre Schleife kodiert, über den Vorwärtsprimer ein zusätzliches Nukleotid (Desoxyguanosinmonophosphat) in das PCR-Fragment eingeführt (siehe

Tabelle 15). Die Richtigkeit des Vektors wurde mittels eines Restriktionsverdaus gezeigt (siehe C.1.1.1). Zudem wurde die cDNS der größten extrazellulären Schleife in dem Vektor „pCEPPu\_GES“ mit den zu ihrer Amplifikation verwendeten Primer in zwei parallel laufenden Ansätzen sequenziert, um PCR-bedingte Fehler auszuschließen (siehe C.1.1.12 und Tabelle 15). Es waren keine Sequenzfehler vorhanden.

Nach der transienten Transfektion des Expressionsvektors „pCEPPu\_GES“ in HEK-293-EBNA-Zellen wurde die Transkription der rekombinanten cDNS von einem starken und konstitutiv-aktiven Promotor kontrolliert (siehe B.4.3 und C.4.1.). Dies bewirkte eine Überexpression des rekombinanten Proteinfragments (NH<sub>2</sub>-BM40SP-GES-COOH, ca. 17 kDa). Das BM40SP führte zu einem Ausschleusen des Fragments aus der Zelle. Es wurde hierbei abgespalten. Die GES (ca. 15 kDa) wurde im Zellkulturmedium angereichert (siehe Abbildung 22).

**APLA**AHHCRIPETLNLTAGWRNASVPRPQPHGDPPRASRCYRLRLDLVKNYSDG  
**GLLPGLDV**NVSEIPREECADGWYDKEIYSSTIVSEWDLVCSDDWKSPLLEGSLV  
**PRGS**AWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK

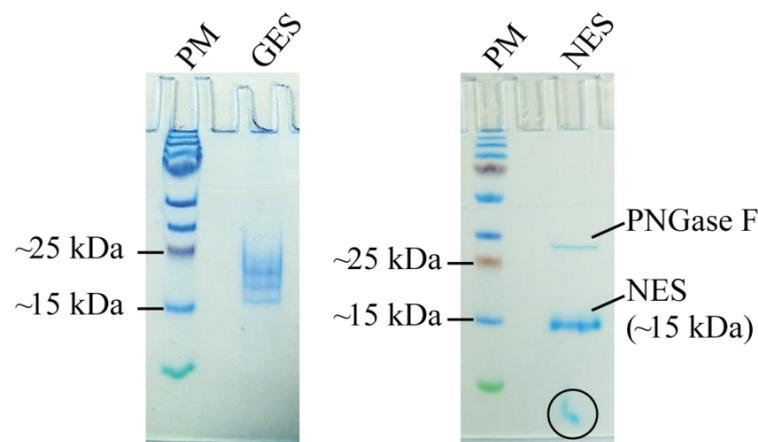
2x-Strep-Tag II

**Abbildung 22: Aminosäuresequenz des Antigens GES**

Das Antigen GES besteht aus 139 ASs. Zwischen der Aminosäuresequenz der größten extrazellulären Schleife (X, 98 ASs) und dem 2x-Strep-Tag II (28 ASs) befinden sich 11 ASs. Von diesen 11 ASs stellen 8 ASs eine Spaltstelle für Thrombin (X) dar. Der 2x-Strep-Tag II (28 ASs) besteht aus zwei Strep-Tag II-Sequenzen (X, 8 ASs) zwischen denen sich ein 12 ASs langer *Spacer* befindet. Die drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind schwarz unterstrichen. Die vier Cysteine, zwischen denen sich vermutlich zwei Disulfidbindungen ausbilden, sind lila unterstrichen.

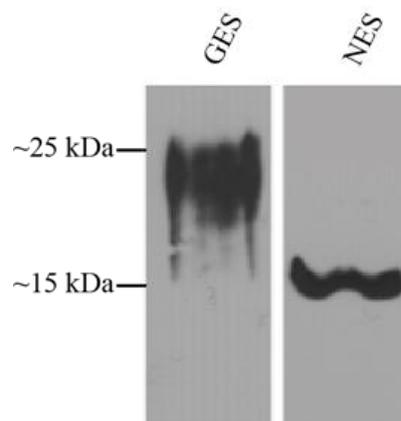
Die GES wurde mittels Affinitätschromatographie über den 2x-Strep-Tag II aus dem Zellkulturüberstand gereinigt (siehe C.5.1). Die Reinheit und die Unversehrtheit wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung untersucht (siehe C.5.4 und C.5.5). Hierbei wurde entdeckt, dass die GES N-glykosyliert vorlag. Auf eine Glykosylierung deuteten zunächst drei eng beieinander liegende und verschmierte Banden (zwischen ca. 15 kDa und ca. 25 kDa) hin (siehe Abbildung 23; linkes Protein-Gel). Die N-Glykosylierung wurde schließlich durch einen Verdau des Proteinfragments mit der Protein N-Glykosidase F (PNGase F) bestätigt. Dieses Enzym spaltet N-gekoppelte Oligosaccharide von Proteinen ab, indem es das Amid der Asparagin-Seitenkette hydrolysiert (siehe C.5.3). Das so verdaute Proteinfragment (nicht-N-glykosylierte extrazelluläre Schleife des Slc22a4 mit C-terminalem 2x-Strep-Tag II, NES) lief im SDS-Gel als einzelne scharfe Bande mit der erwarteten Größe von ca. 15 kDa. Es war keine

Verunreinigung mit anderen Proteinen gegeben (siehe Abbildung 23; rechtes Protein-Gel). Mittels Western-Blot mit anschließender Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen den Strep-Tag II wurde bestätigt, dass es sich bei den zuvor betrachteten Proteinbanden um die GES und um die NES gehandelt hatte (siehe Tabelle 18 und Abbildung 24).



**Abbildung 23: SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zur Überprüfung der Integrität und der Reinheit der NES und der GES**

Die GES (5 µg) und die NES (5 µg) wurden in einem 16 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Um die N-gekoppelten Zucker von der GES zu entfernen, mussten diese mit dem Enzym PNGase F abgespalten werden. Da der enzymatische Verdau auf das Gel aufgetragen wurde, ist zusätzlich zu der Bande der NES eine Bande bei ca. 34 kDa, die auf die PNGase F zurückgeht, zu sehen. Die schwarz umrandete Färbung geht auf Komponenten im PNGase F-Reaktionsansatz zurück. Diese Färbung ist auswaschbar. PM, Protein-Marker



**Abbildung 24: Western-Blot mit anschließender Immundetektion zur Identifikation der GES und der NES**

Die GES (5  $\mu$ g) und die NES (5  $\mu$ g) wurden in einem 16 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot mit darauffolgender Immundetektion unter Verwendung von Antikörpern gegen den Strep-Tag II nachgewiesen.

Von dem Pineda Antikörper-Service in Berlin (<http://www.pineda-abservice.de>) wurden ein Meerschweinchen und ein Kaninchen mit je 400  $\mu$ g der GES immunisiert. Es ist nicht bekannt, ob die Verzuckerung des in HEK 293-EBNA-Zellen heterolog überexprimierten Antigens, der Verzuckerung des endogenen Slc22a4 Transporters entspricht (siehe D.2.1.1). Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen spezifische polyklonale Antikörper, die den endogenen Slc22a4 Transporters erkennen, zu erhalten, wurden daher zusätzlich ein Meerschweinchen und ein Kaninchen mit je 400  $\mu$ g der NES injiziert. Zur Gewinnung der NES wurde die Verzuckerung von der GES mit dem Enzym PNGase F entfernt (siehe C.5.3, D.2.1.1 und Tabelle 5).

#### **D.2.1.2 Gewinnung und Aufreinigung**

Um zu überprüfen, ob die Immunreaktionen in ausreichendem Maße eingetreten waren, wurden am 61. Tag nach der Immunisierung Antiserenproben entnommen. Mittels indirekter ELISAs wurden die Titer der Antiseren gegen das jeweilige Antigen bestimmt (siehe C.5.8). Sie lagen zwischen 1:5000 und 1:100000. Da die gewünschten Antikörper in ausreichendem Maße gebildet worden waren (Erfahrungswerte aus der AG von Prof. Dr. R. Wagener), wurden die Antiseren zum nächstmöglichen Zeitpunkt (85. Tag nach der Immunisierung) durch Ausbluten der Tiere gewonnen. Die produzierten polyklonalen Antikörper wurden nach dem Spenderorganismus und nach dem Antigen folgendermaßen benannt: M (Meerschweinchen)-anti-GES Antikörper, M-anti-NES Antikörper, K (Kaninchen)-anti-GES Antikörper und K-anti-NES Antikörper.

In den gewonnenen Antiseren befinden sich neben den Antikörpern gegen die GES und die NES auch Serumproteine und nicht relevante Immunglobuline. Um unspezifische Reaktionen mit nicht relevanten Antikörpern oder anderen Proteinen bei späteren immunohistochemischen Methoden zu vermeiden, wurden die Antikörper gegen die GES und die NES isoliert und konzentriert. Die Isolierung aus einem Antiserum wurde wie folgt durchgeführt (siehe C.5.7): Zunächst wurden mögliche Antikörper, die eine Kreuzreaktivität zu den größten extrazellulären Schleifen des Slc22a5a Transporters und des Slc22a5b Transporters aufwiesen, aus dem Antiserum herausgefiltert. Die Transporter Slc22a5a und Slc22a5b sind homolog zu dem Slc22a4 Transporter. Die Aminosäureidentität mit der größten extrazellulären Schleife des Slc22a4 Transporters liegt für die größte extrazelluläre Schleife des Slc22a5a Transporters bei 48 % und für die größte extrazelluläre Schleife des Slc22a5b Transporters bei 46 % (siehe A.3.2 und Tabelle 22). Hierfür wurde das Antiserum über eine Säule, an die die größten extrazellulären Schleifen des Slc22a5a Transporters und des Slc22a5b Transporters gekoppelt waren, geleitet. Diese extrazellulären Schleifen sind wie das Antigen hier in HEK 293-EBNA-Zellen produziert worden. Ebenso waren sie C-terminal mit einem 2x-Strep-Tag II markiert (siehe D.2.1.1). Durch diesen Schritt wurden eventuelle Antikörper, die an die extrazellulären Schleifen des Slc22a5a Transporters und des Slc22a5b Transporters und an den 2x-Strep-Tag II binden konnten, in der Säule zurückgehalten. Der Durchlauf wurde anschließend über eine Säule, an die das zur Immunisierung verwendete Antigen gekoppelt war, geleitet. Die spezifischen polyklonalen Antikörper banden an ihr Antigen und wurden so in der Säule zurückgehalten. Irrelevante Immunglobuline, die in dem Antiserum vorhanden waren, liefen aus der Säule heraus und wurden verworfen. Die gegen das Antigen gerichteten polyklonalen Antikörper konnten nun von der Säule eluiert werden. Das Eluat wurde in 1 ml-Fraktionen aufgefangen. Insgesamt wurden 5 Fraktionen gesammelt. Eine Proteinbestimmung mittels BCA-Methode ergab, dass sich die höchste Konzentration der aufgereinigten polyklonalen Antikörper in der ersten Eluatfraktion befand (siehe C.5.2).

Tabelle 20 zeigt die Proteinkonzentrationen der ersten Eluatfraktionen der vier polyklonalen Antikörper. Mit den ersten Eluatfraktionen wurde nachfolgend gearbeitet.

**Tabelle 20: Antikörperkonzentrationen**

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration [mg/ml]</b>
M-anti-GES	0,7
K-anti-GES	3,9
M-anti-NES	0,7
K-anti-NES	1,4

### **D.2.1.3 Titerbestimmung**

Um die vier aufgereinigten polyklonalen Antikörper in den ersten Eluatfraktionen nachzuweisen und deren Titer zu bestimmen, wurden indirekte ELISAs durchgeführt (siehe C.5.8).

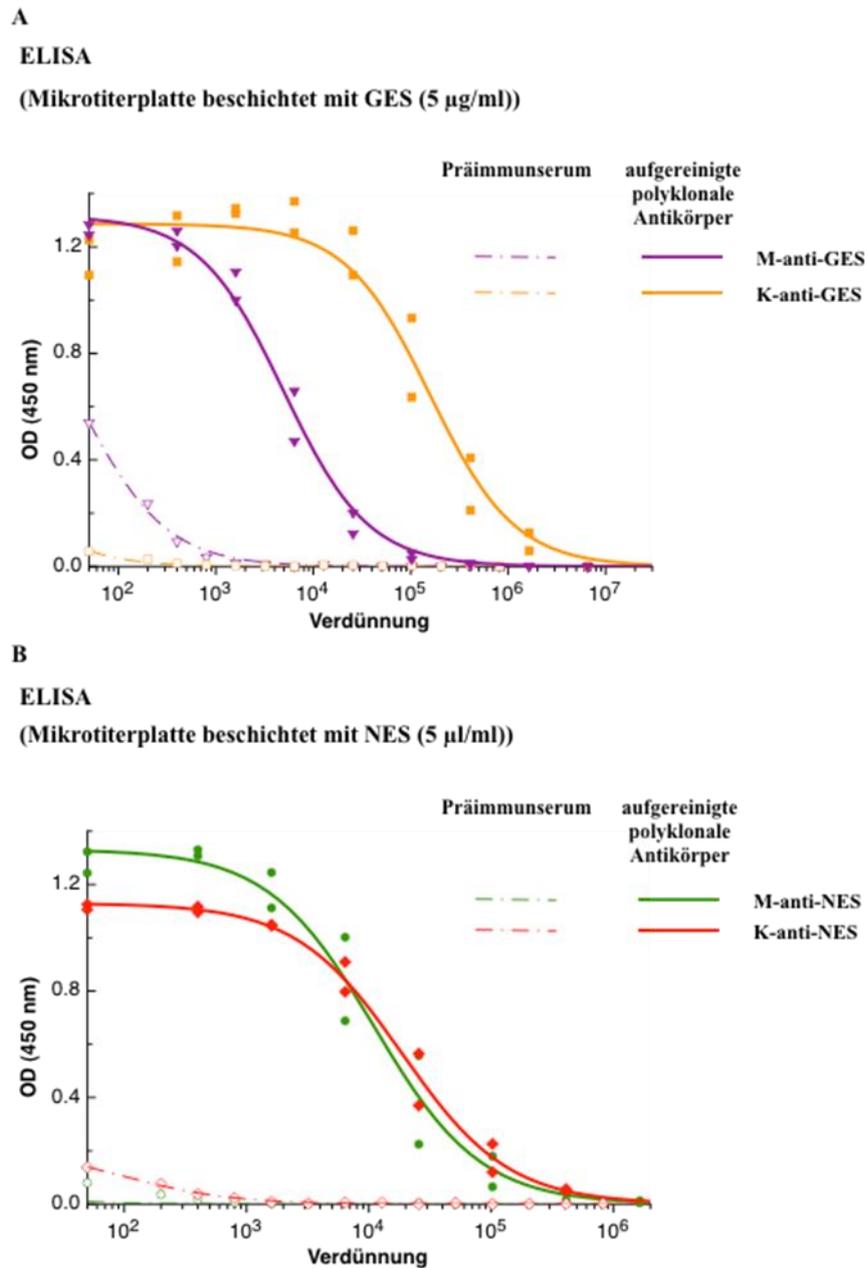
Hierfür wurde das jeweilige Antigen an den Wänden der Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen der entsprechenden Eluate zugegeben. Die Antikörper, die an das Antigen gebunden hatten, wurden wiederum von HRP-markierten Zweitantikörpern (HRP S.-anti-K-IgG bzw. HRP K-anti-M-IgG ) gebunden und mit einer darauffolgenden Farbreaktion, die durch die Bestimmung der OD bei 450 nm gemessen wurde, nachgewiesen (siehe Tabelle 18). Die Verdünnungen der aufgereinigten polyklonalen Antikörper (x-Achse, logarithmisch) wurden anschließend gegen die jeweiligen gemessenen OD-Werte bei 450 nm (y-Achse, linear) aufgetragen (siehe Abbildung 25). Es wurden typisch sigmoidal verlaufende Titrationskurven erhalten, aus denen die Antikörpertiter ermittelt werden konnten. Dies sind die Verdünnungen, bei denen die Antikörper-Antigen-Bindungen auf 50 % des Maximalwertes (Wendepunkte) abfallen. Sie sind in Tabelle 21 aufgelistet. Als Negativkontrolle wurden die Präimmunsereen der vier Tiere verwendet. So wurde überprüft, ob die für die Eluatfraktionen gemessenen OD-Werte bei 450 nm auf andere unspezifische Antikörper oder Serumproteine zurückgingen. Für die Präimmunsereen konnten in allen vier Fällen keine nennenswerten Werte für die OD bei 450 nm gemessen werden (siehe Abbildung 25).

**Tabelle 21: Antikörpertiter**

<b>Antikörper</b>	<b>Titer</b>
M-anti-GES	1:5000
K-anti-GES	1:160000
M-anti-NES	1:11000
K-anti-NES	1:19000

Aus den sigmoidal verlaufenden Titrationskurven wurden die anfänglichen Antikörperverdünnungen für die nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbungen abgeschätzt

(siehe D.2.1.4 und D.2.2). Es handelte sich dabei um die ungefähren Verdünnungen, bei denen die Titrationskurven vom Plateau zum Wendepunkt hin abfallen (siehe Abbildung 25). Sie wurden im Laufe der Optimierung der Immunfluoreszenzfärbungen verändert.



**Abbildung 25: ELISA-Messungen zur Titerbestimmung**

Die Verdünnungen der aufgereinigten polyklonalen Antikörper gegen die GES (A) bzw. gegen die NES (B) (x-Achse, logarithmisch) wurden gegen deren OD-Werte bei 450 nm (y-Achse, linear) aufgetragen. Bei den dargestellten ELISA-Messungen handelt es sich jeweils um Zweifachbestimmungen. Aus den Messwerten wurden mit dem Programm pro Fit 6.2.8 sigmoidal verlaufende Kurven ermittelt. Als Negativkontrollen wurden die Präimmunseren verwendet (Einfachbestimmung). Präimmunseren und aufgereinigte Antikörper, die von demselben Tier stammten, wurden mit der gleichen Farbe gekennzeichnet.

#### D.2.1.4 Untersuchung der Spezifität

Als Nächstes wurde untersucht, ob die vier polyklonalen Antikörper ihr Antigen in dem vollständigen Slc22a4-Protein erkennen konnten. Hierfür wurde überprüft, ob der Slc22a4 Transporter mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung jeweils eines der vier Antikörper-Gemische als Primärantikörper in HEK-293-EBNA-Zellen lokalisiert werden konnte. Als Sekundärantikörper wurden Alexa 594-gekoppelte Z-anti-M-IgG Antikörper bzw. Alexa 594-gekoppelte Z-anti-K-IgG Antikörper benutzt (siehe C.6.4 und Tabelle 18).

Der Slc22a4 Transporter musste hierzu in HEK-293-EBNA-Zellen heterolog produziert werden. Hierfür wurden die Zellen mit einem episomalen Vektor, der die induzierbare Expression eines Slc22a4-eGFP-Fusionsproteins (C-terminale eGFP-Fusion des Slc22a4 Transporterproteins; „*pEBTetD-slc22a4-eGFP*“) ermöglicht, transfiziert (siehe B.4.3 und C.4.1). Die Expression wurde anschließend mittels Doxyzyklin eingeschaltet (Bach et al., 2007) (siehe C.4.1 und C.6.4). In diesen *slc22a4-eGFP*-exprimierenden Zellen konnte in den Cytoplasmamembranen eine gleichmäßig verteilte eGFP-Fluoreszenz detektiert werden (siehe Abbildung 26 A). Dieser Befund bestätigte das Ergebnis von M. Bach, der in seiner Doktorarbeit ebenfalls die eGFP-Fluoreszenz von *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen in den Zellmembranen detektiert hatte. Zudem konnte M. Bach in einer Kolokalisationsstudie mit dem Zellmembranmarker Alexa Fluor® 594 WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) zeigen, dass in keinen weiteren Zell-Kompartimenten eGFP-Fluoreszenz zu finden war (Bach, 2009) (siehe Abbildung 43). Die Anwesenheit von eGFP-Fluoreszenz in den Cytoplasmamembranen ließ vermuten, dass vollständige Slc22a4-eGFP-Fusionen in den HEK-293-EBNA-Zellen vorlagen (siehe A.2.4.1). Die eGFP-Fluoreszenz wurde hier genutzt, um die Präsenz der Slc22a4-eGFP-Fusionsproteine vor Beginn der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen zu kontrollieren. Es wurden keine Bilder der eGFP-Fluoreszenz aufgenommen, da dies das Auflegen eines Deckgläschens auf die HEK-293-EBNA-Zellen erfordert hätte. Die Durchführung von indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wäre an diesen Zellen dann nicht mehr möglich gewesen.

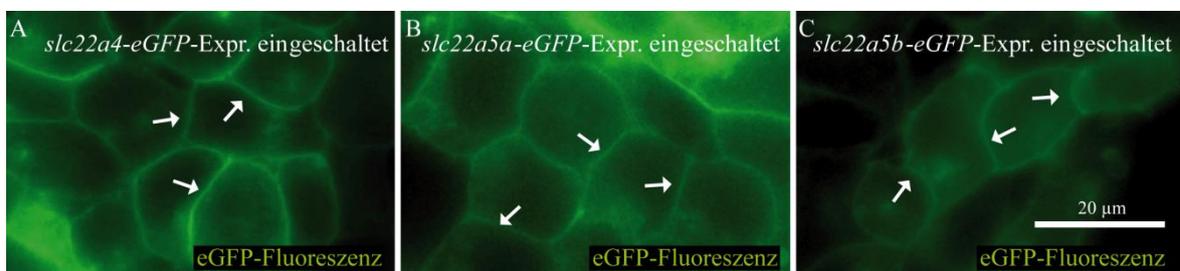
Bei allen vier durchgeführten indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellmembranen der HEK-293-EBNA-Zellen gleichmäßig rot-fluoreszierend gefärbt. Zudem wurden Fluoreszenzsignale im Cytosol und in cytosolischen Vesikeln detektiert (siehe Abbildung 27 A, Abbildung 28 A, Abbildung 29 A und Abbildung 30 A). Da nach der Fixierung der Zellen mit 4 % PFA, die vor Beginn der Immunfluoreszenzfärbungen zur

Erhaltung der Zellstruktur durchgeführt wurde, das eGFP seine fluoreszierenden Eigenschaften verloren hatte, konnten keine Ko-Lokalisationsstudien durchgeführt werden (siehe C.6.4). Als Negativkontrollen wurden die gleichen indirekten Immunfluoreszenzfärbungen mit den entsprechenden Präimmunsereen durchgeführt, um zu kontrollieren, ob nicht relevante Antikörper oder Serumproteine die Ergebnisse verfälschten (siehe Abbildung 27 B, Abbildung 28 B, Abbildung 29 B und Abbildung 30 B). In diesen Zellen konnte vor Beginn der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen eGFP-Fluoreszenz in den Plasmamembranen detektiert werden. Als weitere Negativkontrollen wurden die gleichen indirekten Immunfluoreszenzfärbungen an HEK-293-EBNA-Zellen, die zwar mit dem induzierbaren Expressionssystem für das Slc22a4-eGFP-Protein transfiziert worden waren, es aber ausgeschaltet hatten, durchgeführt (siehe Abbildung 27 C, Abbildung 28 C, Abbildung 29 C und Abbildung 30 C). In diesen Zellen konnte vor Beginn der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen keine eGFP-Fluoreszenz in den Plasmamembranen detektiert werden. Mit diesen Negativkontrollen wurde überprüft, ob die Anfärbungen tatsächlich auf die heterologe Expression der eGFP-Transporterfusion zurückzuführen waren. In allen Negativkontrollen wurden keine Fluoreszenzsignale detektiert. Somit konnten alle vier polyklonalen Antikörper ausschließlich den Slc22a4 Transporter in HEK-293-EBNA-Zellen lokalisieren; d. h. die Antikörper erkennen in diesem Test ihr Antigen in dem Slc22a4 Transporter spezifisch und sind nicht gegen Bestandteile von HEK-293-EBNA-Zellen gerichtet. Die Fluoreszenzsignale im Cytosol und in den cytosolischen Vesikeln gingen vermutlich auf von einigen Slc22a4-eGFP-Fusionsproteinen abgespaltene Proteinfragmente zurück, die jeweils das Antigen enthielten (siehe E.2.1.2).

Desweiteren wurde untersucht, ob die hergestellten polyklonalen Antikörper eine Kreuzreaktivität zu den zu dem Slc22a4 Transporter homologen Transportern Slc22a5a und Slc22a5b besitzen. Hierzu wurde eine C-terminale eGFP-Fusionen des Slc22a5a Transporters bzw. des Slc22a5b Transporter wie zuvor das Slc22a4-eGFP-Protein heterolog in HEK-293-EBNA-Zellen exprimiert (siehe B.4.3, C.4.1 und C.6.4). Sowohl in *slc22a5a-eGFP*- als auch in *slc22a5b-eGFP*-exprimierenden Zellen konnte in den Cytoplasmamembranen eine gleichmäßig verteilte eGFP-Fluoreszenz detektiert werden (siehe Abbildung 26 B, C). Dies bestätigte das Ergebnis von M. Bach, der in einer vorangegangenen Doktorarbeit ebenfalls die eGFP-Fluoreszenz von *slc22a5a-eGFP*- und *slc22a5b-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen in den Plasmamembranen detektiert hatte. Zudem konnte M. Bach in einer Kolokalisationsstudie mit dem

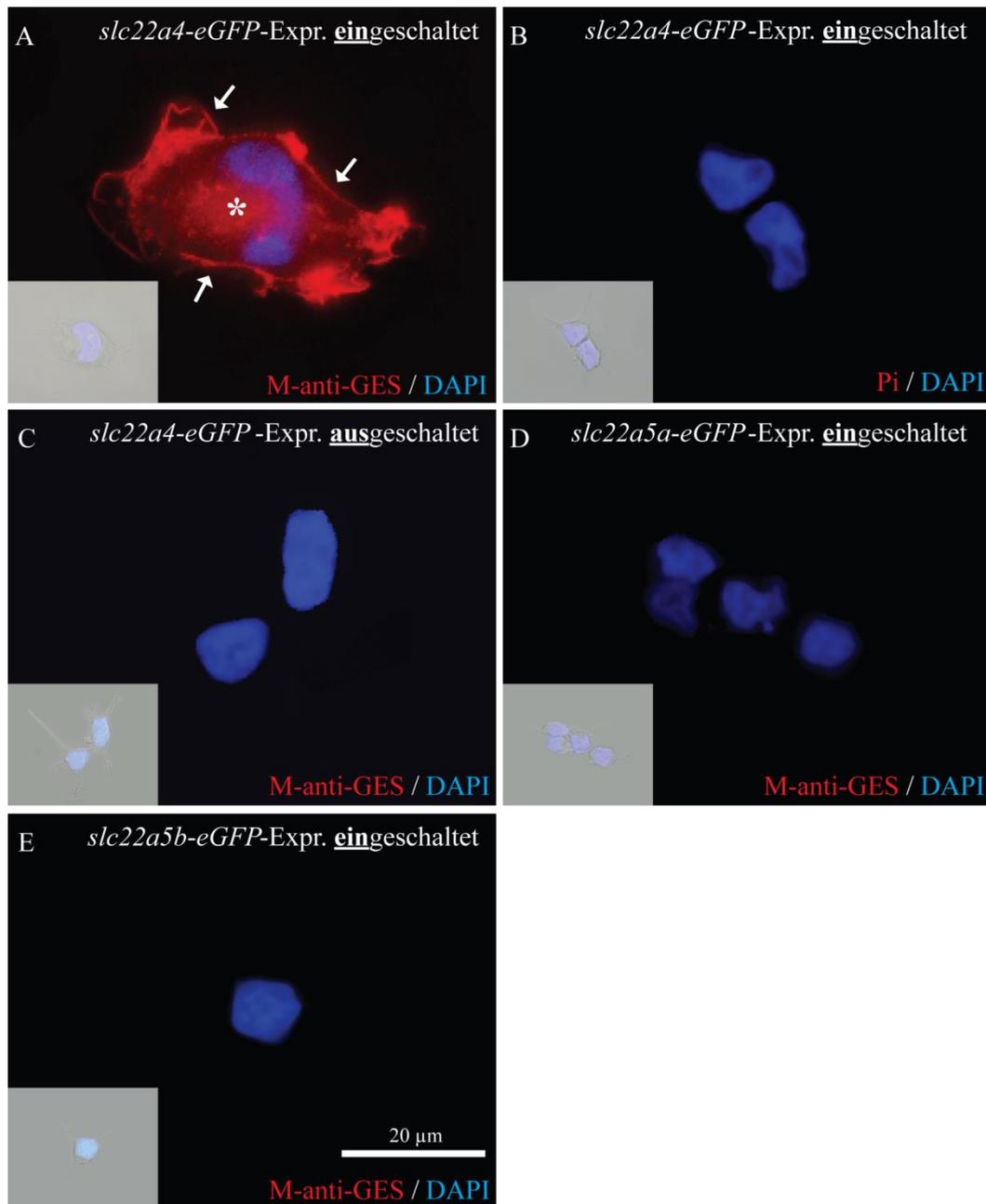
Zellmembranmarker Alexa Fluor® 594 WGA zeigen, dass eGFP-Fluoreszenzsignale ausschließlich in den Cytoplasmamembranen zu finden waren (Bach, 2009) (siehe Abbildung 43). Die Anwesenheit von eGFP-Fluoreszenz in den Cytoplasmamembranen ließ vermuten, dass intakte Slc22a5a-eGFP- und intakte Slc22a5b-eGFP-Fusionen in den HEK-293-EBNA-Zellen vorlagen (siehe A.2.4.1). Die eGFP-Fluoreszenz wurde hier genutzt, um vor Beginn der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen zu überprüfen, ob die Fusionsproteine synthetisiert worden waren. Es wurden aus den gleichen Gründen wie bei den *slc22a4-eGFP*-exprimierenden Zellen keine Bilder der eGFP-Fluoreszenz aufgenommen.

An diesen Zellen wurden genauso wie zuvor an den *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (siehe C.6.4). Es wurden keine Fluoreszenzsignale detektiert (siehe Abbildung 27 D, E, Abbildung 28 D, E, Abbildung 29 D, E und Abbildung 30 D, E). Als Positivkontrollen dienten die indirekten Immunfluoreszenzen an den *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen. Somit konnten die vier polyklonalen Antikörper weder den Slc22a5a Transporter noch den Slc22a5b Transporter in den eGFP-Fusionsproteinen in HEK-293-EBNA-Zellen erkennen; d. h. die Antikörper waren im Rahmen dieses Tests spezifisch.



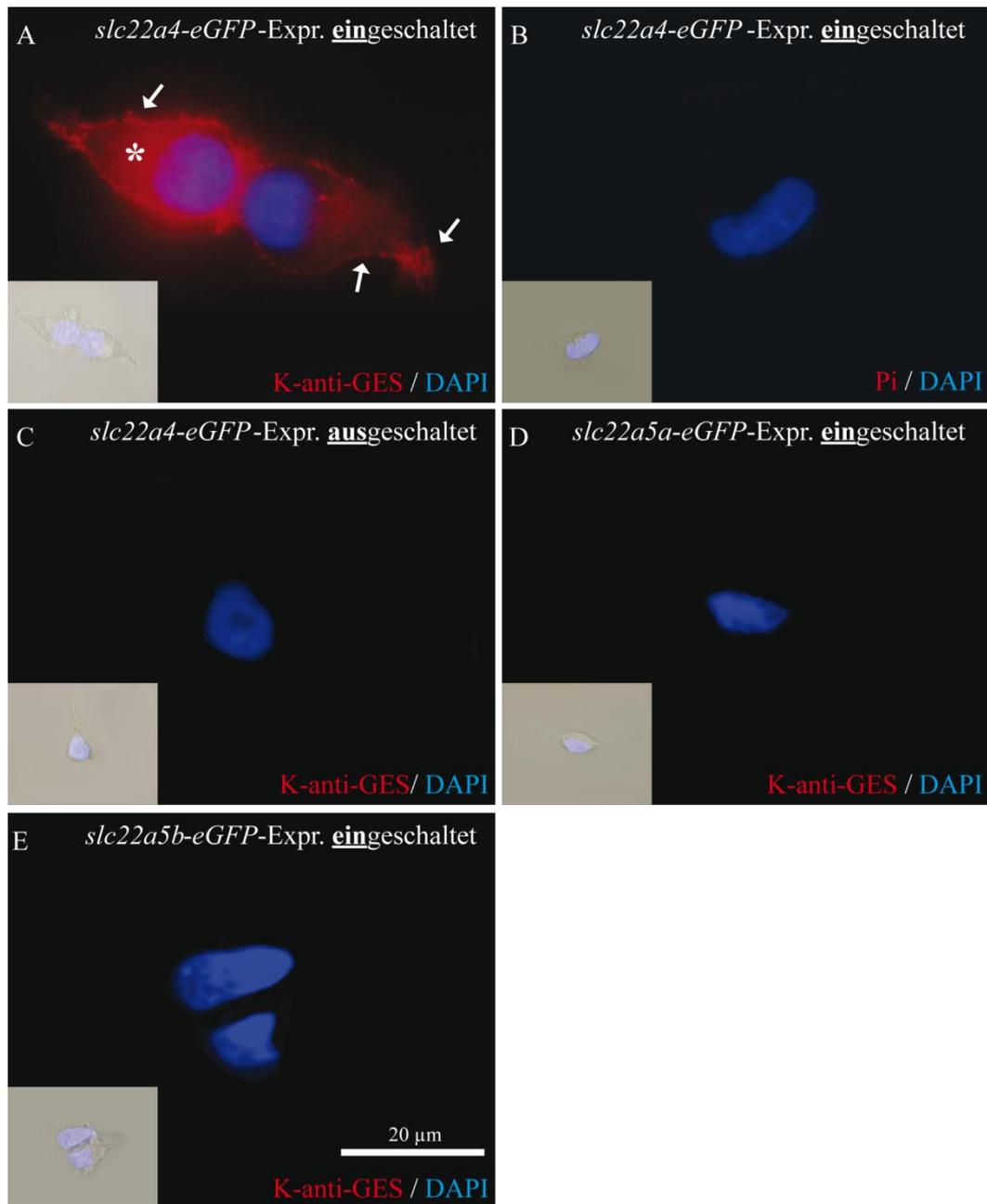
**Abbildung 26: Detektion der eGFP-Fluoreszenz der *slc22a4-eGFP*- (A), *slc22a5a-eGFP*- (B) und *slc22a5b-eGFP*-exprimierenden (C) HEK-293-EBNA-Zellen**

Die eGFP-Fluoreszenz wurde in allen Zellen (A-C) in der Plasmamembran detektiert. Die weißen Pfeile deuten auf einige Zellmembranen. Expr., Expression

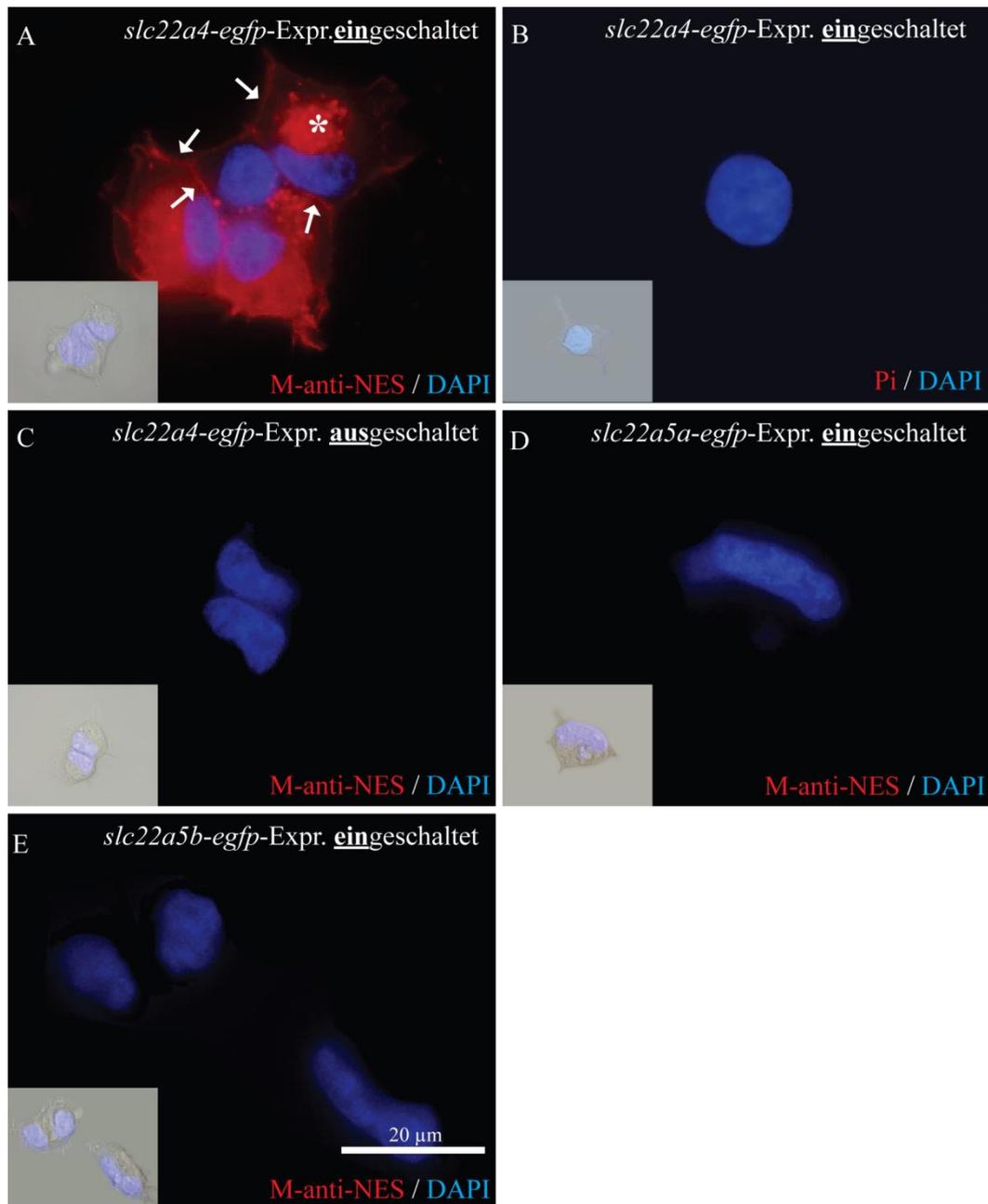


**Abbildung 27: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen M-anti-GES Antikörper**

Dargestellt sind die Ergebnisse indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit M-anti-GES Antikörpern als Primärantikörper (1:1000) und mit Alexa 594-gekoppelten Z-anti-M-IgG Antikörpern als Sekundärantikörper an HEK-293-EBNA-Zellen, die *slc22a4-eGFP* (A), *slc22a5a-eGFP* (D) und *slc22a5b-eGFP* (E) mittels induzierbarer Expressionssysteme exprimierten. Als Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Präimmunsereum an *slc22a4-eGFP*-exprimierenden Zellen durchgeführt (B). Als weitere Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit M-anti-GES Antikörpern an HEK 293-EBNA-Zellen, die ein „ausgeschaltetes“ induzierbares Expressionssystem für *slc22a4-eGFP* (gleiches wie in A) enthielten, durchgeführt (C). Die kleinen Bilder in A-E zeigen die Durchlichtaufnahmen der jeweiligen Zelle(n). Bei allen Zellen in A-E wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. In A-E wurden repräsentative Zellen fotografiert. Alle Bilder wurden unter den gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Maßstableiste in E gilt für alle Bilder. DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Expr., Expression; Pi, Präimmunsereum; weiße Pfeile: Zellmembran; \*: Anfärbung im Cytosol und in cytosolischen Vesikeln

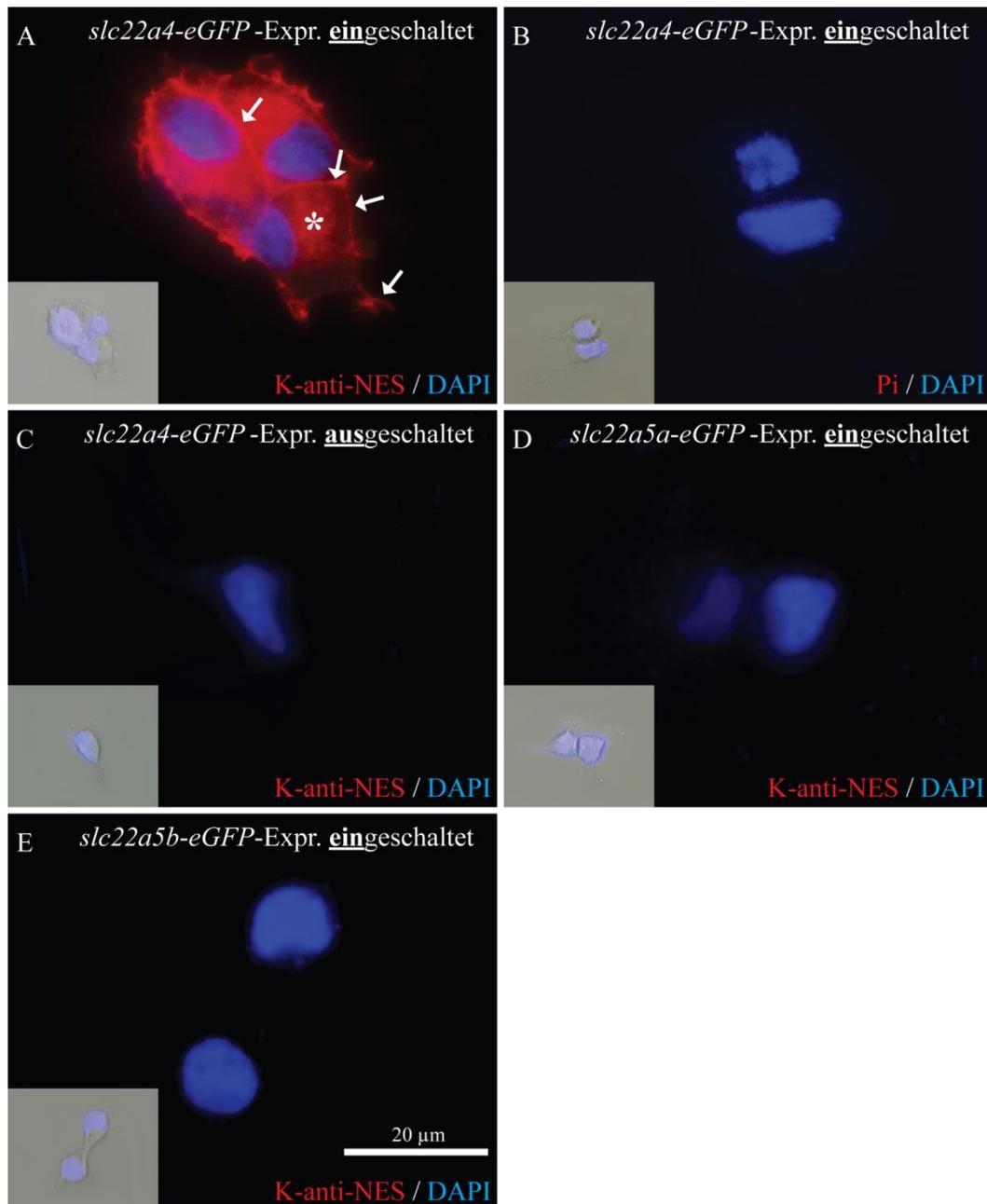


**Abbildung 28: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen K-anti-GES Antikörper**  
 Dargestellt sind die Ergebnisse indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit K-anti-GES Antikörpern als Primäntikörper (1:7000) und mit Alexa 594-gekoppelten Z-anti-K-IgG Antikörpern als Sekundäntikörper an HEK-293-EBNA-Zellen, die *slc22a4-eGFP* (A), *slc22a5a-eGFP* (D) und *slc22a5b-eGFP* (E) mittels induzierbarer Expressionssysteme exprimierten. Als Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Präimmunsereum an *slc22a4-eGFP*-exprimierenden Zellen durchgeführt (B). Als weitere Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit M-anti-GES Antikörpern an HEK 293-EBNA-Zellen, die ein „ausgeschaltetes“ induzierbares Expressionssystem für *slc22a4-eGFP* (gleiches wie in A) enthielten, durchgeführt (C). Bei allen Zellen in A-E wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Die kleinen Bilder in A-E zeigen die Durchlichtaufnahmen der jeweiligen Zelle(n). In A-E wurden repräsentative Zellen fotografiert. Alle Bilder wurden unter den gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Maßstableiste in E gilt für alle Bilder. DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Expr., Expression; Pi, Präimmunsereum; weiße Pfeile: Zellmembran; \*: Anfärbung im Cytosol und in cytosolischen Vesikeln



**Abbildung 29: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen M-anti-NES Antikörper**

Dargestellt sind die Ergebnisse indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit M-anti-NES Antikörpern als Primäntikörper (1:3000) und mit Alexa 594-gekoppelten Z-anti-M-IgG Antikörpern als Sekundäntikörper an HEK-293-EBNA-Zellen, die *slc22a4-eGFP* (A), *slc22a5a-eGFP* (D) und *slc22a5b-eGFP* (E) mittels induzierbarer Expressionssysteme exprimierten. Als Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Präimmunserum an *slc22a4-eGFP*-exprimierenden Zellen durchgeführt (B). Als weitere Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit M-anti-GES Antikörpern an HEK 293-EBNA-Zellen, die ein „ausgeschaltetes“ induzierbares Expressionssystem für *slc22a4-eGFP* (gleiches wie in A) enthielten, durchgeführt (C). Die kleinen Bilder in A-E zeigen die Durchlichtaufnahmen der jeweiligen Zelle(n). Bei allen Zellen in A-E wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. In A-E wurden repräsentative Zellen fotografiert. Alle Bilder wurden unter den gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Maßstabsleiste in E gilt für alle Bilder. DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Expr., Expression; Pi, Präimmunserum; weiße Pfeile: Zellmembran; \*: Anfärbung im Cytosol und in cytosolischen Vesikeln



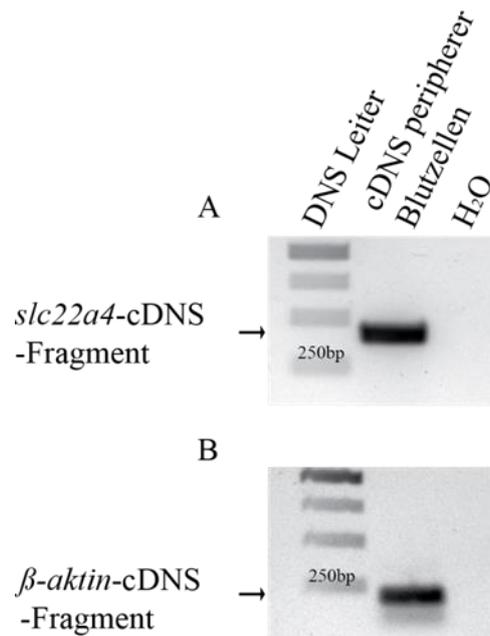
**Abbildung 30: Untersuchung zur Spezifität der polyklonalen K-anti-NES Antikörper**

Dargestellt sind die Ergebnisse indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit K-anti-GES Antikörpern als Primäntikörper (1:3000) und mit Alexa 594-gekoppelten Z-anti-K-IgG Antikörpern als Sekundäntikörper an HEK-293-EBNA-Zellen, die *slc22a4-eGFP* (A), *slc22a5a-eGFP* (D) und *slc22a5b-eGFP* (E) mittels induzierbarer Expressionssysteme exprimierten. Als Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Präimmunsereum an *slc22a4-eGFP*-exprimierenden Zellen durchgeführt (B). Als weitere Negativkontrolle für die indirekte Immunfluoreszenz in A wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit M-anti-GES Antikörpern an HEK 293-EBNA-Zellen, die ein „ausgeschaltetes“ induzierbares Expressionssystem für *slc22a4-eGFP* (gleiches wie in A) enthielten, durchgeführt (C). Die kleinen Bilder in A-E zeigen die Durchlichtaufnahmen der jeweiligen Zelle(n). Bei allen Zellen in A-E wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. In A-E wurden repräsentative Zellen fotografiert. Alle Bilder wurden unter den gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Maßstableiste in E gilt für alle Bilder. DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; Expr., Expression; Pi, Präimmunsereum; weiße Pfeile: Zellmembran; \*: Anfärbung im Cytosol und in cytosolischen Vesikeln

## **D.2.2 Immunhistochemische Lokalisation des Ergothionein-Transporters im adulten Zebrabärblinge**

Mit den vier polyklonalen Antikörpern sollte nun mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen der Slc22a4 Transporter zunächst im adulten Zebrabärbling sichtbar gemacht werden (siehe C.6.3).

Ob in einem Gewebe eine Anfärbung erwartet werden konnte, wurde aus der An- bzw. der Abwesenheit von *slc22a4*-mRNS und/oder ET, die auf die An- bzw. die Abwesenheit des Slc22a4 Transporters hindeutet, abgeschätzt. Mittels RT-PCR und quantitativer *Real-Time*-PCR konnte vor Kurzem gezeigt werden, dass die mRNS des *slc22a4*-Gens im Darm, in der Niere, im Gehirn, im Auge und in der Haut vorhanden ist (Bach, 2009, Pfeiffer, 2013) (siehe A.3.3). In allen Organen, die *slc22a4*-Transkripte besaßen, befand sich ET (Pfeiffer, 2013, Bach, 2009) (siehe A.3.3). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mittels RT-PCR entdeckt, dass die *slc22a4*-mRNS in peripheren Blutzellen synthetisiert wird (siehe Abbildung 31). Eine Messung des ET-Gehaltes peripherer Blutzellen steht noch aus. In der Leber, im Herz, in den Kiemen, in der Milz und im Muskel wurden mittels RT-PCR keine *slc22a4*-Transkripte detektiert (Bach, 2009) (siehe A.3.3). Ebenso konnte ET in diesen Organen nicht detektiert werden (siehe A.3.3).



**Abbildung 31: Nachweis der *slc22a4*-mRNS in peripheren Blutzellen mittels RT-PCR**

A zeigt ein aus cDNS peripherer Blutzellen amplifiziertes *slc22a4*-cDNS-Fragment (413 bp) in einem Agarosegel. Ein 203 bp langes amplifiziertes Fragment von *β-aktin*-cDNS diente als Kontrolle für die cDNS (B). Die hier verwendeten Primer sind in Tabelle 15 aufgelistet. Die peripheren Blutzellen wurden durch Absaugen des Blutes gewonnen, das nach dem Köpfen fünf frisch getöteter adulter Zebrafische an der Schnittstelle austrat (siehe C.3.1). Die anschließende Isolierung von Gesamt-RNS erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz von Invitrogen (siehe C.1.2.1). Die Synthese der cDNS wurde mit der SuperScript II reversen Transkriptase von Invitrogen durchgeführt (siehe C.1.1.13). H<sub>2</sub>O: Kontrolle ohne cDNS

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die polyklonalen Antikörper den Slc22a4 Transporter im Zebrafisch-Gewebeschnitt erkennen konnten, wurden zunächst indirekte Immunfluoreszenzfärbungen am Darm und an der Niere vorgenommen (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Der Transporter muss in dem Bürstensaum des Darms und in dem Bürstensaum der proximalen Nierentubuli lokalisiert sein, um seine Aufgaben, die ET-Absorption und -Retention, erfüllen zu können (Gründemann, 2012) (siehe A.2.4.1). Konnten die Antikörper den Slc22a4 Transporter erkennen, musste es folglich zu Anfärbungen dieser Bereiche kommen.

Die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden an 10 µm dicken transversalen Gefrierschnitten durchgeführt, die auf Objektträgern fixiert waren. Vor dem Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Organe übernacht in einer 4 %igen PFA-Lösung fixiert (siehe C.6.2). Als Primärantikörper wurde je einer der vier produzierten polyklonalen Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper wurden Alexa 594-gekoppelte Z-anti-M-IgG Antikörper bzw. Alexa 594-gekoppelte Z-anti-K-IgG Antikörper benutzt (siehe C.6.2, C.6.3 und Tabelle 18). Als Negativkontrollen dienten indirekte

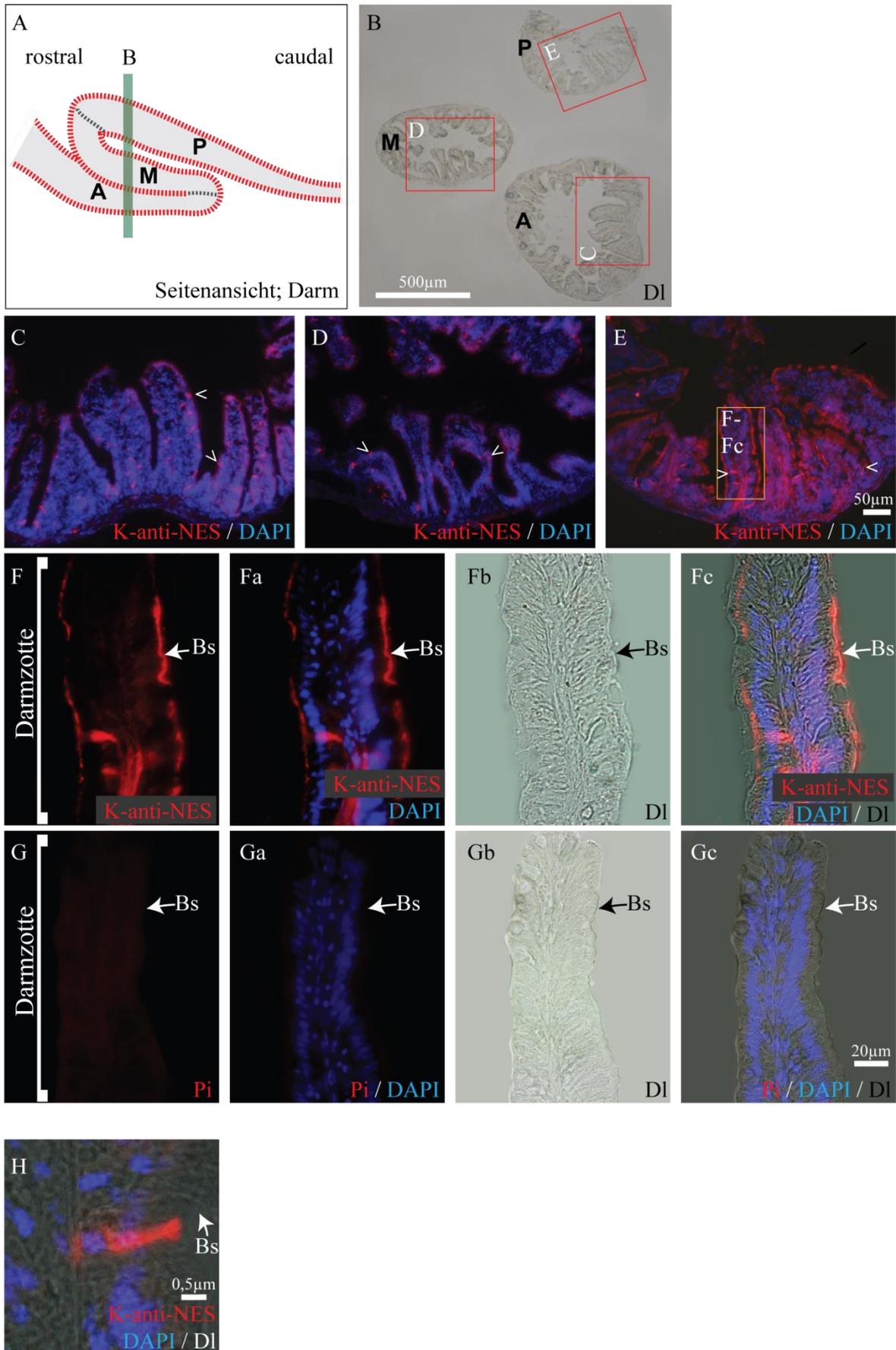
Immunfluoreszenzfärbungen, die mit dem entsprechenden Präimmenserum an vergleichbaren Gefrierschnitten durchgeführt wurden. Mit diesen Negativkontrollen sollte kontrolliert werden, ob die Färbung durch andere Antikörper oder Serumproteine verfälscht wurde. Zur besseren Orientierung im Schnitt wurde in allen Präparaten die DNS der Zellkerne mittels DAPI sichtbar gemacht (siehe C.6.3).

Mit den polyklonalen K-anti-NES Antikörpern konnte eine lumenseitige Anfärbung der Darmzotten erzielt werden. Aufgrund der Lage des angefärbten Bereichs wurde vermutet, dass es sich hierbei um den Bürstensaum handelte. Diese Anfärbung beschränkte sich auf den anterioren Abschnitt der posterioren Darmschleife (siehe Abbildung 32 A (P), B (P), E, F-Fc). Basierend auf dem Ergebnis einer vergleichenden *Gene Set Enrichment Analysis* von Wang und Kollegen besitzt der anteriore Bereich der posterioren Darmschleife starke Ähnlichkeit zu dem Dünndarm der Maus und des Menschen (Wang et al., 2010). Zusätzlich wurden mit den polyklonalen K-anti-NES Antikörpern vereinzelte Enterozyten-ähnliche Zellen im gesamten untersuchten Darmbereich sichtbar gemacht. Die Auflösung der Aufnahmen reichte nicht aus, um sagen zu können, welches Zellkompartiment angefärbt wurde (siehe Abbildung 32 C, D, E, H). In der Negativkontrolle wurden keine Fluoreszenzsignale detektiert (siehe Abbildung 32 G-Gc).

Im adulten Zebrafisch untergliedert sich die Niere in Kopf-, Körper- und Schwanz-Niere. Die Niere ist ein komplexes Röhrensystem (Menke et al., 2011). Hier wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit K-anti-NES Antikörpern zwei „Röhren-Populationen“ in der Körperringiere identifiziert. Eine „Röhren-Population“ wurde angefärbt, die andere nicht (siehe Abbildung 33 B-Bc). Aufgrund der Lage (lumenseitige) der angefärbten Bereiche in den „Röhren“ wurde vermutet, dass es sich hierbei um Bürstensäume handelte. Nur proximale Tubuli besitzen einen Bürstensaum. Daher wurde vermutet, dass es sich bei den angefärbten „Röhren“ um proximale Tubuli handelte (siehe Abbildung 33 B-Bc). In der Negativkontrolle wurde in keiner „Röhre“ ein Fluoreszenzsignal detektiert (siehe Abbildung 33 C-Cc).

Da mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit den K-anti-NES Antikörpern vermutlich eine Anfärbung des Bürstensaums des Darms und vermutlich auch eine Anfärbung des Bürstensaums der proximalen Nierentubuli erzielt wurden, wurde angenommen, dass diese Antikörper den Slc22a4 Transporter im Zebrafisch erkennen konnten. Mit den polyklonalen M-anti-GES Antikörpern und den polyklonalen K-anti-GES Antikörpern konnten sowohl in den Darm- als auch in den Nierenschnitten keine Anfärbungen erzielt werden. Mit den polyklonalen M-anti-NES Antikörpern wurden

kurioserweise alle Nuklei im Darm markiert. Daher wurden zur Lokalisation des Slc22a4 Transporters alle weiteren indirekten Immunfluoreszenzen ausschließlich mit den K-anti-NES Antikörpern durchgeführt.

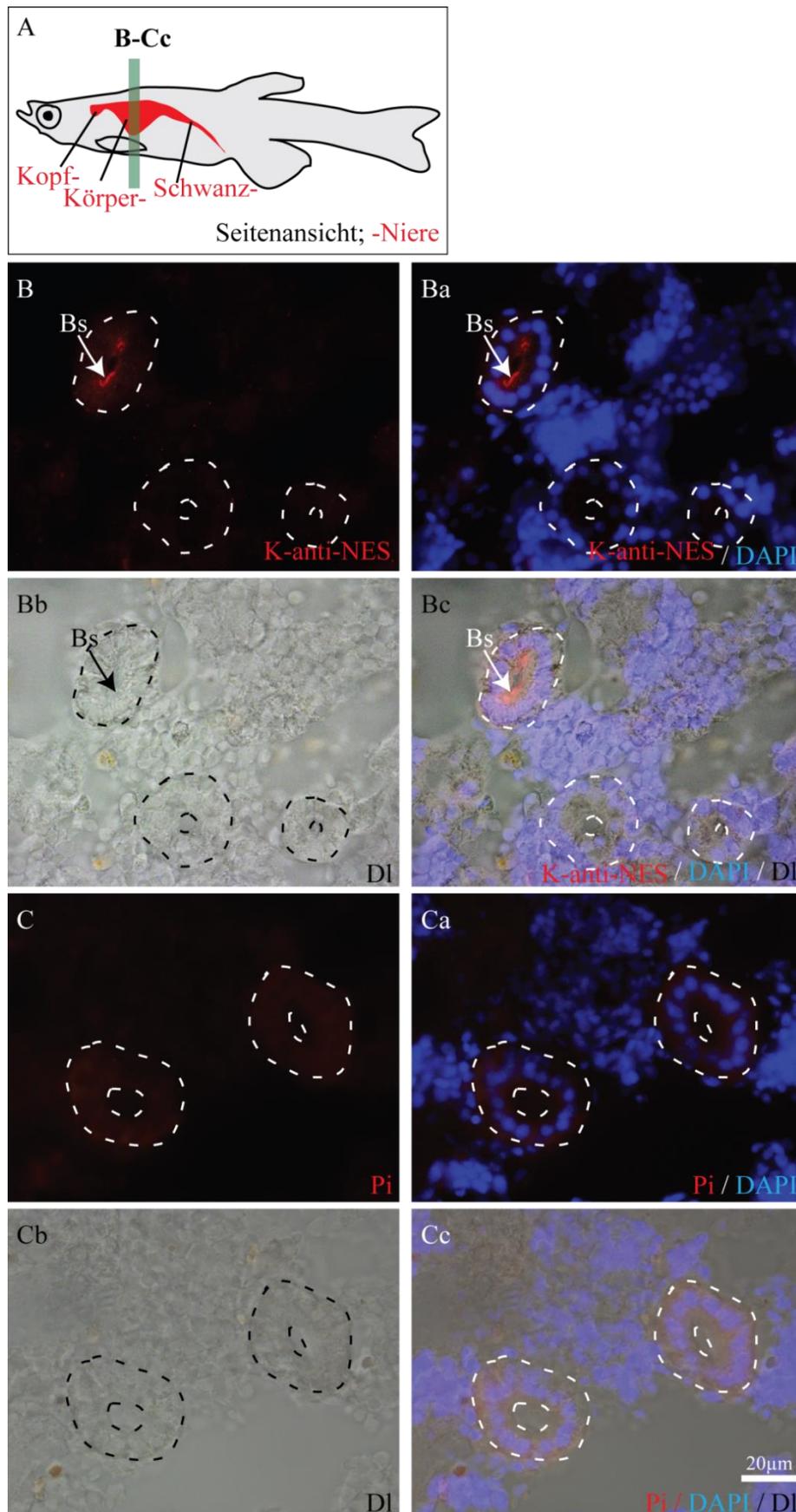


**Abbildung 32: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit K-anti-NES Antikörpern am Darm**  
(Legende siehe Seite 107)

Legende zu Abbildung 32:

In A ist eine laterale Ansicht des Darms schematisch abgebildet. Die grüne Linie gibt die Schnittebene des in B fotografierten Transversalschnitts durch die anteriore, die posteriore und die mediane Darmschleife an. Die drei Kästchen in B zeigen die Lage der in C-E vergrößerten Ausschnitte. Das Kästchen in E zeigt die in F-Fc vergrößert dargestellte Darmzotte. In C-Fc und in H ist das Ergebnis einer indirekten Immunfluoreszenz mit K-anti-NES Antikörpern als Primärantikörper (1:400) und mit Alexa 594-gekoppelten Z-anti-K-IgG Antikörpern als Sekundärantikörper dargestellt. Als Negativkontrolle wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Präimmunserum durchgeführt (G-Gc; Bilder einer Darmzotte, die aus der gleichen Darmregion wie die Darmzotte in F-Fc stammte). In H ist eine angefärbte Enterozyten-ähnliche Zelle vergrößert abgebildet. Diese Zelle stellt eine Vertreterin der Enterozyten-ähnlichen Zellen, die im gesamten hier untersuchten Darm angefärbt wurden, dar (C-E (>)). In allen Präparaten wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Alle Bilder wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Maßstableiste in E gilt ebenso für die Bilder in C und D. Die Maßstableiste in Gc gilt ebenso für die Bilder in F-Gb.

**A**, anterior, **Bs**, Bürstensaum; **DI**, Durchlicht; **M**, median; **P**, posterior; **Pi**, Präimmunserum; weiße Pfeilspitze: Enterozyten-ähnliche Zelle



**Abbildung 33: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit K-anti-NES Antikörpern an der Körperniere**

(Legende siehe Seite 109)

Legende zu Abbildung 33:

In A ist eine laterale Ansicht eines Zebrafischlarves dargestellt, in dem die Niere in rot eingezeichnet ist. Die grüne Linie gibt die Schnittebene der in B-Cc abgebildeten Transversalschnitte an. In B-Bc ist das Ergebnis einer indirekten Immunfluoreszenz mit K-anti-NES Antikörpern als Primärantikörper (1:400) und mit Alexa 594-gekoppelten Z-anti-K-IgG Antikörpern als Sekundärantikörper dargestellt (B-Bc). Als Negativkontrolle wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Präimmunsereum an einem vergleichbaren Transversalschnitt durchgeführt (C-Cc). In allen Präparaten wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Alle Bilder wurden unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die gestrichelten Linien in B-Cc markieren die inneren bzw. äußeren Grenzen der angeschnittenen „Röhren“. Die Maßstabsleiste in Cc gilt ebenso für die Bilder in B-Cb. Bs, Bürstensaum; Dl, Durchlicht; Pi, Präimmunsereum

Im Folgenden wurde versucht, den Slc22a4 Transporter in 10 µm dicken Radial-Gefrierschnitten der Retina adulter Zebrafischlarve zu lokalisieren. Die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden wie für den Darm und die Kopfnieren beschrieben durchgeführt. Fluoreszenzsignale wurden in Zellen der Photorezeptorschicht (PhRL) und in Zellen in der Ebene der Horizontalzellen (HC) detektiert (siehe Abbildung 34 B-Bc). In der Negativkontrolle kam es zu keiner Anfärbung (siehe Abbildung 34 C-Cc). Andere Regionen des Auges des Zebrafischlarves wurden noch nicht untersucht.

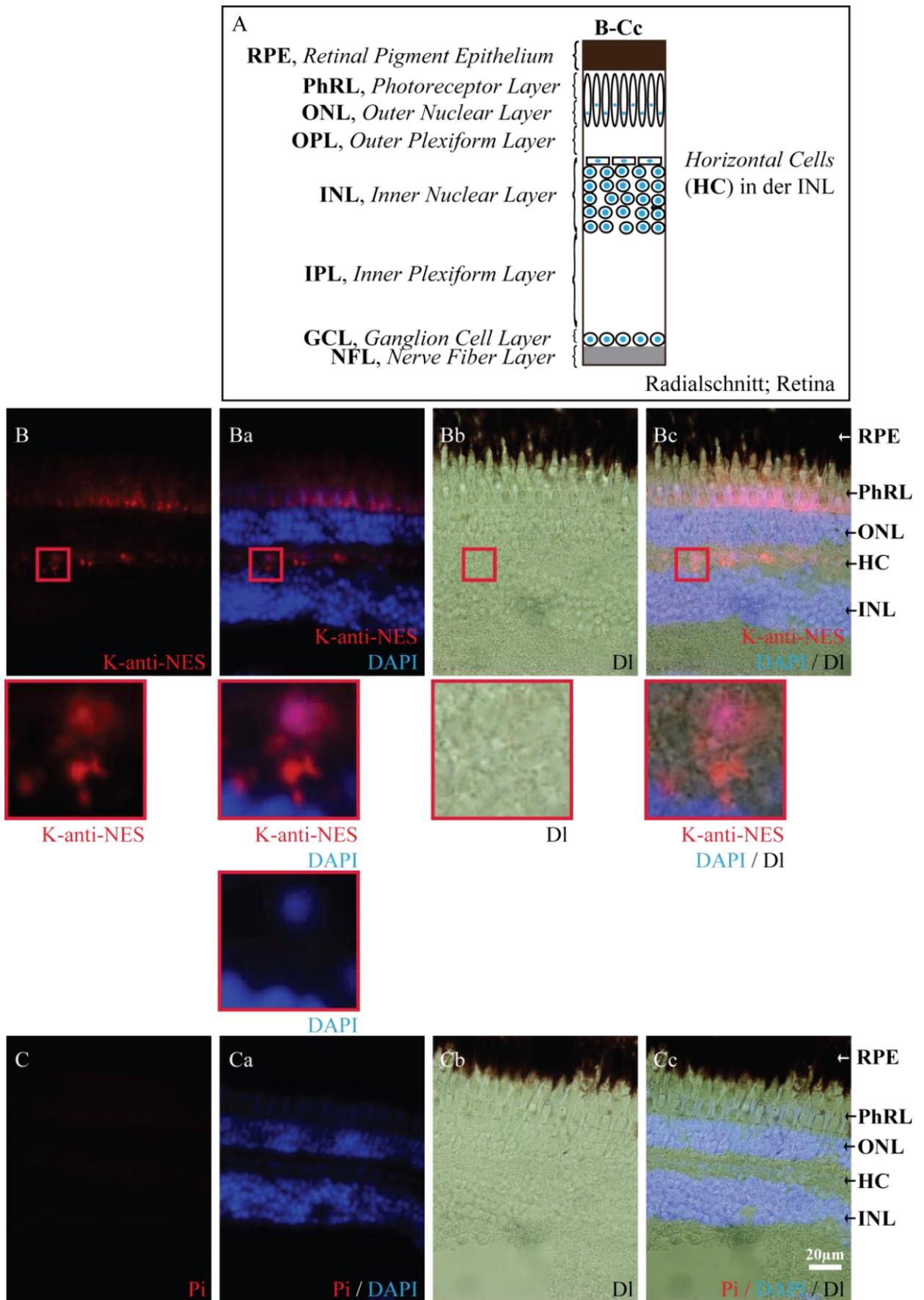


Abbildung 34: Immunhistochemische Lokalisation des Slc22a4 Transporters in der Retina (Legende siehe Seite 111)

Legende zu Abbildung 34:

In A ist ein Radialschnitt durch die Retina eines adulten Zebrabärblings schematisch dargestellt. Die Zellkerne sind mit blau eingezeichnet. In B-Bc ist das Ergebnis einer indirekten Immunfluoreszenz mit K-anti-NES Antikörpern als Primärantikörper (1:400) und mit Alexa 594-gekoppelten Z-anti-K-IgG Antikörpern als Sekundärantikörper an einem Radialschnitt durch die Retina dargestellt. Als Negativkontrolle wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Präimmenserum an einem vergleichbaren Radialschnitt durchgeführt (C-Cc). In allen Präparaten wurde die DNS der Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Alle Präparate wurden unter gleichen Bedingungen fotografiert. Die Maßstableiste in Cc gilt ebenso für die Bilder in B-Cb. Die roten Quadrate in B-Bc geben die Lage der vergrößerten Ausschnitte an, die unter den einzelnen Bildern abgebildet sind. Unter Ba ist zusätzlich die DAPI-Färbung des vergrößerten Bereichs dargestellt. Dl, Durchlicht; Pi, Präimmenserum

Im Gegensatz zu dem Darm und der Niere konnte der Slc22a4 Transporter mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen nicht in der Haut und im Gehirn detektiert werden. Die Herstellung der Präparate und die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Auch das Wechseln des Fixativs PFA hin zu Ethanol und Aceton führte zu keiner Detektion (siehe C.6.2). Als Positivkontrolle wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung an einem transversalen Gefrierschnitt des Darms durchgeführt. In der Positivkontrolle wurden die erwarteten Bereiche angefärbt. Die Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung an Ausstrichen von Blutzellen, in denen auch *slc22a4*-mRNS lokalisiert wurde, steht noch aus (siehe Abbildung 31).

In den Organen Milz, Muskel, Herz und Leber, in denen keine *slc22a4*-mRNS und kein ET nachgewiesen wurde, wurde der Slc22a4 Transporter nicht detektiert (siehe A.3.2). Die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wurden wie zuvor für den Darm und die Niere beschrieben ausgeführt. Als Positivkontrolle wurde parallel ein transversaler Gefrierschnitt des Darms mitgeführt. In diesem Gefrierschnitt wurde die erwartete Anfärbung erzielt. Die Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung an dem Gefrierschnitt einer Kieme, in der ebenfalls keine *slc22a4*-mRNS detektiert wurde, steht noch aus (siehe A.3.2).

Indirekte Immunfluoreszenzen mit K-anti-NES Antikörpern an sich entwickelnden Zebrabärblings wurden noch nicht vorgenommen.

## E Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es ein Werkzeug herzustellen, das es ermöglicht, die ET-Funktionsorte mit Einzelzellauflösung im Zebrafisch zu erfassen. Hierfür wurde genutzt, dass der Slc22a4 Transporter einen Biomarker für ET-Akkumulation/Aktivität darstellt (siehe A.2.3). Anschließend sollten mit diesem Werkzeug im gesamten Zebrafisch die Zellen identifiziert werden, in denen sich ET im Cytoplasma anreichert (siehe A.5).

Hierzu wurde zunächst der Versuch unternommen eine *Tg(slc22a4:eGFP)*-Reporterlinie zu etablieren (siehe D.1 und E.1). Weil dieser Versuch fehlschlug, wurden polyklonale Antikörper gegen den Slc22a4 Transporter produziert. Mit diesen Antikörpern wurde der endogene Slc22a4 Transporter immunhistochemisch in den Bürstensäumen des Darms und der Niere und in Zellen der Retina lokalisiert (siehe D.2 und E.2).

Im Zuge der Arbeit konnten *slc22a4*-Transkripte in peripheren Blutzellen des Zebrafisches nachgewiesen werden (siehe D.2 und E.2).

### E.1 Herstellung der *Tg(slc22a4:eGFP)*-Reporterlinie

In der Vergangenheit wurden bereits erfolgreich transgene Zebrafischlinien etabliert, in denen das *eGFP*-Gen unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert wurde (Cormack et al., 1996, Chalfie et al., 1994, Jessen et al., 1999, Lawson und Weinstein, 2002, Amsterdam et al., 1995). Um ET-haltige Zellen zu identifizieren, sollte eine transgene Zebrafischlinie, die das cytoplasmatische eGFP unter der Kontrolle des Promotors des *slc22a4*-Gens enthält, erzeugt werden (siehe A.4). Die ET-haltigen Zellen könnten in Gewebeschnitten oder ganzen Organen adulter Zebrafische der *Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie über die eGFP-Fluoreszenz direkt und schnell unter einem Fluoreszenzmikroskop ausfindig gemacht werden. Aufgrund der optischen Klarheit der Zebrafisch-Larven könnten zudem Veränderungen des *slc22a4*-Expressionsmusters und das Verhalten ET-haltiger Zellen über die Zeit über die Detektion der eGFP-Fluoreszenz z.B. mittels Zeitrafferaufnahmen mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop erfasst werden (Distel und Köster, 2007). Zur Charakterisierung der Zelltypen, die ET anhäufen, könnten Ko-Expressionsstudien durchgeführt werden, indem Fische der *Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie einfach mit Fischen transgener Reporterlinien, die rot-fluoreszierende Proteine in ausgewählten Zellen wie z.B. Makrophagen (*Tg(mpeg1:mCherry)*-Linie) enthalten, gekreuzt werden (Ellett et al., 2011).

Eine Zelle, die sowohl eGFP als auch ein rot-fluoreszierendes Protein synthetisiert, würde nach Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen gelb erscheinen. Weitere Ko-Lokalisationsstudien stellen mRNS *in situ* Hybridisierungen oder Antikörperfärbungen unter Verwendung passender Marker an der *Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie dar. Das eGFP könnte dabei direkt über seine Fluoreszenz oder indirekt über spezifische Antikörper, die kommerziell erhältlich und vielfach erprobt sind, sichtbar gemacht werden (Peluso et al., 2013, Askou et al., 2012, Love et al., 2012) (siehe Tabelle 18).

Eine Alternative zur Erfassung ET-haltiger Zellen stellen theoretisch *slc22a4*-mRNS *in situ* Hybridisierungen und immunhistologische Methoden zum Nachweis des Slc22a4-Proteins dar (siehe A.3.3). Diese Methoden sind arbeits- und kostenintensiver und erstrecken sich über mehrere Tage (siehe C.6.3). Bezüglich der *slc22a4*-mRNS *in situ* Hybridisierungen muss angemerkt werden, dass diese bereits von M. Bach durchgeführt wurden und zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führten. So konnte *slc22a4*-mRNS zwar im sich entwickelnden Zebrabärbling von 6 hpf bis 5 dpf nachgewiesen werden, jedoch war die Anfärbung so schwach, dass eine Einzelzellauflösung nicht erreicht werden konnte (siehe Abbildung 20 C). Zudem konnte mittels mRNS *in situ* Hybridisierungen im adulten Zebrabärbling in Organen, in denen *slc22a4*-mRNS mittels RT-PCR nachgewiesen wurde, keine *slc22a4*-mRNS detektiert werden (Bach, 2009) (siehe A.3.2). Nilsson und Kollegen beschreiben für die zu dem *slc22a4*-Gen homologen Transportergene *slc22a5a* und *slc22a5b* ebenfalls, dass deren mRNS-Moleküle mittels *in situ* Hybridisierungen im Embryo 24 hpf kaum detektierbar waren. Mittels quantitativer *Real-time*-PCR konnten Nilsson und Kollegen außerdem zeigen, dass die *slc22a5a*- und die *slc22a5b*-mRNS-Moleküle nur in sehr geringen Mengen transkribiert werden. Es muss erwähnt werden, dass in dieser Publikation das *slc22a5a*-Gen fälschlicherweise für das Gen des ET-Transporters gehalten wurde (Nilsson et al., 2009) (siehe A.3.2).

### **E.1.1 Die Transkription des *slc22a4*-Gens wird vermutlich von weit entfernten *cis*-regulatorischen Elementen beeinflusst**

Zur Etablierung der *Tg(slc22a4:eGFP)*-Reporterlinie mit dem Tol2-Transposon-System muss ein Tol2-*eGFP*-Transposonvektor hergestellt werden, in dem sich das *eGFP*-Gen unter der transkriptionellen Regulation des Promotors des *slc22a4*-Gens befindet (siehe A.4).

Der Promotor des *slc22a4*-Gens ist unbekannt.

Eukaryotische Promotoren sind meist in drei Abschnitte unterteilt. Dem Transkriptionsstartpunkt des Gens am nächsten liegt der Kernpromotor, stromaufwärts folgt

der proximale Promotor und weiter entfernt (bis zu über 100 kb), sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts, schließlich die *Enhancer* und *Silencer* sowie Locus-Kontrollregionen (Graw und Hennig, 2006, Zhang et al., 2007). Als Transkriptionsstartpunkt wurde hier eine Desoxyguanosinmonophosphat, das sich 57 Nukleotide vom Translationsstartpunkt entfernt befindet, ermittelt (siehe Abbildung 38).

Das *slc22a4*-Gen befindet sich auf der Kopplungsgruppe 21 (Ensembl Danio rerio – Zv9). Stromaufwärts des ATGs des *slc22a4*-Gens befindet sich in einem Abstand von ca. 1,6 kb in gleicher Orientierung das *slc22a5b*-Gen. Das *slc22a5b*-Gen kodiert für einen Transmembrantransporter, der zu dem Slc22a4 Transporter homolog ist. Das Substrat des Slc22a5b Transporters ist unbekannt (Bach, 2009) (siehe A.3.2). In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurde die ca. 1,6 kb große intergene Region als putativer Promotor des *slc22a4*-Gens angesehen. Jedoch wurde durch Cytoplasma-Injektion eines Konstrukts, in dem sich dieser putative Promotor stromaufwärts des *eGFP*-Gens befand, unter Verwendung des Ac/Ds-Transposon-Systems gezeigt, dass diese DNS-Region nicht ausreicht, um die Expression des *eGFP*-Gens im Zebrabärbling anzutreiben und somit den Promotor des *slc22a4*-Gens nicht vollständig abbildet (Emelyanov et al., 2006, Bach, 2009). Dieses Ergebnis konnte hier unter Verwendung des Tol2-Transposon-Systems und eines in dieser Doktorarbeit konstruierten Transposonvektors mit der gleichen putativen Promotorsequenz bestätigt werden (siehe D.1.2.2). Aus der Literatur ist bekannt, dass kurze Regionen (< 2kb) durchaus alle Elemente zur Kontrolle der Transkription eines Gens enthalten können (Zerucha et al., 2000, Huang et al., 2003, Wang et al., 2011).

In dieser Arbeit wurde weiter der Versuch unternommen, das *eGFP*-Gen unter die transkriptionelle Kontrolle der Gesamtheit der regulatorischen Elemente des *slc22a4*-Gens zu bringen, indem der putative Promotorbereich erweitert wurde. Hierzu wurde mittels *Recombineering* der kodierende Teil des ersten Exons des *slc22a4*-Gens des Fosmids *CH1073-409B12*, gegen eine *eGFP*-Reportergen-kassette erfolgreich ausgetauscht. In dem modifizierten Fosmid ist das *eGFP*-Gen stromaufwärts von 26313 bp (beinhaltet das gesamte *slc22a5b*-Gen) und stromabwärts von 9583 bp (umfasst das *slc22a4*-Gen von Intron1 bis einschließlich Exon 5) genomischer Zebrabärbling-DNS umgeben (siehe C.1.1.10, D.1.1.1 und Abbildung 15). Um eine verstärkte Integration in das Genom des Zebrabärblings zu erzielen, wurde das *eGFP*-modifizierte genomische Zebrabärbling-DNS-Insert (potentielle *slc22a4:eGFP*-Expressionskassette) mittels *Recombineering* mit Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase umgeben (siehe A.4, D.1.1.2 und Abbildung 17).

Anschließende Injektionen dieses konstruierten Tol2-*eGFP*-Transposonvektors zusammen mit der mRNA für die Tol2-Transposase hatten gezeigt, dass sich auch auf diesem Konstrukt vermutlich nicht alle regulatorischen Elemente des *slc22a4*-Gens befinden. So konnte in keinem der injizierten Zebrafisch-Embryonen *eGFP* weder direkt über dessen Fluoreszenz noch indirekt über sensitivere DAB-Färbung detektiert werden (siehe Abbildung 20). Es konnte ausgeschlossen werden, dass die FRT-Stelle und das Vektorrückgrat des Tol2-*eGFP*-Transposonvektors einen negativen Einfluss auf eine mögliche *eGFP*-Expression ausübten. So blockierten diese DNS-Elemente nicht die *eGFP*-Expression, die von einem sCMV IE94-Promotor angetrieben wurde (siehe D.1.2.2 und Abbildung 21).

Es sind zahlreiche Beispiele bekannt, die zeigen, dass man mit Reporter-gen-modifizierten Klonen, die große genomische DNS-Fragmente des Zebrafisches enthalten (*eGFP*-BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*)), unter Verwendung des Tol2-Transposon-Systems transgene *eGFP*-Zebrafisch-Reporterlinien erfolgreich herstellen kann (Bussmann und Schulte-Merker, 2011, Suster et al., 2009b, Suster et al., 2011). Suster und Kollegen empfehlen hierfür, mit den größtmöglichen genomischen Klonen zu arbeiten. Sie sollten mindestens eine Größe von 100 kb besitzen. Dies übersteigt die hier verwendete Größe um fast das dreifache. Zu groß gewählte Klone werden von Suster et al. wiederum als schwierig zu handhaben beschrieben (Suster et al., 2011).

Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Doktorarbeit waren außer dem Fosmid *CH1073-409B12* keine weiteren Klone genomischer DNS, die den vollständigen Promotor des *slc22a4*-Gens und den *slc22a4*-Genlocus enthalten hätten können, kommerziell erwerbbar. Das Ziel, eine transgene *eGFP*-Zebrafisch-Reporterlinie herzustellen, wurde somit zurückgestellt.

Werden in der Zukunft oben beschriebene Klone kommerziell erhältlich oder können aus kommerziell erhältlichen BAC-Bibliotheken identifiziert werden, kann die hier konstruierte *eGFP*-Reporter-gen-kassette zur Modifizierung der genomischen Inserts mit dem *eGFP*-Gen verwendet werden (siehe D.1.1.1, Abbildung 14 und Abbildung 15). Zudem kann der hier geschaffene „pBSK+\_iTol2Kan“-Vektor zur anschließenden Flankierung der *eGFP*-modifizierten Inserts mit Tol2-Erkennungsstellen verwendet werden, indem in diesen die entsprechenden homologen Arme für das *Recombineering* eingebaut werden (siehe D.1.1.2, Abbildung 16 und Abbildung 17).

### E.1.2 Vergleich unterschiedlicher Keimbahn-Transgenese-Methoden im Zebrabärbling

Für den Zebrabärbling wurden in den letzten Jahren viele Keimbahn-Transgenese-Methoden entwickelt. Die erste Methode war die Injektion linearisierter Plasmid-DNS in das Cytosol von Zebrabärblingen im Einzell-Stadium. Diese Methode ist zwar einfach, jedoch kommt es hierbei zu einer sehr geringen Integrationsrate. Sie liegt bei kleinen Konstrukten (<10 kb) bei 5-10 % und bei größeren Vektoren wie Fosmid- und BAC-Klonen bei 2 % (Stuart et al., 1988, Amsterdam et al., 1995, Long et al., 1997, Higashijima et al., 1997, Shin et al., 2003, Suster et al., 2011). Eine weitere, später entwickelte Technik ist das Flankieren des Transgens mit Restriktionsstellen für die I-SceI Meganuklease und die Ko-Injektion mit dem I-SceI Protein, das aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammt (Jacquier und Dujon, 1985). Hierbei liegt die Integrationsrate bei kleinen Konstrukten (ca. 8 kb) bei bis zu 45 % (Rembold et al., 2006, Soroldoni et al., 2009). Retrovirale Vektoren wurden ebenfalls erfolgreich zur Keimbahn-Transgenese im Zebrabärbling eingesetzt (Lin, Gaiano et al. 1994, Gaiano, Allende et al. 1996, Ellingsen, Laplante et al. 2005). Jedoch haben retrovirale Vektoren eine sehr geringe Ladekapazität von unter 8 kb und ihre Anwendung im Labor ist sehr arbeitsintensiv (Thomas et al., 2003, Suster et al., 2011). Seit einiger Zeit sind die transponierbaren Elemente *mariner*, *Tol2* und *Sleeping beauty* sehr beliebt (Fadool et al., 1998, Davidson et al., 2003, Kawakami, 2005). Unter diesen wird mit dem Tol2-Transposon, das von Koga in Medaka (*Oryzias latipes*) indentifiziert und zum ersten Mal von Kawakami im Zebrabärbling eingesetzt wurde, die höchste Keimbahn-Integrationsrate erzielt (Kawakami, 2000, Koga et al., 1996). Sie liegt für kleine Konstrukte (bis zu 10 kb) bei 50-70 % und für BAC-Klone bei 5-20 %. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *Tol2* eine Ladekapazität von mehr als 160 kb besitzt (Suster et al., 2011). Das Tol2-Transposon-System war aufgrund der genannten Eigenschaften am besten für diese hier vorliegende Arbeit geeignet.

Durch Injektion des Vektors *pcmlc2:eGFP*, der eine *cmlc2:eGFP*-Expressionskassette enthält, die von Tol2-Erkennungsstellen flankiert ist, zusammen mit der *Tol2*-mRNS konnte hier nochmals demonstriert werden, dass die Tol2-Transposase die Integration eines Transgens in das Zebrabärbling-Genom verstärkt. So kam es in ca. 62 % der Zebrabärbling-Larven, die mit dem Vektor *pcmlc2:eGFP* und mit der *Tol2*-mRNS injiziert worden waren, zu einer starken, erwarteten transienten eGFP-Fluoreszenz im Herzmuskel, wohingegen nur ca. 2 % der Larven, die mit dem *pcmlc2:eGFP*-Vektor alleine injiziert worden waren, diese aufwiesen (siehe B.4.3, D.1.2.1 und Abbildung 18).

### E.1.3 Herstellung von Knock-in-Linien im Zebrafisch mittels TALENs-induzierter homologer Rekombination

Seit Kurzem (nach Beendigung der Laborarbeit für diese Doktorarbeit) besteht im Zebrafisch die Möglichkeit der TALENs- (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*)-vermittelten präzisen Modifikation des Keimbahn-Genoms durch homologe Rekombination. Diese Methode ermöglicht die gezielte Insertion großer DNS-Fragmente (z. B. *eGFP*-Gen) (Zu et al., 2013, Blackburn et al., 2013).

Eine TALEN ist ein künstlich hergestelltes Fusionsprotein zwischen der DNS-Bindedomäne eines TAL (*Transcription Activator-like*)-Effektors und der unspezifischen DNS-Schneidedomäne der Fok (*Flavobacterium okeanoicoles*) I-Endonuklease. Am N-Terminus einer TALEN befindet sich ein SV40-Kernlokalisierungssignal (siehe Abbildung 35 A). TALENs ermöglichen das Einfügen eines DNS-Doppelstrangbruchs an einer gewünschten Stelle im Genom (Mahfouz et al., 2011, Li et al., 2011, Bedell et al., 2012) (siehe Abbildung 35 B). Es wurde gezeigt, dass TALENs in den Modellsystemen *C. elegans*, Zebrafisch, Ratte, humane somitische Zelllinien und humane pluripotente Zellen aktiv sind (Wood et al., 2011, Sander et al., 2011, Tesson et al., 2011, Miller et al., 2011, Reyon et al., 2012, Hockemeyer et al., 2011).

TAL-Effektoren, eine Familie von Proteinen, werden von den phytopathogenen Bakterien der Gattung *Xanthomonas* synthetisiert und von diesen während der Infektion von Pflanzenzellen sezerniert. Die TAL-Effektoren imitieren eukaryotische Transkriptionsaktivatoren, die im Wirtsgenom an ihre Zielsequenzen binden und die Genexpression zu dem Vorteil der Bakterien umprogrammieren (Boch und Bonas, 2010, Guerlebeck et al., 2005, Roemer et al., 2009). Die TAL-Effektoren besitzen variable C- und N-Termini, die eine konservierte Domäne für die spezifische DNS-Bindung einschließen. Der zentrale Bereich der DNS-Bindedomäne besteht aus einer variablen Anzahl an Modulen von je 33-35 ASs. Ein Modul ist mit Ausnahme von zwei hoch variablen Resten an den Positionen 12 und 13 (RVD, *Repeat Variable Diresidue*) hoch konserviert. Über die RVDs, die mehr oder weniger spezifisch je eine der vier Nukleobasen erkennen und binden, wird die DNS-Sequenz der DNS-Bindedomäne der TAL-Effektoren festgelegt (TALEN Code, siehe Abbildung 35 A). Durch die Kombination unterschiedlicher Module können spezifische Bindedomänen für gewünschte DNS-Sequenzen *in vitro* synthetisiert werden (Boch et al., 2009, Moscou und Bogdanove, 2009, Bedell et al., 2012).

Das Fok I-Protein ist eine Typ II-Restriktionsendonuklease des *Flavobacterium okeanoicoles*. Es besteht aus einer N-terminalen DNS-Bindedomäne und einer C-terminalen

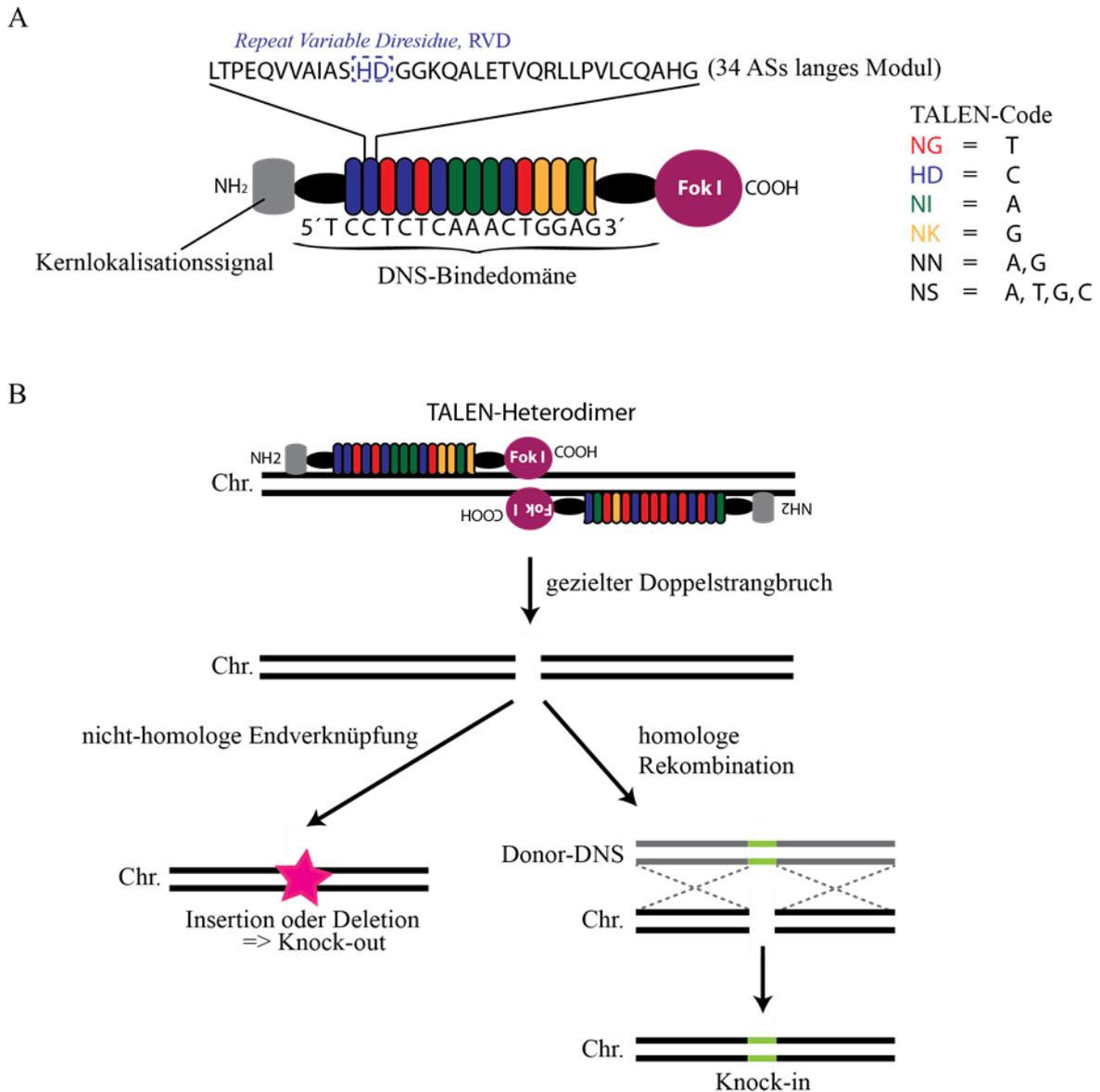
unspezifischen DNS-Schneidedomäne (Kim et al., 1997). Die DNS-Bindedomäne erkennt die Sequenz 5' GGATG 3'. Die DNS-Schneidedomäne spaltet die DNS 9 und 13 bp stromabwärts der Erkennungssequenz (5' GGATG-(N)<sub>9</sub> 3' und 3' CCTAC-(N)<sub>13</sub> 3'). Das Fok I-Protein ist nur als Dimer funktionsfähig (Bitinaite et al., 1998).

Um ein Zielgen zu schneiden, werden zwei TALENs, die die beabsichtigte Position des Doppelstrangbruchs flankieren und so die Dimerisierung der Fok I-Schneidedomänen zu einer funktionellen Einheit ermöglichen, konstruiert. Die Fok I-Schneidedomänen fügen den DNS-Doppelstrangbruch zwischen den DNS-Sequenzen, an die die TALENs binden, ein (siehe Abbildung 35 B). Ein Doppelstrangbruch wird von der Zelle erkannt und meist durch nicht-homologe Endverknüpfung repariert. Hierbei kommt es zu kleineren, nicht vorhersagbaren Deletionen und Insertionen, die zu einem Knock-out des Zielgens führen können. Falls eine doppelsträngige Donor-DNS mit Homologie zu Regionen stromaufwärts und stromabwärts des Doppelstrangbruchs bereitgestellt wird, kann die Reparatur mittels homologer Rekombination erfolgen. Hierbei können gezielt große Insertionen, die keine Narben in der umliegenden DNS verursachen, vorgenommen werden (Zu et al., 2013, Blackburn et al., 2013) (siehe Abbildung 35 B).

Mittels TALENs-vermittelter präziser Genom-Modifikation durch homologe Rekombination konnten Zu und Kollegen stabile Knock-in-Zebrabärblinglinien herstellen, in denen das *eGFP*-Gen in das vierte Exon des *thyrosin-hydroxylase*-Gens integriert ist (Zu et al., 2013). Hierzu wurden die mRNS-Moleküle der passenden TALENs zusammen mit einem linearisierten Vektor, der die Donor-DNS enthielt, in das Cytoplasma von 275 Zebrabärblingen im Einzell-Stadium injiziert. In vier dieser Zebrabärblinge kam es zu der beabsichtigten Insertion mittels homologer Rekombination in das Genom der Keimbahn (Frequenz der Keimbahn-Transmission: ca. 1,5 %) (Zu et al., 2013).

Mittels TALENs-vermittelter homologer Rekombination könnte auch eine Knock-in-Zebrabärblinglinie, in der unmittelbar stromaufwärts des Stopcodons des *slc22a4*-Gens das *eGFP*-Gen im selben Leserahmen inseriert ist, sodass eine C-terminale eGFP-Fusion des Slc22a4 Transporters translatiert wird, produziert werden. Diese Zebrabärblinglinie würde mittels eGFP-Fluoreszenz nicht nur *slc22a4*-exprimierende Zellen sichtbar machen, sondern auch die subzelluläre Lokalisation des Slc22a4-Proteins widerspiegeln. Um nicht in die Gefahr zu laufen Zebrabärblinge zu produzieren, die kein ET mehr anhäufen können, sollte vor der Konstruktion einer solchen Linie die Funktionsfähigkeit, d. h. die ET-Transportleistung, des Fusionsproteins in Zellkultur überprüft werden.

Auch mit ZFNs (Zinkfinger-Nukleasen) und mit dem CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (*CRISPR-associated nuclease*)-System können Doppelstrangbrüche an beabsichtigten Positionen im Zebrafisch-Genom vorgenommen werden. Diese Doppelstrangbrüche wurden jedoch noch nicht genutzt, um das Keimbahn-Genom mittels homologer Rekombination mit großen Insertionen gezielt zu verändern (Chang et al., 2013, Sood et al., 2013, Hwang et al., 2013, Chen et al., 2013).



**Abbildung 35: TALENs-vermittelte gezielte Insertion großer DNS-Fragmente**

In A ist ein mögliches TALEN-Monomer schematisch dargestellt. Die DNS-Sequenz, die von den Modulen der DNS-Bindedomäne erkannt wird, beginnt nach einem T (Thymin), aber nie mit einem T. Das Modul, das am nächsten am C-Terminus liegt, besitzt nur halb so viele ASs wie die übrigen Module (Liu et al., 2012, Mahfouz et al., 2011). In B ist die Reparatur eines TALENs-vermittelten Doppelstrangbruchs durch homologe Rekombination (rechts) bzw. nicht-homologe Endverknüpfung (links) schematisch dargestellt. Chr., Chromosom; (eigene Grafik)

## E.2 Immunhistochemische Lokalisation des Ergothionein-Transporters

Da es nicht gelang eine *Tg(slc22a4:eGFP)*-Linie zu etablieren, wurde begonnen das ET-Transporter-Protein und somit ET-haltige Zellen mittels polyklonaler Antikörper gegen den Slc22a4 Transporter, die hier hergestellt wurden, zu detektieren (siehe D.2).

Werden diese Antikörper für eine indirekte Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten des Zebraärlings eingesetzt, können nicht nur Zellen, in denen sich der Slc22a4 Transporter befindet, sondern ebenso subzelluläre Verteilungen des Transporters bestimmt werden.

Zudem ermöglichen diese Antikörper die Identifikation eventueller Proteine, die mit dem Slc22a4 Transporter einen Komplex bilden. Diese Identifikation könnte mittels indirekter Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen passende Kandidatenproteine oder mittels Ko-Immunopräzipitation erfolgen. Derartige Versuche wurden jedoch noch nicht durchgeführt.

### E.2.1 Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper

#### E.2.1.1 Die größte extrazelluläre Schleife als Antigen

In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurden von C. Fork polyklonale Antikörper gegen den SLC22A13 Transporter aus der Ratte (SLC22A13r) in einem Kaninchen produziert. Der SLC22A13r Transporter stammt wie der ET-Transporter aus der Familie der *Solute Carrier 22* und besitzt somit eine vergleichbare Topologie (siehe A.2.1 und Abbildung 2). Als Antigen wurde ein Peptid (16 ASs), das in der größten extrazellulären Schleife des SLC22A13r Transporters lokalisiert ist, die die erste und zweite Transmembranhelix miteinander verbindet, gewählt (siehe Abbildung 2). Mit diesen Antikörpern konnte der SLC22A13r Transporter in Gewebeschnitten der Rattenniere erfolgreich lokalisiert werden (Fork, 2009).

Daher wurde hier ebenfalls versucht polyklonale Antikörper gegen die größte extrazelluläre Schleife des Slc22a4 Transporters zu richten. Als Antigen wurde jedoch die gesamte größte extrazelluläre Schleife ausgewählt. Sie wurde als C-terminales 2x-Strep-Tag II-Fusionsproteinfragment heterolog in HEK-293-EBNA-Zellen produziert und anschließend über den 2x-Strep-Tag II aufgereinigt und identifiziert. Das Fusionsproteinfragment wurde von den HEK-293-EBNA-Zellen N-glykosyliert (siehe D.2.1.1 und Abbildung 23). Von einer Verzuckerung der größten extrazellulären Schleife des ET-Transporters wird in der Literatur aufgrund von AS-Sequenzvergleichen von ET-Transportern verschiedener Vertebraten ausgegangen (Gründemann, 2012) (siehe A.2.1 und Abbildung 2). Ein AS-

Sequenzvergleich von den größten extrazellulären Schleifen der homologen Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b ergab, dass der ET-Transporter des Zebrafischs vermutlich über drei N-Glykosylierungsstellen, die konserviert sind, verfügt (siehe D.2.1.1, Abbildung 22 und Abbildung 42). Es war jedoch unklar, ob die Verzuckerung der heterolog exprimierten GES der Verzuckerung des nativen Slc22a4 Transporters entsprach. So könnten aufgrund von Speziesunterschieden andere Oligosaccharide oder aufgrund der Überexpression unvollständige Oligosaccharide angebracht worden sein. Daher wurden ein Meerschweinchen und ein Kaninchen mit dem verzuckerten bzw. mit dem nicht verzuckerten 2x-Strep-Tag II-Fusionsproteinfragment (NES) immunisiert (siehe D.2.1.1). Ein AS-Sequenzvergleich der Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b lässt vermuten, dass die 3D-Struktur der größten extrazellulären Schleife des Slc22a4 über zwei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert wird (siehe Abbildung 2, Abbildung 22, Abbildung 41 und Abbildung 42). Daher wurde angenommen, dass die GES bzw. die NES die gleiche 3D-Struktur ausbildete und die produzierten Antikörper somit gegen die Tertiärstruktur der größten extrazellulären Schleife des nativen Slc22a4 Transporters gerichtet wurden. C-terminale 2x-Strep-Tag II-Fusionsproteinfragmente wurden in der Vergangenheit vielfach erfolgreich als Antigene zur Produktion polyklonaler Antikörper eingesetzt (Neacsu, 2012, Gara et al., 2011, Ehlen et al., 2009).

ELISA-Messungen zeigten, dass es sich bei der GES und bei der NES um sehr immunreaktive Antigene handelte. So wurden für alle vier polyklonale Antikörper sehr hohe Titer ermittelt (siehe D.2.1.2 und D.2.1.3). Diese lagen zwischen 1:5000 und 1:160000 (siehe Abbildung 25).

#### ***E.2.1.2 Die polyklonalen K-anti-NES Antikörper erkennen den Slc22a4 spezifisch***

Die vier produzierten polyklonalen Antikörper gegen die 3D-Struktur der GES bzw. der NES wurden mittels Affinitätschromatographie aus den Antiseren gereinigt. Hierbei wurden mögliche Antikörper, die eine Kreuzreaktion zu den homologen Transportern Slc22a5a und Slc22a5b zeigten, herausgefiltert (siehe C.5.7 und D.2.1.2). Ebenso wurden hierbei mögliche Antikörper gegen den 2x-Strep-Tag II beseitigt (siehe D.2.1.2).

Mit allen vier aufgereinigten Antikörpern konnte in HEK-293-EBNA-Zellen, die C-terminale eGFP-Fusionen des Slc22a4 Transporters mit Hilfe eines induzierbaren Vektorsystems produzierten, mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen ein gleichmäßig verteiltes Fluoreszenzsignal in den Plasmamembranen erreicht werden. Durch die Detektion der eGFP-Fluoreszenz vor der Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen

wurde ermittelt, dass in der Zellmembran vermutlich intakte Slc22a4-eGFP-Fusionsproteine lokalisiert waren (siehe Abbildung 27 F). In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurde von M. Bach in einer Kollokalisationsstudie mit dem Zellmembranmarker Alexa Fluor® 594 WGA gezeigt, dass in *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen neben der Zellmembran in keinen weiteren Kompartimenten eGFP-Fluoreszenz zu finden war (Bach, 2009) (siehe Abbildung 43). Mit keinem der vier Antikörper konnten hingegen die Cytoplasmamembranen von HEK-293-EBNA-Zellen, die den Slc22a5a Transporter bzw. den Slc22a5b Transporter als C-terminale eGFP-Fusion synthetisierten, mittels indirekter Immunfluoreszenzen angefärbt werden (siehe Abbildung 27, Abbildung 28, Abbildung 29 und Abbildung 30). Somit konnten die vier polyklonalen Antikörper weder den Slc22a5a Transporter noch den Slc22a5b Transporter in der jeweiligen eGFP-Fusion in HEK-293-EBNA-Zellen erkennen; d. h. die Antikörper waren im Rahmen dieses Tests spezifisch (siehe D.2.1.4).

Bei allen vier durchgeführten indirekten Immunfluoreszenzfärbungen an *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen wurden zusätzlich Anfärbungen im Cytosol und in cytosolischen Vesikeln erhalten. In diesen Zellkompartimenten war keine eGFP-Fluoreszenz vorhanden. Aufgrund der durchgeführten Kontrollen wurde gezeigt, dass diese zusätzlichen Anfärbungen auf die Anwesenheit der Slc22a4-eGFP-Proteine zurückzuführen waren (siehe D.2.1.4, Abbildung 27, Abbildung 28, Abbildung 29 und Abbildung 30). Vermutlich lassen sie sich durch eine Abspaltung des nahe dem N-Terminus gelegenen Antigens von einigen Slc22a4-eGFP-Fusionsproteinen erklären (siehe Abbildung 2). Die Proteinfragmente mit dem Antigen könnten im Cytosol und in den cytosolischen Vesikeln angehäuft worden sein. Eine Abspaltung erfolgte vielleicht dadurch, dass die HEK-293-EBNA-Zellen die Slc22a4-eGFP-Fusionsproteine als fremd erkannten. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die polyklonalen Antikörper tatsächlich abgespaltene Proteinfragmente im Cytosol und in den cytosolischen Vesikeln erkannten, könnten Western-Blots mit anschließenden Immundetektionen an Lysaten von *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen unter Verwendung der polyklonalen Antikörper durchgeführt werden. Binden die Antikörper an abgespaltene Proteinfragmente, wären zusätzlich zu der 97 kDa großen Bande der vollständigen Fusionsproteine eine oder mehrere kleinere Banden, die das Antigen enthalten, zu erwarten. In der AG von D. Gründemann konnte in den letzten Jahren trotz intensivster Bemühungen mehrerer Personen noch kein einziger ET-Transporter mittels Western-Blot mit anschließender Immundetektion in Lysaten von HEK-293-EBNA-Zellen, die ET-Transporter exprimierten, oder in Gewebeextrakten nachgewiesen werden (Aussage von D. Gründemann).

Es war hier keine Zeit mehr vorhanden, um diesen Western-Blot mit darauffolgender Immundetektion an Lysaten von *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen zu etablieren. Es ist durchaus denkbar, dass ein Slc22a4 Transporter, von dem ein großer Teil abgespalten wurde, nicht mehr funktionsfähig ist. Einen Hinweis auf eine Abspaltung der größten extrazellulären Schleife würde dann das von M. Bach ermittelte Ergebnis, dass die Transporteffizienz (ausgedrückt durch die *Clearance* [ $\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$ ]; das Volumen, das pro Minute pro mg Protein von dem Substrat befreit wird) von ET durch den Slc22a4 Transporter in HEK-293-Zellen etwa um den Faktor 5 niedriger war als die Transporteffizienz von ET durch den ETTh, liefern (Bach, 2009) (siehe A.2.2, A.3.2 und Abbildung 7). Die hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen an *slc22a4-eGFP*-exprimierenden HEK-293-EBNA-Zellen deuten darauf hin, dass HEK-294-EBNA-Zellen den Slc22a4 Transporter zerstören. Somit wurde hier vermutlich die wertvolle Erkenntnis gewonnen, dass HEK-293-EBNA-Zellen nicht optimal dafür geeignet sind, um Proteine aus dem Zebrafisch in ihnen zu untersuchen. Der hier durchgeführte Spezifitätstest wurde dadurch jedoch nicht beeinträchtigt.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die polyklonalen Antikörper den Slc22a4 Transporter im Zebrafisch erkennen konnten, wurden indirekte Immunfluoreszenzen an Darm- und Nierenschnitten durchgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass indirekte Immunfluoreszenzfärbungen mit Primärantikörpern, die den Slc22a4 Transporter erkennen, eine Anfärbung der Bürstensäume des Darms und der proximalen Tubuli liefern, da der Slc22a4 Transporter dort lokalisiert sein muss, um seine vermeintlichen Aufgaben, die ET-Absorption und die ET-Retention, erfüllen zu können (Gründemann, 2012) (siehe A.2.4.1). Eine Anfärbung der Bürstensäume wurde vermutlich mit den polyklonalen K-anti-NES Antikörpern erreicht (siehe D.2.2, Abbildung 32 und Abbildung 33). Mit den polyklonalen M-anti-GES Antikörpern und mit den polyklonalen K-anti-GES Antikörpern konnten keine Fluoreszenzsignale detektiert werden. Vermutlich wurden die Epitope des Slc22a4 Transporters, an die diese Antikörper binden, durch die Gewebefixierung mit 4 % PFA abgeschirmt (siehe C.6.3 und E.2.2.3). Mit den polyklonalen M-anti-NES Antikörpern wurden kurioserweise alle Nuklei angefärbt. Somit erkennen die polyklonalen K-anti-NES Antikörper als einzige der produzierten Antikörper vermutlich den Slc22a4 Transporter im Darm und in der Niere (siehe D.2.1.1 und E.2.1.1). Die Bürstensäume wurden auf Grund der Lage im Gewebeschnitt identifiziert. Das Ergebnis könnte jedoch mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit spezifischen Markern erhärtet werden. Zur Markierung der Bürstensäume des Darms könnte der monoklonale Antikörper 4E8 verwendet

werden. Es gibt keine Informationen darüber, um welche Struktur es sich bei dem Antigen handelt, das der Antikörper 4E8 erkennt (Crosnier et al., 2005). Zur Markierung der Bürstensäume der proximalen Nierentubuli könnte der monoklonale Antikörper 3G8 benutzt werden. Es gibt ebenfalls keine Informationen darüber, um welche Struktur es sich bei dem Antigen handelt, das der Antikörper 3G8 erkennt (Majumdar, 2000). Bis jetzt wurde nur gezeigt, dass die Antikörper 4E8 und 3G8 ihr jeweiliges Antigen im sich entwickelnden Zebrabärbling erkennen. Es ist daher fraglich, ob diese Antigene auch im adulten Zebrabärbling in den Bürstensäumen des Darms und der Niere lokalisiert sind. Somit ist es fraglich, ob mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung der Antikörpern 4E8 und 3G8 eine Anfärbung der Bürstensäume im adulten Zebrabärbling erzielt werden kann. Für einen Test der Antikörper 4E8 und 3G8 an adultem Zebrabärblingewebe und für mögliche anschließende Immunfluoreszenzdoppelfärbungen war in dieser Doktorarbeit keine Zeit mehr vorhanden. Zusätzlich zu dem Bürstensaum wurden mit den polyklonalen K-anti-NES Antikörpern vereinzelte Enterozyten-ähnliche Zellen im gesamten untersuchten Darmbereich sichtbar gemacht. Die Auflösung der Aufnahmen reichte nicht aus, um sagen zu können, welches Zellkompartiment angefärbt wurde (siehe Abbildung 32 C, D, E, H). Aufgrund der Struktur und der Funktion des Slc22a4 Transporters wird davon ausgegangen, dass sich dieser ausschließlich in der Zellmembran befindet (siehe A.2.1 und A.2.4.1). Stellt sich heraus, dass die Färbung in den Enterozyten-ähnlichen Zellen nicht ausschließlich in der Zellmembran zu finden ist, würde das darauf hindeuten, dass die K-anti-NES Antikörper im Darm nicht spezifisch sind. Sie erkennen dann vermutlich noch weitere Proteine. Um zu überprüfen, ob die K-anti-NES Antikörper im Darm noch weitere Proteine erkennen, kann ein Western-Blot an Darm-Lysaten mit anschließender Immundetektion mit K-anti-NES Antikörpern durchgeführt werden. Erkennen die K-anti-NES Antikörper außer dem Slc22a4 Transporter noch weitere Proteine, dann würden neben einer Bande bei 60 kDa, die auf den Slc22a4 Transporter zurückzuführen wäre, noch zusätzliche Banden auftreten. Dieser Versuch wurde jedoch aus vorher genannten Gründen hier nicht durchgeführt.

Die Tatsache, dass die durchgeführten indirekten Immunfluoreszenzfärbungen mit K-anti-NES Antikörpern nur in Organen, in denen *slc22a4*-mRNS und ET vorhanden sind, Fluoreszenzsignale lieferten, spricht dafür, dass die K-anti-NES Antikörper spezifisch sind (siehe D.2.2).

Ein weiterer Spezifitätstest für die K-anti-NES Antikörper wäre die Durchführung einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung an Zebrabärbling-Larven, in denen die Translation des Slc22a4 Transporters durch injizierte Morpholino-Oligonukleotide unterdrückt wird. Die

Morpholino-Oligonukleotide würden in der 5' UTR der *slc22a4*-mRNS binden und somit das Fortschreiten des ribosomalen Präinitiationskomplexes zum Translationsstartpunkt hin verhindern (Nasevicius und Ekker, 2000, Kamachi et al., 2008). Sind die hier hergestellten Antikörper spezifisch, dürfte es in diesen *slc22a4*-Knock-down-Larven zu keiner Anfärbung kommen. Dass das *slc22a4*-Gen zu frühen Entwicklungsstadien (ab 6 hpf bis mindestens 5 dpf) exprimiert wird, ist von *slc22a4*-mRNS *in situ* Hybridisierungen bekannt (Bach, 2009) (siehe A.3.2). Die Sequenz der 5' UTR, die für das Entwerfen geeigneter Morpholino-Oligonukleotide bekannt sein muss, wurde in dieser Doktorarbeit bereits ermittelt (siehe D.1.1, Abbildung 37 und Abbildung 38). Der Einsatz von Morpholino-Oligonukleotiden bedarf jedoch vieler zeitaufwendiger Spezifitäts-Überprüfungen. Daher konnte dieser Test hier nicht mehr durchgeführt werden (Summerton, 2007, Heasman, 2002, Ekker und Larson, 2001, Eisen und Smith, 2008). Eine Alternative zu einem *slc22a4*-Knock-down würde ein Knock-out des *slc22a4*-Gens bieten. In der AG von D. Gründemann befindet sich eine ET-defiziente Zebrabärblinglinie, die eine Virusinsertion im *slc22a4*-Gen trägt. Zebrabärblinge dieser Linie besitzen keine funktionsfähigen Slc22a4 Transporterproteine. Die Lage der Virusinsertion lässt zu, dass noch ein Teil der größten extrazellulären Schleife translatiert werden kann (Bach, 2009) (siehe A.3.4). Diese Linie konnte daher nicht für einen Spezifitätstest der polyklonalen Antikörper verwendet werden. Eine Zebrabärbling-Linie, die das *slc22a4*-Gen nicht besitzt, ist nicht vorhanden.

Ein Vergleich der Ergebnisse indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit den K-anti-NES Antikörpern mit den Ergebnissen indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper, der gegen einen anderen Abschnitt des Slc22a4 Transporters gerichtet ist, würde ebenfalls einen Spezifitätstest darstellen. Dieser zweite Antikörper müsste erst produziert werden. Würden sich die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen gleichen, dann erkennen beide Antikörper den Slc22a4 Transporter vermutlich spezifisch.

## **E.2.2 Lokalisation des Ergothionein-Transporters im adulten Zebrabärbling**

Bisher konnte die Verteilung von ET im Zebrabärbling nur direkt mittels LC-MS/MS-Messungen und indirekt über den Nachweis der *slc22a4*-mRNS mittels RT-PCR und quantitativer *Real-time*-PCR bezogen auf ganze Organe des Zebrabärblings bestimmt werden. So befindet sich ET vermutlich im Darm, in der Niere, im Auge, in der Haut, im Gehirn und in peripheren Blutzellen (Pfeiffer, 2013, Bach, 2009) (siehe D.2.2). Mit den hier produzierten polyklonalen K-anti-NES Antikörpern gegen den Slc22a4 Transporter kann nun zum ersten

Mal gezeigt werden, in welchen Zellen dieser Organe/Zellpopulationen sich ET befindet (siehe A.2.3 und D.2.2).

### ***E.2.2.1 Der Ergothionein-Transporter ist vermutlich für die ET-Aufnahme und die ET-Retention in allen Vertebraten essentiell***

Mittels quantitativer *Real-time*-PCR und indirekter Immunfluoreszenzfärbungen wurde gezeigt, dass der ET-Transporter in der Niere und im Darm des Menschen, des Schweins, der Ratte, des Hühnchens, der Maus und des Zebrafischs exprimiert ist (Nikodemus et al., 2011, Pfeiffer, 2013, Tamai et al., 2004, Sugiura et al., 2010, Gründemann et al., 2005) (siehe Abbildung 5). Es wird angenommen, dass der ET-Transporter dort in den Bürstensäumen lokalisiert ist. Nur so kann er nämlich ET im Darm aus der Nahrung aufnehmen und in den proximalen Nierentubuli aus dem Urin bergen (Nikodemus et al., 2011, Gründemann, 2012, Gründemann et al., 2005).

Der ET-Transporter wurde bis jetzt im Mensch und in der Maus im Bürstensaum des Dünndarms mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen (Sugiura et al., 2010). Sugiura und Kollegen konnten zeigen, dass *slc22a4*<sup>-/-</sup> Mäuse kein ET aufnehmen können. Der ET-Transporter ist somit vermutlich einzig für die ET-Aufnahme im Dünndarm der Maus verantwortlich (Sugiura et al., 2010). In dem Bürstensaum der proximalen Tubuli wurde der ET-Transporter bis jetzt mittels Immunfluoreszenzfärbung nur in der Maus lokalisiert (Tamai et al., 2004).

Mit dem hier produzierten polyklonalen Antikörper konnte nun auch im Zebrafisch, einem Vertreter einer weiteren Vertebratenklasse, ein ET-Transporter im Bürstensaum des Darms und der proximalen Nierentubuli lokalisiert werden (siehe D.2.2, Abbildung 32 und Abbildung 33). In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurde gezeigt, dass *slc22a4*<sup>zpk1Tg</sup> Zebrafische kein ET akkumulieren (siehe A.3.2). Somit kann vorgeschlagen werden, dass der hier lokalisierte Slc22a4 Transporter in den Bürstensäumen funktionsfähig ist und durch keine anderen Proteine ersetzt werden kann.

Die Tatsache, dass neben Säugetieren nun auch in einem Fisch ein funktionsfähiger ET-Transporter in den Bürstensäumen des Darms und der proximalen Tubuli nachgewiesen wurde, deutet daraufhin, dass der ET-Transporter für die ET-Aufnahme und die ET-Retention in allen Vertebraten essentiell ist.

ET wird von dem im Bürstensaum lokalisierten Slc22a4 Transporter in die Epithelzellen des Darms und der Nierentubuli transportiert, gelangt von dort in die Blutbahn und wird schließlich mit Hilfe des Slc22a4 Transporters von den Zellen, in denen es seine Funktion ausübt, aufgenommen (Gründemann, 2012).

Es ist denkbar, dass ET das Darmgewebe des Zebrafisches vor ROS (*Reactive Oxygen Species*)-induzierter Lipidperoxidation und vor Entzündungen schützt. Dass ET Darmgewebe vor Lipidperoxidation schützen kann, wurde 2008 von Sakrak und Kollegen in der Ratte gezeigt. Durch Abtrennung der Blutzufuhr des Darms der Ratte und anschließende Reperfusion (*Ischämie-Reperfusion* (IR)-Verletzung) konnten sie vermehrt oxidativen Stress im Darm erzeugen und so die Lipidperoxidation (gemessen am Marker MDA, Malondialdehyd) erhöhen. Wurden die Ratten vor der IR-Verletzung von ihnen mit ET gefüttert, konnte die Lipidperoxidation signifikant vermindert werden. Neben einer Senkung der Lipidperoxidation konnte von Sakrak und Kollegen auch eine verminderte Ausschüttung der proinflammatorischen Cytokine TNF (Tumornekrosefaktor)- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Interleukin-1) im Darm ermittelt werden (Sakrak et al., 2008). Kato und Kollegen schlagen vor, dass ET den Dünndarm der Maus vor Entzündungen schützen kann. So zeigten *slc22a4*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wt-Mäusen einen deutlichen Verlust der Struktur der Villi des Dünndarms, nachdem eine IR-Verletzung herbeigeführt worden war (Kato et al., 2010). Erste Untersuchungen des Darmgewebes von ET-defizienten *slc22a4*<sup>ipk1Tg</sup> Zebrafischen von M. Bach haben ergeben, dass es sich äußerlich nicht von dem Darmgewebe der Wt-Zebrafische unterscheidet (Bach, 2009). Vermutlich verläuft ein ET-Mangel im Zebrafisch phänotypisch still, bis der Zebrafisch einem Stress ausgesetzt wird, der einen Schutz durch ET erfordert (siehe A.1). Stressversuche am Zebrafisch wurden in einer zu dieser Arbeit parallel laufenden Doktorarbeit durchgeführt.

#### ***E.2.2.2 Die Retina ist ein Wirkungsort von ET***

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen mit den K-anti-NES Antikörpern konnte der Slc22a4 Transporter und somit ET in Zellen in der Schicht der Photorezeptoren und in Zellen in der Schicht der Horizontalzellen nachgewiesen werden (siehe A.2.3, D.2.2 und Abbildung 34). Es konnte nicht gesagt werden, welche Zellen in der Retina angefärbt waren. Zur Bestimmung der Zelltypen müssen Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit spezifischen Markern durchgeführt werden. Für diese Versuche war hier keine Zeit mehr vorhanden. Ebenfalls reichte die Zeit nicht mehr aus, um weitere Bereiche des Auges des Zebrafisches auf die Anwesenheit des Slc22a4 Transporters hin zu untersuchen.

Im Menschen wurde der ETTh indirekt mittels quantitativer *Real-time*-PCR ebenfalls in Retina-Gewebe nachgewiesen (Zhang et al., 2008). Mittels einer HPLC-Methode konnten Shires und Kollegen ET in der Retina des Rindes und des Schweines detektieren (Shires et al., 1997).

Als mögliche Funktion von ET in der Retina des Zebrafisches wäre der Schutz vor oxidativem Stress, der durch UV-Strahlung induziert wird, denkbar. Der Zebrafisch lebt in Gewässern in niedrigen Tiefen, in die UV-Strahlung noch vordringen kann. Ein UV-Schutz der Retina ist somit sinnvoll, vorallem vor dem Hintergrund, dass Zebrafische in Südostasien beheimatet sind, wo die Sonneneinstrahlung sehr hoch ist. Die Befunde, dass ET im Auge mehrerer Vertebraten akkumuliert wird, lassen vermuten, dass ET in allen Vertebraten einen Schutz der Retina vor UV-Strahlung bieten könnte. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass das Auge der nachtaktive Ratte im Vergleich zum Auge des tagaktiven Schweins nur eine sehr schwache Expression des ET-Transporters aufweist (Nikodemus et al., 2011) (siehe A.2.5).

Die UV-Strahlung wird in UVA (315-400 nm)-, UVB (280-315 nm)- und UVC (100-280 nm)-Strahlung unterteilt. Die UVC-Strahlung gelangt nicht auf die Erde, sondern wird von der Ozonschicht abgeblockt. Die UVA-Strahlung stellt mit 95 % den größten Anteil der UV-Strahlung dar, die die Erde erreicht. Die energiereichere UVB-Strahlung bewirkt eine direkte Schädigung von Makromolekülen wie z. B. DNS (Doppelstrangbrüche, Thymin-Dimere). Dahingegen besteht die schadhafte Wirkung der UVA-Strahlung durch die Bildung von ROS. Diese können verschiedene Makromoleküle wie DNS, Proteine und Lipide angreifen. Beim Menschen wirken die vorderen Augenabschnitte als UV-Filter. Daher erreichen etwa nur 2 % des UV-Lichts von 290-320 nm die Netzhaut. Bei ausreichender Exposition mit Licht dieser Wellenlängen können relevante Energiedosen für einen akuten Schaden der Retina, die aufgrund eines sehr hohen Gehalts an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sehr anfällig für Lipidperoxidation durch ROS sind, auftreten (Augustin et al. 2001).

Der Schutz vor UV-induzierten Schädigungen durch ET konnte *in vitro* von Markova und Kollegen an Kulturen von NHEK (*Normal Human Epidermal Keratinocytes*)-Zellen demonstriert werden. Werden NHEK-Zellen solarsimulierter (ss)UV-Strahlung ausgesetzt, kommt es zur Bildung von ROS und zur Entstehung von DNS-, Protein- und Lipid-Schädigungen. Wurden NHEK-Zellen von Markova und Kollegen jedoch vor der Bestrahlung mit ET vorbeladen, konnten der Gehalt an ROS und die Schädigungen an Lipiden, Proteinen und DNS reduziert werden (Markova et al., 2009). Dass ET die Nervenzellen der Retina vor oxidativen Schäden schützen kann, wurde von Moncaster und Kollegen an einem *in vivo* Rattenretina-Modell demonstriert. Hierzu wurde von ihnen der Glutamat-Agonist N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) in den Glaskörper von Ratten injiziert. Es kam zu einer Überstimulation der NMDA-Rezeptoren, die durch verstärkte Bildung von freien Radikalen zum Absterben der Neuronen in der Retina führte. Durch intraperitoneale Injektion von ET konnten die

Neuronen vor einer Degeneration geschützt werden (Moncaster et al., 2002, Lafoncazal et al., 1993). Eine erste Untersuchung von M. Bach an dem Retinagewebe von ET-defizienten *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrafärbungen hatte ergeben, dass sich dieses in seiner Struktur nicht von dem Retinagewebe der Wt-Zebrafärbungen unterscheidet (Bach, 2009) (siehe A.3.4). Vermutlich tritt ein ET-Mangel erst durch einen UV-Stress phänotypisch in Erscheinung. Stressversuche an *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrafärbungen wurden wie schon erwähnt in einer parallel laufenden Doktorarbeit durchgeführt.

### ***E.2.2.3 Gewebespezifische Epitopzugänglichkeit des Ergothionein-Transporters***

In der vor Kurzem angefertigten Doktorarbeit von C. Pfeiffer aus der AG von D. Gründemann konnte mittels LC-MS-Untersuchungen ein hoher Gehalt an ET in der Haut und im Gehirn bestimmt werden (Pfeiffer, 2013) (siehe A.3.3). Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen mit den hier produzierten polyklonalen K-anti-NES Antikörpern konnte der Slc22a4 Transporter jedoch dort, im Gegensatz zum Darm und der Niere, nicht nachgewiesen werden. Da auch *slc22a4*-mRNS in der Haut und im Gehirn detektiert wurde, ist es sehr unwahrscheinlich, dass der Transporter in diesen Geweben nur vorübergehend produziert wird (siehe A.3.3). Es wird vermutet, dass der Slc22a4 Transporter im Gehirn und in der Haut aufgrund der Proteinzusammensetzung der Gewebe anders als im Darm und in der Niere auf die Gewebefixierung mit 4 % PFA reagiert. Immunhistochemische Methoden sind häufig von der Tatsache beeinträchtigt, dass sich optimale Gewebefixierung und Erhaltung der Antigenität ausschließen (Berod et al., 1981). Bei PFA-Fixierungen kommt es zu intra- und intermolekularen Proteinvernetzungen, die die Proteinkonformation verändern und somit Antikörperbindestellen abschirmen (Fraenkelconrat et al., 1947, Fraenkelconrat und Olcott, 1948, Dapson, 1993). Durch enzymatischen Verdau und/oder Hitzebehandlung in bestimmten Puffern können die Epitope jedoch demaskiert werden (Antigen-Retrieval). Häufig verwendete Enzyme zur Wiederherstellung der Antigenität sind Pronase, Trypsin, Pepsin, Proteinase K und Chymotrypsin. Diese Proteasen bewirken eine hydrolytische Spaltung der Proteinquervernetzungen (D'Amico et al., 2009). Eine Hitzebehandlung wird meist bei 90-120 °C durchgeführt (Volkin, 1994). Es wird vermutet, dass Hitzezufuhr die durch die Fixierung hervorgerufene Veränderung der Proteinkonformation umkehrt und somit zu einer Renaturierung der Epitope führt (Volkin und Klibanov, 1989). Als Puffer haben sich hierbei Tris-HCl-, Phosphat-, Acetat-, Citrat- und Tris EDTA-Puffer bewährt, aber auch Kochsalzlösung findet Einsatz. Die Hitzezufuhr kann mittels Mikrowelle, Drucktopf oder im Wasserbad erfolgen. Das Finden einer optimalen Antigen-Retrieval-Methode kann sehr

langwierig sein. Es kann sein, dass nur eine bestimmte Kombination aus enzymatischem Verdau und Hitzezufuhr in einer bestimmten Pufferlösung zu einem Ergebnis führt (D'Amico et al., 2009). Aus Zeitgründen konnten hier keine Antigen-Retrieval-Methoden getestet werden. Obwohl in der Literatur angegeben wird, dass nach einer Fixierung mit Aceton und Ethanol Antigene verloren werden können, wurden hier indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an Aceton- und Ethanol-fixierten Gefrierschnitten der Haut und des Gehirns durchgeführt (D'Amico et al., 2009, Yamashita und Okada, 2005). Diese schlugen ebenfalls fehl (siehe D.2.2). Im Vergleich zu PFA bewirken Ethanol und Aceton keine Protein-Quervernetzungen, sondern führen zu Proteinpräzipitationen. In der Literatur ist angegeben, dass die meisten Antigen-Retrieval-Methoden nicht bei Aceton- und Ethanol-fixierten Geweben hilfreich sind (D'Amico et al., 2009). Es wäre daher in der Zukunft erfolgsversprechender indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an PFA-fixierten Gefrierschnitten, die zuvor geeigneten Antigen-Retrieval-Methoden unterzogen wurden, durchzuführen.

Neben dem Verlust der Antigenität durch Gewebefixierung mit 4 %igem PFA könnten posttranslationale Modifikationen oder das Anheften von Proteinen zur Abschirmung der Epitope in Haut und Gehirn führen. Angeheftete Proteine könnten durch die vorher aufgeführten Proteasen verdaut werden. Als posttranslationale Modifikation sind N-Glykosylierungen, die sich von denen des Slc22a4 Transporters in Darm und Niere unterscheiden, denkbar. Diese könnten mittels PNGase F-Verdau abgespalten werden (siehe A.2.1 und C.5.3). Gewebespezifische N-Glykosylierungen sind z.B. für das Oberflächenglykoprotein Thy-1 (*THYmocyte differentiation antigen 1*) der Ratte und den Chloridkanal ClC (*Chlorid-Channel*)-3 der Maus beschrieben (Parekh et al., 1987, Schmieder et al., 2001).

In der Haut von ET-defizienten *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrafischblingen wurde im Vergleich zu Wt-Zebrafischblingen ein signifikant höherer 8-Hydroxyguanin (8-OH-G)-Gehalt, der ein Indikator für DNS-Läsionen ist, nachgewiesen (Pfeiffer, 2013, Cheng et al., 1992) (siehe A.3.4). Als mögliche Funktion von ET in der Haut des Zebrafischblings wird in der AG von D. Gründemann daher der Schutz vor oxidativem Stress, der durch UV-Strahlung induziert wird und der zu DNS-Schäden führt, diskutiert. In humaner Haut wurde der ET-Transporter mittels Immunfluoreszenzfärbung an Gefrierschnitten in epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten nachgewiesen (Markova et al., 2009). Markova und Kollegen haben an Kulturen von NHEK (*Normal Human Epidermal Keratinocytes*)-Zellen, in denen ebenfalls mittels

Immunfluoreszenz der ETTh nachgewiesen wurde, demonstriert, dass ET vor Schädigungen durch UV-Strahlung schützen kann (Markova et al., 2009) (siehe ).

Im Menschen konnten mittels quantitativer *Real-time*-PCR *SLC22A4*-Transkripte im Gehirn im *Cerebellum*, in der *Substantia nigra*, im *Frontallappen*, im *Temporallappen* und in der *Pons* detektiert werden (Gründemann et al., 2005, Bach, 2009) (S. Golz; Bayer HealthCare) (siehe A.2.4.2). Mittels RT-PCR konnte die *ET-Transporter*-Expression im Gehirn der Ratte und im Gehirn der Maus nachgewiesen werden (Wu et al., 2000, Kobayashi et al., 2004). Später wurde von Nakamachi in der Maus aufgrund von immunhistochemischen Analysen angegeben, dass der ET-Transporter im Gehirn im Mittelhirn, im *Cortex*, im *Striatum*, im *Hypothalamus*, in der *Medulla* und in der *Pons* mit MAP2 (*Microtubuli-Associated Protein 2*), einem Marker-Protein für reife Neuronen, wenigstens teilweise koloalisiert ist. In der Publikation von Nakamachi et. al werden jedoch keine Untersuchungen zur Spezifität des verwendeten Antikörpers erwähnt (Nakamachi et al., 2012). Daher ist es fraglich, ob die von ihnen produzierten polyklonalen Antikörper gegen den C-Terminus des ET-Transporters diesen spezifisch erkannten. ET wurde neben dem Gehirn des Zebrabärblings in dem Gehirn der Maus, der Ratte, des Meerschweinchens, des Kaninchens, der Katze, des Schafes und des Rindes gefunden (Pfeiffer, 2013, Briggs, 1972, Crossland et al., 1966, Kaneko et al., 1980). Dies zeigt, dass ET die Bluthirnschranke überwinden kann. Von Yang und Kollegen wurde 2012 vorgeschlagen, dass in der Maus mit der Nahrung verabreichtes ET vor  $\beta$ -Amyloid (Alzheimer-Peptid)-induziertem Verlust des Gedächtnisses und der Lernfähigkeit schützen kann (Yang et al., 2012). Eine erste Untersuchung des Gehirns adulter ET-defizienter *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrabärblinge von M. Bach hatte ergeben, dass es sich äußerlich nicht von dem Gehirn eines Wt-Zebrabärblings unterscheidet (Bach, 2009). Vielleicht muss das Gehirn des Zebrabärblings einem Stress ausgesetzt werden, der erst einen Schutz durch ET notwendig macht, um einen augenscheinlichen Phänotyp zu erhalten. Stressversuche wurden in einer Doktorarbeit, die zu dieser parallel lief, durchgeführt.

#### ***E.2.2.4 ET übernimmt vermutlich in Blutzellen aller Vertebraten eine Schutzfunktion***

Ob bei einer geplanten indirekten Immunfluoreszenzfärbung eine Anfärbung in dem Gewebe erwartet werden konnte, wurde aus der An- bzw. der Abwesenheit von ET und/oder *slc22a4*-mRNS abgeschätzt (siehe D.2.2).

Für die meisten Organe waren der ET-Gehalt und die An- bzw. die Abwesenheit der *slc22a4*-mRNS bereits ermittelt worden (siehe A.3.3 und E.2.2). Hier wurden mittels RT-PCR

zusätzlich periphere Blutzellen als Ort von *slc22a4*-Expression identifiziert (siehe Abbildung 31). Eine Messung des ET-Gehalts steht noch aus.

Den Hauptbestandteil peripherer Blutzellen stellen in adulten Zebrabärblingen Erythrozyten mit ungefähr 99 % dar. Makrophagen und Monozyten sind mit < 1 % vertreten (Traver et al., 2003). Im Vergleich zu Erythrozyten des Menschen besitzen Erythrozyten des Zebrabärblings einen Zellkern. Zudem ist der Hauptbildungsort der Blutzellen nicht das Knochenmark, sondern die Kopfniere (Traver, Paw et al. 2003).

Mit Hilfe der hier produzierten K-anti-NES Antikörper kann nun untersucht werden, welche Blutzellen ET besitzen. Diese Versuche stehen noch aus.

Bisher wurde ET nur in den Erythrozyten von Säugetieren nachgewiesen (Gründemann, 2012) (siehe A.2.5). Vermutlich konnte nun auch durch den Nachweis der *slc22a4*-Transkripte in peripheren Blutzellen in dem Zebrabärbling, einem Vertreter einer weiteren Vertebratenklasse, ET in Erythrozyten lokalisiert werden. Dies deutet daraufhin, dass ET in den Erythrozyten aller Vertebraten angehäuft wird und in diesen die gleiche wichtige Funktion erfüllt. Gründemann und Kollegen vermuten, dass ET in Erythrozyten vor Schädigungen schützen kann, die auf Ferrylhämoglobin basieren. Es wird vermutet, dass ET Ferrylhämoglobin abfängt, indem es dieses reversibel bindet oder mit diesem reagiert (Gründemann et al., 2005) (siehe A.1). Ferrylhämoglobin ist ein hochreaktives Zwischenprodukt in der Autooxidation von oxygeniertem Hämoglobin zu Methämoglobin. Die Autooxidation kann z. B. durch Nitrit, Chlorat und Hydroxyaniline ausgelöst werden (Kosaka und Tyuma, 1987, Lissi, 1998). Methämoglobinämie verursacht Hämolyse, Hypoxie und Cyanose und kann zum Tod führen. Ferrylhämoglobin wird auch als Startpunkt für schädliche Radikalkettenreaktionen betrachtet (Everse und Hsia, 1997, Nagababu und Rifkind, 2000). In der Tat konnte gezeigt werden, dass über die Nahrung aufgenommenes ET in Kaninchen und Ratten eine durch Nitrit verursachte Methämoglobin-Bildung *in vivo* verhindert (Spicer et al., 1951, Mortensen, 1953, Gründemann et al., 2005). Erste Untersuchungen an den Erythrozyten der ET-defizienten *slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrabärblinge haben ergeben, dass sich diese äußerlich nicht von den Erythrozyten der Wt-Zebrabärblinge unterscheiden (Bach, 2009) (siehe A.3.4). Vermutlich tritt ein ET-Mangel in Erythrozyten erst in Erscheinung, wenn Zebrabärblinge einer starken Methämoglobin bildenden Substanz wie z. B. Nitrit ausgesetzt werden.

In Menschen sind der ETTh und ET zusätzlich in Monozyten und somit vermutlich auch in Makrophagen vorhanden, die aus Monozyten hervorgehen (Gründemann et al., 2005, Harlfinger, 2005) (siehe A.1 und A.2.4.2). Das Ziel von ET in Monozyten und Makrophagen

ist unklar. Vermutlich handelt es sich ebenfalls um ein Häm-Protein wie z. B. eine Peroxidase (siehe A.1). Es ist jedoch gesichert, dass ET eine bedeutsame Aufgabe in Monozyten und Makrophagen erfüllt, da Varianten des *SLC22A4* Transporters mit dem Auftreten chronischer Entzündungserkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten (Gründemann et al., 2005) (siehe A.2.6).

### E.3 Ausblick

Falls wie beim Menschen der Ergothionein-Transporter in Monozyten und Makrophagen vorhanden ist, könnten die Folgen eines Ergothionein-Mangels in diesen Immunzellen dann im Zebrafisch untersucht werden. Es besteht großes Interesse an der Aufklärung der ET-Funktion in Monozyten und Makrophagen, da Fallkontrollstudien Einzelnukleotidpolymorphismen im *SLC22A4*-Gen mit den chronischen Entzündungserkrankungen Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und rheumatoide Arthritis in Verbindung bringen konnten (siehe A.2.6). Bei allen diesen Krankheiten sind Makrophagen und Monozyten an den chronischen Entzündungsprozessen beteiligt.

Monozyten und Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Sie phagozytieren angreifende Mikroben, aktivieren das erworbene Immunsystem und versorgen Wunden mit antimikrobiellen Wirkstoffen (Mosser und Edwards, 2008).

Der Zebrafisch wird immer häufiger als Modellorganismus zur Untersuchung des angeborenen Immunsystems des Menschen eingesetzt. Ein Grund hierfür ist die relativ einfache Aktivierung von Monozyten und Makrophagen in lebenden Zebrafisch-Larven durch das Setzen von Wunden oder Einbringen von Mikroben wie z. B. Sporen von *Penicillium marneffei* (Renshaw und Trede, 2012, Ellett et al., 2011).

Die Auswirkungen eines ET-Mangels auf Makrophagen, die wie zuvor beschrieben aktiviert sind, können in *Tg(mpeg1:eGFP); slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Zebrafisch-Larven untersucht werden. Das *mpeg1:eGFP*-Transgen markiert alle Makrophagen mit cytosolischem eGFP (Ellett et al., 2011). Fische der *slc22a4<sup>ipk1T</sup>* Linie besitzen kein ET (siehe A.3.2). Aufgrund der optischen Klarheit der *Tg(mpeg1:eGFP); slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Larven kann das Verhalten der Makrophagen bei der Wundheilung und der Phagozytose über die Detektion der eGFP-Fluoreszenz *in vivo* beobachtet und mittels Zeitrafferaufnahme unter Verwendung eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops festgehalten werden. Eine derartige intravitale Bildgebung ist in anderen Vertebratenmodellen wie z. B. der Maus nur sehr schwer möglich.

Sollte der ET-Mangel – analog zum erblichen Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Favismus) - zunächst phänotypisch still verlaufen, können die *Tg(mpeg1:eGFP); slc22a4<sup>ipk1Tg</sup>* Larven zusätzlich in Lösungen von schädlichen Substanzen, die vielleicht erst einen Schutz des Organismus durch ET notwendig machen, inkubiert werden (siehe A.1 und A.3.1). Monozyten könnten ebenso untersucht werden. Eine Zebrafisch-Reporterlinie, die ausschließlich Monozyten mit einem Fluoreszenzprotein markiert, ist jedoch noch nicht vorhanden.

## F Literaturverzeichnis

- AUGUSTIN, A. J., DICK, H. B., WINKGEN, A. & SCHMIDT-ERFURTH, U. 2001. Ursachen und prävention oxidativer Schäden des Auges. *Der Ophthalmologe*, 98, 776-797
- AKANMU, D., CECCHINI, R., ARUOMA, O. I. & HALLIWELL, B. 1991. THE ANTIOXIDANT ACTION OF ERGOTHIONEINE. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288, 10-16.
- ALAYASH, A. I. 2004. Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3,152-159.
- AMSTERDAM, A. & HOPKINS, N. 2006. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends in Genetics*, 22, 473-478.
- AMSTERDAM, A., LIN, S. & HOPKINS, N. 1995. THE AEQUOREA-VICTORIA GREEN FLUORESCENT PROTEIN CAN BE USED AS A REPORTER IN LIVE ZEBRAFISH EMBRYOS. *Developmental Biology*, 171, 123-129.
- ARDUINI, A., EDDY, L. & HOCHSTEIN, P. 1990. THE REDUCTION OF FERRYL MYOGLOBIN BY ERGOTHIONEINE - A NOVEL FUNCTION FOR ERGOTHIONEINE. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 281, 41-43.
- ARDUINI, A., MANCINELLI, G., RADATTI, G. L., HOCHSTEIN, P. & CADENAS, E. 1992. POSSIBLE MECHANISM OF INHIBITION OF NITRITE-INDUCED OXIDATION OF OXYHEMOGLOBIN BY ERGOTHIONEINE AND URIC-ACID. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294, 398-402.
- ARUOMA, O. I., SPENCER, J. P. E. & MAHMOOD, N. 1999. Protection against oxidative damage and cell death by the natural antioxidant ergothioneine. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1043-1053.
- ARUOMA, O. I., WHITEMAN, M., ENGLAND, T. G. & HALLIWELL, B. 1997. Antioxidant action of ergothioneine: Assessment of its ability to scavenge peroxyntirite. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231, 389-391.
- ASKOU, A. L., POURNARAS, J.-A. C., PIHLMANN, M., SVALGAARD, J. D., ARSENIJEVIC, Y., KOSTIC, C., BEK, T., DAGNAES-HANSEN, F., MIKKELSEN, J. G., JENSEN, T. G. & CORYDON, T. J. 2012. Reduction of choroidal neovascularization in mice by adeno-associated virus-delivered anti-vascular endothelial growth factor short hairpin RNA. *Journal of Gene Medicine*, 14, 632-641.
- AUMAN, H. J., COLEMAN, H., RILEY, H. E., OLALE, F., TSAI, H.-J. & YELON, D. 2007. Functional modulation of cardiac form through regionally confined cell shape changes. *Plos Biology*, 5, 604-615.
- BACH. 2009. *Identifizierung des orthologen Ergothionein-Transporters des Zebrafischs, Etablierung und Phänotypisierung des Knockout-Modells*. PhD-thesis, Universität zu Köln.

- BACH, M., GRIGAT, S., PAWLIK, B., FORK, C., UTERMÖHLEN, O., PAL, S., BANCZYK, D., LAZAR, A., SCHOEMIG, E. & 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 Journal*, 274, 783-790.
- BACHER, P., GIERSIEFER, S., BACH, M., FORK, C., SCHOEMIG, E. & GRÜNDEMANN, D. 2009. Substrate discrimination by ergothioneine transporter SLC22A4 and carnitine transporter SLC22A5: Gain-of-function by interchange of selected amino acids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1788, 2594-2602.
- BALCIUNAS, D., WANGENSTEEN, K. J., WILBER, A., BELL, J., GEURTS, A., SIVASUBBU, S., WANG, X., HACKETT, P. B., LARGAESPADA, D. A., MCIVOR, R. S. & EKKER, S. C. 2006. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *Plos Genetics*, 2, 1715-1724.
- BARGER, G. & EWINS, A. J. 1913. The Identity of Trimethylhistidine (Histidine-Betaine) from Various Sources. *The Biochemical journal*, 7, 204-6.
- BARTON, A., EYRE, S., BOWES, J., HO, P., JOHN, S. & WORTHINGTON, J. 2005. Investigation of the SLC22A4 Gene (Associated With Rheumatoid Arthritis in a Japanese Population) in a United Kingdom Population of Rheumatoid Arthritis Patients. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 752-758.
- BEDELL, V. M., WANG, Y., CAMPBELL, J. M., POSHUSTA, T. L., STARKER, C. G., KRUG, R. G., II, TAN, W., PENHEITER, S. G., MA, A. C., LEUNG, A. Y. H., FAHRENKRUG, S. C., CARLSON, D. F., VOYTAS, D. F., CLARK, K. J., ESSNER, J. J. & EKKER, S. C. 2012. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 491, 114-U133.
- BEROD, A., HARTMAN, B. K. & PUJOL, J. F. 1981. IMPORTANCE OF FIXATION IN IMMUNOHISTOCHEMISTRY - USE OF FORMALDEHYDE SOLUTIONS AT VARIABLE PH FOR THE LOCALIZATION OF TYROSINE-HYDROXYLASE. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29, 844-850.
- BITINAITE, J., WAH, D. A., AGGARWAL, A. K. & SCHILDKRAUT, I. 1998. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10570-10575.
- BLACKBURN, P. R., CAMPBELL, J. M., CLARK, K. J. & EKKER, S. C. 2013. The CRISPR System-Keeping Zebrafish Gene Targeting Fresh. *Zebrafish*, 10, 116-118.
- BOCH, J. & BONAS, U. 2010. Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology*, Vol 48, 48, 419-436.
- BOCH, J., SCHOLZE, H., SCHORNACK, S., LANDGRAF, A., HAHN, S., KAY, S., LAHAYE, T., NICKSTADT, A. & BONAS, U. 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326, 1509-1512.
- BRATKE, K., LUTTMANN, W., KÜPPER, M. & MYRTEK, D. 2009. *Der Experimentator: Immunologie*, Springer.

- BRIGGS, I. 1972. ERGOTHIONEINE IN CENTRAL NERVOUS-SYSTEM. *Journal of Neurochemistry*, 19, 27-&.
- BUSSMANN, J. & SCHULTE-MERKER, S. 2011. Rapid BAC selection for tol2-mediated transgenesis in zebrafish. *Development*, 138, 4327-4332.
- CARBONNEL, F., JANTCHOU, P., MONNET, E. & COSNES, J. 2009. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, 33, S145-S157.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W. & PRASHER, D. C. 1994. GREEN FLUORESCENT PROTEIN AS A MARKER FOR GENE-EXPRESSION. *Science*, 263, 802-805.
- CHANG, N., SUN, C., GAO, L., ZHU, D., XU, X., ZHU, X., XIONG, J.-W. & XI, J. J. 2013. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Research*, 23, 465-472.
- CHAUDIERE, J. & FERRARI-ILIOU, R. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- CHEAH, I. K. & HALLIWELL, B. 2012. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1822, 784-793.
- CHEN, S., OIKONOMOU, G., CHIU, C. N., NILES, B. J., LIU, J., LEE, D. A., ANTOSHECHKIN, I. & PROBER, D. A. 2013. A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly. *Nucleic Acids Research*, 41, 2769-2778.
- CHENG, K., CAHILL, D. S., KASAI, H., NISHIMURA, S. & LOEB, L. A. 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 267, 166-172.
- COPELAND, N. G., JENKINS, N. A. & COURT, D. L. 2001. Recombineering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature Reviews Genetics*, 2, 769-779.
- CORMACK, B. P., VALDIVIA, R. H. & FALKOW, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 33-38.
- CROSNIER, C., VARGESSON, N., GSCHMEISSNER, S., ARIZA-MCNAUGHTON, L., MORRISON, A. & LEWIS, J. 2005. Delta-Notch signalling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine. *Development*, 132, 1093-1104.
- CROSSLAND, J., MITCHELL, J. F. & WOODRUFF, G. N. 1966. PRESENCE OF ERGOTHIONEINE IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND ITS PROBABLE IDENTITY WITH CEREBELLAR FACTOR. *Journal of Physiology-London*, 182, 427-&.
- D'AMICO, F., SKARMOUTSOU, E. & STIVALA, F. 2009. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 341, 1-18.

- DAPSON, R. W. 1993. FIXATION FOR THE 1990S - A REVIEW OF NEEDS AND ACCOMPLISHMENTS. *Biotechnic & Histochemistry*, 68, 75-82.
- DAVIDSON, A. E., BALCIUNAS, D., MOHN, D., SHAFFER, J., HERMANSON, S., SIVASUBBU, S., CLIFF, M. P., HACKETT, P. B. & EKKER, S. C. 2003. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Developmental Biology*, 263, 191-202.
- DISTEL, M. & KÖSTER, W. 2007. In vivo time-lapse imaging of zebrafish embryonic development. *CSH Protoc.*, 2.
- DONG, K. K., DAMAGHI, N., KIBITEL, J., CANNING, M. T., SMILES, K. A. & YAROSH, D. B. 2007. A comparison of the relative antioxidant potency of L-ergothioneine and idebenone. *Journal of cosmetic dermatology*, 6, 183-8.
- DUBOST, N. J., BEELMAN, R. B., PETERSON, D. & ROYSE, D. J. 2006. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8, 215-222.
- DUBOST, N. J., OU, B. & BEELMAN, R. B. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105, 727-735.
- EHLEN, H. W. A., SENGLER, G., KLATT, A. R., TALKE, A., MUELLER, S., PAULSSON, M. & WAGENER, R. 2009. Proteolytic Processing Causes Extensive Heterogeneity of Tissue Matrilin Forms. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 21545-21556.
- EISEN, J. S. & SMITH, J. C. 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135, 1735-1743.
- EKKER, S. C. & LARSON, J. D. 2001. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis*, 30, 89-93.
- EKKER, S. C., UNGAR, A. R., GREENSTEIN, P., VONKESLER, D. P., PORTER, J. A., MOON, R. T. & BEACHY, P. A. 1995. PATTERNING ACTIVITIES OF VERTEBRATE HEDGEHOG PROTEINS IN THE DEVELOPING EYE AND BRAIN. *Current Biology*, 5, 944-955.
- ELLETT, F., PASE, L., HAYMAN, J. W., ANDRIANOPOULOS, A. & LIESCHKE, G. J. 2011. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood*, 117, E49-E56.
- EMEL'YANOV, A., GAO, Y., NAQVI, N. I. & PARINOV, S. 2006. Trans-kingdom transposition of the maize Dissociation element. *Genetics*, 174, 1095-1104.
- ENGLER, H., TAUROG, A., NAKASHIMA, T. 1982. Mechanism of inactivation of thyroid peroxidase by thioreylene drugs. *Biochemical Pharmacology*, 31, 3801-3806
- EVERSE, J. & HSIA, N. 1997. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 1075-1099.

- FADOOL, J. M., HARTL, D. L. & DOWLING, J. E. 1998. Transposition of the mariner element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5182-5186.
- FOLKES, L. K. & CANDEIAS, P. L. 1997. Interpretation of the reactivity of peroxidase compounds I and II with phenols by the Marcus equation. *FEBS Letters*, 412, 305-308
- FORK, C. 2009. *Die Transporter SLC22A7 (OAT2) und SLC22A13: Substratsuche, Lokalisation, Entdeckung eines Orotsäure Transporters*. PhD-thesis, Universität zu Köln.
- FRAENKELCONRAT, H., BRANDON, B. A. & OLCOTT, H. S. 1947. THE REACTION OF FORMALDEHYDE WITH PROTEINS .4. PARTICIPATION OF INDOLE GROUPS - GRAMICIDIN. *Journal of Biological Chemistry*, 168, 99-118.
- FRAENKELCONRAT, H. & OLCOTT, H. S. 1948. REACTION OF FORMALDEHYDE WITH PROTEINS .6. CROSS-LINKING OF AMINO GROUPS WITH PHENOL, IMIDAZOLE, OR INDOLE GROUPS. *Journal of Biological Chemistry*, 174, 827-843.
- FRANZONI, F., COLOGNATO, R., GALETTA, F., LAURENZA, I., BARSOTTI, M., DI STEFANO, R., BOCCHETTI, R., REGOLI, F., CARPI, A., BALBARINI, A., MIGLIORE, L. & SANTORO, G. 2006. An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 453-457.
- GAILLARD, C. & STRAUSS, F. 1990. ETHANOL PRECIPITATION OF DNA WITH LINEAR POLYACRYLAMIDE AS CARRIER. *Nucleic Acids Research*, 18, 378-378.
- GARA, S. K., GRUMATI, P., SQUARZONI, S., SABATELLI, P., URCIUOLO, A., BONALDO, P., PAULSSON, M. & WAGENER, R. 2011. Differential and restricted expression of novel collagen VI chains in mouse. *Matrix Biology*, 30, 248-257.
- GARA, S. K., GRUMATI, P., URCIUOLO, A., BONALDO, P., KOBBE, B., KOCH, M., PAULSSON, M. & WAGENER, R. 2008. Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha 3 chain. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 10658-10670.
- GAZOULI, M., MANTZARIS, G., ARCHIMANDRITIS, A. J., NASIOULAS, G. & 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.
- GEBAUER, J. M., MUELLER, S., HANISCH, F.-G., PAULSSON, M. & WAGENER, R. 2008. O-glucosylation and O-fucosylation occur together in close proximity on the first epidermal growth factor repeat of AMACO (VWA2 protein). *Journal of Biological Chemistry*, 283, 17846-17854.
- GENGHOF, D. S. & VANDAMME, O. 1968. BIOSYNTHESIS OF ERGOTHIONEINE FROM ENDOGENOUS HERCYNINE IN MYCOBACTERIUM SMEGMATIS. *Journal of Bacteriology*, 95, 340-&.
- GRAW, J. & HENNIG, W. 2006. *Genetik*, Springer-Verlag.

- GRIGAT, S., HARLFINGER, S., PAL, S., STRIEBINGER, R., GOLZ, S., GEERTS, A., LAZAR, A., SCHOEMIG, E. & GRÜNDEMANN, D. 2007. Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations. *Biochemical Pharmacology*, 74, 309-316.
- GRÜNDEMANN, D. 2012. The ergothioneine transporter controls and indicates ergothioneine activity - A review. *Preventive Medicine*, 54, S71-S74.
- GRÜNDEMANN, D., HARLFINGER, S., GOLZ, S., GEERTS, A., LAZAR, A., BERKELS, R., JUNG, N., RUBBERT, A. & SCHOMIG, E. 2005. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 5256-5261.
- GRÜNDEMANN, D., LIEBICH, G., KIEFER, N., KOSTER, S., & SCHOMIG, E. 1999. Selective Substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Molecular Pharmacology*, 56, 1-10.
- GUERLEBECK, D., SZUREK, B. & BONAS, U. 2005. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant Journal*, 42, 175-187.
- HALL, C., FLORES, M., STORM, T., CROSIER, K. & CROSIER, P. 2007. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol*, 7, 42.
- HALL, C., FLORES, M. V., CHIEN, A., DAVIDSON, A., CROSIER, K. & CROSIER, P. 2009. Transgenic zebrafish reporter lines reveal conserved Toll-like receptor signaling potential in embryonic myeloid leukocytes and adult immune cell lineages. *Journal of Leukocyte Biology*, 85, 751-765.
- HAMILTON, F. 1822. An Account of the Fishes found in the river ganges and its branches.
- HANLON, D. P. 1971. INTERACTION OF ERGOTHIONEINE WITH METAL IONS AND METALLOENZYMES. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14.
- HARLFINGER, S. 2005. *Identifizierung des physiologischen Substrates und funktionelle Charakterisierung des organischen Kationentransporters OCTN1 mittels LC-MS/MS*. PhD-thesis, Universität zu Köln
- HARTMAN, P. E. 1990. ERGOTHIONEINE AS ANTIOXIDANT. *Methods in Enzymology*, 186.
- HEASMAN, J. 2002. Morpholino oligos: Making sense of antisense? *Developmental Biology*, 243, 209-214.
- HEATH, H. & WILDY, J. 1956. BIOSYNTHESIS OF ERGOTHIONEINE AND HISTIDINE BY CLAVICEPS-PURPUREA .1. INCORPORATION OF 2-C-14 ACETATE. *Biochemical Journal*, 64, 612-620.
- HEDIGER, M. A., CLÉMENÇON, B., BURRIER, R. E. & BRUFORD, E. A. 2013. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction. *Molecular Aspects of Medicine*, 34, 13.

- HEINECKE, J. W. 1999. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 133, 321-325.
- HERBST, H. & HÜBNER, J.-H. 2000. <http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie> [Online].
- HIEBER, V., DAI, X. H., FOREMAN, M. & GOLDMAN, D. 1998. Induction of alpha 1-tubulin gene expression during development and regeneration of the fish central nervous system. *Journal of Neurobiology*, 37, 429-440.
- HIGASHIJIMA, S., HOTTA, Y. & OKAMOTO, H. 2000. Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the Islet-1 promoter/enhancer. *Journal of Neuroscience*, 20, 206-218.
- HIGASHIJIMA, S., OKAMOTO, H., UENO, N., HOTTA, Y. & EGUCHI, G. 1997. High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Developmental Biology*, 192, 289-299.
- HOCKEMEYER, D., WANG, H., KIANI, S., LAI, C. S., GAO, Q., CASSADY, J. P., COST, G. J., ZHANG, L., SANTIAGO, Y., MILLER, J. C., ZEITLER, B., CHERONE, J. M., MENG, X., HINKLEY, S. J., REBAR, E. J., GREGORY, P. D., URNOV, F. D. & JAENISCH, R. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology*, 29, 731-734.
- HORVATH, G., SCHMID, N., FRAGOSO, M. A., SCHMID, A., CONNER, G. E., SALATHE, M. & WANNER, A. 2007. Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36, 53-60.
- HUANG, C. J., TU, C. T., HSIAO, C. D., HSIEH, F. J. & TSAI, H. J. 2003. Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish. *Developmental Dynamics*, 228, 30-40.
- HWANG, W. Y., FU, Y., REYON, D., MAEDER, M. L., TSAI, S. Q., SANDER, J. D., PETERSON, R. T., YEH, J. R. J. & JOUNG, J. K. 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31, 227-229.
- JACQUIER, A. & DUJON, B. 1985. AN INTRON-ENCODED PROTEIN IS ACTIVE IN A GENE CONVERSION PROCESS THAT SPREADS AN INTRON INTO A MITOCHONDRIAL GENE. *Cell*, 41, 383-394.
- JAO, L.-E., MADDISON, L., CHEN, W. & BURGESS, S. M. 2008. Using retroviruses as a mutagenesis tool to explore the zebrafish genome. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 7, 427-443.
- JESSEN, J. R., WILLETT, C. E. & LIN, S. 1999. Artificial chromosome transgenesis reveals long-distance negative regulation of rag1 in zebrafish. *Nature Genetics*, 23, 15-16.
- KALEV-ZYLINSKA, M. L., HORSFIELD, J. A., FLORES, M. V. C., POSTLETHWAIT, J. H., VITAS, M. R., BAAS, A. M., CROSIER, P. S. & CROSIER, K. E. 2002. Runx1 is

- required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development*, 129, 2015-2030.
- KAMACHI, Y., OKUDA, Y. & KONDOH, H. 2008. Quantitative assessment of the knockdown efficiency of morpholino antisense oligonucleotides in zebrafish embryos using a luciferase assay. *Genesis*, 46, 1-7.
- KANEKO, I., TAKEUCHI, Y., YAMAOKA, Y., TANAKA, Y., FUKUDA, T., FUKUMORI, Y., MAYUMI, T. & HAMA, T. 1980. QUANTITATIVE-DETERMINATION OF ERGOTHIONEINE IN PLASMA AND TISSUES BY TLC-DENSITOMETRY. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 3093-3097.
- KATO, Y., KUBO, Y., IWATA, D., KATO, S., SUDO, T., SUGIURA, T., KAGAYA, T., WAKAYAMA, T., HIRAYAMA, A., SUGIMOTO, M., SUGIHARA, K., KANEKO, S., SOGA, T., ASANO, M., TOMITA, M., MATSUI, T., WADA, M. & TSUJI, A. 2010. Gene Knockout and Metabolome Analysis of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1. *Pharmaceutical Research*, 27, 832-840.
- KAWAKAMI, K. 2000. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. *Genes and Genetic Systems*, 75, 363-363.
- KAWAKAMI, K. 2005. Transposon tools and methods in zebrafish. *Developmental Dynamics*, 234, 244-254.
- KAWANO, H., OTANI, M., TAKEYAMA, K., KAWAI, Y., MAYUMI, T. & HAMA, T. 1982. STUDIES ON ERGOTHIONEINE .6. DISTRIBUTION AND FLUCTUATIONS OF ERGOTHIONEINE IN RATS. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 1760-1765.
- KIM, Y. G., SHI, Y. G., BERG, J. M. & CHANDRASEGARAN, S. 1997. Site-specific cleavage of DNA-RNA hybrids by zinc finger FokI cleavage domain fusions. *Gene*, 203, 43-49.
- KIMMEL, C., BALLARD, W., KIMMEL, S., ULLMANN, B. & SCHILLING, T. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203, 253-310.
- KOBAYASHI, D., AIZAWA, S., MAEDA, T., TSUBOI, I., YABUUCHI, H., NEZU, J., TSUJI, A. & TAMAI, I. 2004. Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Experimental Hematology*, 32, 1156-1162.
- KOEPSSELL, H. 2013. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Molecular aspects of medicine*, 34, 413-35.
- KOGA, A., SUZUKI, M., INAGAKI, H., BESSHO, Y. & HORI, H. 1996. Transposable element in fish. *Nature*, 383, 30-30.
- KOHFELDT, E., MAURER, P., VANNAHME, C. & TIMPL, R. 1997. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *Febs Letters*, 414.

- KOSAKA, H. & TYUMA, I. 1987. MECHANISM OF AUTOCATALYTIC OXIDATION OF OXYHEMOGLOBIN BY NITRITE. *Environmental Health Perspectives*, 73, 147-151.
- KOSTER, R. W. & FRASER, S. E. 2001. Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Developmental Biology*, 233, 329-346.
- KWAN, K. M., FUJIMOTO, E., GRABHER, C., MANGUM, B. D., HARDY, M. E., CAMPBELL, D. S., PARANT, J. M., YOST, H. J., KANKI, J. P. & CHIEN, C.-B. 2007. The Tol2kit: A multisite Gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental Dynamics*, 236, 3088-3099.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R. F. 1982. A SIMPLE METHOD FOR DISPLAYING THE HYDROPATHIC CHARACTER OF A PROTEIN. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132.
- LAEMMLI, U. K. 1970. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. *Nature*, 227, 680-&.
- LAM, E. Y. N., CHAU, J. Y. M., KALEV-ZYLINSKA, M. L., FOUNTAINE, T. M., MEAD, R. S., HALL, C. J., CROSIER, P. S., CROSIER, K. E. & FLORES, M. V. 2009. Zebrafish runx1 promoter-EGFP transgenics mark discrete sites of definitive blood progenitors. *Blood*, 113, 1241-1249.
- LAMHONWAH, A. M. & TEIN, I. 2006. Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1315-1325.
- LANGENAU, D. M., FERRANDO, A. A., TRAVER, D., KUTOK, J. L., HEZEL, J. P. D., KANKI, J. P., ZON, L. I., LOOK, A. T. & TREDE, N. S. 2004. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 7369-7374.
- LAWSON, N. D. & WEINSTEIN, B. M. 2002. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, 248, 307-318.
- LEE, E. C., YU, D. G., DE VELASCO, J. M., TESSAROLLO, L., SWING, D. A., COURT, D. L., JENKINS, N. A. & COPELAND, N. G. 2001. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 73, 56-65.
- LI, T., HUANG, S., JIANG, W. Z., WRIGHT, D., SPALDING, M. H., WEEKS, D. P. & YANG, B. 2011. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*, 39, 359-372.
- LIESCHKE, G. J. & TREDE, N. S. 2009. Fish immunology. *Current Biology*, 19, R678-R682.
- LISSI, E. 1998. Autocatalytic oxidation of hemoglobin by nitrite: A possible mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1535-1536.
- LIU, J., LI, C., YU, Z., HUANG, P., WU, H., WEI, C., ZHU, N., SHEN, Y., CHEN, Y., ZHANG, B., DENG, W.-M. & JIAO, R. 2012. Efficient and Specific Modifications of

- the Drosophila Genome by Means of an Easy TALEN Strategy. *Journal of Genetics and Genomics*, 39, 209-215.
- LIU, P. T., JENKINS, N. A. & COPELAND, N. G. 2003. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Research*, 13, 476-484.
- LONG, Q. M., MENG, A. M., WANG, H., JESSEN, J. R., FARRELL, M. J. & LIN, S. 1997. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development*, 124, 4105-4111.
- LOVE, K. R., POLITANO, T. J., PANAGIOTOU, V., JIANG, B., STADHEIM, T. A. & LOVE, J. C. 2012. Systematic Single-Cell Analysis of *Pichia pastoris* Reveals Secretory Capacity Limits Productivity. *Plos One*, 7.
- LOYNES, C. A., MARTIN, J. S., ROBERTSON, A., TRUSHELL, D. M. I., INGHAM, P. W., WHYTE, M. K. B. & RENSHAW, S. A. 2010. Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*, 87, 203-212.
- MAHFOUZ, M. M., LI, L., SHAMIMUZZAMAN, M., WIBOWO, A., FANG, X. & ZHU, J.-K. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2623-2628.
- MAJUMDAR, A., LUN, K., BRAND, M. & DRUMMOND, I. A. 2000. Zebrafish no isthmus reveals a role for pax2.1 in tubule differentiation and patterning events in the pronephric primordia. *Development*, 127, 2089-2098.
- MALYSHEVA, O., PIERER, M., WAGNER, U. & BAERWALD, C. G. O. 2010. Stress and rheumatoid arthritis. *Zeitschrift Fur Rheumatologie*, 69, 539-543.
- MANN, T. & LEONE, E. 1953. STUDIES ON THE METABOLISM OF SEMEN .8. ERGOTHIONEINE AS A NORMAL CONSTITUENT OF BOAR SEMINAL PLASMA - PURIFICATION AND CRYSTALLIZATION - SITE OF FORMATION AND FUNCTION. *Biochemical Journal*, 53, 140-148.
- MARKOVA, N. G., KARAMAN-JURUKOVSKA, N., DONG, K. K., DAMAGHI, N., SMILES, K. A. & YAROSH, D. B. 2009. Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 1168-1176.
- MARTINEZ, A., VALDIVIA, A., PASCUAL-SALCEDO, D., Balsa, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, B., DE LA CONCHA, E. G. & URCELAY, E. 2006. Role of SLC22A4, SLC22A5, and RUNX1 genes in rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 33, 842-846.
- MCADAMS, T. A., MILLER, W. M. & PAPOUTSAKIS, E. T. 1998. pH is a potent modulator of erythroid differentiation. *British Journal of Haematology*, 103, 317-325.
- MEISSNER, P., PICK, H., KULANGARA, A., CHATELLARD, P., FRIEDRICH, K. & WURM, F. M. 2001. Transient gene expression: Recombinant protein production with

- suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 197-203.
- MELVILLE, D. B. 1959. ERGOTHIONEINE. *Vitamins and Hormones-Advances in Research and Applications*, 17, 155-204.
- MELVILLE, D. B., EICH, S. & LUDWIG, M. L. 1957. THE BIOSYNTHESIS OF ERGOTHIONEINE. *Journal of Biological Chemistry*, 224.
- MELVILLE, D. B., GENGHOF, D. S., INAMINE, E. & KOVALENKO, V. 1956. ERGOTHIONEINE IN MICROORGANISMS. *Journal of Biological Chemistry*, 223, 9-17.
- MELVILLE, D. B., OTKEN, C. C. & KOVALENKO, V. 1955. ON THE ORIGIN OF ANIMAL ERGOTHIONEINE. *Journal of Biological Chemistry*, 216, 325-331.
- MENKE, A. L., SPITSBERGEN, J. M., WOLTERBEEK, A. P. & WOUTERSEN, R. A. 2011. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39, 759-775.
- MILLER, J. C., TAN, S., QIAO, G., BARLOW, K. A., WANG, J., XIA, D. F., MENG, X., PASCHON, D. E., LEUNG, E., HINKLEY, S. J., DULAY, G. P., HUA, K. L., ANKOUDINOVA, I., COST, G. J., URNOV, F. D., ZHANG, H. S., HOLMES, M. C., ZHANG, L., GREGORY, P. D. & REBAR, E. J. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29, 143-U149.
- MORTENSEN, R. A. 1953. THE EFFECT OF DIET ON METHEMOGLOBIN LEVELS OF NITRITE-INJECTED RATS. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 46, 241-243.
- MOSCOU, M. J. & BOGDANOVA, A. J. 2009. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, 326, 1501-1501.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8, 958-969.
- MOTOHASHI, N., MORI, I., SUGIURA, Y. & TANAKA, H. 1974. METAL-COMPLEXES OF ERGOTHIONEINE. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 22.
- NACY, C.A., MEIEROVICS, A.I., BELOSEVIC, M. & GREEN, S.J. 1991. TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA: CENTRAL REGULATORY CYTOKINE IN THE INDUCTION OF MACROPHAGE ANTIMICROBIAL ACTIVITIES. *Pathobiology*, 59, 182-184.
- NAGABABU, E. & RIFKIND, J. M. 2000. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: Superoxide production and heme degradation. *Biochemistry*, 39, 12503-12511.
- NAKAMICHI, N., TAGUCHI, T., HOSOTANI, H., WAKAYAMA, T., SHIMIZU, T., SUGIURA, T., ISEKI, S. & KATO, Y. 2012. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1 in mouse brain neurons: Possible involvement in neuronal differentiation. *Neurochemistry International*, 61, 1121-1132.

- NASEVICIUS, A. & EKKER, S. C. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics*, 26, 216-220.
- NEACSU, C. D. 2012. *Untersuchung zur Funktion der Knorpelproteine Ucma und Matrilin-1 im Zebrafisch*. Universität zu Köln.
- NIKODEMUS, D., LAZIC, D., BACH, M., BAUER, T., PFEIFFER, C., WILTZER, L., LAIN, E., SCHOEMIG, E. & GRÜNDEMANN, D. 2011. PARAMOUNT LEVELS OF ERGOTHIONEINE TRANSPORTER SLC22A4 MRNA IN BOAR SEMINAL VESICLES AND CROSS-SPECIES ANALYSIS OF ERGOTHIONEINE AND GLUTATHIONE IN SEMINAL PLASMA. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62, 411-419.
- NILSSON, R., SCHULTZ, I. J., PIERCE, E. L., SOLTIS, K. A., NARANUNTARAT, A., WARD, D. M., BAUGHMAN, J. M., PARADKAR, P. N., KINGSLEY, P. D., CULOTTA, V. C., KAPLAN, J., PALIS, J., PAW, B. H. & MOOTHA, V. K. 2009. Discovery of Genes Essential for Heme Biosynthesis through Large-Scale Gene Expression Analysis. *Cell Metabolism*, 10, 119-130.
- OKABE, N. 2001. The pathogenesis of Crohn's disease. *Digestion*, 63 Suppl 1, 52-9.
- OKUMURA, N., TSUJI, K. & NAKAHATA, T. 1992. CHANGES IN CELL-SURFACE ANTIGEN EXPRESSIONS DURING PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF HUMAN ERYTHROID PROGENITORS. *Blood*, 80, 642-650.
- PAREKH, R. B., TSE, A. G. D., DWEK, R. A., WILLIAMS, A. F. & RADEMACHER, T. W. 1987. TISSUE-SPECIFIC N-GLYCOSYLATION, SITE-SPECIFIC OLIGOSACCHARIDE PATTERNS AND LENTIL LECTIN RECOGNITION OF RAT THY-1. *Embo Journal*, 6, 1233-1244.
- PELTEKOVA, V. D., WINTLE, R. F., RUBIN, L. A., AMOS, C. I., HUANG, Q. Q., GU, X. J., NEWMAN, B., VAN OENE, M., CESCO, D., GREENBERG, G., GRIFFITHS, A. M., ST GEORGE-HYSLOP, P. H. & SIMINOVITCH, K. A. 2004. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nature Genetics*, 36, 471-475.
- PELUSO, J. J., YUAN, A., LIU, X. & LODDE, V. 2013. Plasminogen Activator Inhibitor 1 RNA-Binding Protein Interacts with Progesterone Receptor Membrane Component 1 to Regulate Progesterone's Ability to Maintain the Viability of Spontaneously Immortalized Granulosa Cells and Rat Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, 88.
- PFEIFFER. 2013. *Investigation of the function of ergothioneine by knock-out of the ergothioneine transporter in zebrafish Danio rerio*. PhD-thesis, Düsseldorf.
- PFEIFFER, C., BAUER, T., SUREK, B., SCHOEMIG, E. & GRÜNDEMANN, D. 2011. Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine. *Food Chemistry*, 129, 1766-1769.
- REMBOLD, M., LAHIRI, K., FOULKES, N. S. & WITTBRODT, J. 2006. Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nature Protocols*, 1, 1133-1139.

- RENSHAW, S. A. & TREDE, N. S. 2012. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Disease Models & Mechanisms*, 5, 38-47.
- REYON, D., TSAI, S. Q., KHAYTER, C., FODEN, J. A., SANDER, J. D. & JOUNG, J. K. 2012. High-Throughput Gene Editing in Human Cells Enabled by Fast Ligation-Based Automatable Solid-Phase High-Throughput (FLASH) Assembly of TALENs. *Molecular Therapy*, 20, S122-S123.
- ROEMER, P., RECHT, S. & LAHAYE, T. 2009. A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 20526-20531.
- RUPP, R. A. W., SNIDER, L. & WEINTRAUB, H. 1994. XENOPUS-EMBRYOS REGULATE THE NUCLEAR-LOCALIZATION OF XMYOD. *Genes & Development*, 8, 1311-1323.
- RUSSELL, R. K., DRUMMOND, H. E., NIMMO, E. R., ANDERSON, N. H., NOBLE, C. L., WILSON, D. C., GILLETT, P. M., MCGROGAN, P., HASSAN, K., T WEAVER, L., BISSET, W. M., MAHDI, G. & SATSANGI, J. 2006. Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease. *Gut*, 55, 1114-1123.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. ENZYMATIC AMPLIFICATION OF BETA-GLOBIN GENOMIC SEQUENCES AND RESTRICTION SITE ANALYSIS FOR DIAGNOSIS OF SICKLE-CELL ANEMIA. *Science*, 230, 1350-1354.
- SANDER, J. D., CADE, L., KHAYTER, C., REYON, D., PETERSON, R. T., JOUNG, J. K. & YEH, J.-R. J. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology*, 29, 697-698.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.
- SCHMIDT, T. G. M., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *Journal of Molecular Biology*, 255, 753-766.
- SCHMIEDER, S., LINDENTHAL, S. & EHRENFELD, J. 2001. Tissue-specific N-glycosylation of the CIC-3 chloride channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 635-640.
- SHIN, J., PARK, H.-C., TOPCZEWSKA, J. M., MAWDSLEY, D. J. & APPEL, B. 2003. Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics. *Methods in Cell Science*, 25, 7-14.
- SHIRES, T. K., BRUMMEL, M. C., PULIDO, J. S. & STEGINK, L. D. 1997. Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 117, 117-120.

- SIUZDAK, G. 1994. THE EMERGENCE OF MASS-SPECTROMETRY IN BIOCHEMICAL-RESEARCH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 11290-11297.
- SOOD, R., CARRINGTON, B., BISHOP, K., JONES, M., RISSONE, A., CANDOTTI, F., CHANDRASEKHARAPPA, S. C. & LIU, P. 2013. Efficient Methods for Targeted Mutagenesis in Zebrafish Using Zinc-Finger Nucleases: Data from Targeting of Nine Genes Using CompoZr or CoDA ZFNs. *Plos One*, 8.
- SOROLDONI, D., HOGAN, B. M. & OATES, A. C. 2009. Simple and Efficient Transgenesis with Meganuclease Constructs in Zebrafish. *Zebrafish: Methods and Protocols*, 546, 117-130.
- SPICER, S. S., WOOLEY, J. G. & KESSLER, V. 1951. ERGOTHIONEINE DEPLETION IN RABBIT ERYTHROCYTES AND ITS EFFECT ON METHEMOGLOBIN FORMATION AND REVERSION. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 77, 418-420.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F. 1981. PRODUCTION OF CLONES OF HOMOZYGOUS DIPLOID ZEBRA FISH (BRACHYDANIO-RERIO). *Nature*, 291, 293-296.
- STUART, G. W., MCMURRAY, J. V. & WESTERFIELD, M. 1988. REPLICATION, INTEGRATION AND STABLE GERM-LINE TRANSMISSION OF FOREIGN SEQUENCES INJECTED INTO EARLY ZEBRAFISH EMBRYOS. *Development*, 103, 403-412.
- SUGIURA, T., KATO, S., SHIMIZU, T., WAKAYAMA, T., NAKAMICHI, N., KUBO, Y., IWATA, D., SUZUKI, K., SOGA, T., ASANO, M., ISEKI, S., TAMAI, I., TSUJI, A. & KATO, Y. 2010. Functional Expression of Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1/SLC22A4 in Mouse Small Intestine and Liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 38, 1665-1672.
- SUMMERTON, J. E. 2007. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: Impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7, 651-660.
- SUN, X.-D., JENG, L., BOLLIET, C., OLSEN, B. R. & SPECTOR, M. 2009. Non-viral endostatin plasmid transfection of mesenchymal stem cells via collagen scaffolds. *Biomaterials*, 30, 1222-1231.
- SUSTER, M. L., ABE, G., SCHOUW, A. & KAWAKAMI, K. 2011. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nature Protocols*, 6, 1998-2021.
- SUSTER, M. L., KIKUTA, H., URASAKI, A., ASAKAWA, K. & KAWAKAMI, K. 2009a. Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 561, 41-63.
- SUSTER, M. L., SUMIYAMA, K. & KAWAKAMI, K. 2009b. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *Bmc Genomics*, 10.

- TAMAI, I., NAKANISHI, T., KOBAYASHI, D., CHINA, K., KOSUGI, Y., NEZU, J.-I., SAI, Y. & TSUJI, A. 2004. Involvement of OCTN1 (SLC22A4) in pH-dependent transport of organic cations. *Molecular Pharmaceutics*, 1, 57-66.
- TAMAI, I., OHASHI, R., NEZU, J., SAI, Y., KOBAYASHI, D., OKU, A., SHIMANE, M. & TSUJI, A. 2000. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 40064-40072.
- TAMAI, I., OHASHI, R., NEZU, J., YABUUCHI, H., OKU, A., SHIMANE, M., SAI, Y. & TSUJI, A. 1998. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 20378-20382.
- TAMAI, I., YABUUCHI, H., NEZU, J., SAI, Y., OKU, A., SHIMANE, M. & TSUJI, A. 1997. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *Febs Letters*, 419, 107-111.
- TANRET, C. 1909. Sur une base nouvelle retiree du seigle ergote, l'ergothioneine. *Rend. Acad.*, 222-224.
- TESSON, L., USAL, C., MENORET, S., LEUNG, E., NILES, B. J., REMY, S., SANTIAGO, Y., VINCENT, A. I., MENG, X., ZHANG, L., GREGORY, P. D., ANEGON, I. & COST, G. J. 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature Biotechnology*, 29, 695-696.
- THOMAS, C. E., EHRHARDT, A. & KAY, M. A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4, 346-358.
- TOKUHIRO, S., YAMADA, R., CHANG, X. T., 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. & YAMAMOTO, K. 2003. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics*, 35, 341-348.
- TRAVER, D., HERBOMEL, P., PATTON, E. E., MURPHEY, R. D., YODER, J. A., LITMAN, G. W., CATIC, A., AMEMIYA, C. T., ZON, L. I. & TREDE, N. S. 2003. The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Advances in Immunology*, Vol 81, 81, 253-+.
- TURSUN, B., COCHELLA, L., CARRERA, I. & HOBERT, O. 2009. A Toolkit and Robust Pipeline for the Generation of Fosmid-Based Reporter Genes in *C. elegans*. *Plos One*, 4.
- URASAKI, A., MORVAN, G. & KAWAKAMI K. 2006. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-Sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics*, 174, 639-649
- VOLKIN, D. B. 1994. Minimizing the inactivation of proteins in solution. *Biopharm Conference Proceedings '94*, 127-127.
- VOLKIN, D. B. & KLIBANOV, A. M. 1989. MINIMIZING PROTEIN INACTIVATION. *Creighton, T. E. (Ed.). Practical Approach Series: Protein Function: a Practical*

- Approach. Xx+306p. Irl Press at Oxford University Press: New York, New York, USA; Oxford, England, Uk. Illus, 1-24.*
- WALLER, S., TREMELLING, M., BREDIN, F., GODFREY, L., HOWSON, J. & PARKES, M. 2006. Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut*, 55, 809-814.
- WANG, R., LI, Z., WANG, Y. & GUI, J.-F. 2011. An Apo-14 Promoter-Driven Transgenic Zebrafish That Marks Liver Organogenesis. *Plos One*, 6.
- WANG, Z., DU, J., LAM, S. H., MATHAVAN, S., MATSUDAIRA, P. & GONG, Z. 2010. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. *Bmc Genomics*, 11.
- WARMING, S., COSTANTINO, N., COURT, D. L., JENKINS, N. A. & COPELAND, N. G. 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using gaIK selection. *Nucleic Acids Research*, 33.
- WINTERBOURN, C.C., VISSERS, M.C., & KETTLE, A. J. 2000. Myeloperoxidase. *Current Opinion in Hematology*, 7, 53-58.
- WHO Working Group. 1989. GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE DEFICIENCY. *Bulletin of the World Health Organization*, 67, 601-611.
- WOOD, A. J., LO, T.-W., ZEITLER, B., PICKLE, C. S., RALSTON, E. J., LEE, A. H., AMORA, R., MILLER, J. C., LEUNG, E., MENG, X., ZHANG, L., REBAR, E. J., GREGORY, P. D., URNOV, F. D. & MEYER, B. J. 2011. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science*, 333, 307-307.
- WU, X., GEORGE, R. L., HUANG, W., WANG, H. P., CONWAY, S. J., LEIBACH, F. H. & GANAPATHY, V. 2000. Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1466, 315-327.
- YABUUCHI, H., TAMAI, I., NEZU, J. I., SAKAMOTO, K., OKU, A., SHIMANE, M., SAI, Y. & TSUJI, A. 1999. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289, 768-773.
- YAMASHITA, S. & OKADA, Y. 2005. Application of heat-induced antigen retrieval to aldehyde-fixed fresh frozen sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53, 1421-1432.
- YANG, N., LIN, H., WU, J., OU, H., CHAI, Y., TSENG, C., LIAO, J. & SONG, T. 2012. Ergothioneine protects against neuronal injury induced by  $\beta$ -amyloid in mice. *Food Chem Toxicol.*, 50, 3902-3911.
- YATES, J. L., WARREN, N., & SUGDEN, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 313, 812-815
- YODER, J. A., NIELSEN, M. E., AMEMIYA, C. T. & LITMAN, G. W. 2002. Zebrafish as an immunological model system. *Microbes and Infection*, 4, 1469-1478.

- YU, D. G., SAWITZKE, J. A., ELLIS, H. & COURT, D. L. 2003. Recombineering with overlapping single-stranded DNA oligonucleotides: Testing a recombination intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7207-7212.
- ZERUCHA, T., STUHMER, T., HATCH, G., PARK, B. K., LONG, Q. M., YU, G. Y., GAMBAROTTA, A., SCHULTZ, J. R., RUBENSTEIN, J. L. R. & EKKER, M. 2000. A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *Journal of Neuroscience*, 20, 709-721.
- ZHANG, T., XIANG, C. D., GALE, D., CARREIRO, S., WU, E. Y. & ZHANG, E. Y. 2008. Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: Implications for ocular drug disposition. *Drug Metabolism and Disposition*, 36, 1300-1307.
- ZHANG, Z. D. D., PACCANARO, A., FU, Y. T., WEISSMAN, S., WENG, Z. P., CHANG, J., SNYDER, M. & GERSTEIN, M. B. 2007. Statistical analysis of the genomic distribution and correlation of regulatory elements in the ENCODE regions. *Genome Research*, 17, 787-797.
- ZU, Y., TONG, X., WANG, Z., DA, L., RUOCHUAN, P., ZHE, L., YINGYING, H., ZHOU, L., PENG, H., QIAN, W., ZUOYAN, Z., BO, Z. & SHUO, L. 2013. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature methods*, 10, 329-31.

## G Abkürzungen

2x-Strep-Tag II	Doppel-Strep-Tag II
8-OH-G	8-Hydroxyguanin
<i>ITg</i>	<i>first transgenic line</i>
A	Adenin
A	Ampere
<b>A</b>	anterior
Ac	<i>Activator</i>
ad.	addiere
AG	Arbeitsgruppe
Amp.	Ampicillin
AS(s)	Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>Bichinonic Acid</i>
bp	Basenpaare
BM40SP	BM40-Signalpeptid
BPRC	BACPAC <i>Resources Center</i>
Bs	Bürstensaum
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Cas9	<i>CRISPR-associated nuclease 9</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNS	komplementäre DNS
Chl	<i>Chloramphenicolresistenzgen</i>
Chl.	Chloramphenicol
Chr.	Chromosom
CHORI	<i>Children's Hospital Oakland Research Institute</i>
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTTh	humaner Carnitin-Transporter
cDNS	komplementäre DNS
cmlc2	<i>cardiac myosin light chain</i>
CMV	<i>Cytomegalievirus</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DI	Durchlicht
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNSase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxyribonucleosidtriphosphat(e)
dpf	<i>days post fertilization</i>
DR	<i>Danio rerio</i>
dT	distaler Tubulus
Ds	<i>Dissociation</i>
E	Exon
EBNA	Epstein-Barr Nucleare Antigen
EBNA1	Epstein-Barr Nucleare Antigen 1
ECL	<i>enhanced Chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ET	Ergothionein
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ETT	Ergothionein-Transporter
ETTh	humaner Ergothionein-Transporter
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FLP	Flippase
Fok	<i>Flavobacterium okeanokoites</i>
FRT	<i>FLP-Recognition Target</i>
G	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Guanin
GCL	<i>Ganglion Cell Layer</i>
G.	Gewebeschnitt
GES	N-glykosylierte größte extrazelluläre Schleife des Slc22a4 Transporters mit C-terminalem 2x-Strep-Tag II
GSH	Glutathion
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H	Herz
h	Stunde(n)
h.	<i>homologer</i>
HABA	2-(4-Hydroxyazobenzol)-Benzoessäure
HC	<i>Horizontal Cells</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
hpf	<i>hours post fertilization</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunhistochemie

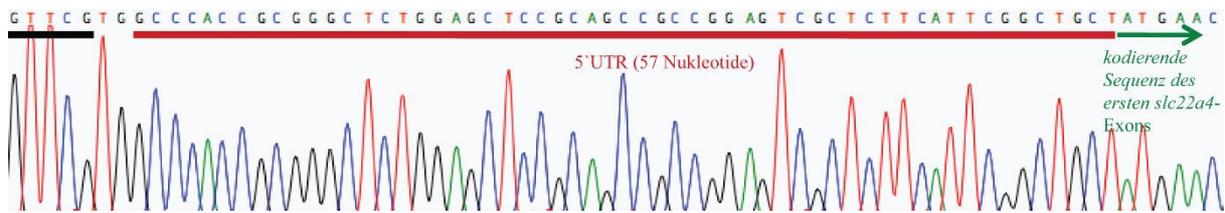
Inc.	<i>Incorporated</i>
INL	<i>Inner Neuclear Layer</i>
inj.	injiziert
ipk	Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln
IPL	<i>Inner Plexiform Layer</i>
iTol2Kan	invertierte Tol2-Erkennungsstellen, die ein Kanamycinresistenzgen flankieren
K	Kaninchen
Kan	<i>Kanamycinresistenzgen</i>
Kan.	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare (1000 bp)
kb	Kilobasen (1000bp)
LB	Luria-Bertani
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
lysC	<i>lysozyme C</i>
M	Meerschweinchen
<b>M</b>	median
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
Ma	Maus
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mpeg1	<i>macrophage expressed gene 1</i>
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
myd88	<i>myeloid differentiation response gene 88</i>
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
N	Asparagin
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NES	nicht-N-glykosylierte größte extrazelluläre Schleife des Slc22a4 Transporters
	mit C-terminalem 2x-Strep-Tag II
NFL	<i>Nerve Fiber Layer</i>
OAT	<i>Organic Anion Transporter</i>
OCT	<i>Organic Cation Transporter</i>
OCTN	<i>Novel Organic Cation Transporter</i>
OD	optische Dichte
ONL	<i>Outer Neuclear Layer</i>
<b>P</b>	posterior
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PBT	phosphatgepufferte Tween®20-haltige Salzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PK	Positivkontrolle
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PhRL	<i>Photoreceptor Layer</i>
Pi	Präimmunserum
PM	Protein-Marker
PNGase F	Protein N-Glykosidase F
pT	proximaler Tubulus
PTU	1-Phenyl-2-thioharnstoff
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNS	Ribonukleinsäure
RNSase A	Ribonuklease A
rNTP	Ribonucleosidtriphosphat
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPE	<i>Retinal Pigment Epithelium</i>
RT	reverse Transkriptase
RUNX1	Runt-related transcriptionfactor 1
runx1P1	<i>runt-related transcription factor 1-Promoter 1</i>
RVD	<i>Repeat Variable Diresidue</i>
Rwpr.	Rückwärtsprimer
S	Substratkonzentration
S.	Schwein
s	<i>simian</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
slc	solute carrier
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TALEN(s)	<i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease(s)</i>
TAL	<i>Transcription Activator-like</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBT	Tris-gepufferte Triton™ X-100-haltige Salzlösung
TE	Transporteffizienz
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tg	<i>Transgene</i>

---

TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tol2	Transposon <i>Oryzias latipes</i> 2
Tol2L	linkes Ende des <i>Tol2-Transposase</i> -Gens
Tol2R	rechtes Ende des <i>Tol2-Transposase</i> -Gens
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween <sup>®</sup> 20	Poly(oxyethylen) <sub>n</sub> -sorbitan-monolaurat
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/S	<i>Clearance</i>
Vwpr.	Vorwärtsprimer
v/v	Volumenprozent
WB	Western-Blot
w/v	Masse pro Volumen
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Z	Ziege
Ze.	Zellkultur
ZFN(s)	Zinkfinger Nuklease(n)





**Abbildung 37: Sequenzierungsdatensatz zur Bestimmung der 5' UTR der *slc22a4*-mRNA**

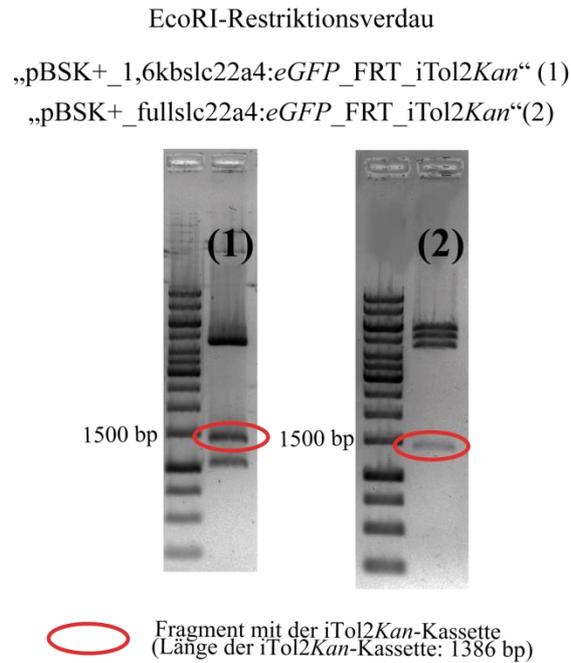
Die schwarze Linie markiert eine Sequenz, die auf den für die 5' RACE-PCR verwendeten phosphorylierten Primer zurückzuführen ist (siehe C.1.1.14). UTR, *Untranslated Region*

5'

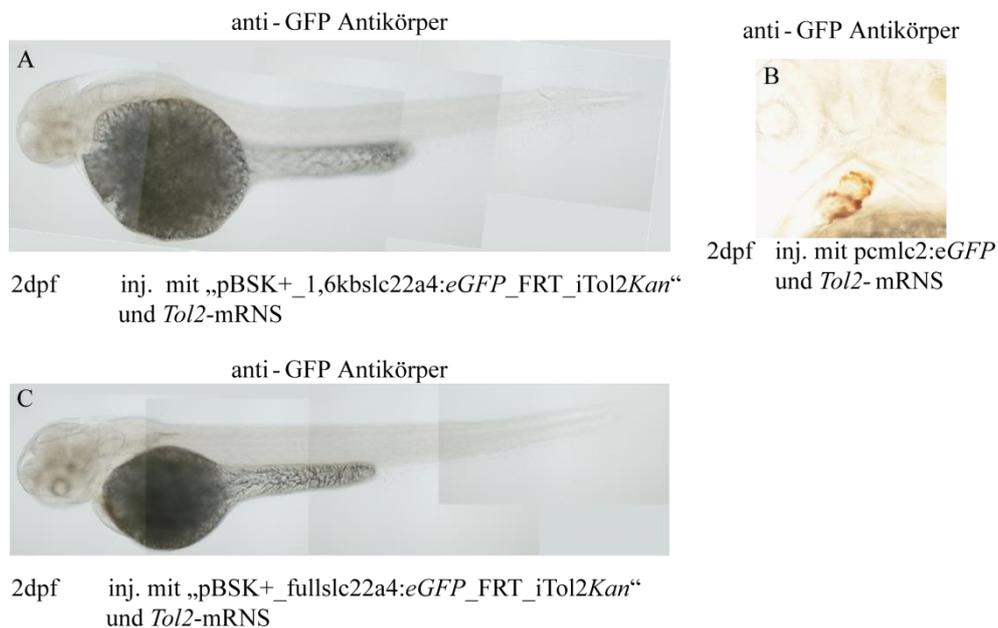
**GCCACCGCGGGCTCTGGAGCTCCGCGACCCGCGGAGTCGCTCTTCATTCGGCTGCT**ATGAACCT  
 CCAGGACTACGAGGAGCAAACCGGTTCTGGGCGCTTGGGGCCCGTTCCAGAAGACCGTCTTT  
 AGCTTGCTGTGTCTGAGCATCATCCCGAACGGATTACCGGTTTATCCATCGTGTTCCTGGGTGA  
 CACCCGGGCCATCACTGCCGGATCCCGAGACGCTGAACCTGACGGCGGGCTGGAGAAACGCG  
 TCTGTGCCGCGACCACAGCCGCACGGAGACCCGCGTGCCAGCAGGTGCTACAGACTCCGACTAG  
 ACCTGGTGAAGAATACTCGGACGGTGGTCTGTTGCCGGACTGGACGTC AATGTGTGGAGAT  
 CCCCCGGGAGGAGTGC GCGGACGGCTGGATCTACGATAAAGAGATTTACAGCTCCACCATAGTG  
 TCGGAGTGGGACTTGGTGTGTTCCGGATGACTGGAAATCTCCACTGACCTCCTCAATCTTCTTCTG  
 TGGTGTCTGACTGGTCTGTGATCTCCGGTCCAGTGTGCGACAGGTTTGGCAGGAAAATCGTGC  
 TGTTTCGTGACGATGGCGATTCAGACGCTGTTACCCGTCGTTCAAGTCTTCTCTCCATCTTGGCAG  
 ATTTTTGTTTGCTGTTTTTCATTGTTGGAATGGGTCAAATTTCTAACTATGTGGCAGCGTTTGTT  
 TAGGAATGGAGATTCTGAGCTCGTCTGTTCCGGACGTGTACTCCACTCTGGGTGTGTCTGTTC  
 TTCTCCATCGGCTACATGATTCTCCCGCTGGCCGCTTTCTTCTGCGGGACTGGAGATCTCTGATG  
 CTGGCCCTCACCATCCCCGGTCTTCTACATCCCCCTGTGGTGGTTTATCCCGAGTCTCCGCGC  
 TGGCTGCTGTCTCAGGGCCGGTCCAGGAGGCGGAAGCCATCATCAGAAAAGCAGCAAAGATA  
 AACAGAGTTACAGCTCCGGACGTCATCTTCCCTTGATGCAGTCTACAGAAGATGCCGGAGGCG  
 TGCAGAGCTTCAGTGTGTGTGAGCTGCTCAAATCCTCCAACATCCGCTATATGACCGGCCTGCTG  
 TGTCTGATCTGGATGGCGGCTCCATCGGGTACTGTGCTCTCTCCCTGAACACCTCCAGTCTGCA  
 CGGGAACATCTACCTGAACTGCCTGCTGTGTCAGCGGTGGTGGAGGTGCCGGCGCTGCTGATGGCG  
 TGGCTGATGCTCCGGCTGGCGCCCCGCCGACACTGCCTGGCTCCACATTGGCACTGGGAGGAC  
 TGGTGTGCTGCTCATACTGCTGATCCAGAGGATCAGAGTTCTGTTACCCTCGCTCTGGTGATG  
 CTGGGGAAGTTTGGTCTGTGCGCAGCGTCTCCATCATTTACCCTGTTACTGCTGAGCTTTACCCC  
 ACTGTGCTGAGGAACACCGCTCTAGGAGCCTGCTCAATGCTCCTCCAGAGTTGGCGGCATTTCTGC  
 TCCATACTCAACTACTTAGGAAGCTACCACAGATCTTTACCGTACATCCTCATCGGCGGTATAA  
 ATGTGCTTTCTGGTCTGCTCAGTTTTCTGCTTCCAGAGAGTCGAGGATCAGCTTTACCGAGACT  
 ATCGGTCAAATGCAGACCGTAAAGGGGTTAAAAAACACAGTCCACTCAACATTATCAGTGAAG  
 AGGCGCGTATCTGA 3'

**Abbildung 38: Sequenz der *slc22a4*-cDNS**

Dargestellt ist die 1698 bp lange cDNS-Sequenz des *slc22a4*-Gens. Die 57 Basen lange 5' UTR ist mit grün unterlegt. Das ATG ist rot unterstrichen. Die Exons sind alternierend in rot und blau abgebildet. Die Sequenz, die für die größte extrazelluläre Schleife kodiert, ist schwarz unterstrichen.



**Abbildung 39: EcoRI-Restriktionsverdau der Konstrukte „pBSK+\_1,6kbslc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“ (links) und „pBSK+\_fullslc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“ (rechts)**



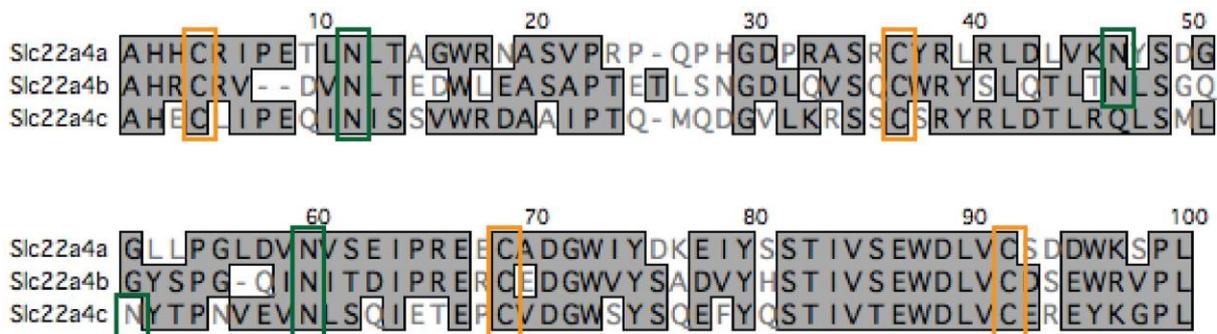
**Abbildung 40: eGFP-Detektion mittels DAB-Färbung in Zebrafärblingen injiziert mit *Tol2*-eGFP-Transposonvektoren und *Tol2*-mRNS**

In A und C sind laterale Ansichten von Zebrafärblingen 2 dpf, die mit den *Tol2*-eGFP-Transposonvektoren „pBSK+\_1,6kbslc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“ (200 ng/μl) (A) bzw. „pBSK+\_fullslc22a4:eGFP\_FRT iTol2Kan“ (200 ng/μl) (C) zusammen mit der *Tol2*-mRNS (50 ng/μl) injiziert wurden, dargestellt. Mittels DAB-Färbung konnte kein eGFP detektiert werden. In B ist eine ventrale Ansicht des Kopf-Herz-Bereichs eines Zebrafärblings 2 dpf dargestellt, der mit dem Vektor pcmlc2:eGFP (50 ng/μl) und mit der *Tol2*-mRNS (50 ng/μl) injiziert wurde.

MNLQDYEEQTAFLGAWGPFQKTVFSLCLSIIPNGFTGLSIVFLGDTPAHHCRIPETLN  
 LTAGWRNASVPRPQPHGDPRASRCYRLRLDLVKNYSDGGLLPGLDENVSEIPRECA  
 DGWIYDKEYSSTIVSEWDLVCSDDWKSPLTSSIFFCGVLTGSVISGPVSDRFGRKIVLF  
 VTMAIQTLFTVVQVFSPSWQIFCLLFFIVGMGQISNYVAAFVLGMEILSSSVRDVYSTL  
 GVCLFFSIGYMILPLAAFFLRDWRSLMLALTIPGFFIPLWWFIPESPRWLLSQGRVQE  
 AEAIRKAAKINRVTAPDVIFPLMQSTEDAGGVQSFSVCELLKSSNIRYMTGLLCLIWM  
 AVSIGYCALSLNTSSLHGNIYLNCLLSAVVEVPALLMAWMLRLAPRRHCLASTLALG  
 GLVLLILLIPEDQSSVTLALVMLGKFGLSAAFSIYPVTAELYPTVLRNTALGACSMSS  
 RVGGISAPYFNYLGSYHRSLPYILIGGINVLSGLLSFLLPESRGSALPETIGQMOTVKGL  
 KHSPLNIISEEARI

**Abbildung 41: AS-Sequenz des Slc22a4-Proteins**

Dargestellt ist die 546 ASs lange Sequenz des Slc22a4-Proteins (ca. 60 kDa). Die größte extrazelluläre Schleife (98 ASs; ca. 15 kDa) ist mit rot gefärbt. Die vier Cysteine, die die zwei möglichen Disulfidbrücken bilden, sind orange gefärbt. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind grün gefärbt.

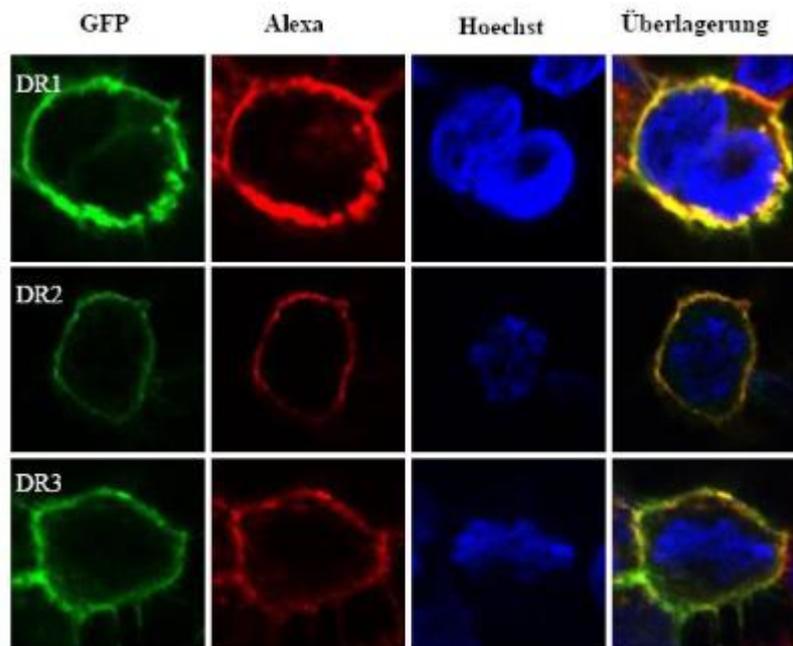


**Abbildung 42: Alignment der größten extrazellulären Schleifen der Transporter Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b**

Dargestellt ist ein AS-Sequenzvergleich der größten extrazellulären Schleifen von Slc22a4, Slc22a5a und Slc22a5b. Die drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind mit grünen Kästchen markiert. Die vier Cysteine, die die zwei möglichen Disulfidbrücken bilden sind mit orangen Kästchen eingefasst.

**Tabelle 22: AS-Identitäten der größten extrazellulären Schleifen von Slc22a5a und Slc22a5b mit Slc22a4 in %**

	Slc22a4
Slc22a5a	48
Slc22a5b	46



**Abbildung 43: Lokalisation der C-terminalen eGFP-Fusionen der Transporter *Slc22a4* (DR2), *Slc22a5a* (DR3) und *Slc22a5b* (DR1)**

Die Reihen zeigen Zelllinien, die mit den Konstrukten pEBTetD-DR1(*Slc22a5b*)eGFP, pEBTetD-DR2(*Slc22a4*)eGFP und pEBTetD-DR3(*Slc22a5b*)eGFP transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 250-facher Vergrößerung eines konfokalen Laserscanning-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.

(Die Abbildung und die Legende wurden aus der Doktorarbeit von M. Bach entnommen (Bach, 2009))

„Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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 der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Sigrun Korsching betreut worden.“

Köln, August 2013 \_\_\_\_\_  
Veronika Zapilko

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name: Veronika Zapilko

Geboren: 01.03.1980 in Deggendorf

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

## Beruflicher Werdegang

---

seit 05/2010	<b>wissenschaftliche Promotion:</b> <b>Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln</b> <b>AG Prof. Dr. D. Gründemann</b> Thema: „Identifizierung Ergothionein-haltiger Zellen im Zebrafisch <i>Danio rerio</i> “; Abschluss: 10/2013
01/2007 bis 09/2009	<b>Mitarbeiter in der Forschung:</b> <b>Institut für Neurowissenschaften, Karolinska Institut,</b> <b>Stockholm, Sweden</b> <b>AG Prof. Dr. C. F. Ibáñez</b>
10/2004 bis 04/2006	<b>Mitarbeiter in der Forschung:</b> „Neuroimaging Group“, <b>Institut für Entwicklungsgenetik,</b> <b>Helmholtz Zentrum München</b> <b>AG Prof. Dr. R. W. Köster</b>

## Ausbildung

---

11/2001 bis 09/2004	<b>Hauptdiplom in Biologie - Technische Universität München</b> <b>Gesamtnote:</b> 1,3 Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Fgf8-abhängigen Induktion des Kleinhirns im Zebrafisch“ (Note: 1,3) <b>Hauptfach:</b> Genetik (Note: 1,3), <b>Nebenfächer:</b> Biochemie (Note: 1,0), Botanik (Note: 1,7)
11/1999 bis 10/2001	<b>Vordiplom in Biologie - Universität Bayreuth</b> <b>Gesamtnote:</b> 1,3 <b>Prüfungsfächer:</b> Biologie (Note: 2,3), Genetik (Note: 1,0), Organische Chemie (Note: 1,0), Mathematik (Note: 1,3)
09/1990 bis 06/1999	<b>Abitur - Comenius-Gymnasium Deggendorf</b> <b>Gesamtnote:</b> 2,0