

**Untersuchung der Funktion von Ergothionein durch
Knockout des Ergothionein-Transporters des
Zebrafisches *Danio rerio***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Carolin Pfeiffer
aus Wermelskirchen

Düsseldorf, Oktober 2012

aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Peter Proksch
Korreferent: Prof. Dr. Dirk Gründemann

Tag der mündlichen Prüfung:

für meine Eltern, Oma Käte und Tobi

„Der Kluge häuft Wissen auf, der Weise sortiert es“
- Alberto Moravia -

Danksagung

Mein Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Peter Proksch für die Betreuung dieser Arbeit. Ebenso danke ich Prof. Dr. Dirk Gründemann für die Vergabe dieses Projektes.

Ich danke Dr. Tim Bauer, Simone Kalis und Bea Steinrücken für die technische Unterstützung während meiner Arbeit. Nicht vergessen seien die Bachelor, Master und Diplomanden und Kollegen, die meinen Weg begleiteten.

Besonderer Dank geht an die Zuhörer, Versther, Mitdiskutierer, Mitdenker und Mitlacher die man braucht um eine Doktorarbeit durchzuhalten: Dr. Markus Pietsch, Cora Fried, Miriam Sheikh, Margit Pohle und Doris Theisen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	ET-Chemie und Synthese	1
1.2	ET-Aufnahme und -Transport	2
1.3	Positive Eigenschaften – Physiologische Eigenschaften	3
1.4	Assoziation des ET/des ETT ^{-/-} mit pathologischen Prozessen	4
1.5	Danio rerio als Modelorganismus	5
1.6	Der ETT ^{-/-} -Zebrafisch	6
1.7	ET und Lipidperoxidation	7
1.8	Ziel der Doktorarbeit	8
2	Material und Methoden	
2.1	Material	
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte	10
2.1.2	Lösungen und Puffer	11
2.1.2.1	Algenkulturmedien	11
2.1.3	Enzyme	12
2.1.4	Oligonukleotide	12
2.1.5	Fischfutterherstellung	14
2.2	Zebrafisch Danio rerio	14
2.2.1	Zebrafischhaltung	14
2.2.2	Verpaarung	17
2.2.3	Euthanasie	17
2.2.4	Stressinduktion	17
2.2.4.1	Toxizitätstest	17
2.2.4.2	Aufbau zur Stressinduktion	19
2.2.5	Fütterungsversuch mit Spirulina	20
2.3	Molekularbiologische Methoden	
2.3.1	Finclip-Typisierung	20
2.3.1.1	Hot-Shot-DNA-Extraktion	21

2.3.1.2	Nested PCR	21
2.3.1.3	Amplifikationsprogramm nested PCR	23
2.3.1.4	Probenpräparation für Gelauftragung, Gelherstellung und Gelelektrophorese	23
2.3.2	Real-Time-PCR (quantitative RT-PCR)	25
2.3.2.1	RNA-Isolierung aus Fischorganen	25
2.3.2.2	Photometrische Gesamt-RNA-Bestimmung	26
2.3.2.3	RNA-Gel und Denaturierung	27
2.3.2.4	DNase-Behandlung und Phenol-Chloroform-Extraktion	27
2.3.2.5	Reverse Transkription zur cDNA-Synthese	29
2.3.2.6	RNase-A-Behandlung	30
2.3.2.7	Kontrolle der cDNA durch β -Aktin-Endpunkt-PCR	31
2.3.2.8	Durchführung der Real-Time-PCR (quantitative RT-PCR)	32
2.4	Präparative Methoden	
2.4.1	Sektion Zebrafisch	33
2.4.2	Aufschluss von Ganzfisch und Fischorganen	34
2.4.3	Aufschluss Nahrungsergänzungsmittel, Fischfutter, Pflanzen, Pilze, Flechten und Cyanobakterien für ET- und Herzynin-Bestimmung	36
2.5	Hochdruckflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	37
2.5.1	Kalibriergerade	37
2.5.2	Auswertung der LC-MS/MS-Analysen	39
2.5.2.1	Fullscans/Differenzabtönung	39
2.5.2.2	Analyse von Einzelverbindungen	40
2.6	Berechnungen und Statistik	42
3	Ergebnisse	
3.1	Finclip-Typisierung/ Schwanzflossenbiopsie	43
3.1.1	„Genotypisierung“ homozygoter Adultfische mittels ET Bestimmung des Schwanzflossensaums per LC-MS/MS	45

3.2	Optimierung der ET-Versorgung der Versuchsfische	46
3.2.1	ET-Gehalt in Anlagenfischen, Wildfängen und Fischen aus einem naturnahem Aquarium	46
3.2.2	ET in Cyanobakterien	47
3.2.3	ET-Gehalt in Cyanobakterien, Pilzen, Rot- Grünalgen sowie Fischfutter und Nahrungsergänzungsmitteln	49
3.2.3.1	ET-Gehalt Steigerung im Fisch durch Spirulinafütterung	51
3.2.4	ET- und Herzzyningehalt in verschiedenen Cyanobakterien, Rot- und Grünalgen	52
3.2.5	Gehalt der Verbindung Nr. 3 in verschiedenen Algen	53
3.2.6	ET-Gehalt in Flechten	54
3.3	ET-Verteilung in ausgewählten Organen normiert auf Gewicht	55
3.3.1	ET-Verteilung in verschiedenen Körperregionen der Zebrafischhaut	56
3.3.2	Quantitativer PCR-Nachweis des ETT ^{-/-} in Haut und in ausgewählten Referenzorganen adulter Zebrafische	57
3.4	Unterschiede in Indikatormolekülen zwischen WT und ETT ^{-/-} -Fischen unter Metallionenbelastung	61
3.4.1	4-Hydroxy-2-nonenal (HNE)	62
3.4.2	Malondialdehyd (MDA)	65
3.5	Molekulare Unterschiede in WT und ETT ^{-/-} -Zebrafischorganen ermittelt durch LC-MS/MS Differenzabtönung	66
3.5.1	Carnitin	68
3.5.2	Acetylcarnitin	69
3.5.3	4-Hydroxychinolin (4-HQ)	70
3.5.4	8-Hydroxiguanin	71
3.5.5	Anserin	72
3.5.6	Xanthin	73
3.5.7	Kynurenin	74
3.5.8	Weitere getestete Verbindungen	74
3.5.8.1	Histidin	75
3.5.8.2	Histamin	76
3.5.8.3	Carnosin	77

3.5.8.4 3-Methyl-L-Histidin	77
3.5.8.5 Kynuramin	79
3.5.8.6 γ -Butyrylbetain	80
3.5.8.7 β -Alanin	81
3.5.8.8 5-Aminolävulinsäure	81
3.5.8.9 Harnsäure	82
3.5.8.10 Taurin	83
3.5.8.11 Rivoflavin/ Vitamin B2	86
3.5.8.12 L-Dropa	86
3.5.8.13 Neopterin	87
3.5.8.14 Tryptophan	88
3.5.8.15 o-Tyrosin	89
3.5.8.16 Prostaglandin E2	90
4 Diskussion	
4.1 ET in Cyanobakterien – eine neue ET-Quelle	92
4.1.1 ET in Flechten	95
4.2 Organverteilung von ET im Zebrafisch Danio Rerio	95
4.2.1 Expressionsmuster des ETT ^{-/-} im Zebrafisch Danio Rerio	98
4.3 Unterschiede im Gehalt von Biomarkern für LPO zwischen WT und ETT ^{-/-} -Zebrafischen unter Metallionenbelastung	99
4.3.1 HNE	101
4.3.2 MDA	102
4.3.3 HNE- und MDA-Analyse (Probleme und Perspektiven)	102
4.5 Molekulare Unterschiede zwischen Organen von WT und ETT ^{-/-} -Zebrafischen analysiert durch LC-MS/MS-Differenzabtönung	103
4.5.1 Carnitin und Acetylcarnitin	106
4.5.2 8-Hydroxiguamin (8-OH-G)	107
4.5.3 4-Hydroxychinolin	108
4.5.4 Anserin, Xanthin und Kynorenin	109
4.5.5 Vor- und Nachteile der LC-MS/MS-Differenzabtönung zur Ermittlung molekularer Unterschiede in Zebrafischorganen	110

4.6	Weiter getestete Verbindungen	111
4.7	Mögliche physiologische Funktionen von ET	113
4.7.1	ET im Darm	113
4.7.2	ET im Blut	114
4.7.3	ET in der Niere	114
4.7.4	ET im Auge	114
4.7.5	ET im Hirn	115
4.7.6	ET in der Haut	115
4.8	Ausblick	116
5	Zusammenfassung	117
6	Abstract	119
7	Abkürzungsverzeichnis	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Strukturformel von Ergothionein	2
Abb. 2	Aquarium Pharmakologie	16
Abb. 3	Aufbau zur Stressinduktion	19
Abb. 4	Primerpositionierung	22
Abb. 5	Sektion Zebrafisch	33
Abb. 6	Genotypisierung	44
Abb. 7	ET-Gehalt Wildtyp vs. Knockout	45
Abb. 8	ET im Schwanzflosensaum	46
Abb. 9	ET-Gehalt-Vergleich Anlage, Wildfang, Naturaquarium	47
Abb. 10	Bewuchs im Naturaquarium	48
Abb. 11	Phormidium spec.	49
Abb. 12	ET-Gehalt in Fischfutter, Nahrungsergänzungsmitteln, Cyanobakterien und Pilz	50
Abb. 13	Fütterungsversuch	51
Abb. 14	Strukturformel von Herzynin	52
Abb. 15	ET-Synthesenachweis	53
Abb. 16	Strukturformel der "Substanz Nr. 3"	54
Abb. 17	ET-Gehalt in Flechten	55
Abb. 18	Organverteilung von ET im Zebrafisch	56
Abb. 19	ET in verschiedenen Bereichen der Zebrafischhaut	57
Abb. 20	Kontrolle RNA-Qualität	58
Abb. 21	Kontrolle cDNA	59
Abb. 22	Simultanie Kurvenanpassung	60
Abb. 23	ETT-Expressionsmuster	61
Abb. 24	Strukturformeln HNE, MDA und DNPH	62
Abb. 25	HNE-Gehalt bei Metallionenbelastung	63
Abb. 26	HNE-Gehalt bei Blei(II)acetatbelastung	64
Abb. 27	HNE-Gehalt in ungestressten Fischen	64
Abb. 28	MDA-Gehalt bei Metallionenbelastung	65
Abb. 29	Substanzen aus Differenzabtönung	68
Abb. 30	Carnitin-Gehalt	69

Abb. 31	Acetylcarnitin-Gehalt	70
Abb. 32	4-HQ-Gehalt	71
Abb. 33	8-OH-G-Gehalt	72
Abb. 34	Anserin-Gehalt	73
Abb. 35	Xanthin-Gehalt	73
Abb. 36	Kynurenin-Gehalt	74
Abb. 37	Strukturformeln I	75
Abb. 38	Histidin-Gehalt	76
Abb. 39	Histamin-Gehalt	76
Abb. 40	Carnosin-Gehalt	77
Abb. 41	3-Methyl-L-Histidin-Gehalt	78
Abb. 42	Strukturformeln II	79
Abb. 43	Kynuramin-Gehalt	80
Abb. 44	γ -Butyrylbetain-Gehalt	80
Abb. 45	β -Alanin-Gehalt	81
Abb. 46	AVA-Gehalt	82
Abb. 47	Harnsäure-Gehalt	83
Abb. 48	Taurin-Gehalt	84
Abb. 49	Strukturformeln III	85
Abb. 50	Riboflavin-Gehalt	86
Abb. 51	L-DOPA-Gehalt	87
Abb. 52	Neopterin-Gehalt	88
Abb. 53	Tryptophan-Gehalt	89
Abb. 54	o-Tyrosin-Gehalt	90
Abb. 55	Prostaglandin E2-Gehalt	91
Abb. 56	Differenzabtönung	104
Abb. 57	Entstehung von 8-OH-G	107

1 Einleitung

Eine Zelle ist im Laufe ihres Lebens vielen schädlichen Einflüssen ausgesetzt. Oxidativer Stress spielt bei der Bedrohung der intakten Zelle eine wichtige Rolle. Verantwortlich für diese Art von Stress sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) welche einerseits auf natürliche Weise als Abfallprodukt verschiedener Stoffwechselwege entstehen (z.B. in den Mitochondrien), aber auch durch äußere Einflüsse im Körper angereichert werden können (Umweltgifte, UV-Strahlung, Alkohol, Medikamente). Reichern sich ROS in überhöhten Mengen in einem Organismus an kommt es zu Zellschäden welche sowohl einzelne Organe als auch den gesamten Organismus schwer schädigen können. Es ist für Zellen essentiell sich vor diesen Gefahren zu schützen. Vom Prokaryoten bis zum Eukaryoten stehen den Zellen komplexe Abwehrmechanismen zum Schutz zur Verfügung. Diese umfassen enzymatische Systeme (Glutathionperoxidase, Superoxid-Dismutase, Katalase) [1-4], von der Zelle selbst synthetisierte Antioxidantien (z.B. Glutathion [5, 6]) und Verbindungen, die der Organismus z.B. durch die Nahrung aus der Umwelt aufnehmen muss, da er sie nicht selbst synthetisieren kann (Vitamine) [7]. Einige dieser Systeme, z. B. Glutathion, sind hoch konserviert und in einer Vielzahl von Spezies zu finden [8, 9].

Die Aufnahme von Antioxidantien aus der Nahrung bietet die Möglichkeit die Schutzbarriere der Zellen aktiv zu unterstützen. Die Erhaltung der Homöostase zwischen ROS und Antioxidantien spielt im Organismus eine essentielle Rolle im Erhalt der Gesundheit [10].

1.1 ET - Chemie und Synthese

Eine antioxidative Verbindung, welche sowohl der Mensch als auch Tiere mit ihrer Nahrung aufnehmen ist Ergothionein (ET). ET wurde 1909 von Tanret in Mutterkorn (*Claviceps purpureum*) entdeckt [11, 12]. Die Synthese von ET erfolgt in verschiedenen Pilzarten (*Aspergillus spec.*, *Alternaria spec.*, und *Penicillium spec.*) sowie einigen Mykobakterien. Die Funktion der Verbindung in den Produzenten konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass ET z.B. bei *Mycobacterium smegmatis* mit dem Thiolabwehrsystem assoziiert sein könnte [13].

ET ist das Betain des L-Histidins, welches an der 2-Position des Imidazolrings eine Mercaptogruppe trägt [14]. Die Synthese verläuft in Pilzen und Mykobakterien ausgehend von Histidin und Cystein (Donor des Schwefelatoms) über verschiedene Zwischenprodukte wie z. B. Herzynin hin zum Endprodukt dem ET. In den Produzenten kann sich dabei ET bis zu Konzentrationen von 2 mg/g Trockenmasse anreichern [15-19]. Eine Besonderheit des ET ist seine Thiol-Thion-Tautomerie, wobei bei physiologischem pH-Wert das Gleichgewicht zur sehr stabilen Thion-Form verschoben ist (Abb. 1). Dies verleiht ET eine besondere Stabilität und so einen Vorteil gegenüber anderen Thiolen wie z.B. Glutathion, welches bei physiologischem pH-Wert einer Autoxidation unterliegt.

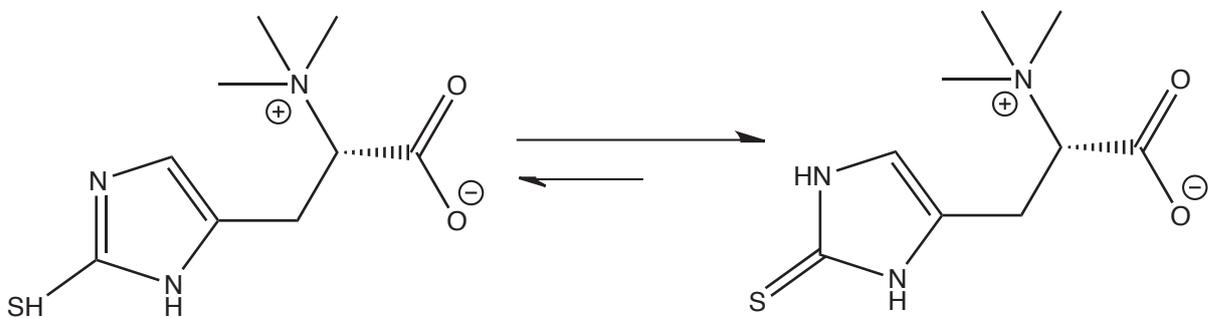


Abb. 1: Strukturformel von Ergothionein

Gezeigt sind die Thiol-Form (links) und die Thion-Form (rechts). Unter physiologischen Bedingungen liegt das Ergothionein in der stabileren Thion-Form vor.

1.2 ET-Aufnahme und -Transport

Höhere Organismen (ET-auxotroph) sind auf die Aufnahme von ET durch die Nahrung angewiesen [20]. Da ET nicht membrangängig ist [21] ist eine aktive Absorption durch einen spezifischen Ergothionien-Transporter (ETT, Gensymbol SLC22A4) notwendig [22, 23]. Die zelluläre Aufnahme ist signifikant Temperatur-, Na⁺- und pH-abhängig und sättigbar [24-26]. Kato et al. zeigten, dass das Silencing des Transporter-Gens in der Maus zu einer ET-Aufnahmeunfähigkeit führt [27].

Nach der Resorption aus dem Darm findet eine organspezifische Verteilung des ET statt. So findet man die höchsten ET-Werte im human Körper in Knochenmark, Erythrozyten

und Auge [28]. Zudem kann ET in neuronalem Gewebe nachgewiesen werden [29-33]. In Mäusen wurde gezeigt, dass ET in Geweben nur sehr langsam verstoffwechselt wird. Schon nach einmaliger oraler Gabe (330 µg/kg Körpergewicht) wurde ET bis zu 14 Tage nachgewiesen. Dieser Umstand ist wahrscheinlich auf die renale Rückresorption zurückzuführen [27]. Eine Ausscheidung über den Urin ist nicht nachweisbar [34, 35]. In einigen früheren Experimenten konnte nicht gezeigt werden, dass ein erzeugter ET-Mangel *in vivo* einen Effekt auslöst. In diesen Arbeiten wurde versucht in Ratten durch eine ET-freie Ernährung einen ET-Mangel zu erzeugen [15, 36]. Versuche von Kato et al. [27] an ETT-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen gaben Hinweise darauf, dass ET einen protektiven Effekt gegenüber intestinalen Schädigungen zeigt. Um dies zu demonstrieren, wurden die Tiere Ischämie-Reperfusionsexperimenten am Darm unterzogen. Das bedeutet, dass der Darm der anesthetisierten Mäuse für 60 min von der Blutversorgung abgeklemmt wird, um ein hohes Maß an oxidativem Stress zu erzeugen. Viele Versuche zur Funktion von ET wurden *in vitro* durchgeführt. So demonstrierten z. B. Song et al. [37] eine neuroprotektive Funktion des ET an primären kortikalen Neuronenzellen (PCN) und einer Phäochromocytomzelllinie (PC12) der Ratte. Dazu wurden die Zellen für 2 Stunden mit 0,1 bis 10 µM mit ET inkubiert und anschließend für weitere 72 Stunden mit Cisplatin. Cisplatin ist ein Antitumormedikament, das u. a. auch neurotoxisch wirkt. Akanmu et al. [38] arbeiteten mit Rattenlebermikrosomen. Sie zeigten eine Schutzfunktion von ET gegenüber der Peroxidation von Arachidonsäure.

Weitere Versuche, vor allem solche *in vivo*, sind notwendig um die Funktion von ET aufzuklären. Der molekulare Mechanismus von ET ist immer noch unklar.

Die Tatsache, dass ET vermehrt in Organen mit hohem oxidativem Stress akkumuliert wird [39, 15, 40], gibt Hinweise auf eine möglicherweise antioxidative Funktion *in vivo*.

1.3 Positive Eigenschaften – Physiologische Eigenschaften

In früheren Arbeiten zum ET konnten einige der vielseitigen positiven Eigenschaften dieses Moleküls dargestellt werden. Es ist in der Lage ROS und Nitritverbindungen, wie Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$), Hypochlorige Säure (HOCl), Peroxinitrit (ONOO^-) und Singulett-Sauerstoff abzufangen [41, 42, 28, 38, 43]. Außerdem ist ET fähig die

Metallionen-abhängige Entstehung von $\cdot\text{OH}$ aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Fenton-Reaktion) zu verhindern [38]. ET zeigt außerdem eine hohe Affinität zu Häm-Gruppen [44]. Dies kann auf eine Schutzfunktion von ET des Hämoglobins in Erythrozyten hindeuten. Weiterhin besitzt ET die Möglichkeit Metalle (z.B. Cu^{2+}) zu komplexieren und dadurch DNA und Proteine zu schützen [38, 45] oder sogar die Motilität von Spermien positiv zu beeinflussen [46]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass ET eine schützende Funktion gegen UV- [47-49] und γ -Strahlung [50-52] besitzt. ET ist ebenfalls in der Lage mit Komponenten der intrazellulären Abwehr zu interagieren [53, 54, 44, 55-57, 37]. Mit H_2O_2 und Superoxid (O_2^-) reagiert es hingegen nur träge [38].

1.4 Assoziation des ET/des ETT mit pathologischen Prozessen

Untersuchungen zur Funktion des ET zeigen eine Assoziation von Mutationen im humanen ETT (ETTh) mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatischer Arthritis [58, 59] und Morbus Crohn [60, 24, 61, 62]. Tokuhiro et al. [58] zeigten exemplarisch in einer Fallkontrollstudie in Japan, dass das Auftreten von intronischen SNPs (engl. single nucleotide polymorphism) in der RUNX1 (engl. runt-related transcription factor 1)-Bindungsregion vom SLC22A4 mit dem Auftreten von rheumatischer Arthritis assoziiert ist. Im Zusammenhang mit Morbus Crohn zeigten z.B. Peltekova et al. [60] das Auftreten einer Missense-Substitution im Bereich des SLC22A4-Gens. Leung et al. [61] fanden eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Morbus Crohn und dem Auftreten eines Polymorphismus im Genbereich des Transporters. Wie genau das Auftreten von SNPs und Polymorphismen im Genbereich des Transporters chronisch entzündliche Erkrankungen begünstigt ist noch nicht geklärt. Da für ET eine Assoziation mit verschiedenen immun- und zellregulativen Faktoren gezeigt wurde, könnte ein durch Mutation auftretende Fehlverteilung des ETs für Veränderungen in Immunreaktionen sorgen. So hat ET einen negativen Einfluss auf die Apoptose von kultivierten Blutzellen [25] und eine positive Auswirkung auf das Überleben von Immunzellen [24, 63]. Zudem wurde eine Assoziation zwischen ET und inflammatorischen Zytokinen [64-66] und dem Transkriptionsfaktor RUNX1 hergestellt [65].

Der Verlauf des Diabetes mellitus scheint ebenfalls durch ET beeinflusst zu werden [67-71, 66]. Salt et al. [67] zeigten einen leicht erhöhten ET-Spiegel im Blut von Diabetes-

Patienten. Versuche von Laurenza et al. [66] forcierten eine mögliche positive Auswirkung von ET auf vaskuläre Komplikationen im Rahmen des Diabetes mellitus. In einer C2C12-Zelllinie (Maus-Myoblasten) wurde durch die Zugabe plasmalfreier Fettsäuren (Palmitinsäure) Lipotoxizität erzeugt. Zellen die vor dem Versuch 24 Stunden mit 500 bzw. 1000 μM ET inkubiert wurden, zeigten eine verminderte Sterblichkeit.

Es wurden weitere positive Wirkungen von ET auf verschiedene Erkrankungen gezeigt. Der durch ET vermittelte Schutz von neuronalem Gewebe gegenüber degenerativen Einflüssen wurde *in vitro* und *in vivo* [72, 37] demonstriert. In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen wurden ebenfalls positive Effekte des ET gezeigt [44, 73-75]. So fanden Arduini et al. [44] in IR-Versuchen am Rattenherz, dass ein Zusatz von 100 μM ET im Perfusionspuffer myokardialen Schäden entgegenwirkt. Weiterhin wurde ein erniedrigter ET-Gehalt in Patienten mit Katarakt gemessen [76, 77]. Dies impliziert eine mögliche Schutzfunktion des ET gegenüber Katarakt. Nishigori et al. [78] zeigten am Model des Glucokortikoid-induzierten Kataraktes in Hühnerembryonen, dass eine Behandlung mit ET den Katarakt abmildern kann.

1.5 *Danio rerio* als Modelorganismus

Bereits 1934 wurden die ersten Versuche mit dem Zebrafisch *Danio rerio* dokumentiert [79]. Die eigentliche Einführung des Modelorganismus wird aber Georg Streisinger in den 1960er Jahren zugeschrieben [80, 81]. Attribute wie die preisgünstige, platzsparende Haltung und die kurze Generationszeit der Tiere machen den Zebrafisch als Model attraktiv. Die Ähnlichkeit zwischen Human- und Zebrafischgenen ermöglicht eine gute Übertragbarkeit von Testergebnissen am Zebrafisch auf den Menschen [82]. Für die vorliegende Arbeit eignete sich das Fischmodel unter anderem, da Gewebe wie das Auge, von ihrer Entwicklung und ihrem histologischen Aufbau gut vom Zebrafisch auf Menschen übertragbar sind [83]. Die gute Verwendbarkeit des Zebrafisches zur Erforschung humaner Krankheiten wurde von Lieschke & Curie (2007) ausführlich dargestellt [84]. Zudem wurde in zahlreichen Arbeiten gezeigt, dass einige Medikamente Verbindungen sowohl im Menschen als auch im Fischmodel pharmakologisch wirksam sind. Hierzu zählen eine Reihe von Steroiden,

Statinen und herzwirksamen Verbindungen [85-90].

1.6 Der ETT^{-/-}-Zebrafisch

Für diese Arbeit stand ein Zebrafisch-Knockout-Modell zur Verfügung welchem der ETT nicht mehr exprimiert wird. Der Knockout-Fisch wurde aus einer Insertions-Bibliothek (ZeneMark®-Library, Znomics, Portland, OR, USA) ausgewählt. Der Transporter wurde mittels einer Virusinsertion im Exon 1 ausgeschaltet [91]. Aus der Insertion resultiert ein Stoppcodon, welches den offenen Leserahmen des ETT-Gens unterbricht ([92], Abb. 28). Um sicherzugehen, dass die Virusinsertion im Fisch, den zum ETTh orthologen ETTzf betrifft, wurden vor Auswahl der Mutante Voruntersuchungen von Dr. Markus Bach durchgeführt [92]. Da durch Untersuchungen hochkonservierter HOX-Cluster (Homöobox) gezeigt wurde, dass Knochenfische (*Teleostei*), wie der Zebraquarienfisch *Danio rerio*, mehr Genduplikate aufweisen als Säugetiere [93], musste geklärt werden, ob eventuell mehrere Kopien des ETTzf-Gens im Genom des Zebrafisches vorhanden sind. Innerhalb der Untersuchungen von Markus Bach konnte aus 3 möglichen Kandidatengenen durch funktionelle Analyse sichergestellt werden, dass nur ein homologer ETT im Zebrafisch existiert. Eine nähere physiologische Charakterisierung (Substratspezifität, Transporteffizienz und Natriumabhängigkeit) des ETTzf wurde von Dr. Markus Bach durch heterologe Expression des ETTzf in HEK-Zellen vorgenommen. Eine Virusinsertion in der entsprechenden Gensequenz führt also sicher zum Funktionsverlust des ETT. Eine ET-Aufnahme ist dem Fisch definitiv nicht mehr möglich ([92], Abb. 31). Dies wurde ebenfalls im Rahmen der Arbeit von Dr. Markus Bach durch ET-Gehalts-Bestimmung bewiesen. In früheren Zeiten wurden Versuche unternommen, in Tieren einen ET-Mangel durch ET-freie Fütterung zu erzeugen [94, 36]. Da einmal aufgenommenes ET, aber scheinbar nicht mehr vollständig verloren geht [36], sondern auf einem basalen Level verbleibt, sind Versuche die auf so einem erzeugten Mangel basieren, eher kritisch zu betrachten. Nur ein Knockout des Transporters garantiert eine absolute ET-Freiheit und ist damit eine solide Basis für vergleichende Untersuchungen. Erste Untersuchungen zum Phänotyp des ETT^{-/-}-Fisches wurden bereits von Dr. Markus Bach durchgeführt [92]. Hierbei wurden ET-reiche Gewebe von Adultfischen durch mikroskopische Untersuchungen histologisch untersucht. Es wurden dabei keine Unterschiede zwischen ETT^{-/-}- und WT-Fischen festgestellt. Ebenso wurde durch RT-

PCR die Lokalisation des ETT im Zebrafisch aufgezeigt ([92], Abb 22). Unter den ausgewählten Geweben (Leber, Herz, Gehirn, Niere, Auge, Muskel, Kiemen, Darm, Milz) zeigten besonders Gehirn, Niere und Darm eine starke Expression des Transporters. In den Augen war eine schwache, in den übrigen Organen keine Expression zu finden. Diese Ergebnisse wurden durch In-situ-Hybridisierungen an Zebrafisch-Embryonen gestützt. Die Signale waren nahezu deckungsgleich mit den Resultaten aus der RT-PCR. In den in situ Hybridisierungen trat zusätzlich ein Signal in den Kiemen auf, dass nicht durch die RT-PCR bestätigt werden konnte. Bei einer darauffolgenden ET-Gehaltsbestimmung der Organe mit Hilfe der LC-MS/MS (normiert auf Prolin) ([92], Abb. 23) stellten sich besonders der Darm, die Augen, das Gehirn und die Niere als ET-reich dar. Durch Zufüttern von ET-haltiger Nahrung (ET-inkubierten Zebrafischeier) wurde eine zusätzliche Steigerung des ET-Gehaltes in den WT-Fischen erzielt (Bach [92], Abb. 27). Zur weiteren Phänotypisierung folgten bei Dr. Markus Bach mikroskopische Untersuchungen der Augenlinsen ([92], Abb. 36), sowie histologische Untersuchungen an Gewebsschnitten der Augen von adulten Tieren ([92], Abb. 37). Hier konnte kein Unterschied zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen gezeigt werden. Zusätzliche Bestrahlungsversuche der Augen mit UV-A- und UV-B-Strahlung ([92], Abb. 41 und 42), zur Erzeugung eines Katarakt durch erhöhten oxidativen Stress zeigten keine Unterschiede in der Linsentrübung zwischen WT- und ET^{-/-}-Fischen auf. Zudem wurden histologische Untersuchungen an Gewebsschnitten von Niere, Gehirn, Darm und Kiemen durchgeführt ([92], Abb. 38). Es wurden ebenfalls keine histologischen Unterschiede gefunden. Mikroskopische Untersuchungen zu frei zirkulierenden Blutzellen, die an Blutaussstrichen durchgeführt wurden, zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Zebrafischlinien ([92], Abb. 40).

Trotz detaillierter Analysen, vor allem histologischer Natur, konnte von Dr. Markus Bach kein Unterschied zwischen den WT- und ETT^{-/-}-Fischen aufgezeigt werden.

1.7 ET und Lipidperoxidation

Die Literatur zur Auswirkung von Ergothioneine auf die Lipidperoxidation (LPO) liefert widersprüchliche Ergebnisse [49]. Während Akanmu et al. 1990 [38] bei Versuchen an Rattenlebermikrosomen keinen Effekt durch ET fanden, zeigten Kawano et al. 1983 [54] bei Versuchen zur LPO an Mäuseleber einen inhibitorischen Effekt durch ET auf. Die bei

den Versuchen verwendeten ET-Konzentrationen unterschieden sich hierbei stark voneinander. Während Akanmu et al. Konzentrationen von weniger als 3 mM verwendeten, wurden bei Kawano et al. Konzentrationen über 10 mM eingesetzt [54, 38]. Die sehr hohe ET-Konzentration in der Arbeit von Kawano et al. wird bereits bei Akanmu et al. als unphysiologisch kritisiert [38]. Die bisher gemessenen physiologischen ET-Konzentrationen in Geweben betragen lediglich ca. 2 mM. Weitere Untersuchungen führten Dong et al. 2007 [95] an Phosphatidylcholinliposomen durch, die mit Hilfe von Alloxan unter oxidativen Stress gebracht wurden. Hierbei wurde ein besserer Schutz vor LPO durch ET als durch Coenzym Q10 gefunden. Bei diesen Versuchen wurden bis zu 57,3 g/mL ET eingesetzt. *In vivo* Versuche zur Lipidperoxidation wurden bereits an Ratten durchgeführt [96]. Diese wurden 7 Tage lang mit 70 mg/kg mit ET gefüttert. Anschließend wurde durch einmalige Gabe des Fenton-Reagenz Eisen(III)-nitrilotriacetat (15 mg Fe pro kg Körpergewicht) oxidativer Stress in den Tieren erzeugt. Bei diesem Versuch wurde ebenfalls ein protektiver Effekt von ET gegenüber LPO gezeigt.

Die Heterogenität der Versuchsaufbauten (Stressinduktor, verwendete Zellsysteme, ET-Konzentrationen) macht eine klare Aussage zur Protektivität von ET gegenüber LPO schwierig. Weitere Experimente hierzu, besonders *in vivo* und mit möglichst der Natur nachempfundenen Stressreizen, sind daher nötig.

1.8 Ziel der Doktorarbeit

Trotz diverser Untersuchungen in den letzten hundert Jahren, konnte die spezifische Funktion von ET noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Cheah und Halliwell haben 2011 den bisherigen Stand der Forschung in einem Übersichtsartikel zusammengefasst [97]. Da bisher nur wenige *in vivo* Experimente publiziert wurden, die Hinweise auf die physiologische Funktion des ET geben können, wurde dieser Ansatz für diese Arbeit gewählt. Mit Hilfe einer ETT-Knockout-Zebrafischlinie (*ETT^{-/-}*) sollte eine *in vivo* Charakterisierung des ET vorgenommen werden.

Basierend auf den Voruntersuchung von Dr. Markus Bach sollte der Fokus dieser Arbeit auf den molekularen Unterschieden zwischen den WT- und *ETT^{-/-}*-Fischlinien liegen. Hinweisen folgend, das ET in der Lage wäre die Folgen von LPO zur verringern [54, 96]

sollte in ersten Versuchen, ein möglicher Unterschied zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen bezüglich des Auftretens von Lipidperoxidation unternommen werden. Weiterführend sollten mit der Methode der LC-MS/MS-Differenzabtönung Unterschiede im molekularen Spektrum zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen untersucht werden. Um die Erfolgsaussichten der Versuche zu erhöhen sollte eine Optimierung der ET-Versorgung der Versuchstiere vorgenommen werden. Da es Vermutungen gibt, dass ET erst unter Einfluss von Stress seine spezielle Wirkung entfaltet [92] sollte ein geeigneter Aufbau zur Erzeugung oxidativen Stresses im Fisch ausgearbeitet werden.

Insbesondere vor dem Hintergrund der Assoziation des humanen ETT (ETTh) mit chronischen Erkrankungen ist es wichtig die Funktion von ET aufzuklären.

2 Material und Methoden

Die für diese Arbeit notwendigen Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dirk Gründemann am Institut für Pharmakologie, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln durchgeführt. Die Zebrafischhaltung ist in den Räumlichkeiten von Frau Prof. Dr. Maria Leptin, Institut für Genetik, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln und in den Räumlichkeiten des Instituts für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln, von Herrn Prof. Dr. Raimund Wagner lokalisiert.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Fluka (über Sigma-Aldrich, München, Deutschland), Acros Organics (Geel, Belgien), Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA), Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland). Soweit nicht anders vermerkt wurden die Chemikalien in den Reinheitsgraden „p.a“ und „reinst“ verwendet.

Die verwendeten Glas- und Plastikgefäße sowie Filtermaterial wurden bezogen von: Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), VWR International (Darmstadt, Deutschland), Sartorius (Göttingen, Deutschland), BRAND (Wertheim, Deutschland).

Falls für den Versuch notwendig wurden die Materialien vor dem Gebrauch für 20 min bei 121°C und 1,2 bar im Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland) sterilisiert. Die Glasgefäße wurden dann im Heißluftsterilisator T12 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) für weitere 4 Stunden bei 200°C sterilisiert.

Für die Fischhaltung und Aufzucht wurden folgende Geräte und Materialien verwendet: Schrankmodule V30 und V60 und 1,5 l Mausboxen zur Fischhaltung (Aqua Schwarz,

Göttingen, Deutschland), Ablachboxen/Breeding Tanks (Aquatic Habitats, Apopka, FL, USA), Luftpumpe 200 (Eheim, Deizisau, Deutschland), Brillant Filter (Tetra, Melle, Deutschland), Jäger Präzisions-Regelheizer 50W (Eheim, Deizisau, Deutschland). Folgendes Fischfutter wurde verwendet: ST-Futterlinie (Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland), Sanders Premium Great Salt Lake Artemia Cysts (Rebie, Bielefeld, Deutschland), Spirulina Mikroalgenpulver (Drak-Aquaristik, Schönaich, Deutschland), Vipan Flockenfutter (Sera, Heinsberg, Deutschland). Zur Wasserpflege wurde folgender Wasseraufbereiter verwendet: Aqua Safe (Tetra, Melle, Deutschland).

2.1.2 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Wenn für den Versuchsaufbau notwendig wurden diese anschließend autoklaviert (121 °C für 20 min). Bei flüssigem Autoklaviergut wurde die Flasche stets nur zu 2/3 befüllt und der Deckel im Autoklaven leicht aufgedreht um ein Überlaufen oder eine Explosion der Flasche zu verhindern.

Allen Verbindungen, die den Vermerk „DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt“ tragen wurde 1:1000 DEPC zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung über Nacht gerührt und am nächsten Tag autoklaviert.

2.1.2.1 Algenkulturmedien

Die Lösungen wurden von Mitarbeitern der Culture Collection of Algae at the University of Cologne (CCAC, Köln, Deutschland) hergestellt [98]. Details zu den Medien sind den Internetseite der CCAC [98] und der Internetseite der Abteilung Experimentelle Phykologie und Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (EPSAG)/ Culture Collection of Algae at Göttingen University (SAG) [99] zu entnehmen. Hinter den Bezeichnungen der Medien sind die Stämme angegeben, für welche die Medien verwendet wurden. Stammbezeichnungen die mit „M“ beginnen sind der CCAC zuzuordnen; Stammbezeichnungen die mit „SAG“ beginnen, sind der SAG zuzuordnen.

- Waris-H (für M1944, M2010, M3193, SAG 36.72)
- Spirulina medium (für SAG 85.79)
- Jones medium (für SAG 1380-1c)

2.1.3 Enzyme

- RNase A (DNase-frei; Qiagen, Hilden, Deutschland) in 10mM TRIS-HCl pH 7,5/Glycerol (1 : 1) auf 0,5 mg/ml verdünnen
- GoTaq Polymerase (5 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA)
- Reverse Transkriptase (SuperscriptII, 200 U/ μ l, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) .
- RQ1 DNase (1 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA)

2.1.4 Oligonukleotide

Primer für die Genotypisierung

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

Primer für die Kontrolle der cDNA durch β -Aktin Endpunkt-PCR (Sigma)

Zur Kontrolle der Qualität der cDNA wurde eine Endpunkt-PCR für ein Fragment des Housekeeping-Gens β -Aktin durchgeführt.

Bezeichnung	Sequenz
F4	5'-ggggtgttgaaggtctctaaa
R4ACTB	5'-ggcatcctcacctgaagta

→ erwartete Bande bei 203bp

Primer für die quantitative PCR zum Nachweis des Ergothionein-Transporters

Primer β -Aktin (biomers.net, Ulm, Deutschland)

Bezeichnung	Sequenz
ACTB zf F	5'-gcccatctatgttacg
ACTB zf R	5'-ggtcacgaccagatcc

→ Sonde #60 04 688 589 001 (Universal Probe Library Set, Human; Roche, Mannheim, Deutschland)

Primer für ETT (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Bezeichnung	Sequenz
F_Dr2#40	5'-cctccaacatccgctatatga
R_DR#40	5'-cacagtacccgatggagacc

→ Sonde #40 04 687 990 001 (Universal Probe Library Set, Human; Roche, Mannheim, Deutschland)

2.1.5 Fischfutterherstellung

Um die Fische mit einer ausreichenden Menge an ET versorgen zu können musste ein Futter mit entsprechenden ET-Gehalt verwendet werden. Da es ein geeignetes Futter nicht käuflich zu erwerben gibt wurde es selbst hergestellt. Aus einem Teil Spirulina Mikroalgenpulver (Drak-Aquaristik, Schönaich, Deutschland) und zwei Teilen Vipan Flockenfutter (Sera, Heinsberg, Deutschland) wurde unter Zugabe von deionisiertem Wasser (Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Advantage A10, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eine streichfähige Masse hergestellt und auf Backpapier (Aromata, Lidl, Neckarsulm, Deutschland) 24 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach wurde das getrocknete Futter in einem Mörser (Morgan Technical Ceramics, Haldenwagner, Waldkraburg, Deutschland), zu Flocken in angemessener Größe, zerkleinert.

2.2 Zebrafisch *Danio rerio*

Um die Wirkung und Fähigkeiten von ET am lebenden Organismus zu erforschen wurde der Zebraärbling *Danio rerio* als Modelorganismus ausgewählt.

Um die Studien möglichst vergleichbar durchführen zu können wurden für die Versuche jeweils Fische verwendet, die gleich alt waren. Die Fische innerhalb eines Experiments stammen alle vom selben Legedatum aber von unterschiedlichen Elterntieren. Die Tiere der verschiedenen Gelege wurden zufällig gepoolt. Es wurden Adultfische verwendet, welche ca. 1 Jahr alt waren. Für die Versuche zur Lipidperoxidation wurden Männchen und Weibchen zufällig gepoolt verwendet. Für alle anderen Versuche wurden ausschließlich Männchen verwendet.

2.2.1 Zebrafischhaltung

Für die Experimente (Genehmigungs-Nr. 31.08.045) wurden die beiden folgenden Fischlinien verwendet: Fischbezeichnung Gen Referenz Wildtyp (Ekkwill ZFIN ID: ZDB-

GENO-990520-2, Znomics, Portland, OR, USA) und eine ETT-Knockout-Linie (ZM_00007837, Gen *slc22a4b*, Znomics, Portland, OR, USA). Die Tiere wurden aus heterozygoten Tieren gezogen, genotypisiert und nach Genotypen getrennt. Während der Versuche wurde nur genotypenrein verpaart. Die Wildfänge wurden über ZooZajac (Duisburg, Deutschland) bestellt und in Westbengalen, Indien (Suthimari River bei Laskarpara nahe Barobisha Town, Japaiguri District, West Bengal GPS-Koordinaten : N 26 ° 29.403' E 89 ° 46.259') gefangen. Die Wildfänge wurden während des Transportes nicht gefüttert um eine Verfälschung des ET-Gehalts durch Zufütterung zu vermeiden. Die Tiere wurden direkt nach dem Eintreffen euthanasiert und eingefroren.

Im Institut für Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln, wurden die Fische in Mausboxen in einem PP-Modul (Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland) gehalten. Im Institut für Genetik, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln wurden die Fische in Mausboxen (Stand-alone Unit V30, Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland) und in Tankanlagen (Stand-alone Unit V60, Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland) gehalten. Für die gezeigten Experimente wurden ausschließlich die Fische aus der Haltung im Institut für Genetik verwendet. Die Anlage im Institut für Biochemie II diente als Backup. Die Fische wurden bei einer Temperatur von 26-28 °C gehalten [80]. Täglich wurde 1/10 des Gesamtvolumens durch Frischwasser ersetzt. Um eine geeignete Wasserhärte zu erreichen wurde das Stadtwasser mit VE-Wasser verschnitten. Bei jedem Wasserwechsel wurde der Anlage Wasseraufbereiter (AquaSafe, Tetra, Melle, Deutschland) zugesetzt. Der Hell-Dunkel-Rhythmus wurde in 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit unterteilt. Gefüttert wurden die Fische wochentags zweimal täglich. Adultfische wurden morgens mit selbsthergestellte Spirulinaflocken (Vipan Flockenfutter mit Spirulinapulver s. Fischfutterherstellung; ST-Futterlinie, Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland) und ST-Futter gefüttert und abends mit Artemien (Sanders Premium Great Salt Lake Artemia Cysts, Rebie, Bielefeld, Deutschland). Die Larven bekamen Wochentags morgens und abends Spirulina Mikroalgenpulver (Drak-Aquaristik, Schönaich, Deutschland) und ST-Futter (ST-Futterlinie, Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland). Nach ca. zwei Wochen konnte den Larven abends zusätzlich Artemien gefüttert werden. An Wochenenden wurden die Fische einmal täglich mit Artemien (Adultfische) bzw. mit Mikroalgenpulver (Larven) gefüttert.

Kurz vor den Experimenten wurden die Fische in Aquarien (20 l) in das Institut für Pharmakologie überführt. Hier wurden sie in einem speziellen „Doppelbecken“ (Abb. :) gehalten. Durch die Schaumstofftrennwand war gewährleistet, dass beide Genotypen im selben Wasser schwammen. Filterung und Belüftung des Wassers wurde durch einen Lufthebefilter gewährleistet (Brillant Filter, Tetra, Melle, Deutschland) welcher durch eine Luftpumpe (Typ 200, Eheim, Deizisau, Deutschland) betrieben wurde. Eine konstante Temperatur von 26 °C wurde durch einen Regelheizstab (Jäger Präzisions-Regelheizer 50W, Eheim, Deizisau, Deutschland) eingestellt. Die Wasserqualität wurde jener des Institutes für Genetik angepasst. Aufgrund der Übergangshaltung im Institut für Pharmakologie konnten die Fische kurz vor den Experimenten in einem nicht gestressten Zustand entnommen werden. Auf diese Weise wurde verhindert, dass während den Experimenten durch den Transportstress Artefakte in den Messergebnissen durch den Transportstress entstanden. Der Transport zwischen den Instituten erfolgte im Privatkraftfahrzeug.

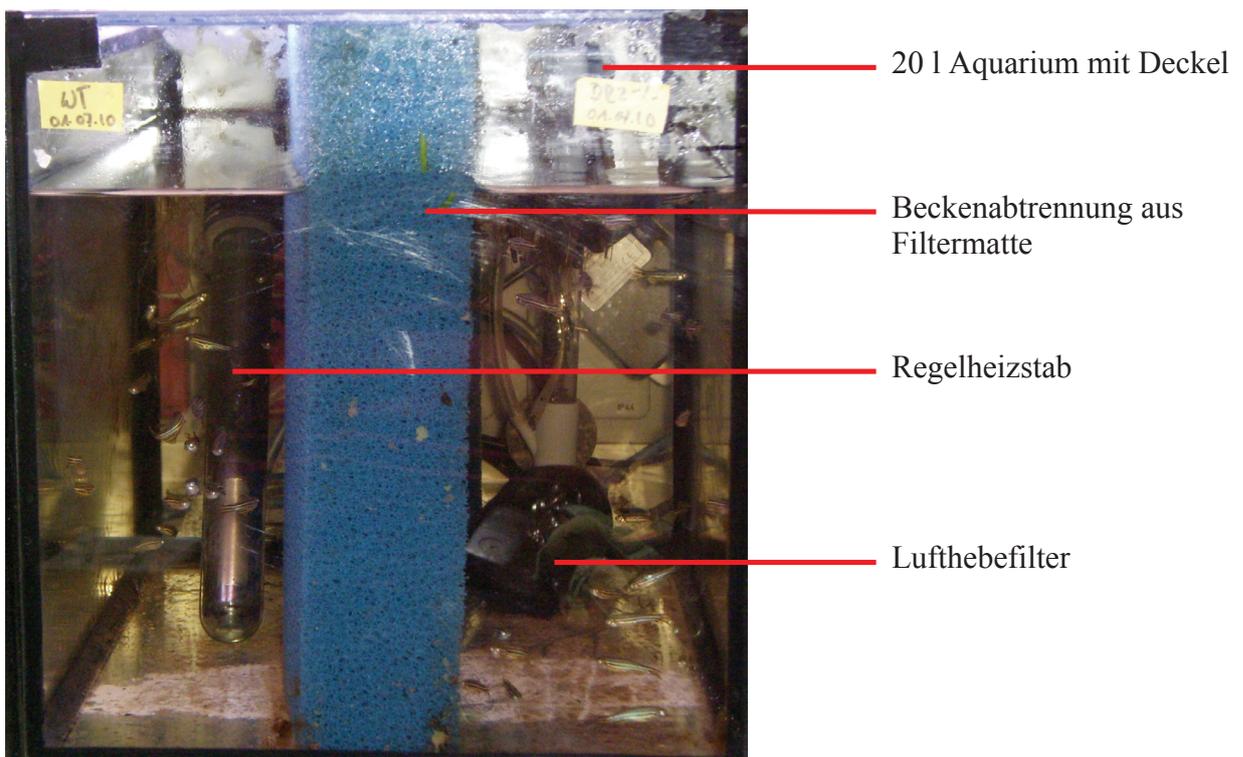


Abb. 2: Aquarium Pharmakologie

Aufbau des Aquariums für die Übergangshaltung im Institut für Pharmakologie, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln.

2.2.2 Verpaarung

Zur Verpaarung wurden abends ein Männchen und ein Weibchen oder ein Männchen und zwei Weibchen in eine 1,5 l Mausbox (Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland) gesetzt. Auf dem Boden der Box wurden flächendeckend bunte Glasmurmeln ausgelegt um sowohl die Paarung zusätzlich anzuregen, als auch die Fische daran zu hindern die abgelegten Eier zu fressen. Am darauffolgenden Morgen löste der Lichtreiz das Paarungsverhalten aus. Nach ca. 30 min wurden die befruchteten Eier aus den Boxen gesammelt.

2.2.3 Euthanasie

Die Fische wurden jeweils unmittelbar vor der Sektion in Eiswasser getötet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass über 15 min hinweg keine Kiementätigkeit mehr zu erkennen war [100].

2.2.4 Stressinduktion

Da es die Vermutung gab, dass ein bestimmter Stressreiz notwendig ist, um die Funktion von ET deutlich erkennbar zu machen wurden folgende Stressoren ausgewählt: Schwermetalle (Kupfer, Blei, Zink) und ROS erzeugende Chemikalien (*tert*-Butylhydroperoxid, tBOOH).

2.2.4.1 Toxizitätstest

Der Versuchsaufbau der Toxizitätstests entsprach dem „Aufbau zur Stressinduktion“. Die Toxizitätstests wurden ebenso wie die nachfolgenden Experimente mit adulten Fischen (ca. 1 Jahr) durchgeführt. Die Toxizitätstests wurden jeweils in einer unterteilten 1,5 l Mausbox (Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland) mit je 6 Wildtyp (WT)- und 6 ETT^{-/-}-Fischen durchgeführt. Als Zeitspanne der Inkubation wurde, wie in LD₅₀-Tests üblich, 96 Stunden gewählt [101]. Während des Versuchs wurden die Tiere

nicht gefüttert, um eine Verunreinigung des Wassers zu vermeiden. Das letzte Mal bekamen die Tiere unmittelbar vor dem Versuch Vipran Flockenfutter (ET-frei). Die Wasserqualität des verwendeten Wassers (2:1 VE-Wasser: Leitungswasser; ohne Zusätze) wurde vor den Versuchen mit einem Teststreifen (6 in 1, Tetra, Melle, Deutschland) überprüft: pH 6,8-7,2, KH 6 °d, GH 16 °d, NO₂⁻ 0 mg/l, NO₃⁻ 0-10 mg/l; Cl₂ 0 mg/l. Die Werte befanden sich alle im angemessenen Bereich für Fische (laut Farbcodierung auf dem verwendeten Teststreifen). Zudem wurde getestet, ob je 8 WT und 8 ETT^{-/-}-Fische ohne Zusatz von Verbindungen in dem vorbereiteten Versuchsbecken 96 Stunden ohne erkennbaren Stress gehalten werden können. Alle Fische überlebten die eingeplante Versuchsdauer ohne Anzeichen von Stress wie Farbverlust, hektisches Atmen oder extremen Gewichtsverlust

[102]. Der Inkubationsaufbau wurde daraufhin als geeignet befunden.

Um einen stressinduzierende aber nicht tödliche Konzentration der verwendeten Chemikalien zu ermitteln wurden Literaturwerte zur Orientierung herangezogen [103-106]. Da der exakte Versuchsaufbau nicht in der Literatur zu finden war und keine LD₅₀-Werte für *D. rerio* (adult) vorlagen wurde bei einer höheren Stoffkonzentration gestartet und die Konzentration heruntertitriert. Es wurde Blei(II)-acetat trihydrat (379,33 g/mol, CAS Nr. 6080-56-4, Sigma), Zinksulfatmonohydrat (179,47 g/mol, CAS Nr. 74446-19-7, Sigma), Kupfer(II)-sulfat (159,60 g/mol, CAS Nr. 77-98-7, Sigma) und *tert*-Buthylhydroperoxid (tBOOH) (90,12 g/mol, CAS Nr. 75-91-2, Acros) verwendet. Anfangskonzentrationen: 0,8 mg/l Blei(II)-acetat, 5 mg/l Zinksulfat, 1,6 mg/l Kupfer(II)-sulfat, 500 µmol/l (~45 mg/l) tBOOH. Von diesen Konzentrationen ausgehend wurden die Gehalte auf- bzw. herabtitriert bis eine stressende, aber nicht tödliche Konzentration erreicht wurde. So wirkten 5 mg/l Zinksulfat, 1,6 mg/l Kupfer(II)-sulfat, sowie 100 µM tBOOH nach wenigen Stunden und 0,016 mg/l Blei(II)-acetat nach drei Tagen tödlich.

Der Konzentrationsbereich (Metallionen) sollte ein Überleben der Tiere im Versuchsaufbau für 96 Stunden sichern (tBOOH 24 Stunden). Starben die Tiere vor dieser Zeit wurde der Versuch abgebrochen, die restlichen Tiere euthanasiert und ein neuer Versuchsansatz mit einer verringerten Konzentration begonnen.

Die im endgültigen Experiment verwendeten Konzentrationen betragen 0,16 mg/l Kupfer(II)-sulfat, 0,008 mg/l Blei(II)-acetat und 0,5 mg/l Zinksulfat und 50 µM (~4,5 mg/l) tBOOH. Die Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die ReinVerbindung ohne Wasseranteil.

2.2.4.2 Aufbau zur Stressinduktion

Zur Stressinduktion wurde der in Abb. dargestellte Versuchsaufbau gewählt.

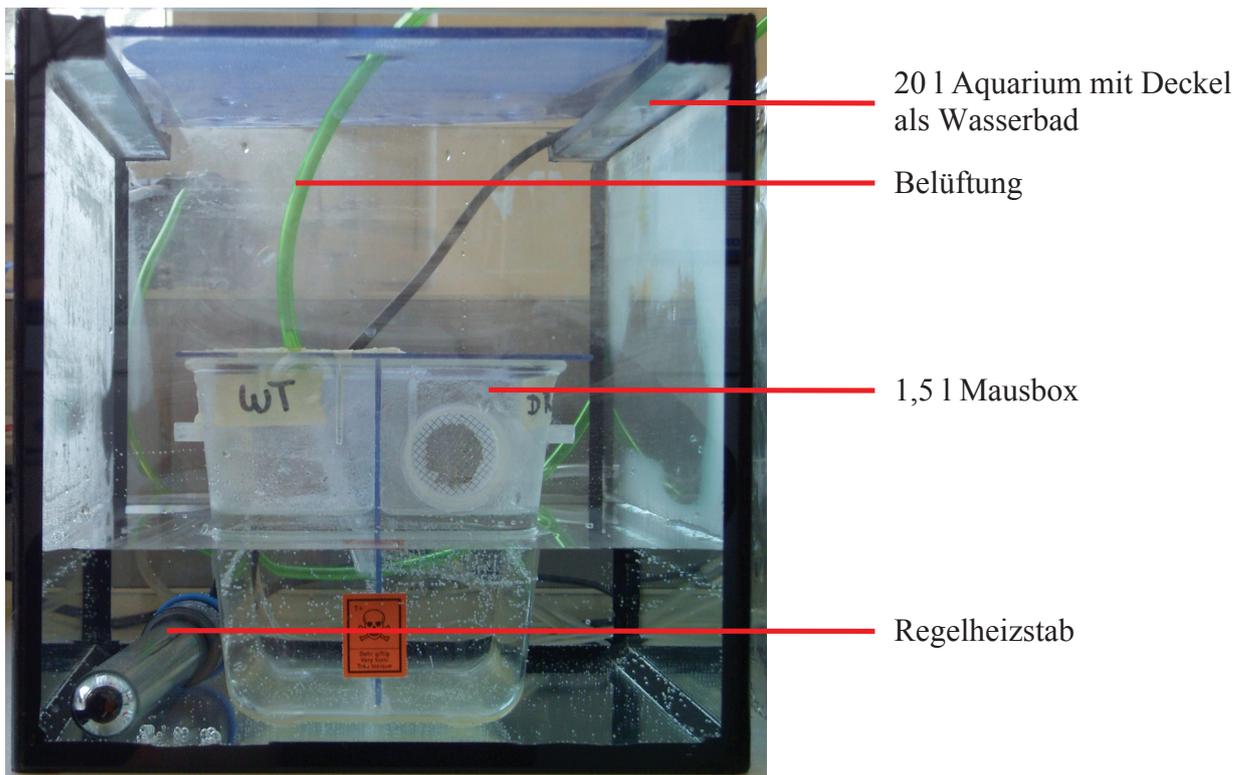


Abb. 3: Aufbau zur Stressinduktion

Im Inkubationsbecken für Toxizitätstests und Stressinduktion können die Fische mit Hilfe des umgebenden Wasserbades ideal und gleichmäßig temperiert werden. Die Abtrennung der Genotypen durch eine durchlässige Plexiglasscheibe ermöglicht gleiche Wasserbedingungen für alle Fische. Auf jeder Seite können bis zu 6 Fische inkubiert werden. Für eine ausreichende Belüftung sorgt eine Membranpumpe.

Die Fische befanden sich hierbei in einer 1,5 l Mausbox (Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland). Die Genotypen wurden durch eine mit kleinen Löchern versehene Plexiglasabtrennung separiert. Das Wasserbad um die Mausbox herum ermöglichte eine Temperierung des Fischwassers. Zur Regulation der Temperatur (26°C) wurde ein Präzisionsheizstab verwendet. Die Belüftung wurde durch einen Schlauch gewährleistet, der mit Hilfe einer Membranpumpe Luft in das Wasser einströmen lässt. Auf den Schlauch wurde vorne eine umgearbeitete Einmalpipette aufgesteckt. Dieser Aufsatz

wurde nach jedem Gebrauch entsorgt. So musste der Schlauch nicht in das belastete Wasser eingetaucht werden und eventuelle Verschleppungen von Wasserzusätzen (Schwermetalle, tBOOH) wurden verhindert.

Drei Tage vor dem Versuch wurde den Fischen kein ET-haltiges Futter mehr gegeben. Sie erhielten nur noch Vipan Flockenfutter. So wurde verhindert, dass sich vor der Sektion störende ET-haltige Futterreste im Darm ansammeln und die Messergebnisse verfälschen.

2.2.5 Fütterungsversuch mit Spirulina

Je 4 WT-Fische aus der Fischanlage im Institut für Genetik wurden 0, 1, 3 und 5 Tage lang mit reinem Spirulinafutter gefüttert. Dazu wurden sie einmal am Tag im Überschuss gefüttert, so dass jeder Fisch soviel Futter aufnehmen konnte wie möglich. Das verwendete Spirulinafutter bestand aus Flocken, welche aus 100% Spirulina Mikroalgenpulver (Drak Aquaristik, Schönaich, Deutschland) hergestellt wurden. Die Herstellungs- und Trocknungsprozedur entsprach der im Unterpunkt „Fischfutterherstellung 2.1.5“ nur ohne Hinzufügen von Vipan Flockenfutter. Um den Fischen ausreichend Zeit zur Verdauung und ET-Aufnahme zu geben, wurden sie jeweils 24 Stunden nach der letzten Fütterung auf Eis euthanasiert. Der gesamte Fisch wurde jeweils in 500 μL 4 mM HClO_4 im Potter S Homogenisator (Sartorius, Göttingen, Deutschland) auf Eis homogenisiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Finclip-Typisierung

Die Fische wurden vorsichtig mit einem Fangnetz (grob, 10 cm \varnothing Europet, Rebie, Bielefeld, Deutschland) aus dem Becken gefangen und so mit der Hand im Kescher fixiert, dass die Schwanzflosse herausragt. Mit einer kleinen Schere (Typ 11-618-08, KLS Martin Group, Tuttlingen, Deutschland) wurde ein ca. 1 mm^2 großes Stück des Flossensaums abgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Vor dem

ersten und jedem weiteren Flossenschnitt wurde die Schere mit 1M NaOH und 70% Isopropanol gereinigt.

2.3.1.1 Hot-Shot-DNA-Extraktion

Zu dem im Eppendorf-Reaktionsgefäß befindlichen Flossenstück (ca. 1 mm²) wurden 100 µl 50 mM NaOH pipettiert. Daraufhin wurde das Gemisch für 20 Minuten im Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf Eis auf 4 °C. In jedes Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde nun 10 µl TRIS (1 M; pH 8,0) hinzugefügt. Abschließend wurde für 3 min (13000x rpm/16000xg) zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde sofort für die PCR verwendet. War es zeitlich nicht möglich den Überstand sofort weiter zu verarbeiten war eine Lagerung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung möglich.

2.3.1.2 Nested PCR (engl. polymerase chain reaction)

Bei der hier durchgeführten „Nested-PCR“ handelt es sich um eine Spezialform der PCR bei welcher zwei PCR-Läufe direkt hintereinander gereiht werden [107]. Diese ist sehr gut geeignet DNA-Abschnitte zu amplifizieren, welche nur einen geringen Anteil an der Gesamt-DNA der Probe haben. Bei der „Nested“-PCR entstehen im ersten PCR-Lauf neben den erwünschten Replikaten auch unerwünschten Amplifikationsprodukte (durch z.B. durch unspezifische Primerbindung). Die erwünschten Replikate werden in der darauffolgenden zweiten PCR als Matrize verwendet. Mit Hilfe von Primern, welche innerhalb dieser Matrize binden, wird der gewünschte DNA-Bereich nun spezifisch und in ausreichender Menge amplifiziert.

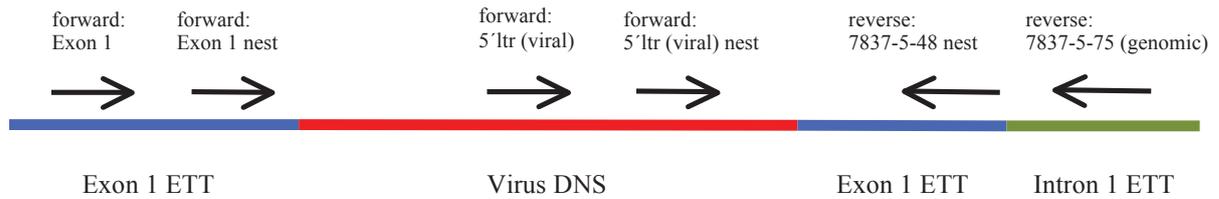


Abb. 4: Primerpositionierung

Schematische Darstellung der Primerpositionierung bei der Nested PCR (modifiziert nach Bach 2009 [92]).

Spezifisch für die durchgeführten Experimente wurden wie in Abb. gezeigt zuerst die Primer *forward Exon1*, *forward 5'ltr* und *reverse 7837-5-75* verwendet. In der zweiten PCR kamen dann entsprechend die Primer *forward Exon 1 nest*, *forward 5'ltr (viral) nest* und *reverse 7837-5-48 nest*, welche innerhalb des schon entstandenen, gewünschten PCR-Produktes binden. Die Primer wurden so gewählt, dass neben dem Wildtypbereich des ETT auch die Virusinsertion innerhalb von Exon 1 nachgewiesen werden konnte. Die Bande für die Virusinsertion weist eine Länge von 731 bp auf. Die Bande des Wildtypallels hatte eine Länge von 344 bp (Abb. 6). Die Bandenlängen wurden von Dr. Markus Bach [92] übernommen. Die Länge für die Virusinsertion scheint aber etwas zu lang angegeben zu sein. Bei heterozygoten Tieren sind beide Banden zu erkennen.

Für die praktische Durchführung wurden die Proben (je 50 µl) in 8-well RealTime PCR-Gefäße (Brand, Wertheim, Deutschland) pipettiert. Es wurde jeweils ein Mastermix für die entsprechende Probenanzahl hergestellt und auf die einzelnen Reaktionsgefäße portioniert. Danach wurde jeweils die Flossen-DNA hinzugefügt.

Für den ersten Teil der PCR wurde pro Probe 30,65 µl H₂O deion, 4,6 µl MgCl₂ (25 mM), 10 µl 5x GoTaq® Flexi Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland), 1 µl BSA (10 mg/ml), 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Primer forward:Exon1 (100 pmol), 0,5 µl Primer forward 5'ltr (viral) (100 pmol), 0,5 µl Primer reverse: 7837-5-75 (genomic) (100 pmol), 1 µl Flossen-DNA (Überstand aus Hot-Shot-DNA-Extraktion 2.3.1.1.1) und 0,25 µl GoTaq® Polymerase (5 U/µl Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Pro Ansatz lag am Ende eine Gesamtmenge von 50µl vor. Es bot sich an, einen geeigneten Mastermix mit allen Bestandteilen, außer dem DNA-haltigen Überstand und der Polymerase herzustellen und in die Reaktionsgefäße vorzulegen. Anschließend wurde um den DNA-haltigen Überstand und die Polymerase ergänzt.

Für die anschließende zweite PCR wurde pro Probe 30,65 µl H₂O deion, 4,6 µl MgCl₂ (25 mM), 10 µl 5x GoTaq® Flexi Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland), 1µl BSA (10 mg/ml), 1 µl dNTPs (10 mM), 0,5 µl Primer forward:Exon1 nest (100 pmol), 0,5 µl Primer forward 5`ltr (viral) nest (100 pmol), 0,5 µl Primer reverse: 7837-5-48 nest (100 pmol), 1 µl Flossen-DNA (Überstand aus Hot-Shot-DNA-Extraktion 2.3.1.1.1) und 0,25µl GoTaq® Polymerase (5 U/µl, Promega Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Pro Ansatz lag am Ende eine Gesamtmenge von 50 µl vor. Es wurde wiederum ein Mastermix hergestellt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz verwendet, der statt der Flossen-DNA lediglich 1 µl H₂O (deionisiert) enthielt. Hierdurch sollte gezeigt werden, dass die amplifizierte DNA auf die korrekte Template-DNA zurückzuführen ist.

2.3.1.3 Amplifikationsprogramm nested PCR

Die PCR wurde mit dem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

95 °C 5 min	} 35 Zyklen
95 °C 30 sek	
55 °C 1 min	
72 °C 1 min	
72 °C 5 min	

2.3.1.4 Probenpräparation für Gelauftragung, Gelherstellung und Gelelektrophorese

Es wurden jeweils 9 µl deionisiertes Wasser in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Dazu wurden sowohl je 3 µl Glycerolblau als auch 1 µl der DNA hinzugefügt. Die Lösung wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt.

Glycerolblau

- 40% Glycerol
- 0,04% Bromphenolblau
- 0,2% Orange G
- 1 mM EDTA
- ad 50 ml mit bidest.. H₂O auffüllen
- sterilfiltrieren

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Hierzu wurde Agarose in 1x TRIS-Acetat (TAE)-Puffer (40 mM TRIS, 1 M EDTA, pH 8,0 mit CH₃COOH) gelöst und auf einem Magnetrührer MR 3002 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach, Deutschland) kurz aufgekocht. Anschließend wurde die Agarose auf 75 °C abgekühlt und in eine mit Geltaschenkamm bestückte Gelform gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Gelkammer überführt.

In die Geltaschen das Gemisch aus DNA, Wasser und Glycerolblau pipettiert. Als Marker wurde ein 100 bp Marker (100 bp DNA ladder, Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Elektrophoreseapparatur (Eigenbau der Feinwerkstatt des Instituts für Pharmakologie und Electrophoresis Power Supply Consort E 432, Turnhout, Belgien) lief bei 90 bis 100 mV bis sich die Front des Farbmarkers kurz vor Ende des Gels befand.

Im Anschluss an die Elektrophorese anschließend wurde das Gel in eine Färbewanne überführt und dort für 10 min bei 60 °C in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml 1x TAE) gefärbt um die Banden sichtbar zu machen. Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert. Hierzu wurde UV-Licht der Wellenlänge 302 nm (3UV Transilluminator, UVP, Upland, CA, USA) verwendet in Kombination mit einem Aufsatz von AlphaDigiDoc Pro (Alpha Innotech/proteinsimple, bezogen über Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) und einer Canon PowerShot A640 (Canon, Krefeld, Deutschland). Die Fotos wurden mit der Software AlphaProView (Alpha Innotech/Proteinsimple, bezogen über Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) aufgenommen. Die Gelfotos wurden daraufhin in Photoshop 7.0 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) geladen und ausgedruckt. In Photoshop wurde lediglich der Bandenkontrast verbessert und die Farben umgekehrt um die Banden deutlicher erkennen zu können. Es wurde nichts hinzugefügt oder manipuliert.

2.3.2 Real Time RT PCR (quantitative RT-PCR)

Mit dieser hochgradig sensitiven Methode wird die Akkumulation eines PCR-Produktes mit Hilfe einer dual-markierten fluoreszierenden Sonde bestimmt. Durchgeführt wurden die Messungen mit einem Roche LightCycler [108]. Da es sich um eine relative Quantifizierung handelt wird ein Referenz-Gen, hier β -Aktin, verwendet welches in allen Zellen gleichmäßig exprimiert wird. Durch diese Normierung werden Mengenunterschiede im eingesetzten genetischen Ausgangsmaterial ausgeglichen [109]. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde mit einer TaqMan-Sonde (Lightcycler TagMan Master, Roche, Mannheim, Deutschland) gearbeitet. Das Prinzip der Sonde basiert auf einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (fluorescence resonance energy transfer, FRET) innerhalb eines Donor-Akzeptor-Paares mit überlappenden Emission-Absorptions Spektren. Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs wird während der Hybridisierung der Sonde an ihre Zielsequenz durch den 3'-Akzeptor unterdrückt. Die verwendete Taq-Polymerase (mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität) baut am Ende der Gegenstrangsynthese die Sonde ab und entfernt dadurch den „Quencher“. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors nimmt so bei jedem Replikationsschritt zu [107]. Diese Fluoreszenzzunahmen wurde zur Quantifizierung verwendet [110].

2.3.2.1 RNA-Isolierung aus Fischorganen

Vom Fisch wurden folgende Organe verwendet: ein Stück der grau gefärbten Rückenhaut, die Augen, das Gehirn, das Herz und die Leber. Für die Organe wurden pro Probe je zwei bzw. für Herz drei Fische verwendet. Für jeden Organtyp wurden je drei unabhängige Proben hergestellt.

Die Fischorgane wurden zuerst in je 200 μ l Extraktionslösung (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7,0, 0,5% *N*-Laurylsarkosin, auf pH 7,0 mit NaOH eingestellt, 0,1M Mercaptoethanol) auf Eis mit Hilfe eines Metallpistills homogenisiert. Pro Reaktionsgefäß wurde 20 μ l (1/10 der Extraktionslösung-Menge) Natriumacetat (2 M; mit Essigsäure auf pH 4,0 eingestellt, DEPC behandelt) zugeben. Anschließend wurden 200 μ l Aqua-Roti-Phenol hinzugegeben und geschüttelt.

Darauffolgend wurde jedem Reaktionsgefäß 200 µl CIA (Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)) zugesetzt, wiederum geschüttelt und die Probe 15 min auf Eis inkubiert. Als nächstes erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 min bei 13.200 rpm) in einer Kühlzentrifuge (4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Interphase wurde dabei nicht berührt. In das neue Reaktionsgefäß wurde im Verhältnis 1:1 CIA zugegeben und geschüttelt. Anschließend wurde erneut 10 min bei 13.200 rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder ohne die Interphase zu berühren in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde im Verhältnis 1:1 mit 100% Isopropanol gefällt und geschüttelt. Dem folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.200 rpm in der Kühlzentrifuge (4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70% EtOH (in DEPC-H₂O) gewaschen. Anschließend wurde erneut 15 min zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend sofort kopfüber auf ein Küchentuch gestellt und für 10-15 min bei 60 °C (Trockenschrank, Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland) getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen und geschüttelt bis das Pellet vollständig gelöst war.

2.3.2.2 Photometrische Gesamt-RNA-Bestimmung

Diese Messung war notwendig um die geeignete Menge an Gesamt-RNA-Lösung für die nachfolgende DNase Behandlung zu ermitteln. Durchgeführt wurde die Messung mit Hilfe des Nano Drop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Die Angaben des Gerätes erfolgten in der Einheit µg/ml. Um später in den Proben für die Reverse Transkription den Soll-Wert von 20 µg (entspricht 5 µg in den später verwendeten vier Reaktionsgefäßen pro Probe) zu erfüllen, wurde die Menge der einzusetzenden Mikroliter der Gesamt-RNA-Lösung bei der DNase-Behandlung errechnet. Da in den Ansätzen für die DNase-Behandlung die Gesamtlösungsmenge pro Reaktionsansatz mit 50 µl vorgesehen war, musste die eingesetzte H₂O-Menge dementsprechend individuell pro Ansatz ermittelt werden.

2.3.2.3 RNA-Gel und Denaturierung

Dieser Schritt wurde eingefügt um den Zustand der RNA zu kontrollieren. Zuerst wurde Denaturierungslösung (DLG) (67% Dimethylsulfoxid (DMSO), 1,33 M Glyoxal, 1,33 x BE) hergestellt und kurz vor Gebrauch Ethidiumbromid (EtBr, Endkonzentration 0,625 µg/ml) zugesetzt. Als nächstes wurde der benötigte RNA-Marker vorbereitet (1:1:6 RNA-Ladder (1 µg/µl; 0,5-10 kb, (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland))/ DEPC-H₂O/ DLG (inkl. EtBr)). Für die Proben wurden pro 1 µl RNA-Ansatz 3 µl der vorbereiteten DLG (inkl. EtBr) verwendet. Anschließend wurden die Proben und der Marker für 60 min bei 50 °C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde genutzt um ein 1%iges Agarose-Gel herzustellen. Nach dem Aufkochen wurde die flüssige Agarose auf 45 °C abgekühlt und Natriumjodessigsäure (Endkonzentration 0,5 mM) hinzugeben. Die Gelkammer wurde mit 1 x BE-Laufpuffer (50fach: 10 mM 2-(Bis-[2-hydroxyethyl]-amino)-ethansulfonsäure (BE), 5 mM EDTA, eingestellt auf pH 6,7 mit NaOH, DEPC-behandelt) aufgefüllt. Die Schläuche der Perestaltikpumpe (Masterflex 7015-42, Microgon Inc., Laguna Hills, CA, USA) wurden so in den Puffer getaucht, dass im Bereich der Anode angesaugt und im Bereich der Kathode ausströmt wurde. Nach der Inkubationszeit der Proben und des Markers wurden pro 4 µl Probe 1 µl 0,2 % Orange G und für den Marker 20 µl Orange G zugesetzt.

Es wurde pro Geltasche jeweils die gesamte RNA-Probe bzw. 5 µl Marker auf das Gel auftragen. Zuerst wurde die Spannungsquelle (Consort E122, Consort bvba, Turnhout, Belgien) für 5 min bei 90 V betrieben ohne die Pumpe laufen zu lassen damit die Proben ins Gel einziehen können und erst anschließend die Pumpe eingeschaltet. Nach dem Lauf wurde das Gel fotografiert und die Pumpe kurz mit Wasser durchgespült.

2.3.2.4 DNase-Behandlung und Phenol-Chloroform-Extraktion

Es wurde eine doppelte DNase-Behandlung durchgeführt, um die Reinheit der RT(-)-Kontrollansätze zu garantieren. Zuerst wurde ein Mastermix angesetzt. Es musste beachtet werden, dass dieser durch die doppelte DNase-Behandlung auch in doppelter Menge angesetzt werden musste.

In jedes Reaktionsgefäß wurde 10 µl Mastermix (5 µl 1 M Triethanolamin-HCl, pH 7,5 (DEPC-behandelt), 5 µl 100 mM MgCl₂) vorgelegt. Es wurde jeder Probe individuell die errechnete Menge an DEPC-H₂O hinzugefügt. Danach wurde in jedes Reaktionsgefäß die errechnete Menge an Gesamt-RNA pipettiert. In jedes Reaktionsgefäß wurde 10 µl RQ1-DNase (1 U/µl; Promega Mannheim, Deutschland; RNase-frei) pipettiert und die Lösung durch gemischt und 1 min (4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben je 100 µl PCI (1 : 1 Aqua-Roti-Phenol/CIA; nur die gelbe Phase) zugefügt. Anschließend wurden die Proben geschüttelt und erneut zentrifugiert (1 min, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die entstandene obere, wässrige Phase wurde in ein neues, steriles Reaktionsgefäß überführt ohne dabei die Interphase zu berühren. In das „alte“ Reaktionsgefäß wurden dann jeweils 50 µl Triethanolamin (10 mM; eingestellt auf pH 7,5 mit HCl; 1 mM EDTA; DEPC-behandelt) hinzugefügt; anschließend wurde geschüttelt und zentrifugiert (1 min, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die obere, wässrige Phase aus dem „alten“ Reaktionsgefäß wurde dann in das „neue“ Reaktionsgefäß zur ersten wässrigen Phase hinzugegeben (vereinigte wässrige Phase). Diese vereinigte wässrige Phase wurde dann jeweils mit 150 µl CIA (24:1) versetzt und die daraufhin gebildete obere Phase wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In einem nächsten Schritt wurde jeder Probe 15 µl Natriumacetat (3 M, eingestellt auf pH 5,2 mit Essigsäure; DEPC-behandelt) zugesetzt. Darauffolgend wurde in jedes Reaktionsgefäß 375 µl EtOH (100%, sauber für RNA) pipettiert, das Reaktionsgefäß wurde geschüttelt und 10 min zentrifugiert (4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde abschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 150 µl EtOH (70% in DEPC-H₂O) gewaschen und anschließend 3 min zentrifugiert (4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im geöffneten Reaktionsgefäß bei 60 °C (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen (Soll-Konzentration 1 µg/µl). In jedes Reaktionsgefäß wurden 10 µl des anfänglich hergestellten Mastermixes, 50 µl DEPC-H₂O und 10 µl RQ1-DNase (1 U/µl; Promega, Mannheim, Deutschland; RNase-frei) zugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert (1 min, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Im Anschluss folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C. Danach wurde jeder Probe 100

µl PCI (1:1 Aqua-Roti-Penol/CIA) hinzufügen (nur die gelbe Phase), geschüttelt, zentrifugiert (1 min, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und die obere, wässrige Phase in neues, steriles Reaktionsgefäß überführt ohne die Interphase zu berühren. In das „alte“ Reaktionsgefäß wurde anschließend 50 µl Triethanolamin (10 mM; eingestellt auf pH 7,5 mit HCL; 1 mM EDTA; DEPC-behandelt) gegeben; das Reaktionsgefäß wurde geschüttelt und zentrifugiert (1 min, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die obere, wässrige Phase aus dem „alten“ Reaktionsgefäß wurde in das „neue“ Reaktionsgefäß gegeben (vereinte wässrige Phase). Der vereinten wässrigen Phase wurde dann 150 µl CIA (24:1) hinzugefügt, es wurde geschüttelt, zentrifugiert (1 min, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und die entstehende obere Phase wiederum in neues Reaktionsgefäß überführt. In jede Probe wurden erst 15 µl Natriumacetat (3 M, eingestellt auf pH 5,2 mit Essigsäure; DEPC-behandelt) und dann 375 µl EtOH (100%, sauber für RNA) hinzugefügt, anschließend wurde geschüttelt und 10 min bei RT zentrifugiert (Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 150 µl EtOH (70% in DEPC-H₂O) gewaschen. Im nächstens Schritt wurden die Proben 3 min bei RT zentrifugiert (Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde abschließend bei 60 °C (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet, dann 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen (entspricht einer Soll-Konzentration 1 µg/µl).

2.3.2.5 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Zuerst wurden die Proben in Transporter Proben (+) und (-) und beta-Aktin (+) und (-) (d.h. aus einer Probe wurden vier) aufteilt. Das bedeutete, dass je 5µl des Ansatzes aus der DNase-Behandlung pro Reaktionsgefäß verwendet wurden, was 5µg RNA pro Reaktionsgefäß entsprach. Zur Denaturierung wurden die Proben für 5min auf 65°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die RNA wurde dann in einem 20 µL Ansatz (1x Reverse-Transkriptase-Puffer (RT-Puffer), 10mM DTT (Dithiothreitol), 7 mM MgCl₂, je 1,5 mM dNTPs und 10 µM randomisierte Primer-Nonamere) weiterverarbeitet. Es kann ein Mastermix ohne RNA und Polymerase angesetzt werden.

Pro Reaktionsgefäß wurden 14,5 µl Mastermix hinzugefügt, durch Auf- und

Abpipettieren gemischt und anschließend kurz zentrifugiert (1 min, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurde 5 min bei RT und 2 min bei 45 °C (Thermal cycler T100, Bio-Rad, München, Deutschland) inkubiert. Zu den RT(+)-Ansätzen wurde je 100 U Reverse Transkriptase (200 U/µl, Superscript II, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Zu den RT(-)-Ansätzen, welche als Negativkontrolle dienten, wurde statt Reverser Transkriptase jeweils 0,5 µl DEPC-H₂O zugesetzt. Es folgte erst eine einstündige Inkubation bei 45°C, dann eine Inkubation der Proben über 10 min bei 95°C (Thermal cycler T100, Bio-Rad, München, Deutschland). Abschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt (modifiziertes Protokoll nach Gründemann et al. 1997 [111]).

Reverse Transkriptase-Puffer („AW“-Puffer)

- 0,75 M KCL
- 0,5 M Triethanolamin_HCl pH 8,7
- mit HCl den pH auf 8,7 einstellen
- 1:1000 DEPC

2.3.2.6 RNase-A-Behandlung

Aufgrund einer geringen RT-Aktivität der eingesetzten GoTaq-Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) musste überschüssige RNA aus den Ansätzen entfernt und so die Ansätze weiter aufgereinigt werden. Die verwendete RNase A (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) besteht aus RNase A (Endkonzentration 0,5 mg/ml in 1:1 10 mM TRIS-HCl pH 7,5/ 50% Glycerol). Die RT-Produkte wurden vor der RNase-A-Zugabe für 5min bei 65°C im Thermal cycler T100 (Bio-Rad, München, Deutschland) inkubiert und anschließend sofort je 5 µl der vorbereiteten RNase hinzugefügt. Anschließend wurde 30 min bei 37 °C (Thermal cycler T100, Bio-Rad, München, Deutschland) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben entweder sofort weiterverarbeitet oder eingefroren werden.

2.3.2.7 Kontrolle der cDNA durch β -Aktin-Endpunkt-PCR

Diese Kontrolle wurde durchgeführt, um zu zeigen, dass noch genügend DNA-Material in den Proben vorliegt um eine quantitative PCR durchzuführen.

PCR-Ansatz:

1 x GoTaq-Flexi-Puffer
2,3 mM MgCl₂
0,2 mM dNTPs
je 0,5 μ M Primer
1,25 U GoTaq-Polymerase
5 % DMSO
H₂O ad 50 μ l je Ansatz

Die PCR wurde nach den unten stehenden PCR-Bedingungen durchgeführt.

94 °C	5 min	} 38 Zyklen
94 °C	30 sek	
50-60 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,6%iges Gel mit 1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) hergestellt. Nach der PCR wurden die Proben für die Gelauftragung vorbereitet. Dazu wurde jeweils zu 10 μ l der DNA-Lösung 3 μ l Glycerolblau gemischt. Dieser Probenvorbereitungsschritt wurde auf Parafilm (Parafilm „M“, Brand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland) ausgeführt. Danach wurde jeweils der gesamte Tropfen in eine Geltasche gefüllt. Es wurde zur Bestimmung der Fragmentgröße ein 100 bp Marker (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 90-100 mV durchgeführt. Die zu erwartende Fragmentgröße betrug bei den verwendeten Primern 202 bp (β -Aktin F4/R4ACTB; Sigma, Steinheim, Deutschland).

2.3.2.8 Durchführung der Real-Time-PCR (quantitative RT-PCR)

Da mehr Proben (60 Proben + 2 Kontrollen) vorhanden waren als Plätze im Lightcycler (32 Plätze; Zentrifuge: LC Carousel Centrifuge, Software: Roche Lightcycler Run 5.3.2, Roche, Mannheim, Deutschland) wurde erst ein Lauf nur mit den ETT-Proben und der Transportermastermixkontrolle und dann ein zweiter Lauf mit den beta-Aktin-Proben und der entsprechenden Mastermixkontrolle gestartet.

Der Mastermix wurde aus dem Kit LightCycler® TaqMan® Master (Roche, Mannheim, Deutschland) hergestellt. Hierzu wurde 10 µl von Lösung 1a in ein Reaktionsgefäß mit Lösung 1b pipettiert. Für die anschließende PCR kann ein Mastermix Hierbei galt es zu beachten, dass die PCR zum Nachweis des ETT und jene zum Nachweis von β-Aktin unterschiedliche Mastermixe (verschiedene Primer) benötigte.

PCR-Ansatz:

Mastermix (Roche) 1x

F-Primer 0,5µM

R-Primer 0,5µM

0,5% Sonde

5 µg cDNA

H₂O ad 10 µl je Ansatz

Für den mRNA-Nachweis wurden je 9 µl Mastermix (jeweils einmal für ETT und einmal für β-Aktin) in einem 50 µl-Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend 1 µl cDNA (5µg) hinzugegeben.. Für die beiden Mastermixe wurden zudem entsprechende Negativkontrollen angesetzt, bei denen 1 µl H₂O an Stelle der cDNA zum Mastermix hinzupipettiert wurde.

2.4 Präparative Methoden

2.4.1 Sektion Zebrafisch

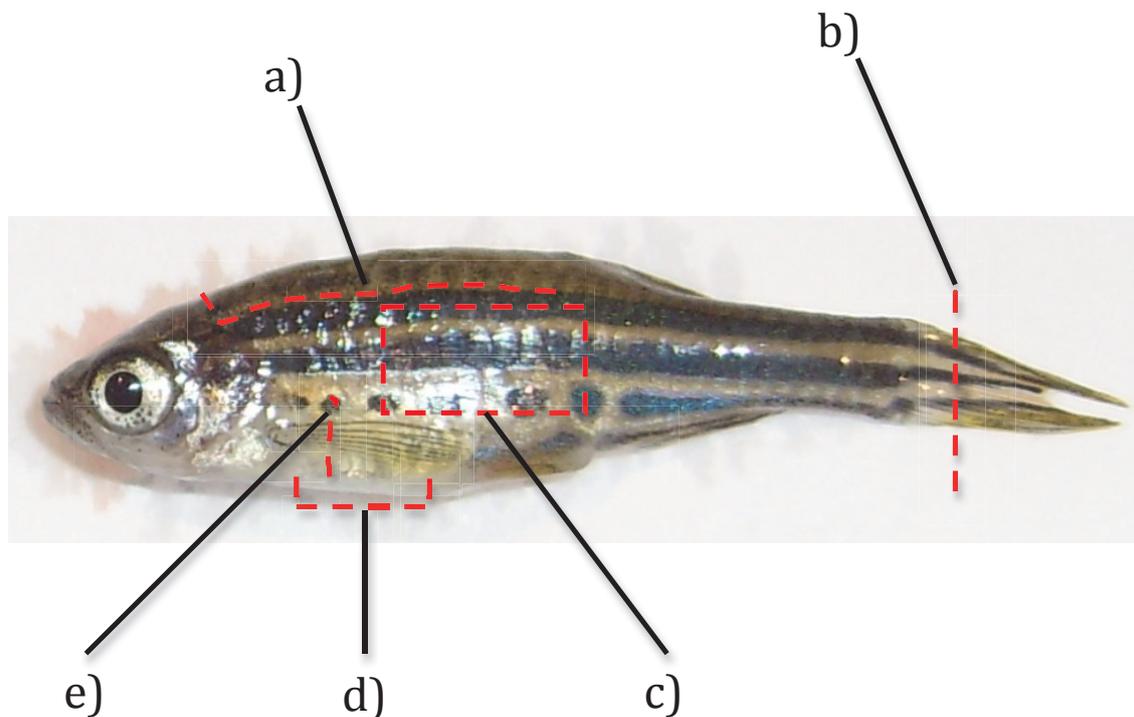


Abb. 5: Sektion Zebrafisch.

In der Abbildung ist ein Zebrafischweibchen gezeigt. Die roten Linien markieren die Schnitte, mit denen die einzelnen Hautbereiche präpariert wurden a) Rückenbereich, b) Schwanzflosse, c) Seitenbereich, d) Bauchbereich und e) Brustflosse. Der Schnitt welche für die Schwanzflossenbiospie durchgeführt wurde war weiter Richtung Flossensaum verschoben.

Die Fische wurden nach der Euthanasie dem Eiswasser entnommen und kurz mit einem fusselfreien Tuch abgetupft. Die Augen wurden entfernt; anschließend wurde der Fisch mit Nadeln auf einer Styroporunterlage fixiert. Diese wurden durch die Augenhöhlen in Richtung des Mauls sowie durch die Schwanzflosse gestochen. Auf diese Weise wurde die Verletzung von Organen vermieden. Mit Hilfe einer Mikro-Federschere (OC 498, Aesculap AG/Braun Sharing Expertise, Tuttlingen, Deutschland) und Hilfe einer Pinzette (FM003R, 0,3mm, Rostfreier Edelstahl, Aesculap AG/Braun Sharing Expertise, Tuttlingen, Deutschland und 10.330.31 Dimeda Instrumente GmbH, Tuttlingen, Deutschland) wurde zuerst ein Schnitt von der Afteröffnung hin zum ersten

Kiemenbogen durchgeführt. Als Nächstes wurden Brustflosse und Kiemendeckel abgetrennt. Das Herz wurde sichtbar und konnte entnommen werden. Der nächste Schnitt erfolgte vom Genick entlang der obersten blauen Linie und dann bogenförmig zurück zur Afteröffnung. Hierbei war es wichtig den Knorpel oberhalb der Kiemen und die Gräten an der Seite des Fisches zu durchtrennen. Im nächsten Schritt wurde die Bauchdecke durch Abheben des „umrissenen“ Hautstückes geöffnet werden. Der nun erkennbare Eingeweidesack wurde mit Hilfe einer Pinzette herausgezogen. Hierzu wurde der Darm auf Höhe des Schlundes sowie das Darmrohr an der Afteröffnung herausgezogen. Darm, Leber, Milz und Galle des Fisches wurden anschließend voneinander getrennt. Um eine Beschädigung der Niere zu verhindern, wurde im Rückenbereich mit größter Vorsicht gearbeitet. Die Niere befindet sich im Bereich der Wirbelsäule und ist in Kopf-, Rumpf- und Schwanzniere unterteilt, wobei lediglich die Rumpfniere verwendet wurde. Das Organ ließ sich nicht komplett herauspräparieren, da es eng mit der Aorta verwachsen ist. Um die Haut eines Fisches zu präparieren wurde er bäuchlings durch Augenhöhlen und Schwanzflosse wie oben beschrieben fixiert. Es erfolgte ein Schnitt im Genick und jeweils seitlich der Wirbelsäule auf Höhe des oberen blauen Streifens. Anschließend wurde die Haut mit einer Pinzette im Genick gefasst und nach hinten abgezogen, wobei sie vor der Rückenflosse abriss. Nach Abziehen der Haut wurde das gewünschte Muskelstück ausgehend von Genick rechts neben der Wirbelsäule mit Hilfe von einer Pinzette von den Gräten gelöst und entnommen. Um das Gehirn zu entfernen wurde der Kopf durch beide Augenhöhlen mit Nadeln fixiert. Unter Zuhilfenahme von zwei spitzen Pinzetten wurde nun von oben vorsichtig die Schädeldecke geöffnet und entfernt. Das Gehirn wurde danach vollständig entnommen.

2.4.2 Aufschluss von Ganzfisch und Fischorganen

Die Fische wurden unmittelbar vor der Sektion auf Eis euthanasiert. Alle Fische, Organe und die daraus hergestellten Proben wurden auf Eis gelagert. Zum Schutz der Proben vor UV-Licht wurden braune Safe Seal Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet.

Zur Ganzfischanalyse wurden die Fische komplett mit 500 µl 4 mM HClO₄ im Potter S Homogenisator (Sartorius, Göttingen, Deutschland) homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 min bei (13000x rpm/16000 x g, 4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg,

Deutschland) zentrifugiert. Anschließend wurde 200 µl des Homogenatüberstandes mit 800 µl Methanol (reinst) gefällt. Überstand und Homogenat werden 1 min geschüttelt (Vortex Genie 2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend 30 min zentrifugiert (4 °C, 13000x rpm/ 16000x g, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Vom Überstand wurden jeweils 20 µl für die LC-MS/MS-Messung verwendet.

Zur Herstellung der Organhomogenate wurden die Fische sofort nach der Euthanasie sezziert und die gewünschten Organe entnommen. Die Sektion wurde unter einem Binokkular Typ MS 5 (Leica, Solms, Deutschland) unter Beleuchtung mit der Kaltlichtquelle KL 200 (Leica, Solms, Deutschland) durchgeführt. Entnommene Organe wurden während der Sektion auf einem kleinen Wägeschälchen in einer geschlossenen Styrophorbox auf Eis zwischengelagert. Die Organe wurden in braune Safe Seal Reaktionsgefäße eingewogen und sofort bei -20 °C eingefroren. Nachdem alle Organe einer Versuchsreihe entnommen, eingewogen und eingefroren waren, wurde jedes Organ mit 300 µl 4 mM HClO₄ versetzt und über Nacht bei -80 °C gefroren. Danach wurden die Organe im Reaktionsgefäß mit Hilfe eines Mikropistills aus Edelstahl homogenisiert. Um den Probenaufschluss zu verbessern, wurden die Proben anschließend mit Ultraschall behandelt. Die Proben für die Fullscan-Versuche wurden für 3 min in einem Ultraschallbad USR 9 (Qualilab, Merck Euro Lab GmbH, Bruchsal, Deutschland) inkubiert, die restlichen Proben wurden 3 bis 5 sek mit dem Ultraschallprozessor UP50H (Hielscher- Ultraschall Technologie, Teltow, Deutschland) aufgeschlossen. Danach wurden die Homogenate 1 min bei 13000 x rpm/16000 x g zentrifugiert (4 °C, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde 200 µl des Homogenatüberstandes mit 800 µl Methanol (reinst) gefällt. Das Homogenat-Methanol-Gemisch wurden 1 min geschüttelt (Vortex Genie 2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend 30 min bei 4 °C (13000x rpm/16000x g, Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 20 µl für die LC-MS/MS-Messung verwendet.

Zur Messung von Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE) wurden die Proben 1:1 mit 12 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln derivatisiert [112].

2.4.3 Aufschluss Nahrungsergänzungsmittel, Fischfutter, Pflanzen, Pilze, Flechten und Cyanobakterien für ET- und Herzynin-Bestimmung

Alle Proben wurden während der Verarbeitung auf Eis gelagert. Zum Schutz der Proben vor UV-Licht wurden Safe Seal Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet.

Alle Proben wurden zur Normierung der Messungen eingewogen (Trockengewicht). Die Proben des Austernpilzes trafen bereits im gefriergetrockneten Zustand ein (zur Verfügung gestellt von Dr. Marvin S. Hausman (Sherwood, OR, USA), die Flechten wurden jeweils luftgetrocknet verwendet (*Collema tenax* und *Leptogium gelatinosum* gesammelt und zur Verfügung gestellt von Dipl. Biol. Dietmar Teuber, -Plantago-Botanische Gutachten, 35394 Gießen, Deutschland; *Cetraria islandica* wurde von K. Leicht, Scheunenlädchen, Kraichtal Gochsheim, Deutschland, zur Verfügung gestellt). Die Proben der Nahrungsergänzungsmittel und Fischfutter wurden wie geliefert (getrocknet) verwendet. Bei dem Fischfutter handelte es sich um Spirulina Mikroalgenpulver und Chlorella Mikroalgenpulver (Drak Aquaristik, Schönaich, Deutschland), Micron, Goldy color spirulina, Spirulina Tabs, Vipan und Flora (Sera, Heinsberg, Deutschland), Nauplien Futter (Aquaristika Wirbellosen Shop, Solingen, Deutschland), Spirulina Flocken (JBL, Neuhofen, Deutschland), Vegetable und Tetraphyll (Tetra, Melle, Deutschland), Algenfutterblätter (Dennerle, Vinningen, Deutschland), ST-Futter (Aqua Schwarz, Göttingen, Deutschland), Fry Feed Kyowa N-250 Larvenfutter (Kyowa Hakko Bio Co.) und Sanders Great Salt Lake Artemia Cysts Artemieneier (Rebie, Bielefeld, Deutschland). Nahrungsergänzungsmittel waren *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) Tabletten (Naturscheune, Autenhausen, Deutschland), *A. flos-aquae* Pulver (Seher's Uralgenshop, Eisingen, Deutschland), Naturland Spirulina Pulver (GSE Vertrieb, Saarbrücken, Deutschland) und Spirulina Base Granulat (Dr. Niedermaier Pharma, Hohenbrunn, Deutschland).

Die Algenkulturen wurden bezogen von der *Culture Collection of Algae at the University of Cologne* (CCAC, Köln, Deutschland) und der *Sammlung von Algenkulturen Göttingen* (SAG, Göttingen, Deutschland). Es wurden folgende Stämme verwendet: *Oscillatoria* sp. M1944 (mit freundlicher Genehmigung von Algenion GmbH & Co. KG, Dietzenbach,

Deutschland), *Oscillatoria sp.* M2010 und *Scytonema sp.* M3193 (alle drei von der CCAC), *Arthrospira platensis* SAG 85.79, *Chlamydomonas noctigama* SAG 36.72, *Porphyridium purpureum* SAG 1380-1c (alle drei von der SAG).

Die Kulturen wurden in der CCAC zwischengelagert und dort bei 23 °C, einer Lichtintensität von 10–20 Imol Photonen/m²/s und einem Hell/Dunkel-Zyklus von 14:10 Stunden weiter kultiviert. Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben in den folgenden Medien gehalten: Waris-H (M1944, M2010, M3193, SAG 36.72); Spirulina medium (SAG 85.79); Jones medium (SAG 1380-1c) (s. Unterpunkt Algenkulturmedien 2.1.2.1) Die Algen aus den Kulturen sowie die Pflanzen und Algen, welche aus den Aquarien gesammelt wurden, wurden im Gefriertrockner ALPHA 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Deutschland) gefriergetrocknet. Die höheren Pflanzen *Vallisneria sp.* (Heimaquarium, Wermelskirchen, Deutschland) und die Brennnessel *Urtica dioica* (Waldgebiet, Wermelskirchen, Deutschland) wurden selbst gesammelt und ebenfalls gefriergetrocknet.

Das Fischfutter, die Nahrungsergänzungsmittel, die Algenkulturen und die höheren Pflanzen wurden in Methanol (reinst) homogenisiert. Die Flechtenproben wurden aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit in 4 mM HClO₄ homogenisiert und dann 1:5 mit Methanol (reinst) gefällt. Alle Proben wurden vor der LC-MS/MS-Analyse mit Hilfe von Minisart RC 25 Einwegfiltern (0,20 µm Ø, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland), Discardit II Einwegspritzen (2 ml, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und Microlance 3 Kanülen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gefiltert. Für die LC-MS/MS-Analyse wurden jeweils 20 µl der Proben verwendet. Es wurden von jedem Probenmaterial drei unabhängige Analyselösungen hergestellt und ausgewertet.

2.5 Hochdruckflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Alle Messungen wurden mit Hilfe der HPLC (High Performance Liquid Chromatography)-Anlage SLC-20AD Prominace (Shimadzu, Kyoto, Japan) gekoppelt mit dem Massenspektrometer Typ 4000 Q Trap LC/MS/MS System (Applied Biosystems, MDS Sciex, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit der Software

Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems, MDS Sciex, Foster City, CA, USA) generiert und ausgewertet. Die Moleküle mussten zur Messung in die Gasphase überführt werden. Hierfür wurden Stickstoffgas und zwei beheizbare Turboheater (550 °C) eingesetzt. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektronenspray-Ionisierung (ESI) (Sprayvoltage: 5500 V). Die Moleküle wurden im Hochvakuum des Quadrupols durch ein elektrisches Potential (CE; collision energy, Kollisionsenergie) beschleunigt und in der Kollisionszelle Q2 fragmentiert. Die Vermessung der Proben erfolgte durch Simone Kalis und Dr. Tim Bauer.

2.5.1 Kalibriergerade

Bei jeder Messung wurde eine entsprechende Kalibrierungsgerade mit 6 bis 9 Konzentrationen der zu analysierenden Verbindung hergestellt. Es wurde jeweils mit Vorverdünnungen (1 mg/ml sofern dies die Löslichkeit zuließ bzw. 0,01 mg/ml) gearbeitet, die dann passend weiter verdünnt wurden. Die Vorverdünnungen wurden mit deionisiertem H₂O hergestellt. Im Fall von 8-Hydroxyguanin (8-OH-G) wurde 2 M NaOH verwendet. Die Konzentrationen der Kalibriergerade waren wie folgt: 400 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml und 1,56 ng/ml. Die Kalibriergerade wurde in Methanol (reinst) hergestellt. Der Konzentrationsbereich, in dem die Gerade zur Anwendung kam, wurde in einem Vortest mit allen 9 Konzentrationen ermittelt. Da nicht alle Verbindungen in den niedrigsten Konzentrationen nachgewiesen werden konnten, wurde hier der obere Konzentrationsbereich der Kalibriergerade verwendet. Pro Kalibriergerade wurden 6 Punkte verwendet.

Wurde in Messungen keine Kalibriergerade verwendet wurden die Peakflächen auf das Gewicht normiert und die Ergebnisse relativ zu dem Organ mit der größten Peakfläche angegeben.

2.5.2 Auswertung der LC-MS/MS-Analysen

2.5.2.1 Differenzabtönung

Zur Auswertung der Differenzabtönung (Difference shading) wurden die Daten mit einer speziell dafür entwickelten Software, DS Data covert 0.5.0.0 (© 2003-2012 Dirk Gründemann, Köln, Deutschland) zunächst konvertiert und dann mit DS Fullview 0.6.0.3 (© 2003-2012 Dirk Gründemann, Köln, Deutschland) analysiert. Bei der Differenzabtönung handelt es sich um ein Verfahren, das es ermöglicht Unterschiede im molekularen Spektrum zweier Proben farblich kenntlich zu machen. Es können immer drei Probenpaare visuell verglichen werden. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass aus einem dreidimensionalen LC-MS/MS-Spektrum bestehend aus den Koordinaten Masse/Ladungs-Verhältnis, Retentionszeit und der Intensität ein zweidimensionales Bild erzeugt wird. Dazu wird auf der y-Achse die Retentionszeit in der HPLC (zunehmend von oben nach unten) und auf der x-Achse der Quotient von Masse zu Ladung (m/z , zunehmen von links nach rechts) angegeben. Die Intensität wird durch die Farbintensität des Signals dargestellt. Den beiden zu vergleichenden Proben wird hierzu ein roter bzw. ein blau-grüner Farbkanal zugewiesen (Abb. 56 a). Tritt ein Molekül in beiden Proben auf, erscheint die Pixel auf dem Auswertungsbildschirm weiß oder grau, gibt es in beiden Proben bei einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis und einer bestimmten Retentionszeit kein Signal erscheinen die Pixel schwarz. Tritt ein mengenmäßiger Unterschied des Signals in den beiden Proben auf, erscheint ein türkises oder rotes Signal. In allen drei Probenpärchen die parallel betrachtet werden können (Abb. 56 b) sollte das Signal gleichermaßen auftreten um als valide betrachtet werden zu können [22, 113]. In den durchgeführten Messungen wurden jeweils 4 Organproben vergleichend zueinander betrachtet. Dazu wurde zuerst Pärchen 1 bis 3 und anschließend die Pärchen 1,2 und 4 verglichen. Es wurden für die weitere Auswertung nur Signale verwendet die in allen 4 Pärchen auftraten. Anschließend wurde in den Rohdaten der Pärchen mit Signal, der Faktor des Unterschiedes der Peakflächen (manuell integriert) ermittelten (Abb. 56 c).

Die gefundenen Signale (755 Stück) wurden unter Angabe folgender Parameter in einer Tabelle zusammengefasst: eingesetzter Stressor, m/z , Retentionszeit [sek], Faktor der

Peakflächeunterschiede, Organ, Laufmittel, Signalfarbe, Laufmodus (positiv/negativ) und Laufdatum. Anschließend wurden alle Daten der Tabelle nach m/z aufsteigend sortiert. Es wurde untersucht, welche Unterschiede besonders häufig auftraten bzw. wo die größten Faktoren in den Unterschieden auftraten. Die Proben, welche Signale zeigten, die weitergehend untersucht werden sollten, wurden erneut in die LC-MS/MS injiziert und die fraglichen Moleküle fragmentiert. Das resultierende Molekülspektrum wurde mit Hilfe von Internetdatenbanken (Metlin und Massbank [114, 115]), wenn möglich, identifiziert. Um das Signal zu verifizieren wurde die vermutete Verbindung käuflich erworben und überprüft ob sie in Zebrafischhomogenat dieselbe Retentionszeit wie das gefundene Signal aufweist und das Fragmentspektrum ebenfalls übereinstimmt.

Verwendete Säulen:

- HILIC (Normalphasensäule Atlantis™ HILIC Silicia, 5 µm, 3,0 x 100 mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA) mit entsprechender Vorsäule (20 x 4,6 mm))
- zicpHILIC (5 µM, 100 mm x 2,1 mm, di2chrom GmbH, Marl, Deutschland)

Verwendete Laufmittel für die Fullscans:

- HILIC: „MeOH“: A = 0,1% Ameisensäure; B = MeOH + 0,1% Ameisensäure
- HILIC: „ACN“: A = 0,1% Ameisensäure; B = ACN + 0,1% Ameisensäure
- zicpHILIC: „MeOH“: 10 mM Ammoniumacetat pH 8,9; B = MeOH
- zicpHILIC: „ACN“: 10 mM Ammoniumacetat pH 8,9; B = ACN

2.5.2.2 Analyse von Einzelverbindungen

Die Läufe wurden mit der Software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems, MDS Sciex, Foster City, CA, USA) ausgewertet. Für jede Verbindung wurde zunächst im Produktionenscan-Modus eine geeignete Messmethode ermittelt. Dazu wurde die Verbindung in einer Konzentration von 500 ng/ml in Methanol (reinst) direkt in das Massenspektrometer injiziert (10 µl/min). Auf diese Weise wurden die zur Messung geeigneten Fragmente und die passende Kollisionsenergie (CE) ermittelt. Anschließend wurde zur Quantifizierung der ausgewählten Massen der SRM-Modus (engl. selected reaction monitoring) verwendet.

Tab. 1: Laufbedingung der jeweiligen Verbindungen. Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) für Muttermasse (Q1) und ausgewähltem Übergang (Q3), CE (collision energy, Kollisionsenergie).

Verbindung	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	CE [V]
Ergothionein	230	127	27
Herzynin	198	95	28
Verbindung Nr. 3	462	333	30
4-Hydroxynonenal (HNE) underivatisiert	155	136,8	-26
4-Hydroxynonenal (HNE) derivatisiert mit DNPH	335	167	-25
Malondialdehyd (MDA) derivatisiert mit DNPH	235	163	-25
Carnitin	162	103	20
Acetylcarnitin	204	145	20
4-Hydroxychinolin	146	91	43
8-Hydroxyguanin	165,8	148	20
Anserin	241	109	31
Xanthin	151	108	-22
Kynurenin	209	146	27
L-Histidin	156	110	19
Histamin	112	95	19
Carnosin	227	110	31
3-Methyl-L-Histidin	170	109	23
Kynuramin	165	136	17
Butyrylbetain	164	60	20
β-Alanin	90	44	17
5-Aminolävulinsäure	132	114	15
Harnsäure	164	124	-22
Taurin	124	80	-28
Riboflavin	372	243	33
L-DOPA	198	152	19
Neopterin	254	236	21
L-Tryptophan	205	188	20
o-Tyrosin	180	134	-30
Prostaglandin E2	351,2	315,1	-20

Das in der Tabelle 1 unter Q1 angegebene Masse/Ladungsverhältnis (m/z) bezeichnet jeweils die Muttermasse der gemessenen Verbindungen. Das unter Q3 angegebene m/z bezeichnet die Tochtermasse/Übergang der bei den Messungen zur eindeutigen Identifizierung der Verbindung verwendet wird. In den Ergebnisdiagrammen ist das m/z von Mutter- und Tochtermasse nach dem Schema m/z Q1 → Q3 angegeben.

2.6 Berechnungen und Statistik

Alle Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM, engl. Standard error of mean) angegeben. Die Anzahl der verwendeten Proben ist mit „n“ bezeichnet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde, wenn nicht anders angegeben, ein ungepaarter t-Test durchgeführt (two tailed, confidence level 95%, significant $P < 0,05$) bzw. eine repeated-measures ANOVA mit Tukey-Post_Hoc-Test (two tailed, confidence level 95%, significant $P < 0,05$).

3 Ergebnisse

In den bisherigen Versuchen zur Aufklärung der physiologischen Funktion von ET wurde hauptsächlich mit Ratten, Mäusen und Kaninchen gearbeitet [116, 69, 94, 29, 36, 54, 71, 72, 58, 96, 27, 37]. Erste Untersuchungen zu ET im Zebrafisch wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Gründemann im Jahr 2009 durch Dr. Markus Bach durchgeführt [92]. Hier konnten keine phänotypischen Unterschiede gezeigt werden. Die Verwendung der ETT-Knockout-Zebrafischlinie (ETT^{-/-}) ermöglicht vergleichende Untersuchungen zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen zur Funktionsaufklärung des ET *in vivo*.

Neben der LC-MS/MS-Analyse wichtiger Indikatormoleküle für Lipidperoxidation wird in dieser Arbeit erstmals die Strategie der LC-MS/MS-Differenzabtönung verwendet. Diese Methode bietet die Möglichkeit die Molekülspektren einzelner Zebrafischorgane vergleichend zu analysieren.

3.1 Finclip-Typisierung/Schwanzflossenbiopsie

Um sicherzustellen, dass die Zebrafische, die für Experimente verwendet wurden, dem korrekten Genotyp entsprechen, wurden regelmäßig Kontrollen durchgeführt. Hierzu wurde eine Schwanzflossenbiopsie durchgeführt und das Gewebematerial einer PCR unterzogen. An die PCR schloss sich eine Gelelektrophorese an, anhand derer der Genotyp des getesteten Fisches eindeutig zugeordnet werden konnte (Abb. 6). Das amplifizierte Fragment des Wildtyp (344 bp) ist eindeutig vom Fragment der amplifizierten Virus-DNA (731 bp) im ETT^{-/-}-Fisch unterscheidbar. Ein Auftreten zweier Banden markiert heterozygote Tiere.

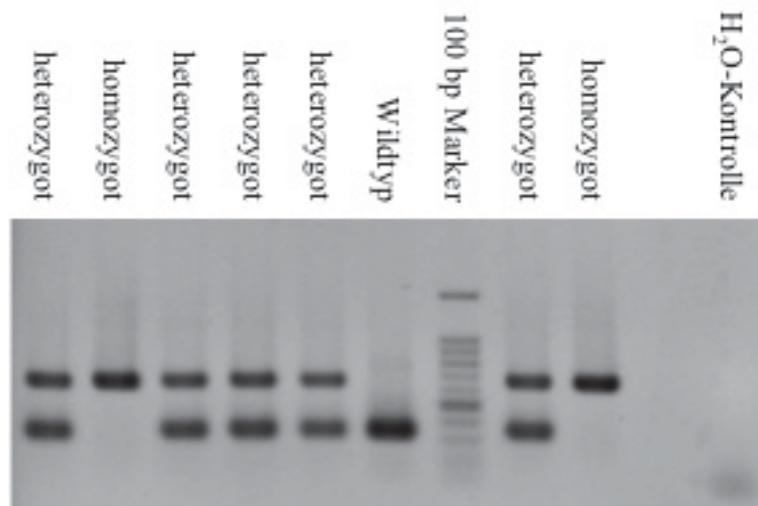


Abb. 6: Genotypisierung

Agarosegel einer Genotypisierung. Zum Größenvergleich wird ein 100-bp Marker (100 bp DNA-Leiter, Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die 731 bp-Bande kennzeichnet die amplifizierte Virus-DNA (ETT^{-/-} homozygot) und 344 bp-Bande das Wildtyp-Allel. Treten beide Banden auf, handelt es sich um ein heterozygtes Tier (ETT^{+/-}). Die Angaben zur Fragmentlänge wurden von Dr. Markus Bach [92] übernommen die Fragmentlänge für die Virusinsertion scheint aber etwas zu lang.

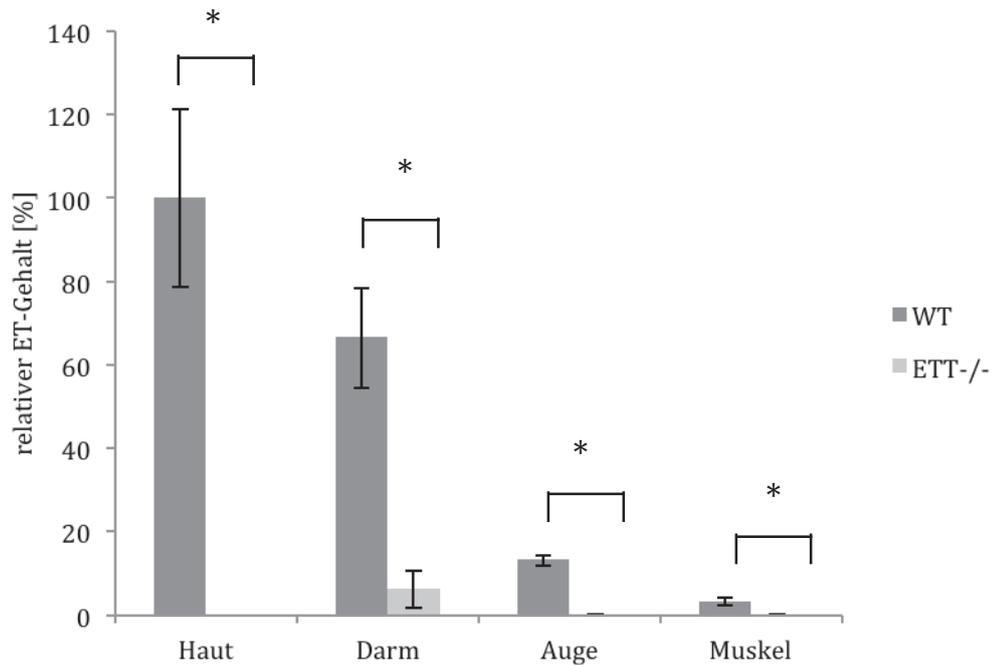


Abb. 7: ET-Gehalt Wildtyp vs. Knockout

Dargestellt ist der relative mittlere ET-Gehalt in Organen adulter Zebrafische. Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. (MW \pm SEM, n = 5; m/z 230 \rightarrow 127). Ausgewählt wurden 3 ET-reiche Gewebe (Auge, Darm, Haut) und ein ET-armes Gewebe (Muskel). Die Unterschiede zwischen WT und ETT^{-/-}-Fischen sind signifikant (Auge WT vs. ETT^{-/-} P < 0,0001; Haut WT vs. ETT^{-/-} nicht messbar weil alle Werte bei Haut ETT^{-/-} = 0; Darm WT vs. ETT^{-/-} P = 0,0014; Muskel WT vs. ETT^{-/-} P = 0,0068).

3.1.1 „Genotypisierung“ homozygoter Adultfische mittels ET-Bestimmung des Schwanzflossensaums per LC-MS/MS

Der hohe ET-Gehalt im Flossensaum (Abb. 7 und 8) der Schwanzflosse führte zu der Überlegung, dies als eine zusätzliche Kontrollmöglichkeit des Genotyps zu nutzen.

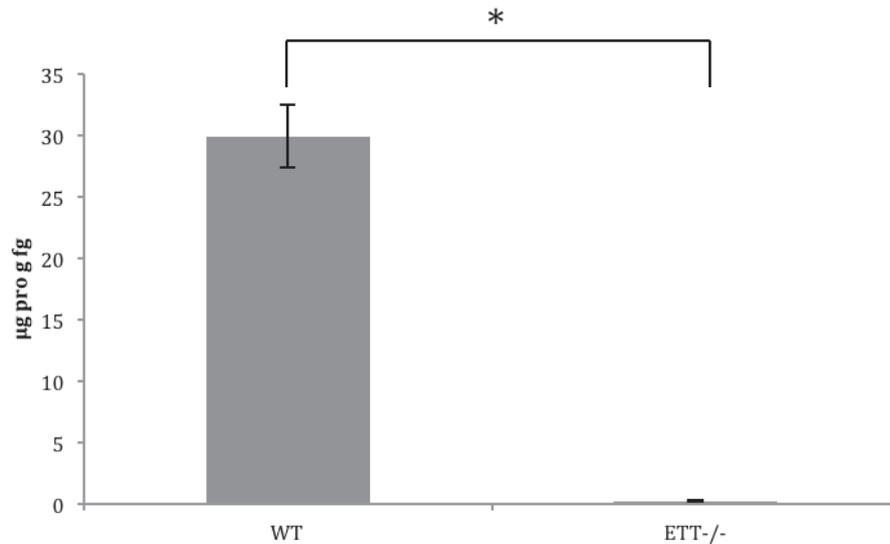


Abb. 8: ET im Schwanzflossensaum

Dargestellt ist der mittlere ET-Gehalt vom Schwanzflossensaum adulter Zebrafische (MW \pm SEM, n = 3; m/z 230 \rightarrow 127). Der Unterschied im ET-Gehalt ist signifikant (P = 0,0003; ungepaarter t-Test).

3.2 Optimierung der ET-Versorgung der Versuchsfische

Um optimale Versorgung der Versuchsfische mit ET sicherzustellen wurden Vorexperimente durchgeführt. Innerhalb dieser Experimente wurde der aktuelle ET-Gehalt der Versuchsfische bestimmt und Optimierungsmaßnahmen durchgeführt.

3.2.1 ET-Gehalt in Anlagenfischen, Wildfängen und Fischen aus einem naturnahen Aquarium

In einer Versuchsreihe wurden die ET-Gehalte von wildgefangenen Zebrafischen aus Westbengalen, Indien, den ET-Gehalten von WT-Fischen aus der Fischanlage im Institut für Genetik (Universität zu Köln), sowie von Zebrafischen aus einem „Naturaquarium“ gegenübergestellt (Abb. 9). Der höchste ET-Gehalt wurde in den Wildfängen und den Fischen aus dem Naturaquarium gefunden. Die Wildfänge wiesen dabei einen 34-mal höheren ET-Gehalt als die Tiere aus der Fischanlage auf. Dies deutet darauf hin, dass der Gehalt an ET in Zebrafischen unter natürlichen Bedingungen gegenüber einer

Fischanlage deutlich erhöht ist.

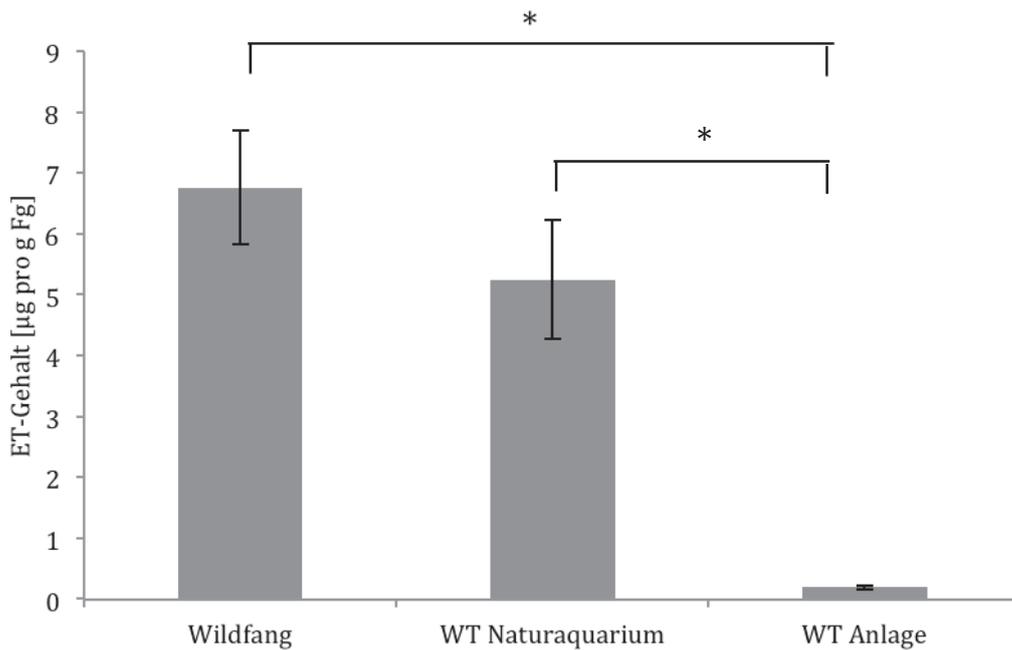


Abb. 9: ET-Gehalt-Vergleich Anlage, Wildfang, Naturaquarium

Dargestellt ist der mittlere ET-Gehalt adulter Zebrafische (MW \pm SEM, WT Anlage n = 7, Wildfänge n = 8, Fische aus Naturaquarium n = 7; m/z 230 \rightarrow 127). Die ET-Gehalte der Wildfänge und der WT-Tiere aus dem Naturaquarium sind signifikant höher als die der WT-Fische aus der Anlage im Gebäude des Institutes für Genetik (WT Anlage vs. Wildfang P = 0,0004; WT Anlage vs. WT Naturaquarium P = <0,0001).

3.2.2 ET in Cyanobakterien (*Phormidium spec.*)

Aufgrund der Ergebnisse aus dem vorherigen Versuch (3.2.1) wurden verschiedene Futtermittel, Pflanzen und Algen des „Naturaquariums“ im Labor als mögliche ET-Quelle per LC-MS/MS untersucht und der ET-Gehalt bestimmt. Der Algenaufwuchs (Abb. 10 links), welcher sich auf dem Kieselboden und zum Teil am Lufthebefilter befand, enthielt nachweislich ET (Abb. 12). Zudem wurden die Fische dabei beobachtet, wie sie die Algen sowohl absichtlich abzupften oder Teile des Bodenbewuchses beim Aufsammeln herabgesunkenen Futters passiv mit aufnahmen. Um ein genaueres Bild zur Artenbestimmung der Algen zu bekommen, wurden kleine Algenstücke in Petrischalen mit gefiltertem Aquarienwasser überführt und einige Tage in Fensternähe bei Raumtemperatur inkubiert. Es entstand hierbei eine sternförmige, fädige Wuchsform

(Abb. 10 rechts), welche zudem Gas produziert. Zu erkennen war dies an den anhaftenden Bläschen.

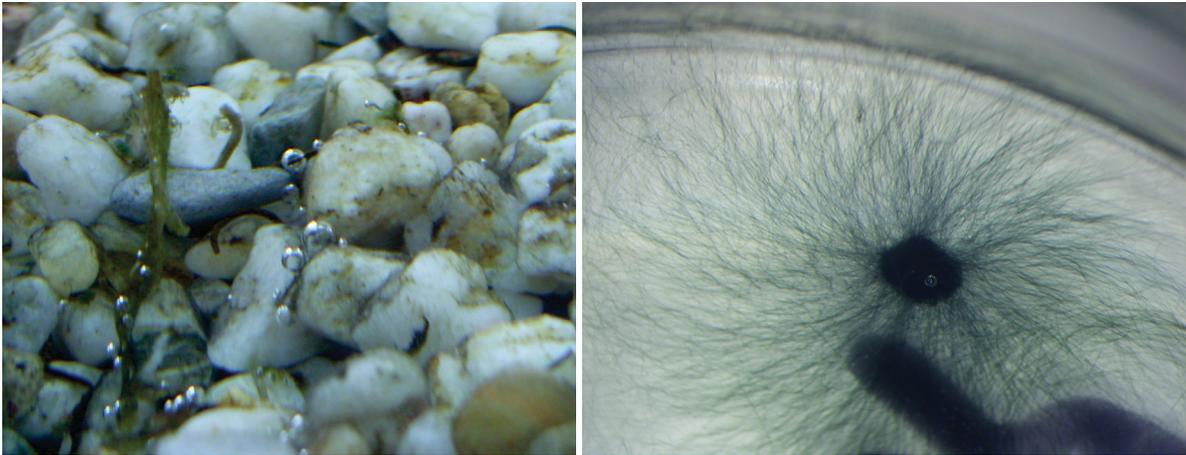


Abb. 10: Bewuchs im Naturaquarium

Dargestellt ist der Bewuchs von *Phormidium spec.* auf der Kieselschicht des Naturaquariums (links). Die Sauerstoffproduktion durch Photosynthese ist an den Gasbläschen auf der Oberfläche zu erkennen. Auf der rechten Seite ist das sternförmige Wachstum, welches die Fäden in einer Petrischale mit gefiltertem Aquarienwasser zeigen, dokumentiert. Auch hier signalisiert ein Gasbläschen die Photosynthesetätigkeit. Fotografie durch Binokkular mit 10-facher Vergrößerung.

Der algenartige Bewuchs im Aquarium wurde mit Hilfe von Dr. Karl-Heinz Linne von Berg (Botanisches Institut der Universität zu Köln) als Cyanobakterienart bestimmt. Der fädige Wuchs (Abb. 11 links) und die Gallertscheiden am Ende der Fäden (Abb. 11 rechts) identifizierten den Bewuchs als *Phormidium spec.*

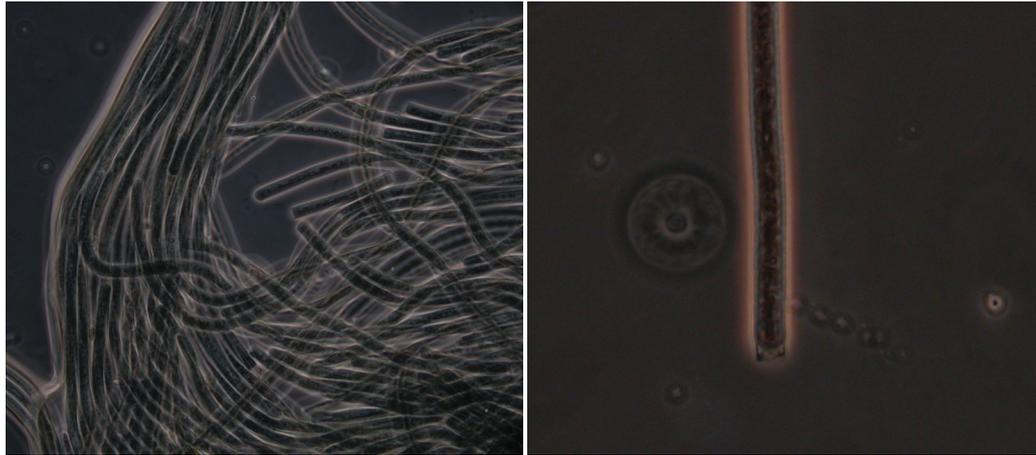


Abb. 11: *Phormidium sp.*

Dargestellt ist eine mikroskopische Aufnahme von *Phormidium spec.* Links ist das typische Flechtwerk des Cyanobakteriums zu erkennen, während rechts die typische Gallertscheide am Ende des Phormidiumfadens zu sehen ist (Vergrößerung: linkes Bild 400-fach; rechtes Bild 630-fach Ölimersion).

3.2.3 ET-Gehalt in Cyanobakterien, Pilzen, Rot- und Grünalgen sowie Fischfutter und Nahrungsergänzungsmitteln

Die Identifizierung des Cyanobakteriums *Phormidium spec.* als ET-Quelle führte zu der Überlegung, dass diese aquatische ET-Quelle dazu verwendet werden könnte, die Versuchsfische aus der Fischanlage dauerhaft ausreichend mit ET zu versorgen. Nach Recherchen zu Cyanobakterien erschien der prominente Vertreter *Spirulina (Arthrospira) platensis* als geeignetes Futtermaterial. Dies resultierte aus der Tatsache, dass *Spirulina* schon in verschiedenen Futtermitteln eingesetzt wird und die Verträglichkeit bekannt ist. In diesem Versuch sollte nun ermittelt werden, ob auch das Cyanobakterium *Spirulina platensis* ET enthält. Weiterhin galt es herauszufinden, welches Fischfutter oder Nahrungsergänzungsmittel ET am höchsten konzentriert enthält und somit als Zusatzfutter für die Versuchsfische besonders geeignet ist. Zudem wurden auch Proben welche nicht zu den Cyanobakterien gehören als Referenzproben eingesetzt (*Valisneria spec.*, *A. linnaei* (Grünalge), *Rhodochorton sp.* (Rotalge), Babyfutter Genetik, Artemieneier, Brennessel, ST-Granulat, Chlorellapulver, Algenfutterblätter Dennerle). Als Positivkontrolle diente der Austernpilz, von dem bereits bekannt ist, dass er ET enthält und produziert [117].

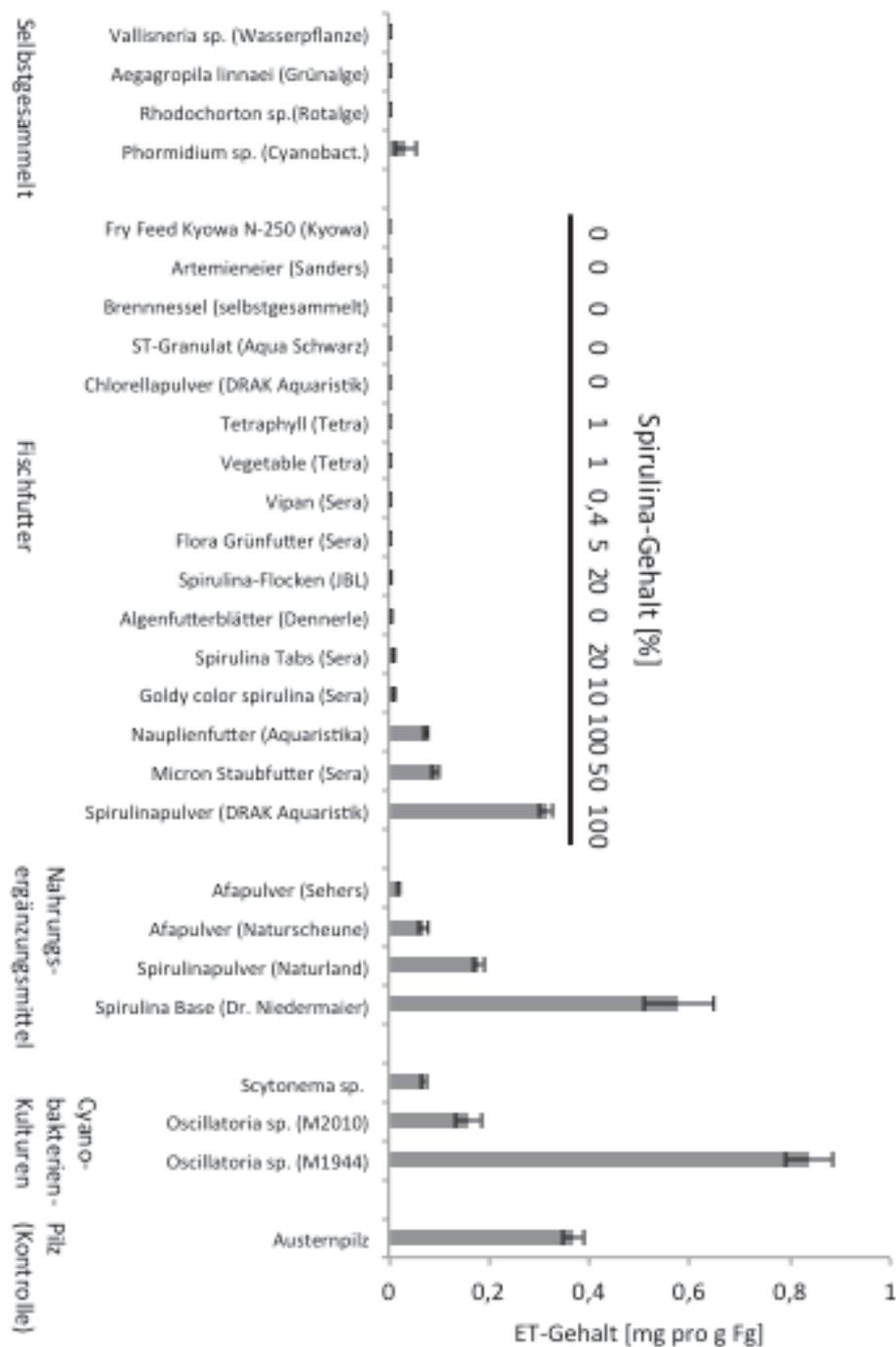


Abb. 12: ET-Gehalt in Fischfutter, Nahrungsergänzungsmitteln, Cyanobakterien und Pilz. Dargestellt ist der mittlere ET-Gehalt in Fischfutter, Nahrungsergänzungsmitteln, kultivierten Cyanobakterien und einer Pilzart (Austernpilz; als positiver Referenzwert) ($MW \pm SEM$, $n = 3$; m/z 230 \rightarrow 127). Die prozentualen Angaben zum Spirulina-Gehalt wurden den Verpackungen oder der persönlichen Korrespondenz des Herstellers entnommen. Abbildung verändert nach Pfeiffer et al. 2011 [118].

Wie Abb. 12 zu entnehmen ist, gibt es eine Korrelation zwischen Cyanobakteriengehalt (*Afa* und *Spirulina spec.*) von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln und ihrem ET

Gehalt. Dieser übersteigt sogar teilweise (*Spirulina* Base Dr. Niedermaier und *Oscillatoria spec.* M1944) den ET-Gehalt des Austernpilzes, welcher als eine der ET-reichsten Pilzarten [117] als Positivreferenz eingesetzt wurde. Das Futtermittel mit dem höchsten ET-Gehalt ist das Spirulinapulver von DRAK-Aquaristik.

3.2.3.1 ET-Gehalt-Steigerung im Fisch durch Spirulinafütterung

Um sicherzustellen, dass eine Fütterung mit Spirulinapulver den ET-Gehalt im Fisch erhöht, wurde ein Fütterungsversuch durchgeführt. Hierbei wurden Fischen aus der Fischanlage der Genetik zu definierten Zeitpunkten (0, 1, 3 und 5 Tage) mit Spirulinaflocken (hergestellt aus 100% Spirulinapulver, Drak Aquaristik; s. Fischfutterherstellung 2.1.5 S. 14) gefüttert (Abb. 13). Die Fische wurden anschließend jeweils 24 Stunden nicht gefüttert und euthanasiert. Der ET-Gehalt wurde auf das Frischgewicht der Fische normiert. Wie in Abb. 13 gezeigt, steigert bereits eine einmalige Fütterung mit ET dessen Gehalt im Fisch.

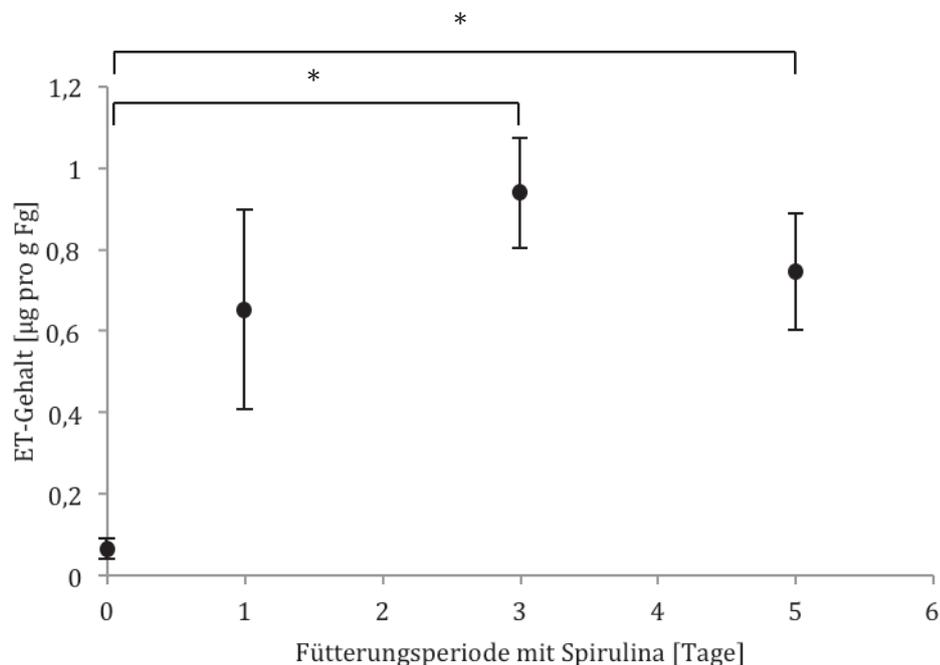
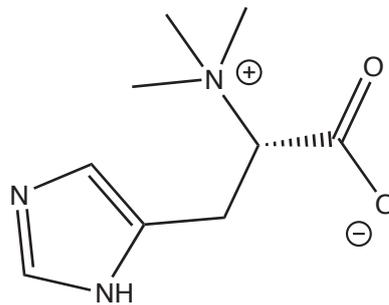


Abb. 13: Fütterungsversuch

Dargestellt ist der mittlere ET-Gehalt im Ganzfischhomogenat (MW ± SEM, n = 4; m/z 230 → 127). Dieser steigt während der Fütterung mit Spirulina an und ist am dritten Tag signifikant höher als der

Ausgangswert zum Zeitpunkt 0. Um den Fischen ausreichend Zeit zu geben das gefütterte ET zu absorbieren, wurden sie jeweils 24 Stunden nach dem angegebenen Fütterungszeitpunkt euthanasiert. Eine One-Way-ANOVA mit Tukey-Post-Hoc-Test ergab eine signifikante Zunahme des ET-Gehaltes nach 3 und 5 Tagen Fütterung gegenüber Tag 0. Abbildung verändert nach Pfeiffer et al. 2011 [118].

3.2.4 ET- und Herzyningehalt in verschiedenen Cyanobakterien, Rot- und Grünalgen



Herzynin

Abb. 14: Strukturformel von Herzynin

Gezeigt ist das ET-Syntheseintermediat Herzynin.

Aufbauend auf der Erkenntnis, dass Cyanobakterienarten ET in deutlichen Mengen enthalten, sollte nun geklärt werden, ob Cyanobakterien ET auch produzieren. Um dies zu belegen, sollte im folgenden Versuch Herzynin, ein bekanntes Zwischenprodukt der ET-Synthese in Pilzen und Mykobakterien [119, 16, 18], in Cyanobakterien nachgewiesen werden (Abb.15). Grün- und Rotalge dienten in diesem Versuch als Referenzmaterial (Negativkontrolle).

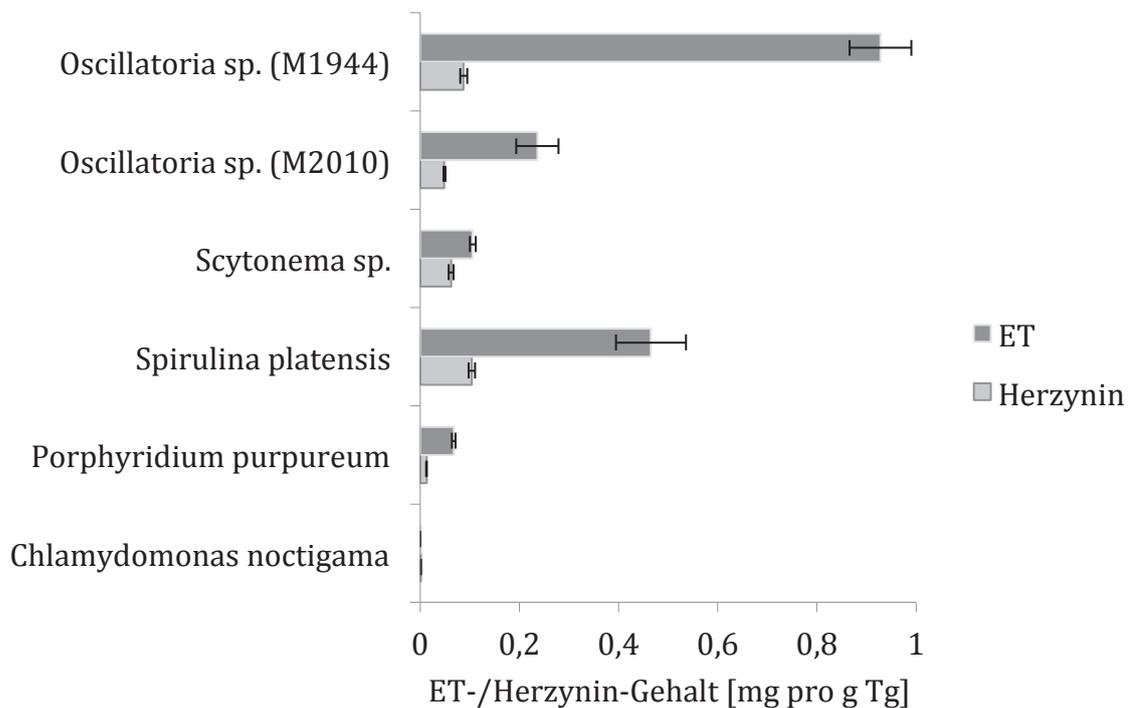


Abb. 15: ET-Synthesenachweis

Dargestellt ist der mittlere ET- und Herzynin-Gehalt ($MW \pm SEM$, $n = 3$; ET m/z 230 \rightarrow 127, Herzynin m/z 198 \rightarrow 95) in *Chlamydomonas noctigama* (Grünalge/Chlorophyta), *Porphyridium purpureum* (Rotalge/Rhodophyta), *Scytonema spec.* (Blualge/Cyanobacteria), *Oscillatoria spec.* (CCAC M2010) (Blualge/Cyanobacteria), *Arthrospira platensis* (Blualge/Cyanobacteria) und *Oscillatoria spec.* (CCAC M1944) (Blualge/Cyanobacteria). Abbildung verändert nach Pfeiffer et al. 2011 [118].

Wie in Abb. 15 gezeigt, gibt es eine Korrelation zwischen den Gehalten an ET und Herzynin. Das Zwischenprodukt Herzynin tritt nur dann auf, wenn eine ET-Synthese stattfindet. Dies bedeutet, dass in der Grünalge keine und in der Rotalge nur eine mäßige ET-Synthese stattfindet. Die drei Cyanobakterienarten, welche einen deutlichen höheren ET-Gehalt aufweisen, zeigten korrelierend dazu auch einen höheren Gehalt an Herzynin. Ergebnis dieses Versuches ist, dass die untersuchten Cyanobakterien als ET-Produzenten identifiziert werden konnten.

3.2.5 Gehalt der Verbindung Nr. 3 in verschiedenen Algen

In seiner Arbeit aus dem Jahre 2010 beschreibt Seebeck anschaulich ein Model für die ET-Synthese in *Mykobakterium smegmatis* [19]. Um den Syntheseweg der

Cyanobakterien weiter aufzuklären wurde der Versuch unternommen, die von Seebeck identifizierte Zwischenstufe „Verbindung Nr. 3“ (Abb. 16) per LC-MS/MS-Analyse nachzuweisen. Das Intermediat wurde von Herrn Dr. Florian Seebeck (Max Planck Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland) zur Verfügung gestellt. In der zugesandten Probe war die Verbindung in geringen Mengen nachweisbar. In den Cyanobakterien-Proben konnte die Verbindung dagegen nicht nachgewiesen werden.

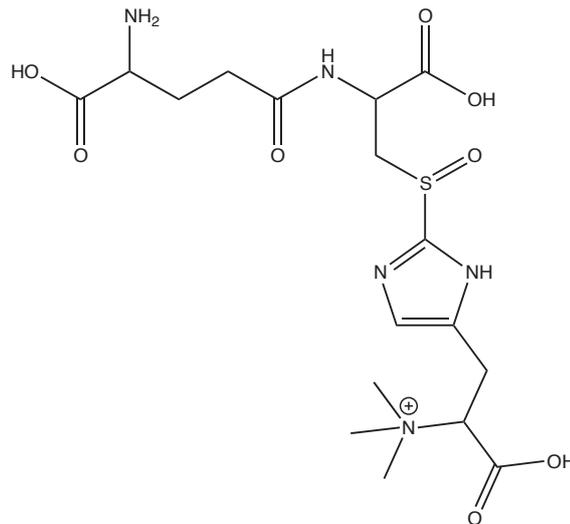


Abb. 16: Strukturformel der „Verbindung Nr. 3“

Möglichen ET-Syntheseintermediates „Verbindung Nr. 3“ (Seebeck 2010 [19]).

3.2.6 ET-Gehalt in Flechten

Die Recherche zu verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Cyanobakterien und Pilzen ergab, dass Symbiosen existieren, welche beide Spezies verbinden. In Flechten finden sich symbiontische Lebensgemeinschaften zwischen einem Pilz und einer Grünalge und/oder Cyanobakterien. Es wurde eine ET-Gehaltsbestimmung in drei verschiedenen Flechtenarten durchgeführt. Eine dieser Flechten (*Cetraria islandica*) weist eine Symbiose zwischen einem Pilz und einer Grünalge. Die anderen beiden Flechten (*Collema tenax* und *Leptogium gelatinosum*) bestehen aus einer Symbiose von Pilz und Cyanoabakterium. In allen drei Flechten wurde ET nachgewiesen, allerdings in Mengen, die deutlich niedriger sind als jene in den Cyanobakterien und dem Austernpilz (Abb. 12).

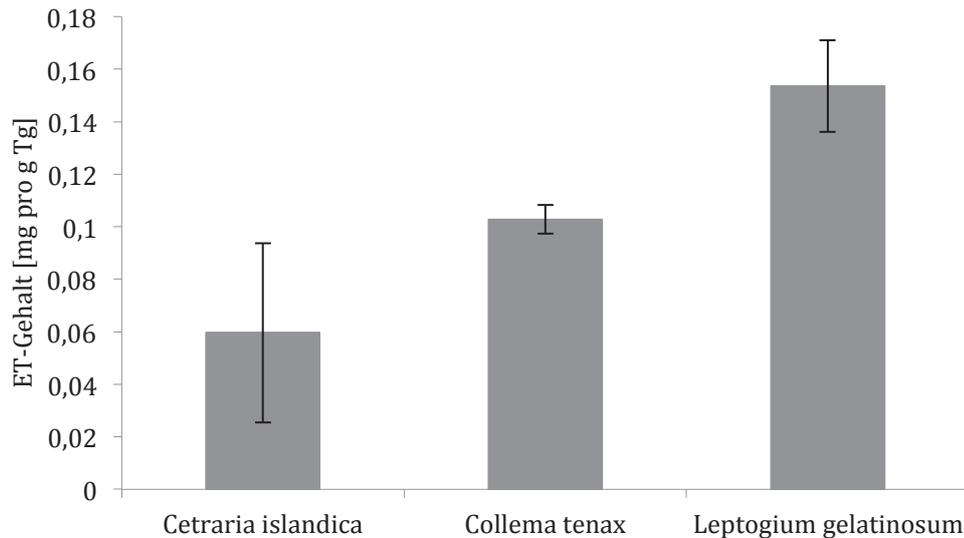


Abb. 17: ET-Gehalt in Flechten

Dargestellt ist der mittlere ET-Gehalt von *Cetraria islandica*, *Collema tenax* und *Leptogium gelatinosum* (MW \pm SEM, n = 3; m/z 230 \rightarrow 127). Bei *Cetraria islandica* handelt es sich um eine Symbiose zwischen Grünalge und Pilz, bei den anderen beiden Flechten um eine Symbiose zwischen Cyanobakterien und einem Pilz.

3.3 ET-Verteilung in ausgewählten Organen normiert auf Gewicht

Um zu ermitteln, welche Zebrafischorgane den höchsten ET-Gehalt aufweisen und so für die nachfolgenden Experimente am besten geeignet sind, wurde eine ET-Gehaltsbestimmung per LC-MS/MS durchgeführt. Es wurde auf das Frischgewicht normiert. Die Organe wurden nicht geschlechtsspezifisch getrennt, da es bereits in der Dissertation von Dr. Markus Bach (2009) [92] keine Hinweise darauf gab, dass das Geschlecht eine Rolle bezüglich des ET-Gehaltes in den Organen spielt [92]. Um bei der ET-Gehaltsbestimmung des Darmes keine Artefakte durch ET-haltige Futterreste zu erzeugen, wurden die Fische 3 Tage vor dem Versuch nicht mehr mit ET-haltigem Futter und 24 Stunden vor der Euthanasie gar nicht mehr gefüttert. Zudem wurde der Darm nach der Entnahme durch Ausstreichen von sämtlichem Inhalt befreit. Die Abb. 18 zeigt, dass der höchste ET-Gehalt in Haut und Darm zu messen ist. Der Gehalt der Augen ist etwas höher als jener in Herz, Hirn und dem restlichen Fisch.

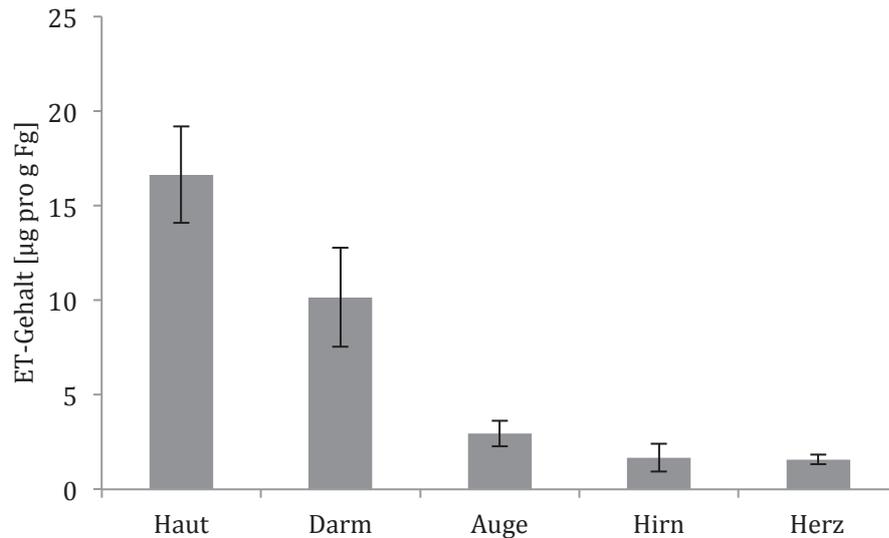


Abb. 18: Organverteilung von ET im Zebrafisch

Dargestellt ist der mittlere ET-Gehalt in ausgewählten Organen des adulten Zebrafisches ($MW \pm SEM$, $n = 2$). Die Zebrafischhaut (Schwanzflossensaum) wurde hier erstmalig im Vergleich untersucht.

3.3.1 ET-Verteilung in verschiedenen Körperregionen der Zebrafischhaut

Da in dieser Arbeit das erste Mal das verstärkte Auftreten von ET in der Zebrafischhaut dokumentiert wurde, erfolgte eine detaillierte Analyse zur ET-Verteilung in verschiedenen Hautbereichen (Abb. 19). Die Hautbereiche (Abbildung zur Präparation, Abb. 5) wurden hinsichtlich ihrer Pigmentierung aufgeteilt. Die Brustflosse (gelbe Pigmente), Schwanzflosse (gelbe Pigmente und blaue Pigmente), der Bauchbereich (silberne Pigmente), der gestreifte Seitenbereich (silberne und blaue Pigmente) und der Rückenbereich (graue Pigmente) wurden separat mittels LC-MS/MS auf ihren ET-Gehalt untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Hautbereichen gemessen.

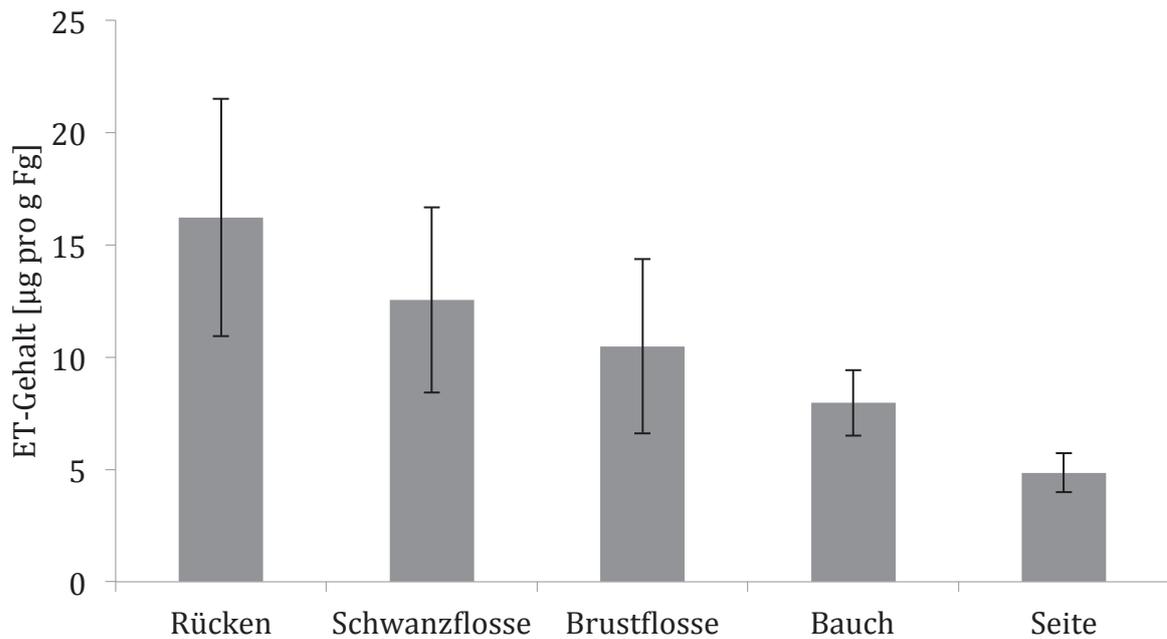


Abb. 19: ET in verschiedenen Bereichen der Zebrafischhaut

Dargestellt ist der mittlere ET-Gehalt ausgewählter Hautbereiche des adulten Zebrafisches ($MW \pm SEM$, $n = 3$; $230 \rightarrow 127$). Nur Unterschied in Rücken vs. Seite signifikant nach Eine Repeated-measures-ANOVA mit Tukey-Post-Hoc-Test ergab einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen Rücken- und Seitenbereich. Separat wurde ein gepaarter t-Test zwischen den Werten für Rücken und Seite durchgeführt, welcher einen nicht signifikanten Unterschied ergab.

3.3.2 Quantitativer PCR-Nachweis des ETT in Haut und in ausgewählten Referenzorganen adulter Zebrafische

Da bisher ein Nachweis des ETT in der Zebrafischhaut fehlte, wurde eine quantitative PCR zum Nachweis der ETT-mRNA durchgeführt. Zunächst wurde dazu aus einzelnen Organen die Gesamt-RNA isoliert. Als Negativkontrolle wurden Herz und Leber ausgewählt; das Gehirn, die Augen und die Haut dienten als Positivkontrolle. Pro Organ wurden 3 separate Proben aufbereitet und analysiert. Für jede Probe wurden drei (Herz) bzw. zwei Organe (alle übrigen Organe) verwendet.

Nach der Isolation der Gesamt-RNA wurde diese auf ihre Qualität untersucht. Hierzu wurde jeweils ein Aliquot der Gesamt-RNA-Lösung gelelektrophoretisch untersucht. Bei intakter RNA sind auf dem Gel deutliche Banden der ribosomalen Untereinheiten zu

erkennen (Abb. 20).

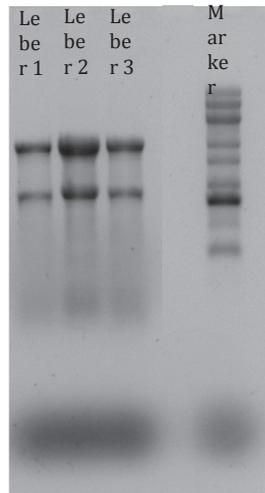


Abb. 20: Kontrolle RNA-Qualität

Ausschnitt aus einem Agarose-Gel zur Kontrolle der Gesamt-RNA-Qualität. (Eine Region wurde mit Hilfe des Programms Photoshop entfernt, um den Marker näher an die Probenbanden zu bringen). Zu erkennen sind (von oben nach unten) die Banden für 28S-rRNA (4718 nt), 18S-rRNA (1874 nt) (Marker: 0,5–10kb RNA-Ladder, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland).

Ein weiterer Kontrollschritt erfolgte nach der reversen Transkription. An dieser Stelle wurde mittels Endpunkt-PCR die erfolgreiche Umschreibung der mRNA in cDNA nachgewiesen. Als Kontrollgen diente β -Aktin (Haushaltsgen). Auf dem in Abb. 21 gezeigten Gelausschnitt sind die Banden des β -Aktins (202bp) zu erkennen. Da in allen Ansätzen die gleiche Menge RNA eingesetzt wurde, weisen die Banden eine vergleichbare Stärke auf.



Abb. 21: Kontrolle cDNA

Ausschnitt aus dem Gel der β -Aktin Endpunkt-PCR zur Kontrolle der Qualität der cDNA (A = Auge, HA = Haut, M = Marker). Bei erfolgreicher Umschreibung sollten gleichmäßig starke Banden bei 202 bp erkennbar sein (Marker: 100 bp DNA-Leiter, Promega, Mannheim, Deutschland).

Nach Kontrolle der cDNA durch Gelelektrophorese wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Hierzu wurde eine Sonde nach dem TaqMan-Prinzip eingesetzt. Da bei der quantitativen PCR eine Normierung der Proben notwendig ist, wurde das Haushaltsgen β -Aktin als Referenzgen ausgewählt. Es wurde von jeder Probe eine quantitative Messung für die mRNAs des ETTs sowie des β -Aktins durchgeführt. Ausgewertet wurde das Ergebnis über simultane Kurvenanpassung (Abb. 22).

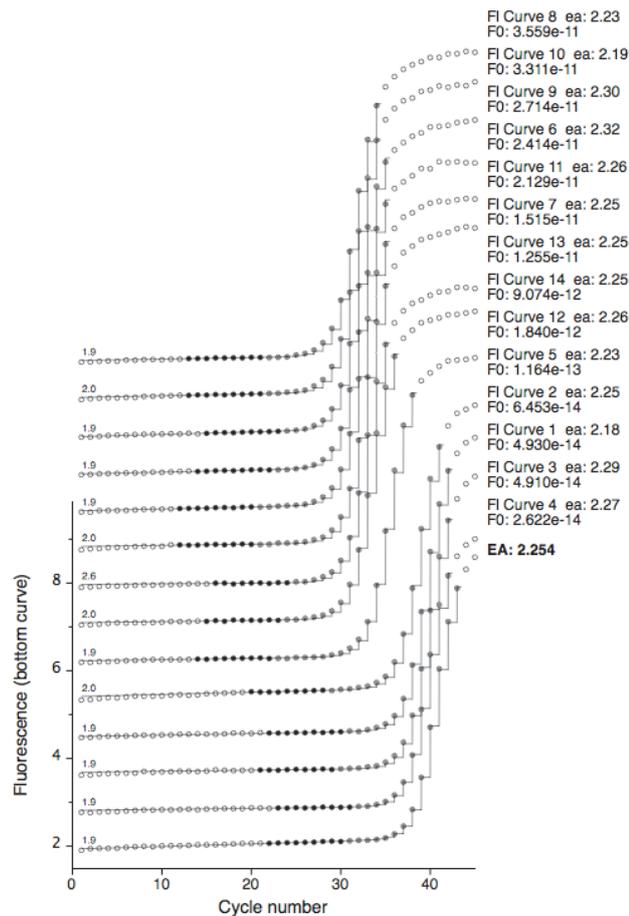


Abb. 22: Simultane Kurvenanpassung

Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis einer simultanen Kurvenanpassung. Berechnet wurde die initiale Fluoreszenz (F_0) und die Amplifikationseffizienz (EA). Aufgetragen wurde die Fluoreszenz gegen die Zyklusnummer, wobei jeder Punkt im Diagramm für einen PCR-Zyklus steht.

Aus den Werten der Initialen Fluoreszenz (F_0) für Transporter- und Referenzgen wurde zur Normierung der Quotient gebildet ($F_0 \text{ ETT} / F_0 \beta\text{-Aktin}$). Zur Erstellung einer grafischen Darstellung des ETT-Expressionsmusters wird die Expression relativ dargestellt. Das Organ mit dem höchsten F_0 -Quotienten dient hierbei als Referenz. Wie in Abb. 23 gezeigt, wurde keine bzw. nur eine geringe Expression des Transporters in Herz und Leber nachgewiesen, wohingegen in Hirn und Haut eine starke und im Auge eine mittlere relative Expression zu erkennen ist.

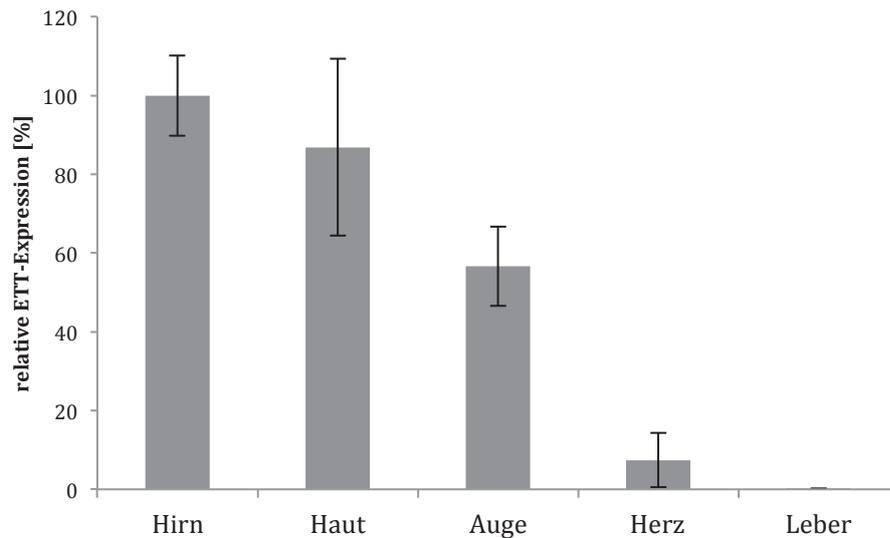


Abb. 23: ETT-Expressionsmuster

Dargestellt ist das Expressionsniveau des ETT in ausgewählten Zebrafischorganen ($MW \pm SEM$, $n = 3$). Zur Normierung der Daten wurde aus den Werten der Initialen Fluoreszenz (F_0) für Transporter- und Referenzgen der Quotient gebildet ($F_0 \text{ ETT} / F_0 \beta\text{-Aktin}$). Die Quotienten wurden auf den den Mittelwert desjenigen Organs mit dem höchsten Quotienten bezogen. Im Diagramm ist die ETT-Expression relativ zum Organ mit dem höchsten Quotienten ($F_0 \text{ ETT} / F_0 \beta\text{-Aktin}$) angegeben.

3.4 Unterschiede in Indikatormolekülen zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen unter Metallionenbelastung

In der Literatur gib es Hinweise darauf, dass ET eine Schutzfunktion bei der LPO haben könnte (z. B. [96]). Da ET möglicherweise erst bei erhöhtem oxidativen Stress seine Wirkung entfaltet, wurden versucht die Versuchstiere mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) belasten. Dazu wurde ein Versuchsaufbau konstruiert und in Vorversuchen geeignete Schwermetallkonzentrationen (0,16 mg/l Kupfer(II)-sulfat, 0,008 mg/l Blei(II)-acetat und 0,5 mg/l Zinksulfat) ermittelt (s. Unterpunkt Toxizitätstest 2.2.4.1 S. 17). Es wurden männliche und weiblichen Tiere gleichen Alters zufällig gepoolt verwendet.

Als Indikatormoleküle wurden Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) eingesetzt. Diese äußerst reaktiven, ungesättigten Aldehyde entstehen bei der LPO ungesättigter Fettsäuren. Die LPO wird zumeist von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) initiiert [120]. Aufgrund der hohen Reaktivität von MDA und HNE wurden diese

Verbindungen zur Messung per LC-MS/MS in dieser Arbeit nach der Methode von Andreoli et al. [112] mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) derivatisiert. Dies sollte die Ausbeute der messbaren LPO-Marker erhöhen.

3.4.1 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE)

Eine häufig verwendete Indikatorsubstanz für die Lipidperoxidation (LPO) ist HNE [120, 121]. Mit Hilfe von LC-MS/MS-Messungen wurde der Gehalt an HNE in Ganzfischhomogenaten von gestressten und ungestressten Fischen ermittelt. Es scheint eine Tendenz zu erhöhter LPO in den ETT^{-/-}-Fischen (Abb. 25), allerdings waren die Unterschiede nicht reproduzierbar signifikant (ungepaarter t-Test).

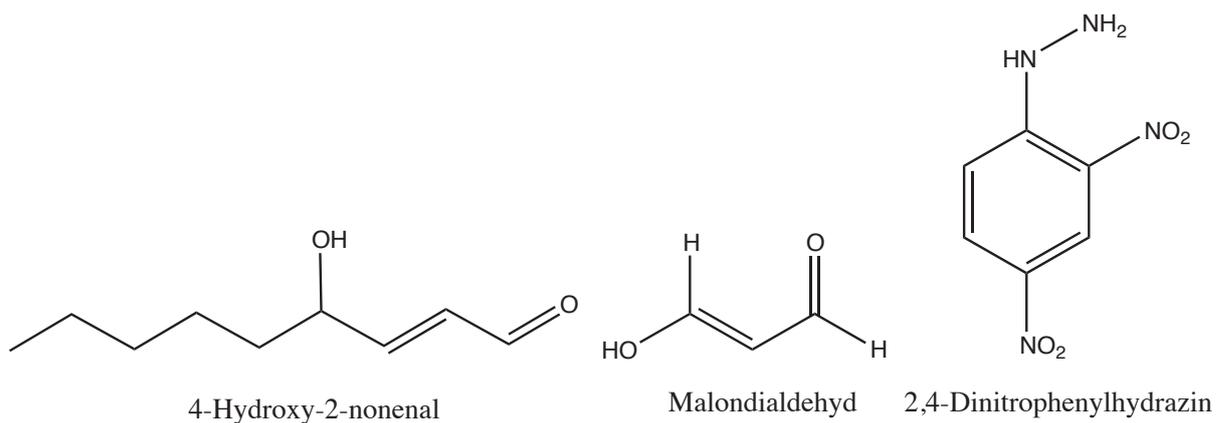


Abb. 24: Strukturformeln HNE, MDA und DNPH

Gezeigt sind die Strukturformeln der LPO-Biomarker 4-Hydroxy-2-nonenal und Malondialdehyd sowie des Derivatisierungsreagenzes 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH).

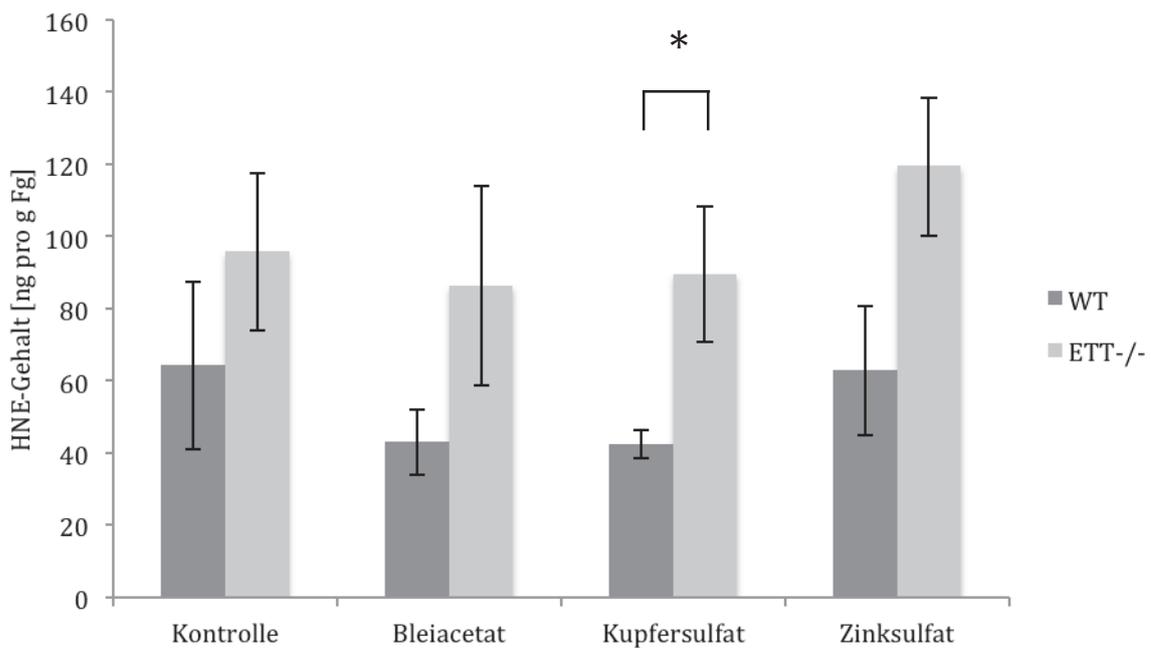


Abb. 25: HNE-Gehalt bei Metallionenbelastung

Dargestellt ist der mittlere HNE-Gehalt im Homogenat adulter Zebrafische (Bleia(II)-cetat: 0,008 mg/l, Kupfer(II)-sulfat: 0,16 mg/l; Zinksulfat 0,5 mg/l, MW \pm SEM, n = 6; m/z 335 \rightarrow 167). Die Proben wurden mit DNPH derivatisiert. Der Unterschied ist nur für Kupfer(II)-sulfat signifikant (P = 0,0349; ungepaarter t-Test).

Da der SEM bei der Vermessung von Ganzfischhomogenaten sehr groß war, wurde daraufhin mit Fischorganen gearbeitet. Hierbei wurden sowohl Organe ungestresster Fische (Abb. 27) als auch Organe nach Inkubation mit Schwermetallen (Abb. 26) analysiert. Der Standardfehler war bei diesen Versuchen kleiner (Abb. 26 und 27), die Unterschiede zwischen den Fischlinien allerdings ebenfalls nicht signifikant (ungepaarter t-Test). Die HNE-Gehalte der gestressten Fische sind im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht.

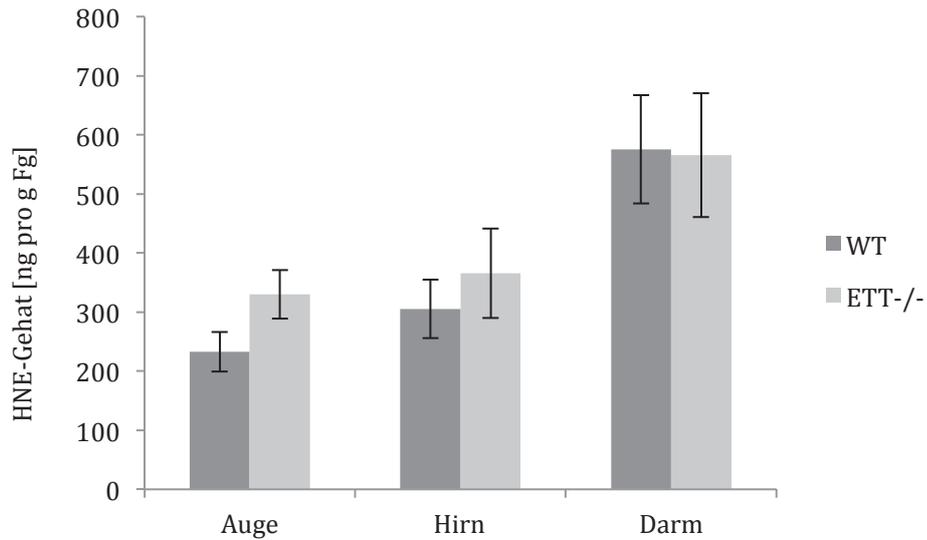


Abb. 26: HNE-Gehalt bei Blei(II)-acetatbelastung

Dargestellt ist der mittlere HNE-Gehalt in Organen adulter Zebrafische, die mit Blei(II)-acetat belastet wurden (MW \pm SEM, n = 3; m/z 335 \rightarrow 167). Die Unterschiede zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test). Alle Proben wurden mit DNPH derivatisiert.

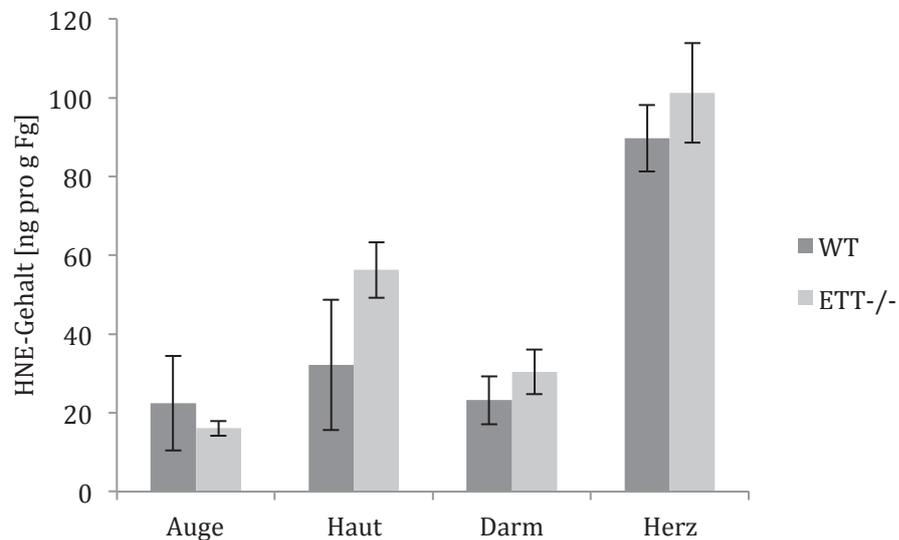


Abb. 27: HNE-Gehalt in ungestressten Fischen

Dargestellt ist der mittlere HNE-Gehalt in Organen ungestresster, adulter Zebrafische (MW \pm SEM, n = 6; m/z 155 \rightarrow 136). Alle Unterschiede sind nicht signifikant P= 0,6115 Auge, P= 0,2100 Haut, P= 0,4050 Darm, P= 0,4632 Herz (ungepaarter t-Test). Der Gehalt an HNE wurde ohne Derivatisierung des HNE mit DNPH gemessen.

Die in Abb. 27 gezeigten Ergebnisse resultieren aus einer HNE-Messung, in der HNE nicht mit DNPH derivatisiert wurde. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass HNE auch ohne Derivatisierung nachweisbar war. Da das DNPH eine extreme Orangefärbung aufweist und das Massenspektrometer stark verschmutzt wurden spätere HNE-Messreihen ohne Derivatisierung durchgeführt.

3.4.2 Malondialdehyd (MDA)

Eine weitere anerkannte Indikatorsubstanz für LPO ist Malondialdehyd (MDA) [120, 122, 121]. Bei Versuchen mit MDA-wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen bei Vermessung von Ganzfischhomogenaten gefunden (Abb. 28). Die MDA-Gehalte der gestressten Fische sind im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht.

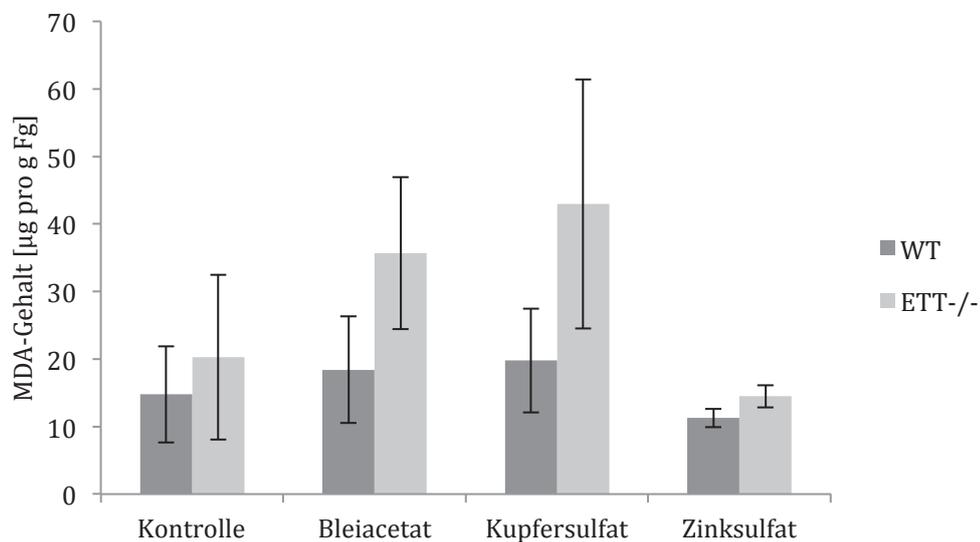


Abb. 28: MDA-Gehalt bei Metallionenbelastung

Dargestellt ist der mittlere MDA-Gehalt im Homogenat adulter Zebrafische (Blei(II)-acetat: 0,008 mg/l; Kupfer(II)-sulfat: 0,16 mg/l; Zinksulfat: 0,5 mg/l). (MW±SEM, Kontrolle WT n = 6; Kontrolle ETT^{-/-} n = 4; Blei(II)-acetat WT n = 5; Blei(II)-acetat ETT^{-/-} n = 5; Kupfer(II)-sulfat WT n = 5; Kupfer(II)-sulfat ETT^{-/-} n = 3; Zinksulfat WT und ETT^{-/-} n = 6). Die Unterschiede in den Wertepaaren sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test). Die Proben wurden mit DNPH derivatisiert.

3.5 Molekulare Unterschiede in WT- und ETT^{-/-}-Zebrafischorganen ermittelt durch LC-MS/MS-Differenzabtönung

Die Organe der Fische wurden mit einem speziellen Verfahren, der Differenzabtönung, vergleichend untersucht. Das System wurde ursprünglich entwickelt um Transportersubstrate in einem zellulären Expressionssystem (pEPTetD Vektor) zu identifizieren [123]. Bei der LC-MS/MS-Differenzabtönung handelt es sich um eine von Prof. Dr. Dirk Gründemann entwickelte Methode, um Molekülspektren von Zellkulturproben paarweise miteinander vergleichen zu können (siehe dazu Unterpunkt Differenzabtönung 2.5.2.1 S. 39). Das Verfahren schien ebenfalls geeignet molekulare Unterschiede zwischen den verwendeten Zebrafischgenotypen mittels LC-MS/MS zu ermitteln. Es wurden nur männliche Tiere exakt gleichen Alters und Größe verwendet, um eventuelle Artefakte auszuschließen. Dabei wurden sowohl gestresste als auch ungestresste Tiere (Kontrolle) verwendet. Jede Probe wurde mit vier verschiedenen LC-MS/MS-Methoden analysiert. Es wurden dafür zwei verschiedene HPLC-Säulen (HILIC und zicpHILIC) und für jede Säule zwei verschiedene Laufmittel („MeOH“ und „ACN“) verwendet (detailliert beschrieben im Unterpunkt Differenzabtönung 2.5.2.1 S. 39). Beide Säulen sind zur Auswertung polarer hydrophiler Verbindungen geeignet. Diese Eigenschaften treffen auf die meisten gelösten Verbindungen innerhalb von Zellen zu. Während die eine der verwendeten Säulen (HILIC) geeignet ist positiv geladene Moleküle zu analysieren, wird die andere Säule (zicpHILIC) zur Messung negativ geladener Verbindungen verwendet. Durch den Einsatz von Laufmitteln mit unterschiedlicher Elutionswirkung wird das Spektrum der messbaren Verbindungen zusätzlich erhöht. Ein Gradient der Laufmittel innerhalb der LC-MS/MS-Messung erhöht das Spektrum der messbaren Verbindungen zusätzlich. Durch die beschriebene Analysenanordnung soll ein möglichst großes Spektrum an in der Zelle enthaltenen Verbindungen gemessen werden.

Es wurden jeweils vier Organpärchen parallel untersucht, wobei innerhalb der durchgeführten Messreihen insgesamt 755 potentielle Unterschiede (= Signale)

gefunden wurden, die jeweils in vier parallel untersuchten Pärchen gleichzeitig auftraten. Jene Signale, die vermehrt auftraten oder sehr große Peakflächen-Unterschiede aufwiesen, wurden weitergehend untersucht. Die den ausgewählten Signale zugrunde liegende Verbindungen wurden wenn möglich durch Fragmentierung und mit Hilfe von Internet-Datenbanken (Metlin und Massbank [114, 115]) identifiziert. Separat durchgeführte Fullscans mit Fischen, die mit tBOOH (50 μM) gestresst wurden, erbrachten keine weiteren Signale.

Für die Untersuchungen der Einzelverbindungen (Carnitin, Acetylcarnitin, 8-Hydroxyguanin, 4-Hydroxychinolin, Xanthin, Kynurenin und Anserin; Strukturformeln Abb. 29) wurden jeweils als Positivkontrolle Organe mit starker Transporterexpression (Auge, Haut, Darm) und als Negativkontrolle Organe mit geringer bis nicht vorhandener Transporterexpression (Muskel oder Herz) verwendet. Der Muskel wurde aufgrund seiner größeren Masse bevorzugt, da nicht alle Verbindungen im deutlich kleineren Herz nachgewiesen werden konnten.

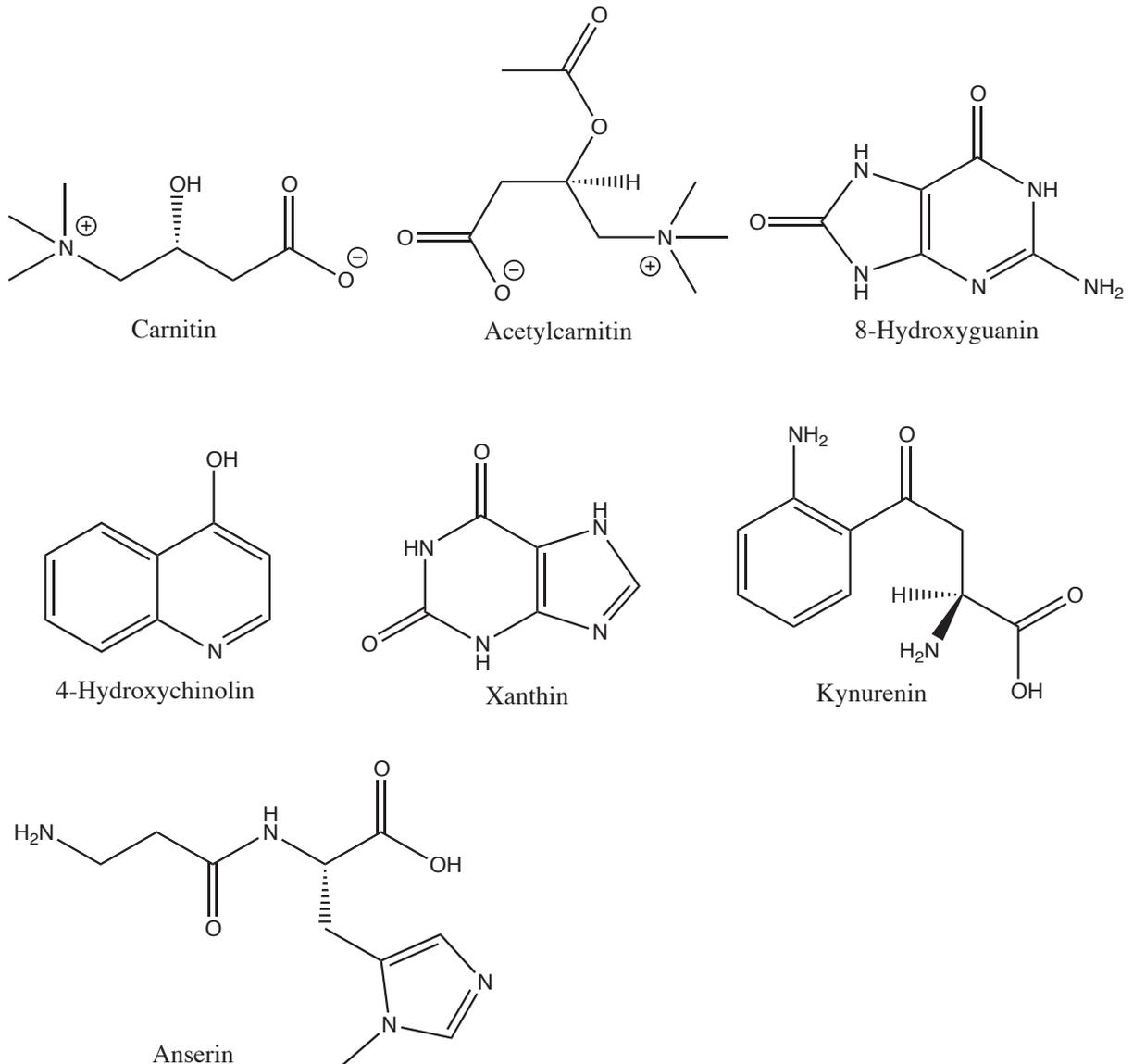


Abb. 29: Verbindungen aus Differenzabtönung

Dargestellt sind die Strukturformeln der durch Differenzabtönung identifizierten Verbindungen.

3.5.1 Carnitin

Signale für Carnitin konnten in verschiedenen Organen mit Hilfe der Differenzabtönung ermittelt und über Vergleich mit der Originalsubstanz verifiziert werden. Carnitin ist ein ubiquitäres Molekül, das u.a. unverzichtbar für den Energiestoffwechsel ist. Es unterstützt Fettsäuren dabei in die Mitochondrien zu gelangen. Hier werden die Fettsäuren durch β -Oxidation in Energie umgewandelt [124-126]. In drei aufeinander

folgenden Messungen, für die Fische unabhängig voneinander seziiert und vermessen wurde, wurde jeweils ein signifikanter Unterschied im Carnitin-Gehalt gezeigt. Die ETT^{-/-}-Fische enthalten immer in Auge, Haut und Muskel und manchmal im Darm signifikant weniger Carnitin als die WT-Fische (Abb. 30) (ungepaarter t-Test).

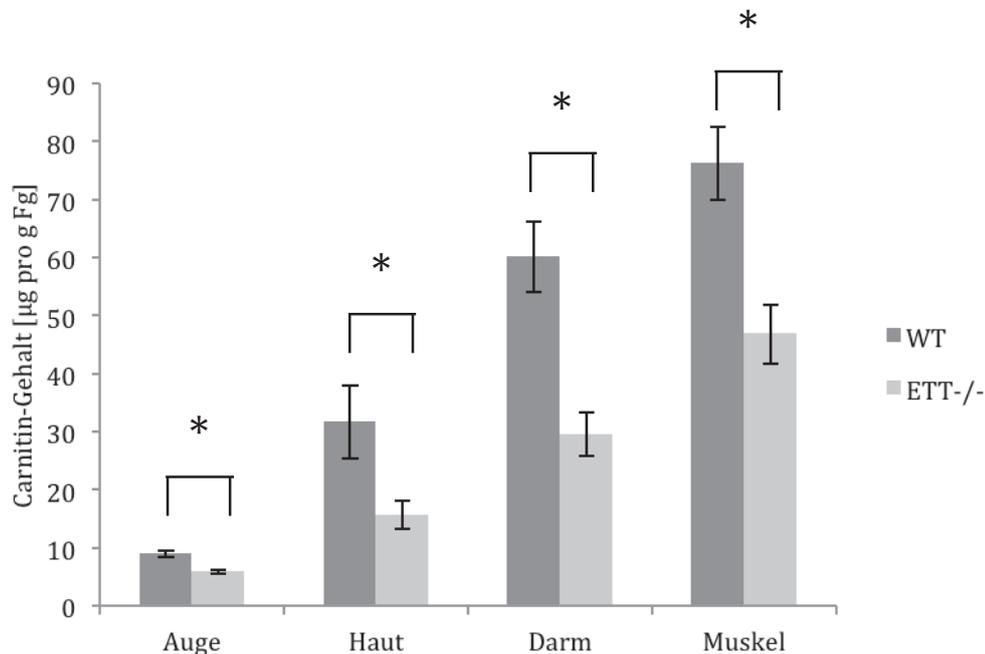


Abb. 30: Carnitin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Carnitin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 5; m/z 162 \rightarrow 103). Die Unterschiede im Carnitin-Gehalt sind in allen Organen signifikant (P = 0,0022 Auge; P = 0,0440 Haut; P = 0,0029 Darm; P = 0,0069 Muskel; ungepaarter t-Test).

3.5.2 Acetylcarnitin

Eine weiteres Signal, das mit Hilfe der Differenzabtönung ermittelt wurde, war das Acetylcarnitin. Das Signal wurde durch Fragmentspektrenvergleich mit der Originalsubstanz bestätigt. Das Acetylcarnitin ist zusammen mit dem Carnitin am Energiestoffwechsel beteiligt [124-126]. In mehrfachen Messungen mit unabhängig durchgeführten Präparationen wurde ein stabiler und signifikanter Unterscheid zwischen den Fischlinien festgestellt. Die ETT^{-/-}-Fische enthalten immer in Auge und Haut und meistens in Darm und Muskel signifikant weniger ET als die WT-Tiere (ungepaarter t-Test).

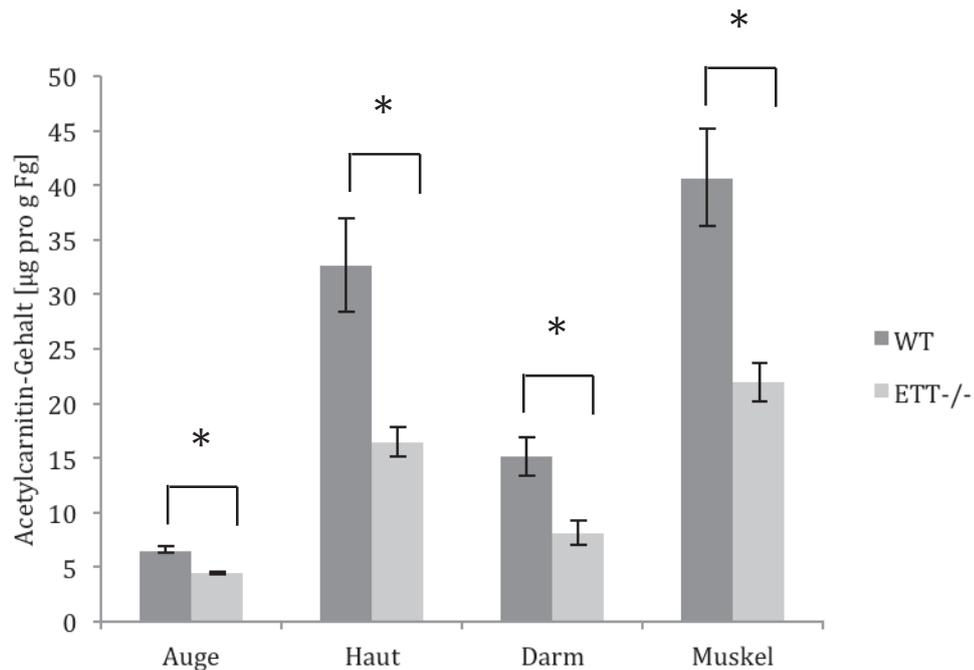


Abb. 31: Acetylcarnitingehalt

Gezeigt ist der mittlere Acetylcarnitin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische (n=5; MW±SEM; m/z 204 → 145). Die Unterschiede sind in allen Organen signifikant (Auge P = 0,0007; Haut P = 0,0065; Darm P = 0,0096; Muskel P = 0,0045; ungepaarter t-Test).

3.5.3 4-Hydroxychinolin (4-HQ)

Ein häufig auftretendes Signal war das des 4-HQ. Dieses Molekül ist Teil des Tryptophanmetabolismus. Hier wird es mit Hilfe der Monoaminoxidase (MAO) aus Kynuramin oder 5-Hydroxykynuremin gebildet [127]. Das Signal konnte zwar klar identifiziert werden, der Unterschied zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen ist allerdings nicht stabil. Als häufigstes Messergebnis (Abb. 32) traten höhere Konzentrationen an 4-HQ im WT-Fisch auf. Teilweise treten signifikanten Unterschiede auf (ungepaarter t-Test), die in anderen Experimenten komplett verschwunden sind oder sich in seltenen Fällen umkehren.

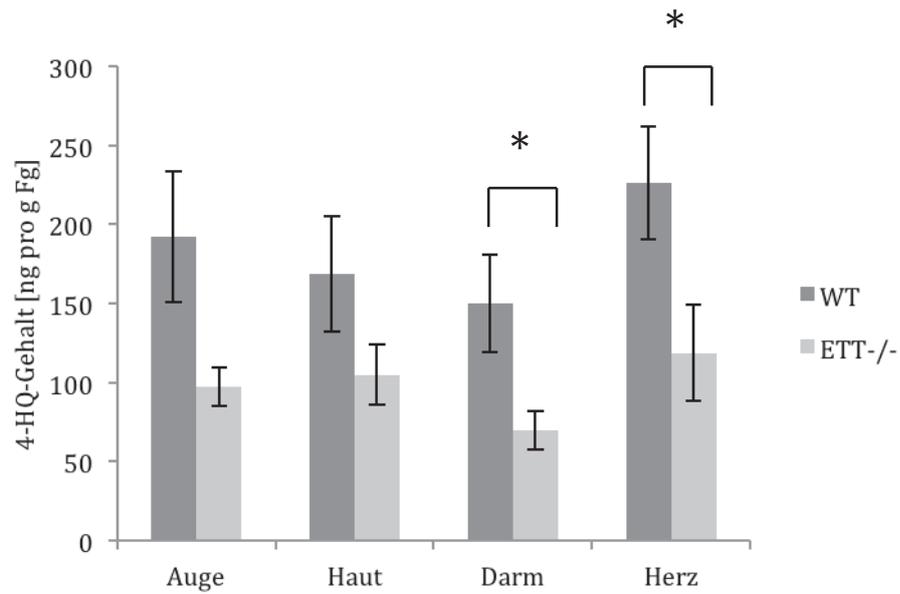


Abb. 32: 4-HQ-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere 4-Hydroxyquinolin in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 6; m/z 146 \rightarrow 91). Die Unterschiede sind in Darm (P = 0,0344) und Herz (P = 0,0457) signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.4 8-Hydroxyguanin

8-Hydroxyguanin (8-OH-G) ist ein bekannter Indikator für DNA-Läsionen [128-134]. In drei unabhängigen Präparationen und darauffolgenden Messungen wurde jeweils ein signifikant höherer Wert für 8-OH-G in der Haut der ETT^{-/-}-Fische gegenüber den WT-Fischen ermittelt (ungepaarter t-Test).

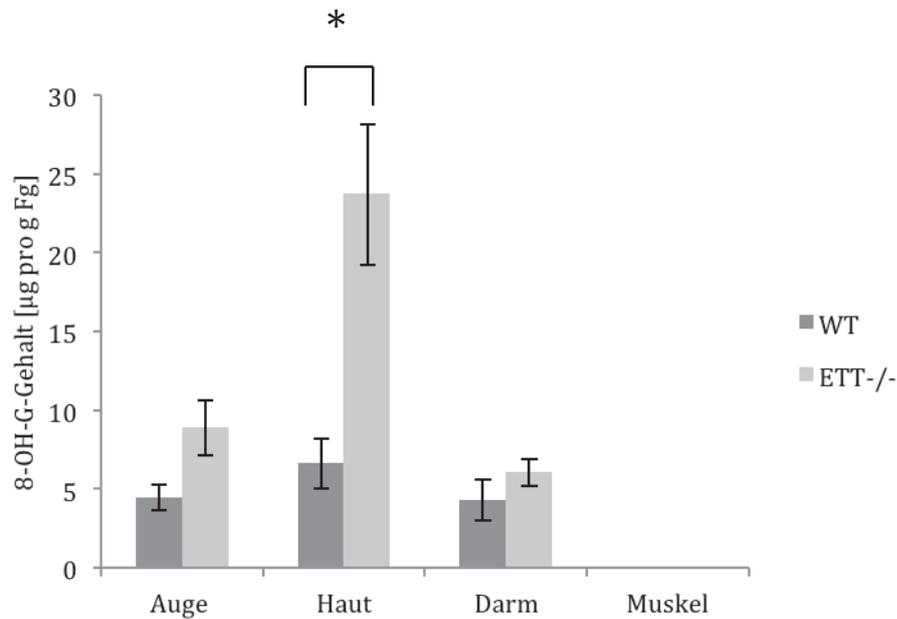


Abb. 33: 8-OH-G-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Gehalt an 8-Hydroxyguanin in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische (MW±SEM, n=5; m/z 165,8 → 148). Der Unterschied in der Haut ist signifikant (P = 0,0068; ungepaarter t-Test).

3.5.5 Anserin

Ein Signal, das häufig auftrat, aber schwer zu identifizieren war, weist starke Ähnlichkeit mit dem Fragmentspektrum des Anserins auf. Anserin ist ein histidinhaltiges Dipeptid, das Bestandteil der Skelettmuskulatur und des Gehirns von Vertebraten ist [135-139]. In diesen Geweben entsteht es durch Methylierung von Carnosin (Strukturformel Abb. 37) [140]. Aus diesem Grunde wurden nachfolgende Messungen angestellt. Anserin konnte lediglich im Darm nachgewiesen werden (Abb. 34). In anderen Organen (Auge, Haut, Hirn) lag es unter der Nachweisgrenze. Es konnte allerdings kein stabiler Unterschied zwischen den WT- und ETT^{-/-}-Fischen ermittelt werden.

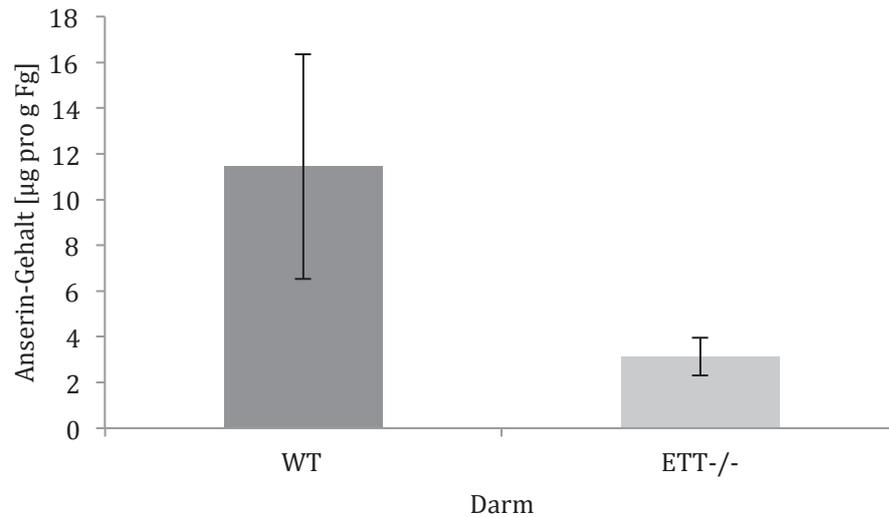


Abb. 34: Anserin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Anserin-Gehalt im Zebrafisch-Darm ungestresster adulter Zebrafische (MW \pm SEM, $n = 5$; m/z 241 \rightarrow 109). Der Unterschied im Gehalt zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen ist nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.6 Xanthin

Der Xanthin-Gehalt zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden verwendeten Fischlinien (Abb. 35) (ungepaarter t-Test).

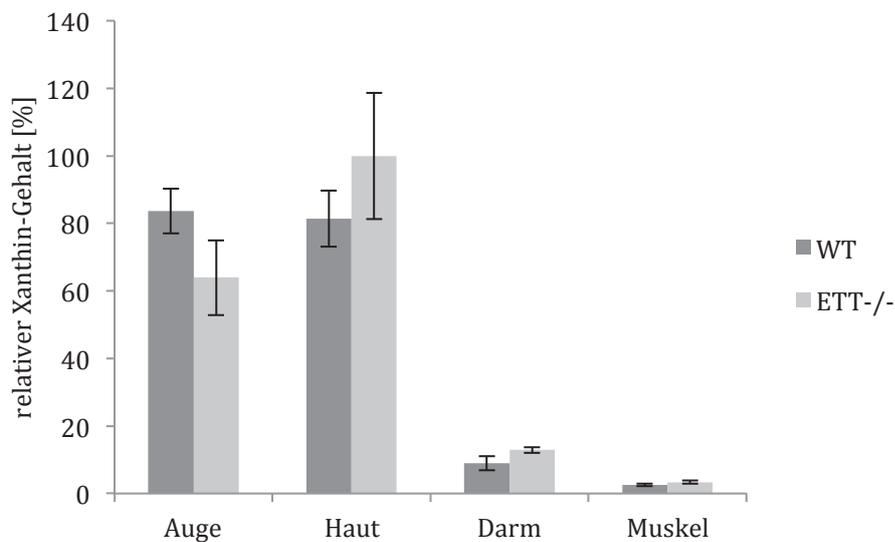


Abb. 35: Xanthin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere relative Xanthin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische. Die

Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. (MW \pm SEM, n = 5; m/z 151 \rightarrow 108). Die Unterschiede sind in allen Organen nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.7 Kynurenin

Das Kynurenin ist ein Molekül aus dem Tryptophanmetabolismus [127]. Der Kynurenin-Gehalt zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden verwendeten Fischlinien (Abb. 36) (ungepaarter t-Test).

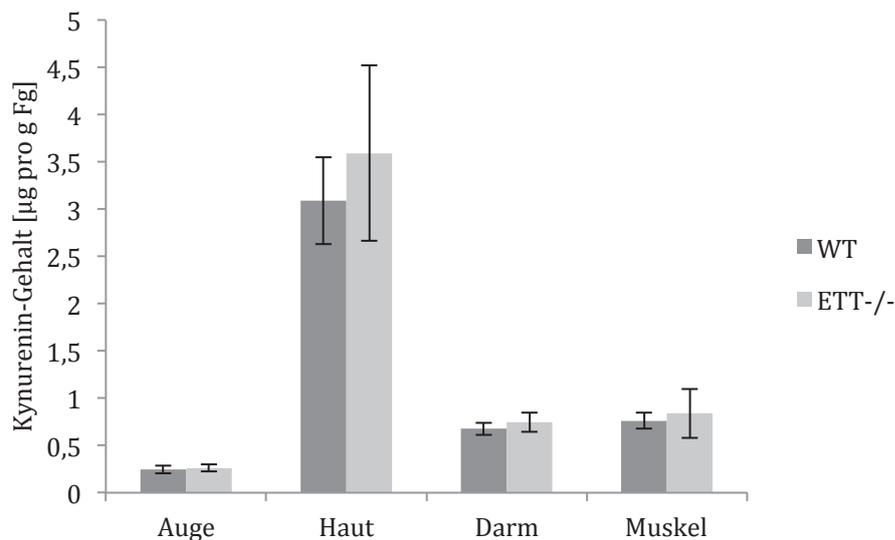


Abb. 36: Kynurenin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Kynurenin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 5; m/z 209 \rightarrow 146). Die Unterschiede sind in allen Organen nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8 Weitere getestete Verbindungen

Um auszuschließen, dass Unterschiede innerhalb der Molekülspektren durch eventuelle Artefakte aufgrund von Lagerung, Präparation oder Auswahl der Fische auftraten, wurde einer Auswahl unterschiedlicher Verbindungen aus verschiedenen

Stoffwechselwegen per LC-MS/MS gemessen. Dies beinhaltete die Verbindungen Histidin, Histamin, Carnosin, 3-Methyl-L-Histidin, Kynuramin, Butyrylbetain, β -Alanin, Aminolävulinsäure, Harnsäure, Taurin, Glycerophosphocholin, Riboflavin (Vitamin B2), L-DOPA, Neopterin, Tryptophan, o-Tyrosin und Prostaglandin E2.

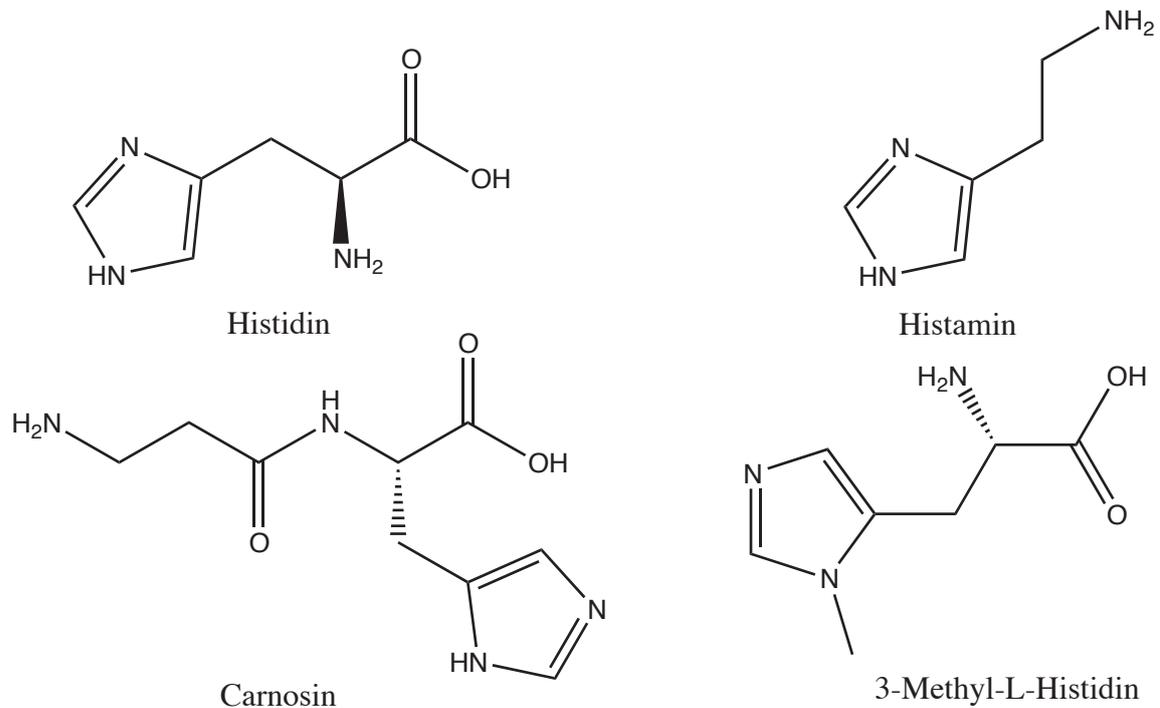


Abb. 37: Strukturformeln I

Strukturformeln weiterhin untersuchter Verbindungen (Teil 1) - Histidin und Histidin-Derivate.

3.5.8.1 Histidin

Das Histidin ist eines der Vorläufermoleküle des ET und weist große strukturelle Ähnlichkeit mit ihm auf [141, 20]. Histamin, Carnosin und Anserin sind ebenfalls Histidinderivate [140].

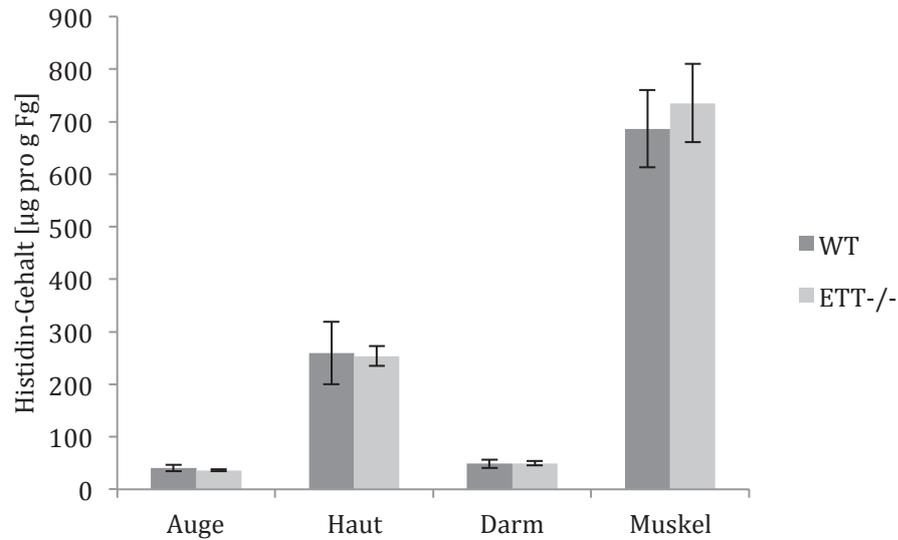


Abb. 38: Histidin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Histidin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische ($MW \pm SEM$, $n = 5$; $m/z 156 \rightarrow 110$). Die Unterschiede sind in allen Organen nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.2 Histamin

Histamin wird aus Histidin gebildet und wurde wie ET in Mutterkorn entdeckt [11, 142]. Es wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (ungepaarter t-Test).

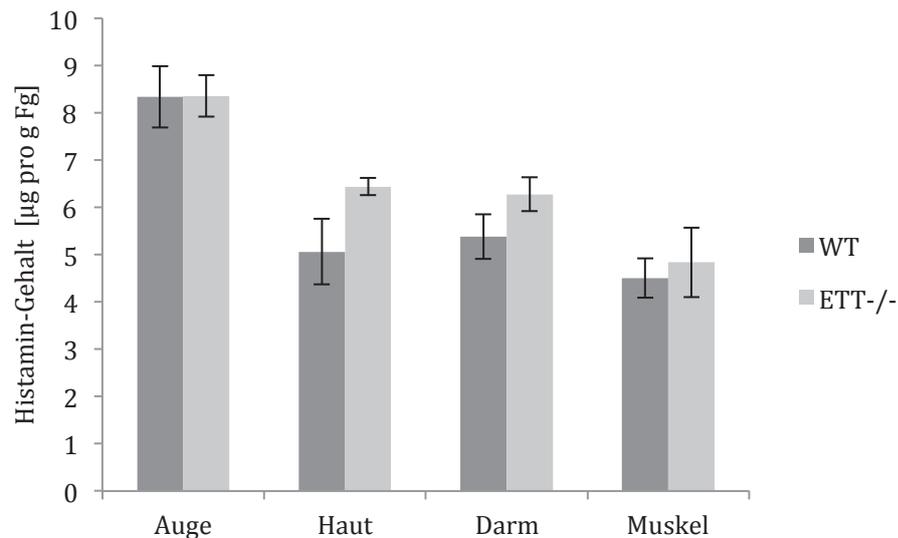


Abb. 39: Histamin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Histamin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische ($MW \pm SEM$, $n = 5$; $m/z 112 \rightarrow 95$). Die Unterschiede sind in allen Organen nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.3 Carnosin

Aufgrund strukturellen Verwandtschaft zum Anserin [140, 143] und der Ähnlichkeit der Fragmentspektren der beiden Moleküle wurden die Zebrafische ebenfalls auf ihren Carnosin-Gehalt untersucht. Es wurden dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt (ungepaarter t-Test).

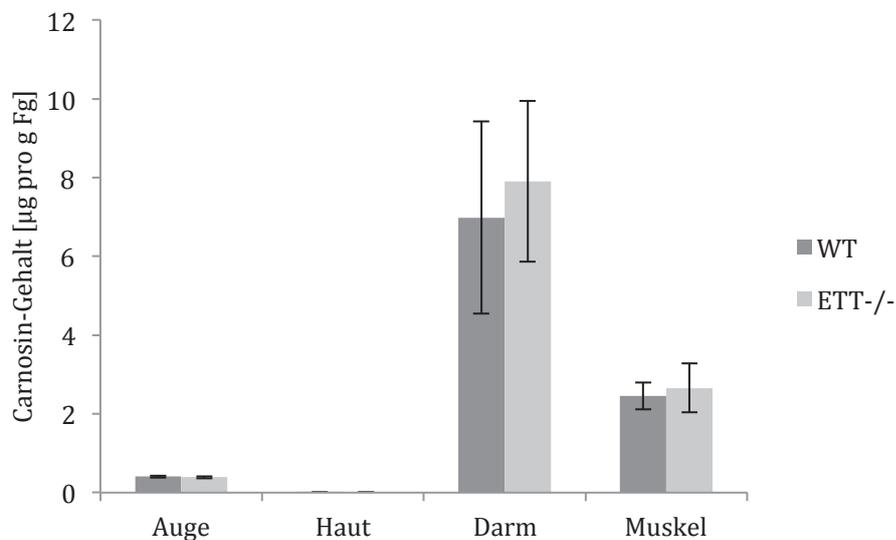


Abb. 40: Carnosin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Carnosin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische ($MW \pm SEM$, $n = 5$; $m/z 227 \rightarrow 110$). Die Unterschiede sind in allen Organen nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.4 3-Methyl-L-Histidin

3-Methyl-L-Histidin ist ein Histidinderivat, das in Aktin und Myosin enthalten ist [144, 145]. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und ETT^{-/-}-Fischen gemessen (ungepaarter t-Test).

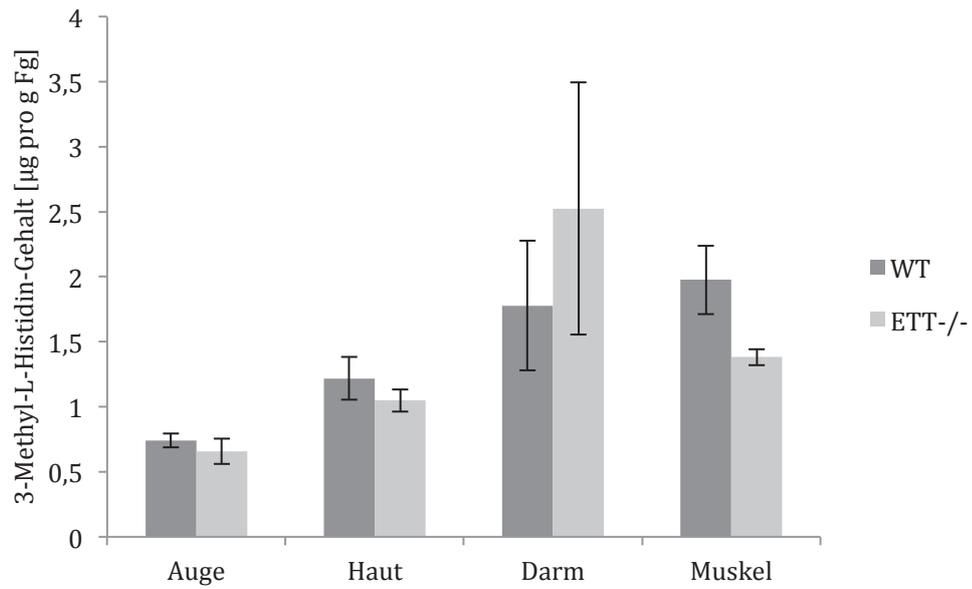


Abb. 41: 3-Methyl-L-Histidin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere 3-Methyl-L-Histidin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische ($\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n = 5$, bis auf ETT^{-/-} Darm: $n = 4$; m/z 170 \rightarrow 109). Die Unterschiede sind in allen Organen nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

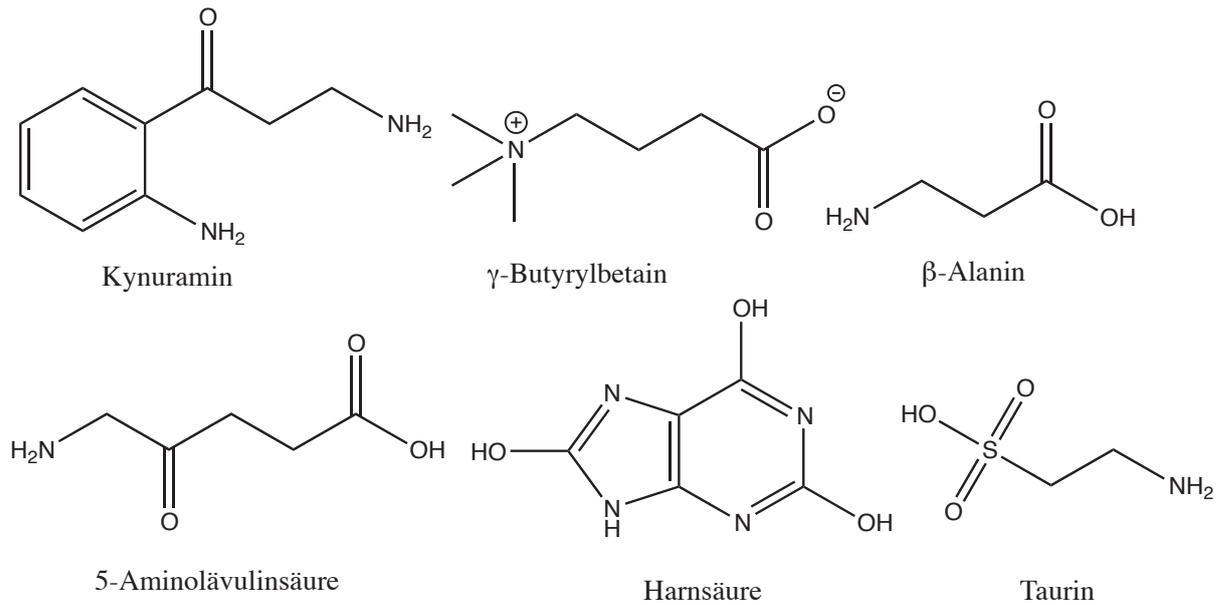


Abb. 42: Strukturformeln II

Strukturformeln der weiterhin untersuchten Verbindungen (Teil 2)

3.5.8.5 Kynuramin

Aufgrund seiner physiologischen Beziehung zu 4-HQ und Kynurenin [127] wurde der Gehalt des Kynuramin vergleichend analysiert. Das Kynuramin stellte sich als schwer messbar heraus. Aufgrund seiner sehr geringen Gewebekonzentrationen wurde lediglich der Gehalt im Auge (Abb. 43) bestimmt. Der Unterschied zwischen den WT- und den ETT^{-/-}-Fischen ist nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

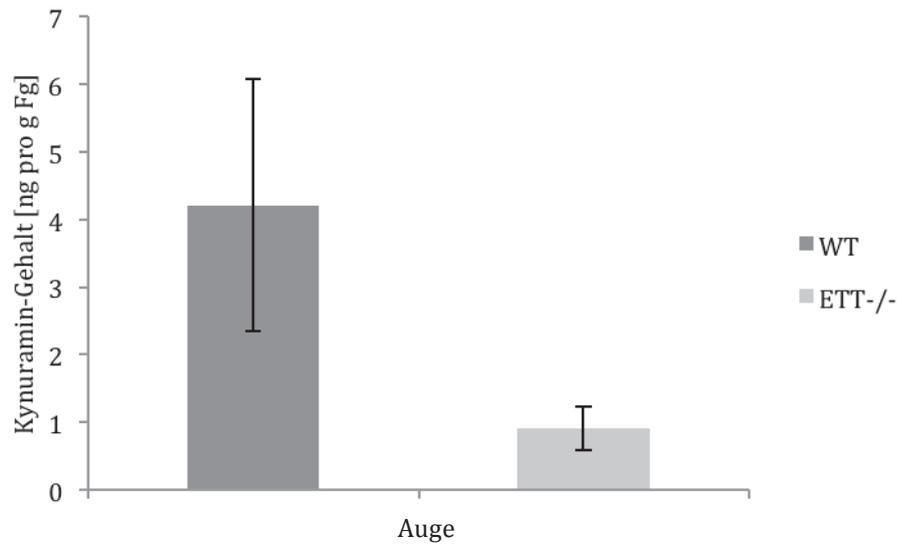


Abb. 43: Kynuramin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere Kynuramin-Gehalt in Augen ungestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 6; m/z 165 \rightarrow 136). Der Unterschied ist nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.6 γ -Butyrylbetain

Aufgrund der Beteiligung von γ -Butyrylbetain an der Carnitinsynthese [125] wurde eine vergleichende LC-MS/MS-Analyse durchgeführt. Es tritt kein signifikanter Unterschied des Gehaltes zwischen den Fischlinien auf (ungepaarter t-Test).

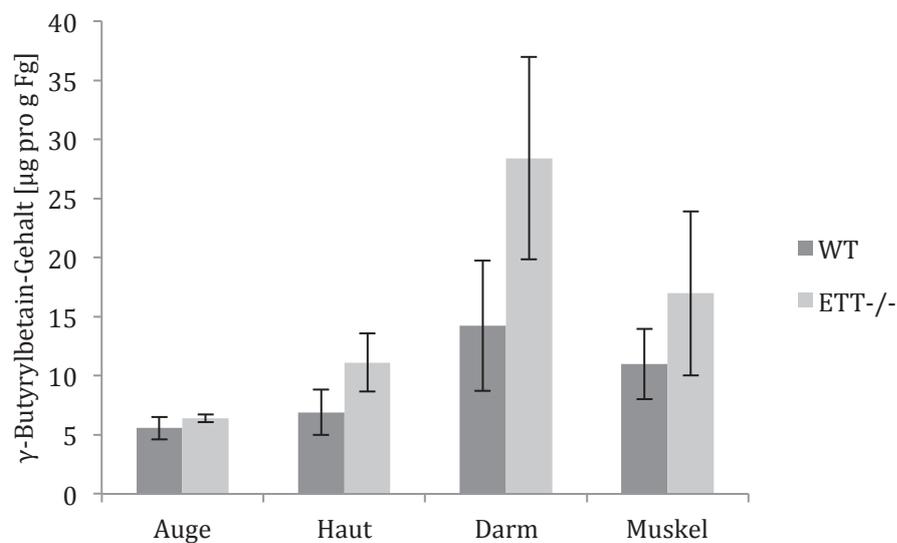


Abb. 44: γ -Butyrylbetain-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere γ -Butyrylbetain-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische (MW

± SEM, n = 5; m/z 164 → 60). Die Unterschiede sind in allen Organen signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.7 β -Alanin

β -Alanin ist ein Vorläufermolekül von Carnosin und Anserin [146, 147]. Es tritt kein signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Fischlinien ein.

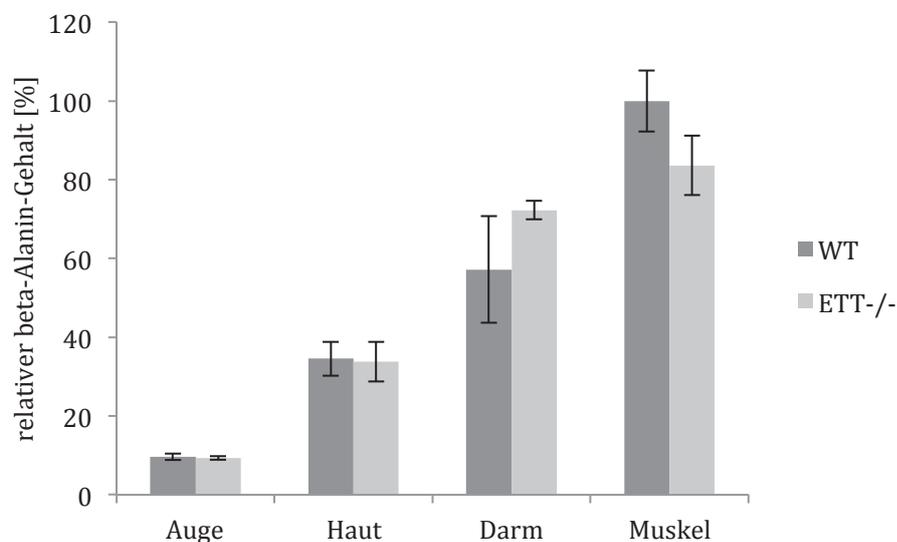


Abb. 45: β -Alanin-Gehalt

Gezeigt ist der mittlere, relative beta-Alanin-Gehalt in ausgewählten Organen ungestresster Zebrafische (MW ± SEM, n = 5; m/z 90 → 44). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Die Unterschiede sind in allen Organen nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.8 5-Aminolävulinsäure

Ein Marker, der bei der humanen Bleivergiftung verwendet wird, ist die 5-Aminolävulinsäure (AVA) [148, 149]. In diesem Versuch sollte analysiert werden, ob AVA auch beim Zebrafisch nachweisbar ist und ggf. auch als Indikator für eine Bleivergiftung verwendet werden kann. Die AVA-Konzentrationen wurden im Ganzfischhomogenat untersucht. Es wurde gezeigt, dass AVA zwar messbar ist, aber

signifikanter Unterschied zwischen gestressten und ungestressten Fischen auftritt.

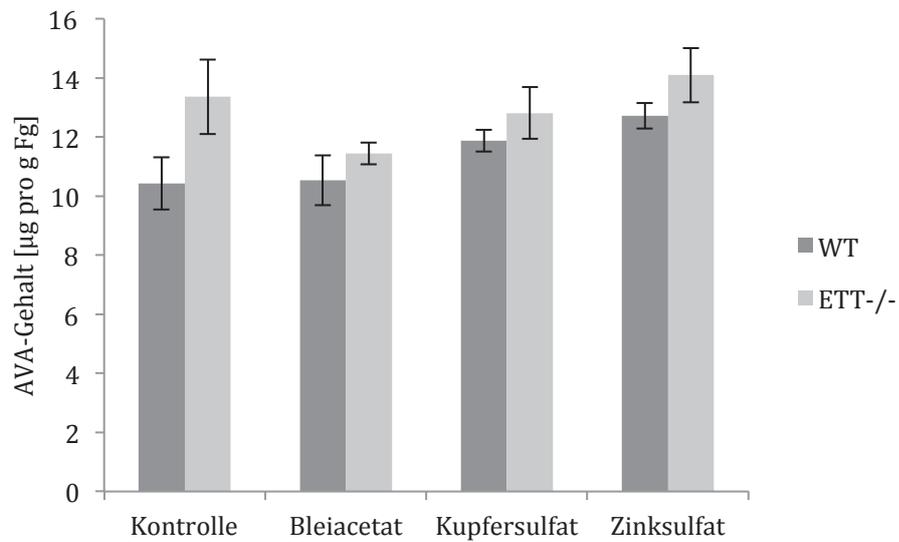


Abb. 46: AVA-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere AVA-Gehalt im Homogenat adulter Zebrafische ($MW \pm SEM$, $n = 6$; m/z 132 \rightarrow 114). Der Versuchsaufbau entsprach dem der HNE- und MDA-Inkubationen (Blei(II)-acetat: 0,008 mg/l, Kupfer(II)-sulfat: 0,16 mg/l, Zinksulfat: 0,5 mg/l. Alle Unterschiede sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.9 Harnsäure

Harnsäure ist das Endprodukt des Nukleinsäureabbaus und wird mit Hilfe der Xanthinoxidase aus Xanthin gebildet [150]. Es konnten in ungestressten Fischen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (ungepaarter t-Test).

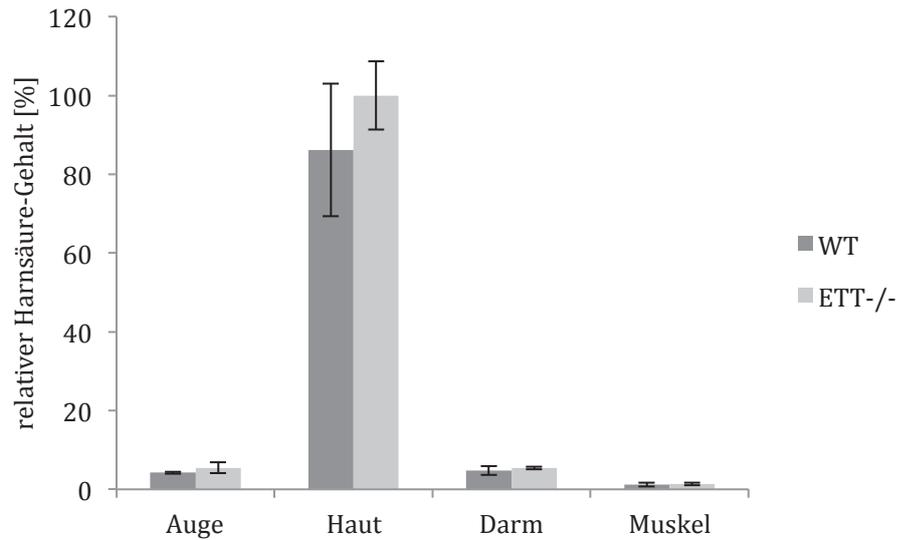


Abb. 47: Harnsäure-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative Harnsäure-Gehalt in ausgewählten Organen adulter, ungestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 5; 164 \rightarrow 124). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Alle Werte sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.10 Taurin

Taurin wurde erstmals 1827 aus Ochsen-galle isoliert [151] und übernimmt essentielle Aufgaben für kardiovaskuläre Funktionen, Skelettmuskel und das Nervensystem [152]. Es konnten in ungestressten Fischen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (ungepaarter t-Test).

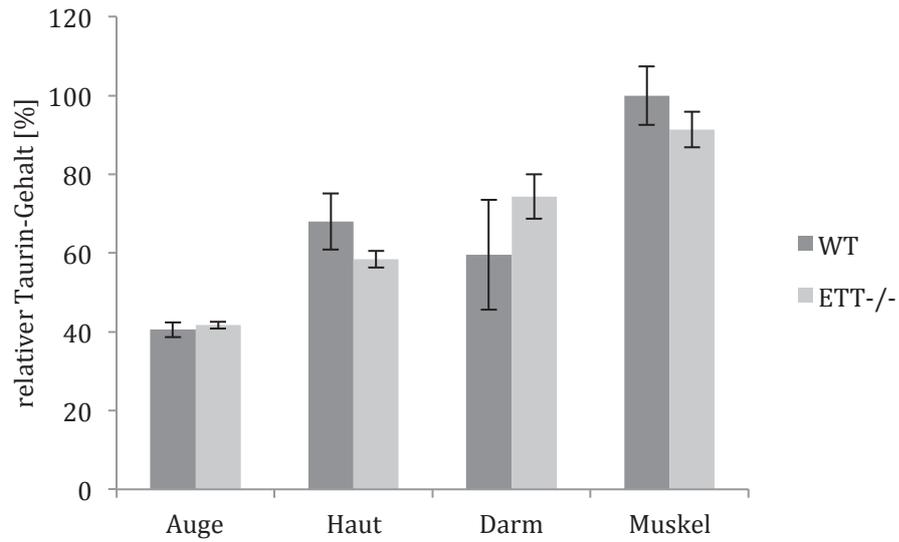


Abb. 48: Taurin-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative Taurin-Gehalt in ausgewählten Organen adulter, ungestresster Zebrafische ($MW \pm SEM$, $n = 5$; $124 \rightarrow 80$). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Alle Werte sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

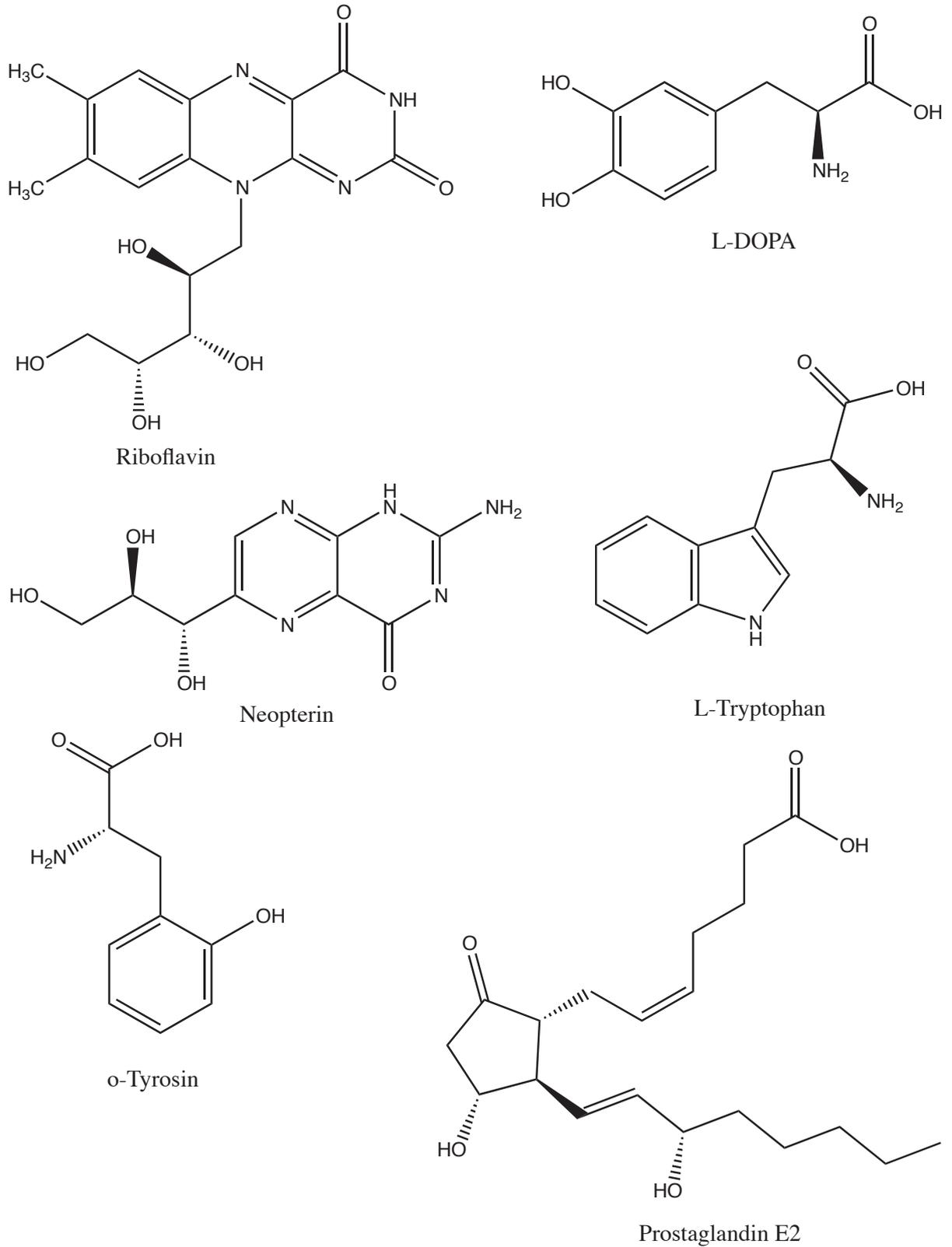


Abb. 49: Strukturformeln III

Strukturformeln der weiterhin untersuchten Verbindungen (Teil 3).

3.5.8.11 Riboflavin/Vitamin B2

Riboflavin dient unter anderem als Vorstufe von Flavin-Koenzymen (z.B. FAD) [153].

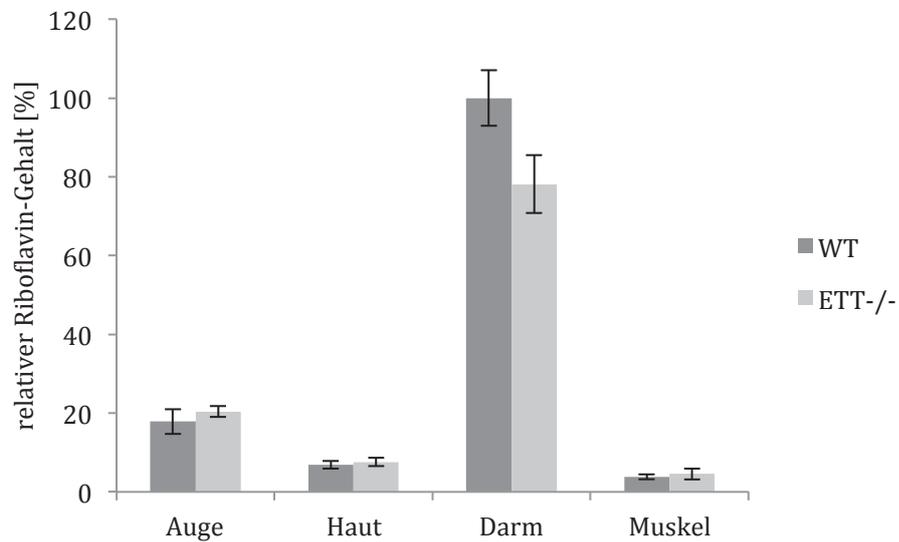


Abb. 50: Riboflavin-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative Riboflavin-Gehalt in Homogenat adulter, ungestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n=5; 372 \rightarrow 243). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Alle Werte sind nicht signifikant P= 0,4394 Auge, P= 6438 Haut, P= 0,0593 Darm, P= 0,7732 Muskel (ungepaarter t-Test).

3.5.8.12 L-DOPA

L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) ist ein Vorläufermolekül aus der Katecholaminbiosynthese [154].



Abb. 51: L-DOPA-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative L-DOPA-Gehalt in ausgewählten Organen adulter, mit tBOOH (50 μ M) gestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 5; 198 \rightarrow 152). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Die Unterschiede sind nicht signifikant (Auge und Hirn, ungepaarter t-Test); die Werte von Haut, Darm und Muskel sind identisch und statistisch nicht auswertbar.

3.5.8.13 Neopterin

Neopterin wird als klinischer Marker zur Erkennung von Autoimmunerkrankungen wie rheumatischer Arthritis [155, 156] und Morbus Crohn [157, 158] eingesetzt.

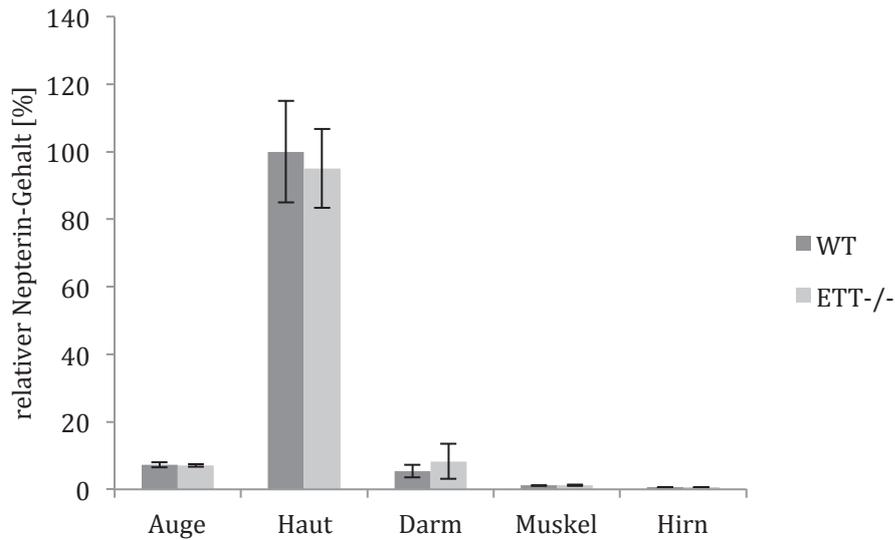


Abb. 52: Neopterin-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative Neopterin-Gehalt in ausgewählten Organen adulter, tBOOH (50µM) gestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 5; 254 \rightarrow 236). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Die Unterschiede sind nicht signifikant (Auge, Haut, Darm und Hirn; ungepaarter t-Test); bzw. nicht auswertbar (Muskel).

3.5.8.14 Tryptophan

L-Tryptophan wird im menschlichen Körper hauptsächlich über den Kynurenin-Pathway abgebaut [159]. Ebenso steht Tryptophan im Zusammenhang mit 4-HQ, das ebenfalls in der Differenzabtönung identifiziert wurde [127].

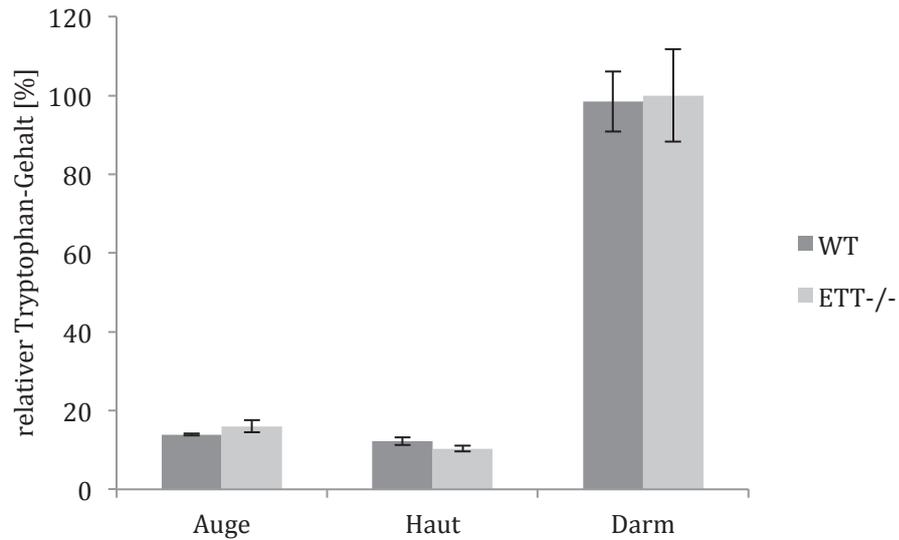


Abb. 53: Tryptophan-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative Tryptophan-Gehalt in Homogenat adulter, mit tBOOH (100 μ M) gestresster Zebrafische (MW \pm SEM, n = 5; 205 \rightarrow 188). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeföhrt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf das Organ mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Alle Unterschiede sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

3.5.8.15 o-Tyrosin

Ein Indikator für oxidativen Stress an Aminosäuren stellt das o-Tyrosin dar. Es entsteht durch Hydroxylierung von Phenylalanin [160, 121]. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

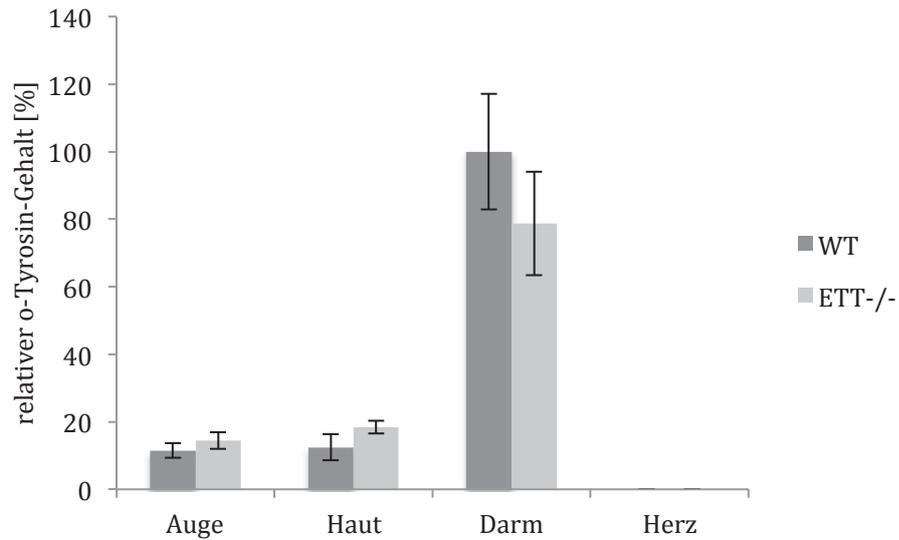


Abb. 54: o-Tyrosin-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative o-Tyrosin-Gehalt in Organen ungestresster, adulter Zebrafische (MW \pm SEM, n = 6; m/z 180 \rightarrow 134). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Alle Unterschiede Auge, Haut, Darm sind nicht signifikant Herz alle Werte 0 kein Test (ungepaarter t-Test); beim Herz wurde kein o-Tyrosin nachgewiesen und daher keine statistische Auswertung der Daten vorgenommen.

3.5.8.16 Prostaglandin E2

Prostaglandin E2 ist ein ubiquitär auftretendes Prostaglandin mit verschiedenen Aufgaben z.B. im Entzündungsgeschehen [161].

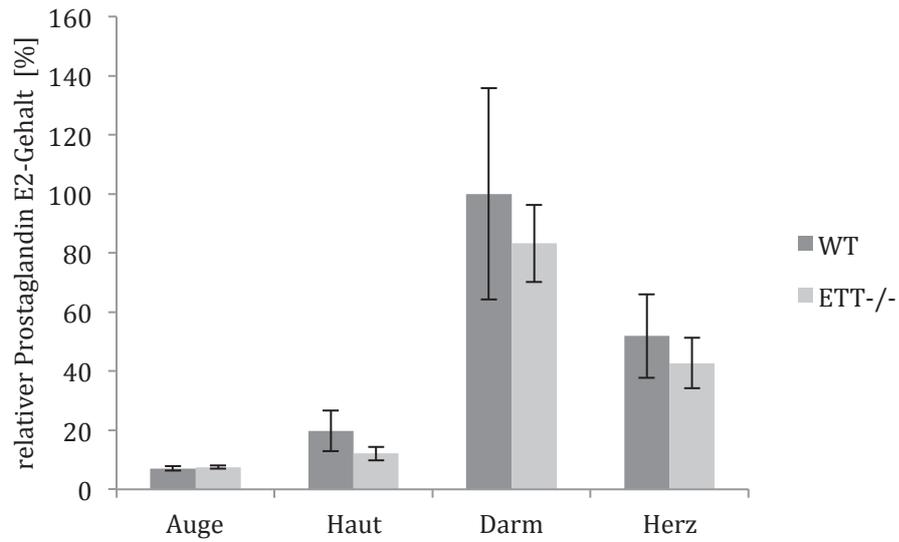


Abb. 55: Prostaglandin E2-Gehalt

Dargestellt ist der mittlere, relative Prostaglandin E2-Gehalt in ausgewählten Organen adulter, ungestresster Zebrafische ($MW \pm SEM$, $n = 5$; $351,2 \rightarrow 315,1$). Die Messung wurde ohne Eichgerade durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden auf das Fg normiert und die Gehalte auf den Mittelwert desjenigen Organs mit der größten relativen Peakfläche bezogen. Alle Werte sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test).

4 Diskussion

4.1 ET in Cyanobakterien – eine neue ET-Quelle

Innerhalb dieser Arbeit sollte die ausreichende Versorgung der Versuchsfische mit ET sichergestellt werden. Ziel sollte es sein, eine den natürlichen Bedingungen entsprechende ET-Versorgung zu sichern. Um einen Einblick in den ET-Gehalt wildlebender Zebrafische zu bekommen, wurden Wildfänge aus Westbengalen, Indien, importiert. Die Wildfänge wurden während des Transportes nicht gefüttert, um eine Verfälschung des ET-Gehaltes zu verhindern. Es wurde eine vergleichende LC-MS/MS-Messung mit Tieren aus der Fischanlage (Institut für Genetik, Universität zu Köln), den Wildfängen und Zebrafischen aus einem naturnah eingerichteten Laboraquarium durchgeführt (Abb. 9). Die Tiere aus der Fischanlage zeigten einen markant geringeren ET-Gehalt als die Wildfänge und die Fische des Naturaquariums. Die ET-Gehalte der Wildfänge und der Tiere aus dem Naturaquarium hingegen unterschieden sich nicht signifikant. Die Erkenntnis, dass die Wildfänge und die Fische aus dem Naturaquarium einen vergleichbaren ET-Gehalt aufweisen, gab einen Hinweis darauf, dass sich im Aquarium eine ET-Quelle befinden muss. Das Naturaquarium enthielt neben Kies als Bodenbelag zusätzlich Wasserpflanzen (*Vallisneria spec.*) und ein Moosbällchen (*Aegropila linnaei*). Es waren 2 getrocknete Brennnesselblätter als pflanzliche Nahrung eingesetzt worden. Diese wurden jeweils ersetzt, wenn die alten Blätter verbraucht waren. Täglich wurde handelsübliches Flockenfutter (Vipan, Sera) verfüttert, weiterhin war Algenbewuchs im Aquarium zu erkennen. Um die mögliche ET-Quelle zu identifizieren, wurden die einzelnen Komponenten des Beckens auf ihren ET-Gehalt untersucht (Abb. 12). Als ET-haltig zeigte sich der Algenbewuchs auf dem Boden (Abb. 10, links). Um diesen näher zu untersuchen, wurde er in einer Petrischale isoliert und einige Tage das Wachstum beobachtet (Abb. 10, rechts). Unter dem Mikroskop zeigte sich ein fädiges Geflecht (Abb. 11, links) dessen Ende in Gallertscheiden ausliefen (Abb. 11, rechts). Der Bewuchs konnte als *Phormidium spec.*, eine Cyanobakterienart, identifiziert werden. Um zu untersuchen, ob neben *Phormidium spec.* noch weitere Cyanobakterienarten ET enthalten, wurde nach weiteren Vertretern dieser Spezies gesucht. Das bekannteste Cyanobakterium ist *Spirulina platensis*. Dieses wird im großen

Maßstab sowohl in Fischfutter als auch in Form von Nahrungsergänzungsmitteln für den Menschen angeboten. Weiterhin findet man die Grüne Spanalge (*Aphanizomenon flos-aquae/AFA*) als Nahrungsergänzungsmittel. In einer Versuchsreihe (Abb. 12) wurden sowohl Pflanzen, Algen und Futter des Naturaquariums (*Vallisneria spec.*, Moosball, Brennnessel, *Phormidium spec.*, *Rhodochorton spec.* (Rotalge), Vipan Flockenfutter (Sera)), als auch das Futter aus der Fischanlage des Institutes für Genetik (ST-Futter (Aqua Schwarz), Fry feed (Kyowa) und Artemieneier (Sanders)) auf ihren ET-Gehalt untersucht. Ergänzt wurde die Messung durch verschiedene Fischfuttermittel und Nahrungsergänzungsmittel mit mehr oder weniger hohem *Spirulina platensis*-Gehalt, sowie 3 Cyanobakterienkulturen. Als Referenz wurde der ET-Gehalt des Austernpilzes bestimmt. Dieser ist als einer der ET-reichsten Pilze bekannt. Abbildung 12 zeigt deutlich, dass von den Futtermitteln (Naturaquarium und Anlage des Institutes für Genetik) und den Kompartimenten aus dem Naturaquarium lediglich *Phormidium spec.* ET aufweist. Weiterhin ist zu erkennen, dass der ET-Gehalt der Fischfuttermittel und Nahrungsergänzungsmittel mit ihrem Cyanobakteriengehalt (*Spirulina spec.* und *AFA*) zunimmt. Den höchsten ET-Gehalt weist die Cyanobakterienkultur *Oscillatoria spec.* (M1944) auf, welche sogar den des Austernpilzes überschreitet. Von den untersuchten Nahrungsergänzungsmitteln zeigt die Spirulina Base von Dr. Niedermaier den höchsten ET-Gehalt. Das Spirulinapulver (Drak Aquaristik) enthielt das meiste ET bei den Fischfuttermitteln.

Um den ET-Gehalt der Anlagen-Fische zu steigern, wurde das Spirulinapulver (100% Spirulina, Drak Aquaristik) als Ergänzungsfuttermittel ausgewählt. Es enthält zwar weniger ET als die Spirulina Base von Dr. Niedermaier, ist aber preisgünstiger. Die *Oscillatoria spec.* (M1944) weist ebenfalls einen höheren ET-Gehalt als das Spirulinapulver (Drak Aquaristik) auf. Diese Cyanobakterien wachsen allerdings sehr langsam in Kultur und hätten den Bedarf zur Fütterung nicht decken können. Zudem gab es keinen Beleg über die Unbedenklichkeit gegenüber den Fischen.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass der ET-Gehalt der Fische nach Fütterung von *Spirulina spec.* signifikant ansteigt (Abb. 13). Die Fische aus der Anlage des Institutes für Genetik (Universität zu Köln) wurden 0, 1, 3 und 5 Tage jeweils einmal am Tag im Überschuss mit Spirulinaflocken gefüttert. Jeweils 24 Stunden nach der Fütterung wurden die Tiere euthanasiert und ihr ET-Gehalt mittels LC-MS/MS bestimmt. Die 24 Stunden Wartezeit wurde gewählt, um erstens genug Zeit zur Absorption des ETs aus dem Darm zu

ermöglichen und zweitens die Entleerung des Darms zu ermöglichen (vermeidet störende Futterreste). Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, steigt der ET-Gehalt der Fische schon nach einem Tag der Fütterung stark an. Nach der dritten Fütterung unterscheidet sich der ET-Gehalt der mit *Spirulina* gefütterten Fische signifikant von jenen der Kontrollfische an Tag 0. Dieser Versuch belegt, dass *Spirulina spec.* geeignet ist, um den ET-Gehalt der Versuchsfische signifikant zu steigern.

Um zu analysieren, ob Cyanobakterien ET nicht nur enthalten sondern es auch produzieren, folgten weitere Versuche. Zum Nachweis der ET-Synthese wurde das bestuntersuchtete Intermediat der ET-Synthese, das Herzynin (Abb. 14) [119, 16-18], nachgewiesen. In einer LC-MS/MS-Analyse wurden in 6 Algenkulturen der ET- und Herzyningehalt bestimmt (Abb. 15). Es wurden 4 Cyanobakterienkulturen (*Oscillatoria spec.* M1944 und M2010, *Scytonema spec.* und *Spirulina platensis*), eine Rotalgenkultur (*Porphyridium purpureum*) und eine Grünalgenkultur (*Chlamydomonas noctigama*) untersucht. Die 4 analysierten Cyanobakterienkulturen weisen einen deutlich messbaren ET- und Herzyningehalt auf, die Rotalgenkultur eine geringe Menge ET und eine marginale Menge Herzynin und die Grünalgenkultur ist ET- und Herzyninfrei. Wie in Abb. 15 zu erkennen ist, besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten von ET und Herzynin. Das Syntheseprodukt (ET) und das Intermediat (Herzynin) treten in allen Cyanobakterienkulturen gemeinsam auf. Die ET-Synthese in den verwendeten Cyanobakterien kann damit belegt werden. In dieser Arbeit wurde mit den Cyanobakterien ein neuer, bisher unbekannter ET-Produzent aufgezeigt.

Der geringe ET- und Herzyningehalt in der Rotalgenkultur könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch Rotalgenspezies ET synthetisieren können. Um dies näher zu analysieren, müssten weitere Rotalgenarten auf ihren ET- und Herzyningehalt untersucht werden.

Nach dem Beleg der ET-Synthese in Cyanobakterien mit Hilfe des Intermediates Herzynin sollte ein weiteres mögliches Intermediat der ET-Synthese (Abb. 16) getestet werden. Dieses Intermediat mit der Bezeichnung „Verbindung Nr. 3“ wurde 2010 von Dr. Florian Seebeck (Max Planck Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland) als mögliches ET-Synthese-Intermediat in *Mykobakterium smegmatis* vorgestellt [19]. Das Intermediat wurde von Dr. Florian Seebeck zur Verfügung gestellt, um weitere Untersuchung durchführen zu können. Es gelang zwar eine Fragmentierung der Verbindung; ein Nachweis in Cyanobakterien (verwendete Proben wie in Abb. 15)

schlug allerdings fehl. Dieses kann zum einen bedeuten, dass die „Verbindung Nr. 3“ in den Cyanobakterien in Mengen unter der Nachweisgrenze vorliegt oder dass „Verbindung Nr. 3“ in Cyanobakterien nicht vorkommt. Ob Cyanobakterien einen ähnlichen Syntheseweg zeigen wie *M. smegmatis* kann somit nicht gezeigt werden.

4.1.1 ET in Flechten

Aufgrund des Nachweises der ET-Synthese in Cyanobakterien folgten Überlegungen, ob es anhand von Vergleichen der bisher bekannten Produzenten (Mykobakterien und Pilze) möglich wäre, Hinweise auf die Funktion von ET zu bekommen. An dieser Stelle traten die Flechten in den Fokus. Diese symbiontischen Lebensgemeinschaften bestehen aus einem Pilz (Mykobiont) sowie aus Grünalgen und/oder Cyanobakterien (Photobiont). Mit Hilfe von LC-MS/MS-Messungen wurde der ET-Gehalt von 3 Flechtenarten untersucht (Abb. 17). Es wurden eine Flechte bestehend aus Pilz und Grünalge (*Cetraria islandica*) und 2 Flechten aus Pilz und Cyanobacterium (*Collema tenax* und *Leptogium gelatinosum*) untersucht. Hierbei konnte ET in geringen Mengen nachgewiesen werden. Den höchsten Wert weist *Leptogium gelatinosum* mit durchschnittlich 0,16 mg/ET pro g Tg auf. Ob der ermittelte ET-Gehalt aus den Mykobionten oder dem Photobionten resultiert wurde innerhalb dieser Versuchsreihe nicht geklärt.

Ob es Zufall ist, dass 2 der bekannten 3 ET-Produzenten-Gruppen (Cyanobakterien, Pilze, Mykobakterien) in symbiontischer Beziehung miteinander auftreten können, ist eine interessante Frage. Die Fragestellung, ob eventuell in früheren evolutiven Phasen Gene zur ET-Synthese zwischen Symbionten in Flechten via horizontalem Gentransfer ausgetauscht wurden oder ob sowohl Pilze als auch Cyanobakterien, die Fähigkeit zur ET-Synthese durch einen gemeinsam Vorfahren oder separat erworben haben, ist ungeklärt. Weitere Untersuchungen sind hierzu nötig.

4.2 Organverteilung von ET im Zebrafish *Danio rerio*

Da in den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit nicht nur ganze Fische sondern auch Zebrafischorgane verwendet werden sollten, war es das Ziel in ersten Untersuchungen

einen Überblick über den ET-Gehalt einzelner Organe zu bekommen (Abb. 18). Die Organe wurden hierzu per LC-MS/MS-Analyse auf ihren ET-Gehalt untersucht. Die Normierung erfolgte jeweils auf das Frischgewicht (Fg) des Organs. Ziel dieser Voruntersuchungen war es Organe mit dem höchsten ET-Gehalt für die Versuche auszuwählen, da hier ein sichtbarer Effekt von ET im Vergleich zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen am wahrscheinlichsten wäre. Der ETT^{-/-}-Fisch ist nicht mehr in der Lage ET in den Organen zu akkumulieren (Abb. 7). Das Organ mit dem höchsten ET-Gehalt stellt die Haut mit $16,65 \pm 2,6 \mu\text{g/g}$ ET pro g Fg dar (Abb. 18). Kato et al. 2010 [27] fanden in der Haut von Mäusen einen vergleichbaren ET-Gehalt ($19,2 \pm 2,3 \mu\text{g/g}$). Der Darm weist ebenfalls einen hohen, das Auge einen mittleren ET-Gehalt auf. Herz, Gehirn (Abb. 18) sowie der Muskel (Abb. 7) enthalten nur geringe Mengen an ET. Dieser Befund korreliert teilweise mit Befunden aus der Arbeit von Dr. Markus Bach [92]. Wichtig ist zu beachten, dass in der hier vorliegenden Arbeit und in der Arbeit von Dr. Markus Bach eine unterschiedliche Normierung des ET-Gehaltes verwendet wurde. Während in dieser Arbeit eine Normierung auf das Frischgewicht gewählt wurde, normiert Dr. Markus Bach auf den Prolin-Gehalt der jeweiligen Gewebe. Deshalb kann der ET-Gehalt der einzelnen Organe in dieser Arbeit lediglich in Form eines Rankings wiedergegeben und verglichen werden. Dr. Markus Bach zeigte einen hohen ET-Gehalt in Darm, Auge, Gehirn und Niere. In Leber, Kiemen, Herz und Milz wurden von ihm geringe ET-Gehalte gefunden ([92], Abb. 25). In den Organen, die in beiden Arbeiten auf ihren ET-Gehalt untersucht wurden, d. h. Darm, Auge, Gehirn und Herz, stimmen die Befunde für Darm, Augen und Herz überein. Das Gehirn weist in der Arbeit von Dr. Markus Bach im Vergleich zu den anderen gemessenen Organen mehr ET auf, als in dieser Arbeit ($1,57 \pm 0,25 \mu\text{g/g}$, Abb. 18).

In den Versuchen wurden jeweils Auge, Haut und Darm als ET-reich gewertet und ihnen als Negativkontrolle die ET-armen Organe Herz oder Muskel gegenüber gestellt.

Um zu klären, ob der ET-Gehalt mit der Pigmentierung der Haut korreliert, wurden Hautproben verschiedener Körperregionen auf ihren ET-Gehalt untersucht (Abb. 19). Untersucht wurden dabei Brust- und Rückenflosse, die einen gelb pigmentierten Flossensaum aufweisen. Auf der Bauchseite dominieren silberne Pigmente, auf dem Rücken graue und auf der Körperseite des Fisches sind sowohl blaue als auch silberne Pigmente zu finden. Eine durchgeführte Repeated-Measures-ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Rückenhaut und der Haut an der Körperseite. Ein

separat dazu durchgeführter gepaarter t-Test konnte diese Signifikanz allerdings nicht bestätigen. Es scheint kein Zusammenhang zwischen der Pigmentierung der Haut und dem ET-Gehalt zu bestehen. Der erhöhte Standardfehler beruht vermutlich auf Verunreinigungen in der Präparation. Beim Präparieren der Haut blieben partiell kleine Stücke des Unterhaut- oder Fettgewebes an der Haut haften und ließen sich schlecht entfernen. Für alle nachfolgenden Untersuchungen wurde deshalb die Präparation optimiert um die individuellen Unterschiede zu minimieren. Die Rückenhaut wurde als bevorzugtes Hautstück ausgewählt. Die Präparationen folgten dem immer gleichen Schnittmuster (Abb. 5). Das Hautstück kann, auf diese Weise vorbereitet, im Genick gefasst und nach hinten abgezogen werden. Es reißt dabei immer an der exakt gleichen Stelle an der Rückenflosse ab. Mit dieser Methode bleibt kein Unterhautgewebe am Präparat haften; alle Stücke haben die gleiche Pigmentierung. Die so präparierten Hautstücke sind fast identisch und gut für vergleichende Analysen geeignet.

In dieser Arbeit wurde das erste Mal gezeigt, dass die Haut von *D. rerio* in der Lage ist ET in großen Mengen zu akkumulieren (Abb. 18) und eine sehr starke ETT-Expression (Abb. 23) aufweist. Im Rahmen der Arbeit von Dr. Markus Bach [92] wurden keine Untersuchungen zur Haut durchgeführt. Der Fund von ET und ETT in der Haut des Zebrafischs korreliert mit Befunden zur Expression des humanen ETT (ETTh). So zeigten Dong et al. [95], dass kultivierte humane Fibroblasten den ETTh exprimieren und in der Lage sind ET zu akkumulieren. Die Expression des ETTh in kultivierten humanen Keratinozyten und Hautproben von adulten Menschen konnte zusätzlich von Markova et al. gezeigt werden [49]. In diesen Arbeiten fehlt allerdings eine Analyse anderer humaner Gewebe, was eine Einordnung der ETTh-Expression im Kontext mit dem gesamten menschlichen Körper verhindert. Für den Fisch wurde gezeigt, dass die Haut innerhalb der getesteten Organe die höchste ET-Konzentration aufweist (Abb. 18). Ein derartiger Vergleich wäre auch für den Menschen interessant.

Das vermehrte Auftreten, des ETT in der Haut macht den Zebrafisch zudem interessant für weitergehende Versuche. Da der Fisch durch seine aquatische Lebensweise besonders eng mit seiner umgebenden Materie verbunden ist, könnte der Fisch ein gutes Model zur Erforschung der physiologischen Funktion von ET in der Haut darstellen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Tiere routinemäßig mittels Schwanzflossenbiopsie und anschließender Nested-PCR und Gelelektrophorese

genotypisiert (Abb. 6). Anhand der Anzahl und Länge der Fragmente wurde zwischen den homozygoten WT- und ETT^{-/-}-Fischen sowie den heterozygoten Tieren unterschieden. Das verstärkte Auftreten von ET in der Haut, auch im Flossensaum der Schwanzflosse, führte zu der Überlegung, die aufwändige Genotypisierung mittels PCR, partiell durch eine „Typisierung“ mittels LC-MS/MS-Analyse des ET-Gehaltes des Flossensaums zu ersetzen (Abb. 8). Die verwendeten Hautstücke sind für beide Methoden gleich groß, die LC-MS/MS-Methode bringt aber eine deutliche Zeitersparnis. Nachteil der LC-MS/MS-Methode ist, dass nur zwischen homozygoten WT- und ETT^{-/-}-Tieren unterschieden werden kann. Da im Rahmen der hier durchgeführten Experimente nur homozygote Tiere verwendet wurden, reichte die LC-MS/MS-Methode an dieser Stelle aus. In der Fischanlage, in der homo- und heterozygote Tiere gehalten werden, wurde weiterhin mit PCR genotypisiert.

4.2.1 Expressionsmuster des ETT im Zebrafisch *Danio rerio*

Da bis zu dieser Arbeit nicht bekannt war, dass die Haut von *Danio rerio* große Mengen an ET akkumulieren kann, wurde zur Bestätigung angestrebt die mRNA des ETT mittels quantitativer RT-PCR (qPCR oder real-time RT-PCR) nachzuweisen. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus der Haut und zu Vergleichszwecken aus Hirn und Auge (Positivkontrolle) sowie Leber und Herz (Negativkontrolle) isoliert. Die Kontrollen wurden nach Befunden von Dr. Markus Bach ([92], Abb. 22) ausgewählt. Dr. Markus Bach zeigte mittels RT-PCR eine starke ETT-Expression in Gehirn, Niere und Darm sowie eine mittlere ETT-Expression im Auge. In Leber, Herz, Muskel, Kiemen und Milz wurde keine Expression des Transporters nachgewiesen [92]. Ein erster Kontrollschritt wurde in dieser Arbeit nach der RNA-Isolierung durchgeführt. Hierbei wurde mittels Gelelektrophorese die Qualität der isolierten RNA untersucht. Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, sind bei intakter RNA die Fragmente der ribosomalen Untereinheiten zu erkennen; in der Wasserprobe findet sich dagegen keine Bande. Die nächste Kontrolle erfolgte nach der reversen Transkription der RNA in cDNA. Dabei wurde eine Endpunkt-PCR auf das Haushaltsgen β -Aktin durchgeführt. War die reverse Transkription gelungen, trat in allen Proben eine gleichmäßige Bande (202 bp) auf (Abb. 21). Das Ergebnis der quantitativen RT-PCR ist in Abb. 23 dargestellt. Zur Auswertung der

quantitativen RT-PCR wurde eine simultane Kurvenanpassung durchgeführt. Ein Beispieldiagramm dazu ist in Abb. 22 gezeigt. Aus den so ermittelten Werten der initialen Fluoreszenz (F_0) für ETT und β -Aktin wurde anschließend der Quotient F_0 ETT/ F_0 β -Aktin ermittelt. Somit wird die Expression des ETT zunächst relativ zur Expression des β -Aktins berechnet. Anschließend wurde auf das Organ mit der stärksten mittleren Expression normiert. In Abb. 23 ist die relative ETT-Expression in Bezug auf das Organ mit der höchsten ETT-Expression (normiert auf das Haushaltsgen β -Aktin) angegeben. Es wurde gezeigt, dass die stärkste relative ETT-Expression in Hirn und Haut auftritt. Im Auge ist ebenfalls eine hohe relative ETT-Expression zu erkennen. In Herz und Leber ist nur eine marginale bzw. keine Expression nachweisbar. Die Befunde von Herz, Leber, Hirn und Auge decken sich mit den ermittelten Endpunkt-PCR-Resultaten von Dr. Markus Bach ([92], Abb. 22). In dieser Arbeit wurde zusätzlich die starke Expression des ETT in Zebrafischhaut gezeigt. Es handelt sich hierbei um den ersten Nachweis des ETT in der Haut adulter Zebrafische.

4.3 Unterschiede im Gehalt von Biomarkern für LPO zwischen WT- und ETT^{-/-}-Zebrafischen unter Metallionenbelastung

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass ET positive Effekte bei der Abwehr von Lipidperoxidation (LPO) zeigen kann [96, 49]. Ein Beispiel stellen die Untersuchungen von Bedirli et al. [73] dar. An Ratten wurden Ischämie-Reperfusionen (IR)-Versuche an der Leber durchgeführt. Als Versuchstiere wurden Tiere mit ET-Diät (1,2 mg/kg Körpergewicht ET pro Tag, über 3 Wochen) und Kontrolltiere mit ET-freier Diät gewählt. Nach 3 Wochen wurde der IR-Versuch durchgeführt. Als Marker für LPO wurde der MDA-Gehalt mit Hilfe eines Thiobarbitursäure (TBARS)-Assays mit anschließender spektroskopischer Auswertung bestimmt. In den Kontrolltieren ohne ET trat ein erhöhter MDA-Gehalt auf. An dem Versuchsaufbau ist allerdings folgendes zu kritisieren: Es wurde bei den Kontrollratten nicht überprüft, ob nach 3 Wochen ET-freier Nahrung wirklich kein ET mehr in den Organen vorhanden ist. In diesem Zusammenhang wurde durch Kawano et al. [36] gezeigt, dass auch nach längerer Zeit ohne ET-haltigem Futter ein ET-Basisniveau in Ratten noch immer nachweisbar ist.

Markova et al. 2009 [49] untersuchten die Wirkung von ET auf die LPO in NHEK-Zellen (engl. neonatal normal human epidermal keratinocytes). Sie untersuchten den ET-Gehalt dabei in unbehandelten Kontrollzellen und ssUV-bestrahlten (engl. solar simulating UV; UVA + UVB) NHEK-Zellen. In unbestrahlten NHEK-Zellen wurde zwischen ET-freien Kontrollzellen und NHEK-Zellen, die mit 500 μM ET vorbehandelt kein signifikanter Unterschied im HNE-Gehalt festgestellt. Bei ssUV-bestrahlten NHEK-Zellen zeigte sich dagegen ein erhöhter HNE-Gehalt in den ET-freien Zellen. Der HNE-Gehalt wurde mit Hilfe eines ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) ausgewertet.

Weiterhin gibt es Belege, dass ET in der Lage ist Metallionen, wie z. B. Cu^{2+} , zu komplexieren und so deren schädliche Wirkung auf den Organismus abzuwehren [45]. Da es bis jetzt keine Untersuchungen zur Funktion von ET in adulten Zebrafischen bezüglich LPO gibt, sollte in diesem Versuchsteil ein möglicher positiver Einfluss von ET im adulten Zebrafisch *in vivo* untersucht werden.

Um LPO in den Fischen zu induzieren, musste ein geeigneter Stressreiz gefunden werden. Hier boten sich zweiwertige Metallionen, wie Pb^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} , an. Diese Metallionen kommen auch in der natürlichen Umgebung der Fische vor und stellen hier einen natürlichen Stressreiz dar [162-165]. In Vortests wurde ein geeigneter Inkubationsaufbau zur Stressinduktion (Abb. 3), sowie stressende, aber nicht tödliche Metallionenkonzentrationen ermittelt (0,008 mg/l Blei(II)-acetat, 0,16 mg/l Kupfer(II)-sulfat und 0,5 mg/l Zinksulfat) (s. 2.2.4.1 Toxizitätstest S. 17). Mit diesen Konzentrationen wurden die Tiere jeweils 96 Stunden (= 4 Tage) inkubiert. Als Indikatoren für LPO wurden die Biomarker 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) und Malondialdehyd (MDA) verwendet (Abb. 24). Diese wurden dazu mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) (Abb. 24) derivatisiert und per LC-MS/MS-Messung analysiert [112]. Frühere kolorimetrische Bestimmungsversuche vom MDA nach Reaktion mit 2-Thiobarbitursäure (TBARS) gerieten zunehmend in die Kritik aufgrund ihrer hohen Unspezifität [166, 167, 112]. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit von einer derartigen Methode abgesehen und nach einer Möglichkeit gesucht MDA per LC-MS/MS-Messung zu bestimmen. Weiterhin sollte es diese Methode ermöglichen, sowohl MDA als auch HNE gleichzeitig zu bestimmen. Eine solche Technik wurde von Andreoli et al. 2003 [112] vorgestellt. Da HNE hochreaktiv ist und sowohl mit Mercaptogruppen (z. B. im Glutathion) [168] als auch mit Aminogruppen von Proteinen reagieren kann

[120], bietet es sich an, freies HNE für die Messung per LC-MS/MS zu derivatisieren. Dies vergrößert die Ausbeute an messbarem HNE. Hierzu bot sich DNPH an, da es wie bei Andreoli et al. [112] beschrieben sowohl MDA als auch HNE schnell und stabil bindet [112]. In mehreren Versuchsdurchläufen wurden die Gehalte von HNE und MDA in Fischen mit metallioneninduziertem Stress untersucht (Abb. 25, 26, 28).

Ergänzend wurden in dieser Arbeit Inkubationsversuche mit tBOOH (50 μM) durchgeführt. Bello et al. [12] führten Versuche an einer NcDEgt-1-Mutante von *Neurospora crassa* durch, wobei diese Knockout-Mutante nicht mehr in der Lage ist ET zu produzieren. Diese Versuche zeigten eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber tBOOH verglichen mit dem Wildtyp. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zebrafischorgane nach Inkubation der Tiere mit tBOOH auf HNE und MDA untersucht. Die LPO-Marker wurden dabei in diesem Versuchsteil in den Zebrafischorganen nicht nachgewiesen, da die Konzentration der Marker unterhalb der Nachweisgrenze lag.

4.3.1 HNE

In mehreren Versuchsreihen wurde der HNE-Gehalt in adulten WT- und ETT^{-/-}-Fischen, die mit Metallionen gestresst bzw. ungestresst waren, untersucht. In Abb. 25 ist exemplarisch eine Messreihe dargestellt. Es besteht sowohl in den ungestressten Kontrolltieren, als auch in den gestressten Fischen eine Tendenz dazu, dass mehr HNE in den ETT^{-/-} Tieren als in den WT-Fischen zu finden ist. Für die mit Kupfer(II)-sulfat inkubierten Tiere ist dieser Unterschied für die abgebildete Messung signifikant ($P = 0,0349$). Dieses signifikante Ergebnis ließ sich allerdings nicht reproduzieren. Für die Analyse wurden Ganzfischhomogenate verwendet. Da dies die Problematik beinhaltet, dass zwischen einzelnen Organen nicht differenziert werden kann, wurden zudem Analysen an einzelnen Organen vorgenommen. Hier wurden die besonders ET-haltigen Organe Auge und Darm (hoher ET-Gehalt; Abb. 7 und 18) sowie Gehirn verwendet. Exemplarisch ist ein Versuchsdurchlauf, bei dem mit Blei(II)-acetat inkubiert wurde in Abb. 26 dargestellt. Auch auf Organebene wurde im gestressten Fisch kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und ETT^{-/-}-Tieren gezeigt. In Kontrolleexperimenten mit ungestressten Fischen traten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 27).

4.3.2 MDA

In Abb. 28 ist exemplarisch eine Messreihe zur MDA-Gehaltsbestimmung in metallionengestressten Fischen und ungestressten Kontrolltieren abgebildet. Es wurden für den MDA-Gehalt weder in gestressten noch in ungestressten Fischen signifikante Unterschiede ermittelt. Dabei traten z. T. erhebliche interindividuelle Schwankungen auf. Der Versuch die MDA-Gehaltsbestimmungen auf die Organebene zu übertragen, schlug fehl, da die Organe MDA-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze enthielten.

4.3.3 HNE- und MDA-Analyse (Probleme und Perspektiven)

Verschiedene Probleme traten bei der Analyse von MDA und HNE auf. Es wurden vereinzelt signifikante Unterschiede in Ganzfischhomogenaten ermittelt (Abb. 25). An dieser Stelle gibt es das Problem, dass die interindividuellen Schwankungen sehr groß sind und daher die ermittelten Werte schwer zu interpretieren sind. Ein Vorteil der Ganzfischuntersuchung stellt die größere Masse an zu untersuchendem Gewebe dar. Dadurch liegen die Gehalte der Biomarker in einem Bereich oberhalb der Nachweisgrenze. Die Untersuchung einzelner Organe hat andererseits den Vorteil, dass eventuelle Effekte einem bestimmten Organ zugeordnet werden können. Beruhen Unterschiede im Biomarkergehalt auf der Funktion des ET, so sollten diese Unterschiede nur in ET-reichen Organen zu erkennen sein. Ein solcher Effekt ist in den hier durchgeführten Messungen nicht erkennbar.

Eine Erklärung, warum Unterschiede im HNE-Gehalt im Ganzfisch (Abb. 25) aber nicht auf Organebene (Abb. 26) zu erkennen sind, könnte sein, dass während der Präparation der einzelnen Organe zu viel Zeit verstreicht und in dieser Zeit bereits Veränderungen im Biomarkergehalt auftreten. Zwar wurde weitestgehend auf Eis gearbeitet; durch die Präparation der Einzelorgane waren die Fische allerdings längere Zeit sowohl Licht als auch Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes ausgesetzt. Ein Versuch die Organe zu poolen, um die Menge an Biomarkern soweit zu erhöhen, dass sich der Gehalt deutlich oberhalb der Nachweisgrenze befindet, wurde deshalb verworfen.

Ob ET einen Einfluss auf das Auftreten von LPO hat, ist anhand der Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, nicht eindeutig zu klären. Zwar zeigen die Ganzfischhomogenatmessungen (Abb. 25) eine Tendenz dazu, dass in ETT^{-/-}-Fischen einer höherer HNE-Gehalt auftritt; mit den hier angewendeten statistischen Tests (ungepaarter t-Test) wurden aber keine reproduzierbaren signifikanten Unterschiede ermittelt.

Trotz größter Bemühungen könnte der Versuchsaufbau noch nicht optimal gewesen sein. Weiterhin könnte der verwendete Stressreiz (Metallionen) noch nicht ideal gewesen sein, um die physiologische Wirkung von ET zu untersuchen. Die Arbeit von Markova et al. 2009 [49] gibt einen Hinweis darauf, dass die Verwendung eines geeigneten Stressreizes notwendig ist, um eine Wirkung von ET zu demonstrieren.

4.5 Molekulare Unterschiede zwischen Organen von WT- und ETT^{-/-}-Zebrafischen analysiert durch LC-MS/MS-Differenzabtönung

Zum ersten Mal wurde in dieser Arbeit die Technik der LC-MS/MS-basierten Differenzabtönung verwendet, um molekulare Unterschiede in den Organen von 2 Zebrafischlinien (WT und ETT^{-/-}) zu ermitteln. Diese Methode wurde ursprünglich von Dirk Gründemann entwickelt um mit einem zellkulturbasierten Transporterexpressionssystem die physiologischen Substrate von Membrantransportern zu ermitteln [22, 123].

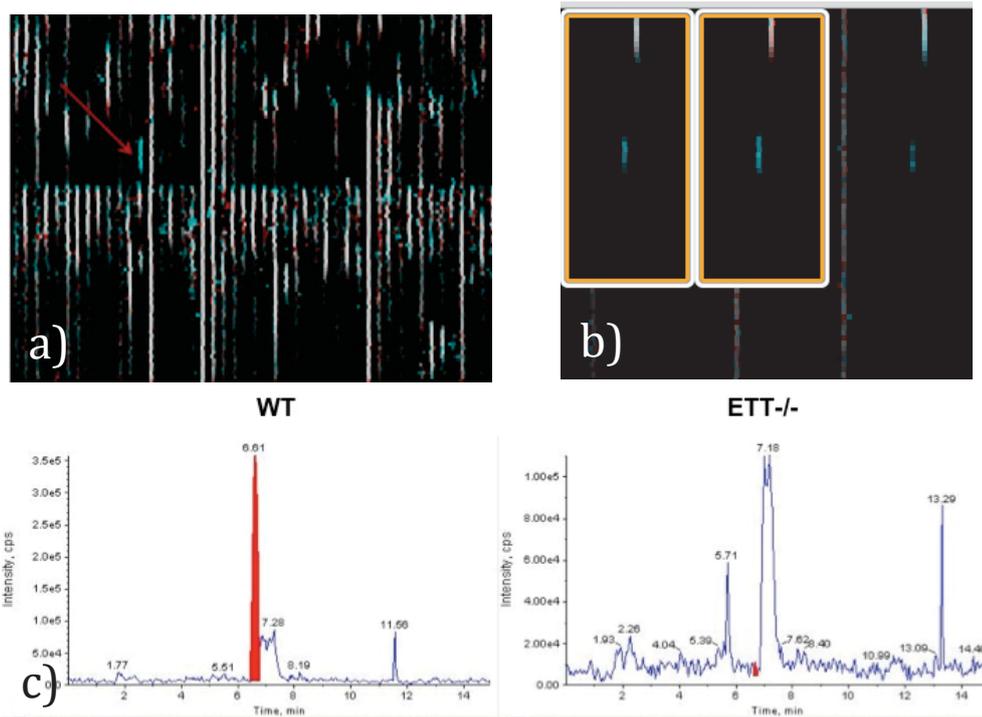


Abb. 56: Differenzabtönung

Schematischer Ablauf der Auswertung eines Fullscans mittels Differenzabtönung. a) Der rote Pfeil markiert ein gefundenes Signal. Auf der Ordinate ist die Retentionszeit zunehmend von oben nach unten dargestellt. Auf der Abszisse ist das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) zunehmend von links nach rechts dargestellt. b) Parallelvergleich von drei Probenpärchen. Die Ausschnitte stellen das gleiche Signal im Fullscan zweier Pärchen dar (o. li. gelbe Rahmen); die Darstellung der Differenzabtönung des dritten Pärchens füllt den ganzen Bildschirm. Drei türkise Beispielsignale sind erkennbar. c) Verifizierung der Signale in den Rohdaten. Hier beispielhaft am ET-Signal für WT (li.) und ETT^{-/-} (re.) gezeigt. Die Peakflächen (rot) wurden manuell integriert und für alle Pärchen jeweils der Faktor der Peakflächenunterschiede (= Intensitätsunterschiede) zwischen WT und ETT^{-/-} ermittelt. (Zu beachten ist die unterschiedliche Achseneinteilung der Diagramme. Diese wird von der Software automatisch eingestellt.)

Die Methode basiert darauf, dass ein dreidimensionaler LC-MS/MS-Datensatz, mit den Koordinaten Retentionszeit, Masse/Ladungsverhältnis (m/z) und Intensität, in eine zweidimensionale Abbildung umgewandelt wird. Hierzu wird die dritte Dimension, die Intensität, in eine Farbintensität übersetzt (Abb. 56). In dieser Methode werden Proben jeweils paarweise verglichen. Der einen Probe wird hierbei ein roter Farbkanal, der anderen Probe die Farbkanäle blau und grün zugeordnet. So entsteht eine zweidimensionale Darstellung in der die Bilder der beiden zu analysierenden Proben überlagert werden (Abb. 56 a). Für jeden Zeitpunkt (Retentionszeit) ist ein

Masse/Ladungsverhältnis (m/z) in Form eines Pixels in der grafischen Darstellung zugeordnet. So können zu jedem Zeitpunkt der Retentionszeit und zu jedem m/z die beiden Molekülspektren der Proben verglichen werden. Tritt bei einer definierten Retentionszeit in beiden Proben kein Molekül gleichen Masse/Ladungsverhältnisses auf, so erscheint dieser Pixel im Bild schwarz. Tritt bei beiden Proben zur gleichen Zeit ein Molekül gleicher m/z in gleicher Menge auf, erscheint dieser Pixel weiß oder grau. Tritt ein Mengenunterschied bei einer m/z bei gleicher Retentionszeit auf, dominiert in diesem Pixel des Diagramms die Farbe (türkis bzw. rot) der Probe mit der größeren Molekülmenge (Abb. 56 a). Es können die Differenzbilder mehrerer Proben parallel untersucht werden. Die Molekülspektren von 3 Pärchen sind jeweils parallel auf dem Bildschirm sichtbar (Abb. 56 b). In dieser Arbeit wurden die Molekülspektren von Zebrafischorganen (Auge, Haut, Darm, Herz, Leber, Milz, Hirn, Niere) von gestressten (gleiche Stressbedingungen wie bei HNE- und MDA-Messung) und ungestressten WT- und ETT^{-/-}-Fischen vergleichend analysiert. Es wurden immer 4 Organpärchen miteinander verglichen. Nur Signale, die in allen 4 Pärchen zu erkennen waren, wurden als valide betrachtet. Für alle Organe (jeweils 2 Versuchsreihen für die gestressten und eine Versuchsreihe für die ungestressten Tiere) wurden insgesamt 754 Signale ermittelt. Diese wurden nach m/z in einer Übersichtstabelle geordnet, dann wurde versucht, eventuelle Muster im Auftreten der Signale zu erkennen. Dazu wurde die Tabelle betrachtet und Vergleiche angestellt, ob bestimmte Signale nur in bestimmten Organen oder bei bestimmten Stressoren auftraten. Die Signale waren keinen bestimmten Mustern zuzuordnen, viele traten ubiquitär in allen oder mehreren Organen auf.

Es sollten diejenigen Signale weitergehend untersucht werden, die sehr häufig auftraten oder die einen sehr großen Unterschied in der Molekülmenge in WT- und ETT^{-/-}-Fischen aufwiesen. Der Unterschied in der Molekülmenge wurde bewertet über einen Vergleich der Peakflächen. Dazu wurde anhand der m/z und der Retentionszeit in den Rohdaten der Fullscans das entsprechende Peakpärchen ausgewählt und manuell integriert. Dieser Schritt wird am Beispiel des ETs in Abb. 56 c gezeigt. Nach der Auswahl potentiell interessanter Signale wurden die Moleküle definierter m/z , welche zur entsprechenden Retentionszeit auftraten, fragmentiert und die Fragmentspektren, falls möglich, mit Hilfe von Datenbanken [114, 115] identifiziert. Die Verbindungen wurden

anschließend separat per LC-MS/MS-Analyse in Proben quantifiziert und die Befunde aus der Differenzabtönung verifiziert.

Mit Hilfe der LC-MS/MS-basierten Differenzabtönung wurden signifikante Unterschiede in den Molekülspektren der WT- und ETT^{-/-}-Fische aufgedeckt. Einzelheiten zu den entsprechenden Verbindungen sind in den folgenden Unterpunkten (4.5.1 - 4.5.3) aufgeführt

4.5.1 Carnitin und Acetylcarnitin

Mit Hilfe der Differenzabtönung wurden Unterschiede im Gehalt von Carnitin und Acetylcarnitin zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen ermittelt (Strukturformeln, siehe Abb. 29). In mehreren unabhängigen Messungen wurden signifikant niedrigere Carnitin- und Acetylcarnitingehalte in den ETT^{-/-}-Fischen festgestellt (Carnitin, Abb. 30; Acetylcarnitin, Abb. 31). Bei Carnitin waren die Messungen für Auge, Haut und Muskel stets und für Darm zumeist signifikant. Bei Acetylcarnitin waren die Messungen stets für Auge und Haut und zumeist bei Darm und Muskel signifikant.

Der Muskel wurde in den Untersuchungen als Negativkontrolle ausgewählt, da er nur marginale Mengen an ET enthält (Abb. 7) und keine ETT-Expression aufweist ([92], Abb. 22). Der Unterschied in den Gehalten in Carnitin und Acetylcarnitin korreliert nicht mit dem ET-Gehalt des Muskels. Die Vermutung, dass der ETT, der ein direkter Verwandter des Carnitintransporters ist, auch Carnitin transportiert, wurde bereits durch Untersuchungen von Dr. Markus Bach ([92], Abb. 17) im Zellkulturexperiment (ETTzf heterolog exprimiert in humanen HEK 293-Zellen) widerlegt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie der Unterschied zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen auch in ET-armen Organen zustande kommen kann. So könnte das freie ET, das sich nach Absorption durch den Darm im Blut befindet, bereits Effekte auslösen. Da das Blut in allen Organen zirkuliert könnte somit ein globaler Effekt auftreten. Eine weitere Möglichkeit wäre ein geringfügig inhibitorischer Effekt des ET auf den Carnitintransporter. Im ETT^{-/-}-Fisch reichert sich das ET im Darm an bis es über den Kot ausgeschieden wird.

4.5.2 8-Hydroxyguanin (8-OH-G)

8-OH-G (Synonyme: 8-Oxoguanin und 8-Oxo-7,8-dihydroguanin [169]), wird als Biomarker für DNA-Läsionen durch oxidativen Stress verwendet [128-134]. Es wurde ein signifikant erhöhter 8-OH-G-Gehalt in der Haut der ETT^{-/-}-Zebrafische gefunden (Abb. 33; Strukturformel, Abb. 29).

8-OH-G entsteht typischerweise beim Angriff von Hydroxylradikalen auf die DNA (Abb. 57) [170, 169].

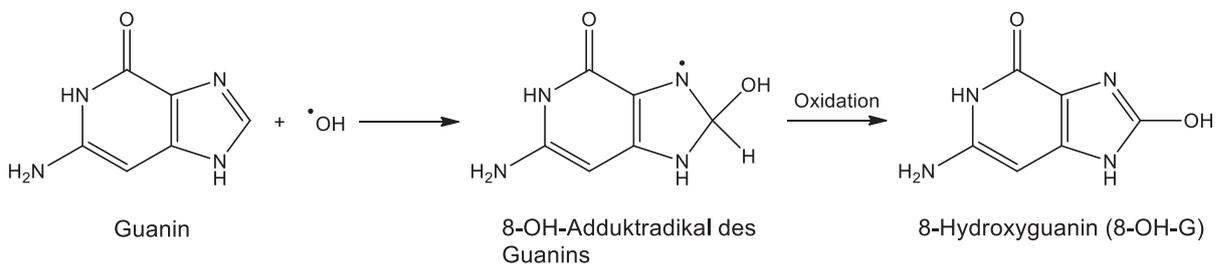


Abb. 57: Entstehung von 8-OH-G.

Die Abbildung zeigt schematisch die Entstehung von 8-OH-G durch Reaktion von Guanin mit einem Hydroxylradikal (Verändert nach Valko et al. 2006 [169]).

Für die Erkennung und Reparatur solcher DNA-Läsionen sind DNA Glykosylasen verantwortlich. Die Glykosylasen, speziell die 8-Oxoguanin DNA Glykosilase (OGG 1), schneiden die defekte Base aus der DNA aus. Anschließend wird der DNA-Strang durch eine Endonuklease geöffnet und durch eine Polymerase korrekt ergänzt. Eine Ligase schließt den Strang nach der Reparatur [171, 172]. Die beschädigte Base wird so aus der DNA entfernt.

DNA-Läsionen sind eine der Ursachen für Krebsentstehung [173, 169]. Marker, wie das 8-OH-G, werden somit auch mit karzinogenem Gewebe in Verbindung gebracht. Jaruga et al. [129] und Olinski et al. [170] zeigten in Untersuchungen, dass karzinogenes Gewebe gegenüber dem kreisfreien umgebenden Gewebe einen erhöhten Gehalt an 8-OH-G aufweist. In diesen Versuchen wurde das 8-OH-G in Chromatinproben nachgewiesen. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Biomarkern, wie dem 8-OH-G und Krebs, besteht ein Interesse daran, Messungen dieser Verbindung auch in Urin durchzuführen. Eine LC-MS/MS-Messmethode zur Analyse des 8-OH-G-Gehaltes in Urin

entwickelten z. B. Weimann et al. 2002 [174]. Loft et al. 2012 [133] und Nishimura 2006 [175] heben in ihren Übersichtsartikeln die Funktion von 8-OH-G als Biomarker bei oxidativem Stress hervor.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikant erhöhter 8-OH-G-Gehalt in der Haut der ETT^{-/-}-Zebrafische gezeigt (Abb. 33; Strukturformel, Abb. 29). Dies ist ein möglicher Hinweis für vermehrte DNA-Läsionen in der Haut der Knockout-Fische. Dieser Befund weist zudem darauf hin, dass ET möglicherweise in der Lage ist die DNA in der Haut (höchste ET-Konzentration im Fisch, (Abb. 18)) zu schützen. Das Ergebnis dieser Arbeit steht im Einklang mit früheren Befunden, die eine DNA-Protektivität von ET belegen [28, 38, 176]. ET ist fähig bis in den Nukleus zur DNA vorzudringen [49]. Zudem gibt es Hinweise bezüglich einer DNA-Schutzfunktion von ET in Seminalplasma [46, 177, 178]. Auch der protektive Einfluss von ET in Pilzsporen könnte einen Hinweis auf den Schutz der in den Sporen enthaltenen DNA geben [12]. So könnte ET auch kanzerogenen Prozessen entgegenwirken. Der positive Einfluss von ET auf Hautzellen wurde außerdem an Keratinozyten in Zellkultur demonstriert. Es wurde gezeigt, dass ET einer erhöhten Caspase-9-Aktivität und somit einer erhöhten Zellsterblichkeit entgegen wirkt [48, 49]. Dies deutet darauf hin, dass ET nicht nur über einen möglichen Schutz der DNA, sondern auch über den Einfluss auf andere Zellkompartimente einen positiven Effekt in der Haut bewirkt.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein möglicher Schutz von DNA durch ET in der Zebrafischhaut *in vivo* nachgewiesen.

Der Unterschied im 8-OH-G-Gehalt ist bereits in ungestressten Fischen deutlich zu erkennen. Ob dieser Unterschied im 8-OH-G-Gehalt durch einen geeigneten Stressreiz (z. B. UV-Bestrahlung der Haut) noch zu vergrößern ist, muss in weiteren Experimente geklärt werden.

4.5.3 4-Hydroxychinolin (4-HQ)

Eine weitere Verbindung, die mit Hilfe der Differenzabtönung detektiert und analysiert wurde, ist das 4-HQ (Strukturformel, Abb. 29). Es handelt sich hierbei um ein Molekül, das im Metabolismus des Tryptophans vorkommt. Innerhalb dieses Stoffwechselweges

würde es mit Hilfe der Monoaminoxidase (MAO) sowohl aus Kynuramin als auch aus 5-Hydroxykynuremin gebildet [127].

In dieser Arbeit wurden z. T. signifikante Unterschiede im 4-HQ-Gehalt zwischen den WT- und Knockout-Tieren gezeigt (Abb. 32). Die Unterschiede zwischen den beiden Fischlinien erwiesen sich aber nicht als stabil. Am häufigsten trat ein verringerter 4-HQ-Gehalt in den ETT^{-/-}-Tieren auf (Abb. 32). Allerdings gibt es vereinzelt auch Messungen in denen dieses Ergebnis genau entgegengesetzt war oder ein Effekt völlig ausblieb. Die Möglichkeit, dass Proben vertauscht wurden, konnte nach Kontrolle ausgeschlossen werden. Ähnlich wie bei Carnitin und Acetylcarnitin treten bei 4-HQ im Herz, einem ET- und ETT-armen Gewebe signifikanten Unterschiede auf (Abb. 18 und 23). Somit scheinen die Unterschiede im 4-HQ-Gehalt der Fischlinien nicht auf dem ET-Gehalt des Gewebes an sich zu beruhen. Stattdessen könnte aus Effekten von freiem ET im Blut resultieren.

4.5.4 Anserin, Xanthin und Kynurenin

In der Differenzabtönung trat häufig ein Signal auf, dessen Fragmentspektrum dem des Anserins (Strukturformel, Abb. 29) sehr ähnlich war. Anserin ist ein histidinhaltiges Dipeptid, das Bestandteil der Skelettmuskulatur und des Gehirns von Vertebraten ist [135-139]. In diesen Geweben entsteht es durch Methylierung von Carnosin (Strukturformel, Abb. 37) [140]. Es zeigt antioxidative Eigenschaften und wirkt u. a. neuroprotektiv [139]. Im Rahmen dieser Arbeit war es lediglich möglich Anserin per LC-MS/MS-Analyse im Darm nachzuweisen (Abb. 34). In den anderen untersuchten Geweben, i.e. Auge, Haut und Muskel, lag die Konzentration unter der Nachweisgrenze. Die Untersuchungen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen.

Ein weiteres Molekül das im Rahmen der Differenzabtönung identifiziert wurde ist das Xanthin. Hierbei handelt es sich um ein Molekül aus dem Purinabbau innerhalb des Nukleotidstoffwechsels. Xanthin wird von der Xanthinoxidase in Harnsäure umgewandelt. Die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten keinen signifikanten Unterschied im Xanthingehalt zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen zeigen (Abb. 35).

Kynurenin (Strukturformel, Abb. 29) ist wie das 4-HQ ein Bestandteil des Tryptophanabbaus. Es wird mit Hilfe der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und der

Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) aus Tryptophan gebildet [127]. Der höchste Kynureningehalt wurde in der Haut des Fisches gemessen (Abb. 36). Es traten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und ETT^{-/-}-Tieren auf.

4.5.6 Vor- und Nachteile der LC-MS/MS-Differenzabtönung zur Ermittlung molekularer Unterschiede in Zebrafischorganen

Ein großer Vorteil der hier angewandten Methode besteht in ihrer Sensitivität. Da die Organe des Zebrafisches nur eine sehr geringe Größe aufweisen, bietet die hochsensitive LC-MS/MS-Analyse eine hervorragende Möglichkeit, um auch Moleküle zu detektieren, welche nur in geringen Konzentrationen in den Organen vorkommen. Ein weiterer Vorteil ist, dass innerhalb der Methode beliebig viele Varianten an Laufmittel- und Säulenkombinationen verwendet werden können, um ein möglichst großes Molekülspektrum abdecken zu können. Ein Problem der Methode ist allerdings die Normierung. Diese wäre zwar möglich, dazu müsste aber ein geeigneter Parameter verwendet werden. Der Parameter auf den normiert wird, muss in beiden Proben identisch sein, damit er seinen Sinn erfüllt. Wird eine bestimmte Zellverbindung, gewählt, so führt dies dann zu Problemen, wenn durch unterschiedliche Stoffwechsellagen in den Zellen Unterschiede in der Produktion der ausgewählten Verbindung entstehen.

In dieser Arbeit wurde ohne Normierung gearbeitet. Das bedeutet, dass ungleich große Probenmengen Signalartefakte auslösen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet, dass die Probenpaare so homogen wie möglich gestaltet sind. Es wurden lediglich Tiere eines Geschlechts verwendet, um Artefaktsignale, z. B. durch hormonelle Unterschiede zwischen den Geschlechtern, zu verhindern. Weiterhin wurden exakt gleichalte Tiere eingesetzt um Artefakte auszuschließen, die durch molekulare Unterschiede in verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsstadien entstehen. Um Größen-/Gewichtsschwankungen in den verwendeten Organen vorzubeugen, wurden nur solche Tiere für die Präparation ausgewählt, die in Größe und Ernährungszustand so identisch wie möglich waren.

Die Differenzabtönung stellt, unter Beachtung der angeführten Besonderheiten zur Probenauswahl, eine gute Methode dar, um molekulare Unterschiede zwischen einer WT- und Knockout-Zebrafischlinie aufzuklären.

4.6 Weitere getestet Verbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den Biomarkern für LPO und den Verbindungen die innerhalb der Differenzabtönung gemessen wurden einige weitere Verbindungen auf ihren Gehalt im Fisch untersucht. Die Auswahl dieser Verbindungen fand nach verschiedenen Kriterien statt. Es wurden solche Moleküle ausgewählt, die eine Beziehung zu den Stoffwechselwegen der Verbindungen haben, welche in der Differenzabtönung identifiziert wurden. Es bestand die Hoffnung auf diesem Wege eventuelle Stoffwechseleränderungen welche mit ET assoziiert sind, aufzudecken. So finden sich beispielsweise Kynurenin (Abb. 36), Kynuramin (Abb. 43), Tryptophan (Abb. 53) und das 4-HQ (Abb. 32) im Tryptophanmetabolismus [127]. Das γ -Butyrylbetain (Abb. 44) wiederum steht in enger Beziehung zum Metabolismus von Carnitin (Abb. 30) und Acetylcarnitin (Abb. 31) [125]. Die Harnsäure (Abb. 47) ist das Endprodukt des Nukleinsäureabbaus und wird in diesem Zuge mit Hilfe der Xanthinoxidase aus Xanthin (Abb. 35) gebildet [150]. β -Alanin (Abb. 45) und Carnosin (Abb. 40) stellen Vorläufermoleküle des Anserins (Abb. 34) dar [140, 147]. Trotz der engen Verknüpfung der oben genannten Moleküle mit Verbindungen, die in der Differenzabtönung z.T. signifikante Unterschiede zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen aufwiesen, konnten für die weiterhin untersuchten Verbindungen keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Tryptophanmetabolismus, Nukleinsäureabbau, Anserinsynthese und Carnitinsynthese weisen keine generellen Unterschiede in den beiden Fischlinien auf.

Es wurden weiterhin Moleküle untersucht, die wie ET Histidin als Vorläufermolekül besitzen. Hierzu zählen Histamin (Abb. 39), 3-Methyl-L-Histidin (Abb. 41) und Carnosin (Abb. 40) [142, 144, 145, 140]. Das Carnosin weist hier die Besonderheit auf, dass es gleichzeitig das Vorläufermolekül des Anserins darstellt. Neben den genannten Histidinderivaten wurde auch Histidin selbst auf seinen Gehalt im Fisch untersucht. Weder Histidin noch seine Derivate zeigten signifikante Unterschiede in ihrem Gehalt zwischen WT- und ETT^{-/-}-Tieren.

Drei Biomarker, welche im human Bereich eingesetzt werden, wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit auf Unterschiede geprüft (AVA, o-Tyrosin und Neopterin). AVA (Abb. 46) wird eingesetzt um Bleivergiftungen zu detektieren; die Entstehung der AVA basiert hierbei auf der Schädigung des Hämoglobins durch Blei [179]. Das o-Tyrosin (Abb. 54) ist ein Marker für oxidativen Stress an Aminosäuren; es entsteht durch Hydroxylierung von Phenylalanin [160, 121]. Der dritte Marker, das Neopterin (Abb. 52), wird in der Praxis eingesetzt, um Autoimmunerkrankungen, wie Morbus Crohn und rheumatische Arthritis, zu detektieren [180, 155, 157, 156]. Alle drei Biomarker sind im Fisch nachweisbar. Ob ihre Markerfunktion von Mensch auf Zebrafisch übertragbar ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Der reine Nachweis der Verbindung ist nicht gleichbedeutend mit der Funktion im Fisch. AVA, o-Tyrosin und Neopterin wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und ETT^{-/-}-Fischen auf.

Abschließend wurden einige Verbindungen wichtiger Stoffwechselwege untersucht, welche keine direkten Interaktionen mit den bisher getesteten Verbindungen zeigen. Zu diesen Verbindungen gehört das Taurin (Abb. 48), welches viele essentielle Funktionen im kardiovaskulären System, im Skelettmuskel und im Nervensystem übernimmt [151, 152]. Der Gehalt des Riboflavins (Abb. 50) wurde ebenfalls vergleichend analysiert. Hierbei handelt es sich um ein Molekül, welches u. a. als Vorstufe der Flavin-Koenzyme (z. B. FAD) dient [153]. Auch das L-DOPA (Abb. 51), ein wichtiger Baustein der Katecholaminsynthese [154], wurde auf seinen Gehalt untersucht. Als ein Molekül, welches maßgeblich am Entzündungsgeschehen beteiligt ist, wurde das Prostaglandin E₂ (Abb. 55) ausgewählt [161]. Keine der vier zuletzt untersuchten Verbindungen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den verwendeten Fischlinien.

Zusammenfassend kann man sagen, dass trotz der signifikanten Veränderung einzelner Verbindungen im Fisch (ET (Abb. 7,8), Carnitin (Abb. 30), Acetylcarnitin (Abb. 31), 4-HQ (Abb. 32) und 8-OH-G (Abb. 33)) in dieser Arbeit keine weitere signifikante Unterschiede in assoziierten Stoffwechselwegen oder strukturell verwandten Molekülen gemessen wurden. Grundsätzlich zeigen diese Untersuchungen, dass bei den Präparationen der Organe sowie der Lagerung und Messung der Proben gleichmäßig gearbeitet wurde. Gemessene signifikante Unterschiede stellen keine Artefakte dar, die aus der Behandlung der Proben resultieren. Das gleichmäßige Auftreten der in diesem Abschnitt beschriebenen Verbindungen unterstreicht somit die Validität der Messungen mit signifikantem Unterschied.

4.7 Mögliche physiologische Funktionen von ET

ET weist eine organspezifische Verteilung innerhalb verschiedener Spezies auf [28]. Dies konnte für verschiedenen Vertebraten nachgewiesen werden (z. B. Ratte, Kaninchen, Hund) [35]. Für manche Organe treten hier große Unterschiede zwischen den Spezies auf. So wurde in der Ratte ein sehr hoher ET-Gehalt in der Leber nachgewiesen. In Kaninchen, Hund und Zebrafisch hingegen sind in der Leber nur geringe ET-Konzentrationen zu finden [35, 92]. Einige Organe zeigen in mehreren Spezies einen ET-Gehalt. So findet sich ET in Mensch, Rind, Schwein und Zebrafisch (Abb. 7, 18) ET in den Augen [76, 40, 92]. Bei Mensch, Zebrafisch und Maus wurde ET in der Haut (Abb. 7, 18) nachgewiesen [95, 49, 27]. Das Auftreten von ET gleichen Organen spricht dabei für eine speziesübergreifende Funktion. Die Unterschiede zwischen den Spezies (z. B. Leber) geben einen Hinweis darauf, dass ET auch speziespezifische Aufgaben in Organen übernehmen könnte. Welche Funktionen ET im Speziellen hat, wurde bis jetzt nicht eindeutig nachgewiesen [97]. Dies gilt für seine Funktion sowohl in den Produzenten, als auch für seine Funktion in Konsumenten.

Eine Vielzahl von *in vitro* Untersuchungen unterstreichen das vielfältige Potential des ET. So wurde neben antioxidativen Eigenschaften, gegenüber einer Mehrzahl von ROS [41, 42, 28, 38, 43], auch die Möglichkeit der Komplexbildung von Metallionen (Cu^{2+}) nachgewiesen [38, 45]. Zudem wurde eine Affinität des ET zu Hämgruppen gezeigt [44]. Die Interaktionen mit Kompartimenten des Immunsystems wurden in verschiedenen Studien ebenfalls belegt [53, 54, 44, 55, 57, 37]. An dieser Stelle soll erwähnt sein, dass viele der *in vitro*-Versuche in Systemen durchgeführt wurden, die von den nativen Bedingungen in der Zelle stark abweichen. So können Versuche an z.B. Liposomen [95] oder isolierten Rattenlebermikrosomen [38] die natürliche Situation in der Zelle nur teilweise abbilden. Aus diesem Grunde sind vor allen *in vivo* Versuche notwendig um die physiologische Funktion von ET im Detail aufzuklären.

4.7.1 ET im Darm

Im Darm wird ET aus der Nahrung über den ETT absorbiert. Ob schon freies ET im Darmlumen eine spezifische Funktion übernimmt, wurde noch nicht belegt. Die Assoziation von Polymorphismen des ETTh mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Morbus Crohn, gibt einen Hinweis darauf, dass eine korrekte Aufnahme und Verteilung des ET für seine Funktion wichtig ist [60, 24, 61-63]. Kato et al. [27] zeigten in IR-Versuchen am Mäusedarm eine schützende Funktion des ET gegen oxidativen Stress. Im Darm könnte ET durch seine antioxidativen Fähigkeiten die natürliche Immunabwehr unterstützen. Die Immunabwehr im Darm ist durch viele Einflüsse belastet. Neben z. T. toxischen Substanzen, welche mit der Nahrung aufgenommen werden (z. B. Pflanzenschutzmittel oder Schwermetalle), führt auch eine erhöhte Keimbelastung zu massivem Stress.

4.7.2 ET im Blut

ET befindet sich nach der Aufnahme durch die Nahrung, bevor es in die Organe verteilt wird, ungebunden im Blut. Ob ET hier schon eine bestimmte Funktion erfüllt ist unklar. ET wurde in Blutzellen, wie z. B. den Erythrozyten nachgewiesen. Das Auftreten von ET in Blutzellen wurde in verschiedenen Spezies gezeigt [56, 33]. Aufgrund seiner Affinität zu Hämgruppen [44] könnte eine Funktion von ET darin bestehen, das Hämoglobin vor oxidativen Schäden zu schützen.

4.7.3 ET in der Niere

In der Niere übernimmt der ETT vermutlich die Rückresorption von ET aus dem Urin [34, 35]. Wie Kawano et al. 1982 demonstrierten, sank auch nach einer ET-freien Diät das ET-Niveau in Ratten lediglich auf ein basales Niveau ab [36]. Die Rückresorption des ET in den Körper unterstreicht die Wichtigkeit dieser Verbindung. Ob auch in der Niere selbst ET eine Funktion hat, wurde bisher nicht gezeigt.

Dr. Markus Bach zeigte im Rahmen seiner Arbeit einen hohen ET-Gehalt in der Niere des Zebrafisches nach [92]. An dieser Stelle ist zu beachten, dass beim Zebrafisch die Blutbildung in der Niere und nicht wie beim Menschen im Knochenmark stattfindet [181]. Daher könnte, der erhöhte ET-Gehalt in der Zebrafischniere auch mit der dort stattfindenden Blutbildung in Verbindung stehen.

4.7.4 ET im Auge

In verschiedenen Spezies, so auch beim Menschen und beim Zebrafisch (Abb. 7, 18), wurde ET in den Augen nachgewiesen [76, 77]. Untersuchungen zeigten, dass mit zunehmendem Alter der Glutathion-Gehalt in den Augen abnimmt. Durch schleichenden Verlust, dieses wichtigen Antioxidans wird das Auge so mit dem Alter anfälliger gegenüber oxidativem Stress. Im Auge wird dieser vor allem durch UV-Strahlung ausgelöst. Shukla et al. 1981 [76] konnten belegen, dass Katarakt Patienten eine verminderte ET-Konzentration haben. Dies lässt vermuten, dass ein erhöhter ET-Gehalt dem Katarakt entgegenwirken kann. In Versuchen an Hühnerembryonen, an denen durch Glucocorticoide ein Katarakt induziert wurde, wurde eine kataraktmildernde Wirkung von ET gezeigt [78].

4.7.5 ET im Gehirn

Eine starke Expression des ETT im Gehirn (Abb. 23) [92] könnte ein Hinweis, darauf sein, dass ET eine wichtige Funktion im Gehirn erfüllt. Da das Gehirn starkem oxidativem Stress ausgesetzt ist, benötigt es einen entsprechenden Schutz durch Antioxidantien. Versuche von Song et al. 2010 [37] belegten eine neuroprotektive Funktion von ET *in vitro* und *in vivo* (Maus). Song et al. 2010 schlussfolgern, dass ET das „Potential hat ein nützlicher neuroprotektiver Wirkstoff für den Menschen zu werden“ [37].

4.7.5 ET in der Haut

In der Literatur finden sich Belege, dass der ETT in humanen Hautzellen exprimiert wird und diese fähig sind ET zu akkumulieren. Kato et al. 2010 zeigten eine Akkumulation von ET in der Haut von Mäusen [27]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Expression des ETT als auch die Akkumulation von ET in der Zebrafischhaut

nachgewiesen. Der Gehalt an ET in der Haut von Mäusen ähnelt dabei mit $19,2 \pm 2,3$ $\mu\text{g/g}$ [27] sehr dem Gehalt in Zebrafischhaut ($16,7 \pm 2,6$ $\mu\text{g/g}$) (Abb. 18). Die Haut ist durch einen sehr engen Kontakt mit ihrer Umwelt besonders vielen Stressreizen ausgesetzt. Neben natürlichem Stress wie UV-Strahlung leidet die Haut unter chemischen Verbindungen die zunehmend in der Umgebung des Menschen auftreten. Zu den schädlichen Einflüssen gehören neben z. B. Zigarettenrauch auch schädliche Verbindungen aus z. B. Reinigungsmitteln, Nagellackentfernern, Farben, Treibstoff, Insektiziden und viele mehr. Zusätzlich dazu kann die natürliche Hautbarriere durch häufiges Waschen mit Seifen angegriffen sein, wodurch die Haut zusätzlichem Stress ausgesetzt ist. Ein besonderer Hautschutz dieses Organs ist daher notwendig.

Das eingelagerte ET könnte der Haut helfen, den vielfältigen Stressoren besser zu widerstehen. In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise gefunden, dass ET fähig sein könnte DNA-Läsionen zu mindern (Abb. 33; Unterpunkt 4.5.2 S. 107). Da DNA-Läsionen mit Prozessen wie der Karzinogenese assoziiert sind, ist der Schutz der DNA besonders wichtig [173]. Markova et al. 2009 [49] zeigten in einer mit ET behandelten NHEK-Zellkultur (engl. normal human epidermal keratinocytes) einen verminderten Gehalt an ROS und eine verminderte LPO. Dies spricht für eine antioxidative Wirkung in der Haut. Obayashi et al. 2004 [47] fanden in humanen dermalen Fibroblasten unter UV-Stress eine hemmende Wirkung von ET auf die Expression von TNF- α (Tumornekrosefaktor) und MMP-1 (Matrix-Metalloproteasen), wichtigen Signalmolekülen des Immunsystems. Diese Befunde deuten darauf hin, dass ET die Haut auf vielfältige Weise schützt und nicht auf eine einzelne Funktion beschränkt ist.

4.8 Ausblick

In dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse zu ET-Produzenten sowie Unterschieden zwischen den WT- und ETT^{-/-}-Fischlinien aufgezeigt. Diese können Hinweise auf die Funktion von ET geben. So sind die Cyanobakterien als neu entdeckte ET-Produzenten ein weiterer Organismus, in dem die Funktion von ET studiert werden kann. Weiterhin sollte die Haut, die hier als sehr ET- und ETT-haltiges Gewebe aufgezeigt wurde, auch in weiteren Spezies detaillierter untersucht werden. Die Haut stellt, als leicht zugängliches Organ mit direktem Umweltkontakt, ein sehr gutes Studienobjekt dar. Weiterführende

Untersuchungen sind daher angezeigt, um die Erforschung der physiologischen Funktion von ET voranzubringen.

5 Zusammenfassung

Ergothionein (ET), ein Betain des L-Histidins, welches eine Mercaptogruppe in 2-Position des Imidazolrings trägt, ist ein pharmakologisch interessantes Molekül. Mutationen im humanen Ergothionein-Transporter (ETTh) sind mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn assoziiert. In Patienten mit Katarakt ist der ET-Gehalt vermindert.

ET ist aufgrund seiner Ladungen nicht membrangängig und so auf den aktiven Transport mit Hilfe eines Transporters (ETT, Gensymbol *SLC22A4*) angewiesen. In der verwendeten Zebrafisch-Knockout-Linie (ETT^{-/-}, retrovirale Insertion in Exon 1) ist der ETT, welcher für die Aufnahme von ET aus der Nahrung notwendig ist, nicht mehr exprimiert. Die ETT^{-/-}-Fische weisen somit einen kompletten ET-Mangel auf.

Zu Beginn der Arbeit waren lediglich Pilze und Mykobakterien als ET-Produzenten bekannt. Innerhalb dieser Arbeit konnten durch Nachweis von ET und des Synthesewegzwischenproduktes Herzynin mittels LC-MS/MS-Messung Cyanobakterien als neue ET-Quelle entdeckt werden. Mit dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* wird eine neue, sichere ET-Quelle für aquatische Lebewesen aber auch den Menschen aufgezeigt.

Zum ersten Mal konnte mittels LC-MS/MS-Messungen ET in der Haut des adulten Zebrafisches nachgewiesen werden. Der Befund wurde durch Nachweis der ETT-Expression in der Haut mittels quantitativer RT-PCR bestätigt.

Zur funktionellen Untersuchung des ET *in vivo* wurden Biomarker für oxidativen Stress (4-Hydroxy-2-nonenal, Malondialdehyd) mit Hilfe von LC-MS/MS-Messungen im Zebrafisch nachgewiesen. Für die Untersuchungen wurden ungestresste Tiere sowie Tiere unter schwermetallinduziertem oxidativem Stress analysiert. Es konnte kein reproduzierbarer, signifikanter Unterschied des Biomarker-Gehaltes zwischen ETT^{-/-} und Wildtyp festgestellt werden.

Zum ersten Mal wurde die Methode der LC-MS/MS-Differenzabtönung zur Detektion molekularer Unterschiede zwischen Zebrafischlinien verwendet. Komplette Organe adulter Zebrafische wurden vergleichend mit dieser Methode untersucht und signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und ETT^{-/-} gezeigt. Die ETT^{-/-}-Fische enthalten in verschiedenen Organen signifikant weniger Carnitin und Acetylcarnitin. Zudem wurde ein signifikant höherer 8-Hydroxyguanin (8-OH-G)-Gehalt in der Haut der ETT^{-/-}-Fische nachgewiesen. Da das 8-OH-G einen Indikator für DNA-Läsionen darstellt

liefern diese Untersuchungen einen Hinweis darauf, dass ET in ET-reichen Geweben DNA schützen könnte.

6 Abstract

Ergothioneine (ET), i. e. the betaine of histidine bearing a mercapto group at Position 2 of the imidazole ring, is a pharmacologic interesting molecule. Mutations within the human ergothioneine transporter (ETTh) are associated with chronic inflammatory diseases, such as Ulcerative colitis and Crohn's disease. Patients suffering from cataract were found to have a decreased level of ET. Due to its ionic character ET is not able to cross membranes. Therefore it is necessary that ET is transported actively by means of a membrane transporter (ETT, gene symbol *SLC22A4*). In the zebrafish knockout lineage used (ETT^{-/-}, retroviral insertion in exon 1) the ETT necessary for ET uptake from food is not expressed. ETT^{-/-} fish thus show a complete lack of ET.

At the beginning of this study, fungi and some mycobacteria were only ET producers known. Within this work, cyanobacteria were discovered as a new ET source as they contain ET and its synthesis intermediate hercynine, which was shown by LC-MS/MS analysis. We thereby revealed *Spirulina platensis* as a new and safe ET source for aquatic organisms and even human beings. For the first time, we showed the presence of ET in the skin of adult zebrafish by LC-MS/MS analysis. This finding was confirmed by proof of ETT expression in the skin using quantitative RT-PCR. In order to investigate the function of ET *in vivo*, biomarkers of oxidative stress, such as 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde, were determined in zebrafish by LC-MS/MS analysis. For this purpose, both unstressed fish and fish stressed with heavy metals to induce oxidative stress were analyzed. However, stably significant differences in the biomarker content between ETT^{-/-} and wild type fish were not found.

The method of LC-MS/MS difference shading was applied for the first time to detect molecular differences between the fish lineages. Complete organs of adult zebrafish were comparatively scanned with this method and significant differences between wild type and ETT^{-/-} fish were shown. The knockout lineage contained significantly less carnitine and acetyl carnitine in various organs. In addition, a significantly increased 8-hydroxy guanine (8-OH-G) content in the skin of ETT^{-/-} fish was shown. As 8-OH-G is an indicator of DNA lesions, there might be the possibility that ET protects DNA in ET rich tissues.

7 Abkürzungsverzeichnis

4-HQ	4-Hydroxychinolin
8-OH-G	8-Hydroxyguanin
ACN	Acetonitril
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
bp	Basenpaare
CCAC	Culture Collection of Algae at the University of Cologne
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EA	Amplifikationseffizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Ergothionein
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ETT	Ergothionein-Transporter
ETT/-	Knockoutmutante ohne funktionierenden Ergothionein-Transporter
F0	initiale Fluoreszenz
Fg	Frischgewicht
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer/Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GPS	global positioning system
h	human
HNE	4-Hydroxynonenal
HPLC	Highperformance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KO	Knockout
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LC	Liquid chromatography, Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled with tandem massspectrometry, Flüssigkeitschromatografie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LPO	Lipidperoxidation
LD50/LC50	mittlere letale Dosis/letale Konzentration
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MS	massspectrometry, Massenspektrometrie
p-Wert	Signifikanzwert für statistische Tests
PCI	Aqua Roti Phenol/CIA (1:1)
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT(+)/(-)	Ansätze für reverse Transkription mit (+) bzw. ohne (-) Enzym (Negativ-Kontrolle)
RTqPCR	Real Time quantitative PCR , quantitative Echtzeit-PCR
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des arithmetischen Mittels
SLC	Solute carrier
SRM	selected reaction monitoring
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
tBOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TEA	Tetraethylammounium
Tg	Trockengewicht
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
u	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VE-Wasser	vollentsalztes/demineralisiertes Wasser
WT	Wildtyp
zf	Zebrafisch

Literaturverzeichnis

1. Raes, M., Michiels, C., and Remacle, J. (1987). Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 3, 3-7.
2. Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.D., and Remacle, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51, 283-297.
3. Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 235-248.
4. Matés, J.É.M., Pérez-Gómez, C., and De Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603.
5. Meister, A., and Tate, S.S. (1976). Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45, 559-604.
6. Ketterer, B., Coles, B., and Meyer, D.J. (1983). The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 49, 59.
7. Christen, P., and Jaussi, R. (2004). *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*, (Springer).
8. Harington, C.R., and Mead, T.H. (1935). Synthesis of glutathione. *Biochem J* 29, 1602.
9. Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27, 916.
10. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
11. Tanret, C. (1909). Sur une base nouvelle retirée du seigle ergote, l'ergothioneine. *Rend. Acad. Sci* 149, 222-224.
12. Bello, M.H., Barrera-Perez, V., Morin, D., and Epstein, L. (2012). The *Neurospora crassa* mutant NcDeltaEgt-1 identifies an ergothioneine biosynthetic gene and demonstrates that ergothioneine enhances conidial survival and protects against peroxide toxicity during conidial germination. *Fungal Genet Biol* 49, 160-172.
13. Ta, P., Buchmeier, N., Newton, G.L., Rawat, M., and Fahey, R.C. (2011). Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in *Mycobacterium smegmatis* mutants. *J Bacteriol* 193, 1981-1990.

14. Barger, G., and Ewins, A.J. (1913). The Identity of Trimethylhistidine (Histidine-Betaine) from Various Sources. *Biochem J* 7, 204.
15. Melville, D.B., Horner, W.H., and Lubschez, R. (1954). Tissue ergothioneine. *J Biol Chem* 206, 221-228.
16. Genghof, D.S., and Van Damme, O. (1964). Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by mycobacteria. *J Bacteriol* 87, 852-862.
17. Genghof, D.S., and Van Damme, O. (1968). Biosynthesis of ergothioneine from endogenous hercynine in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 95, 340-344.
18. Genghof, D.S. (1970). Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and Actinomycetales. *J Bacteriol* 103, 475-478.
19. Seebeck, F.P. (2010). In vitro reconstitution of mycobacterial ergothioneine biosynthesis. *J Am Chem Soc* 132, 6632-6633.
20. Melville, D.B., Eich, S., and Ludwig, M.L. (1957). The biosynthesis of ergothioneine. *J Biol Chem* 224, 871-877.
21. Heath, H., Rimington, C., Searle, C., and Lawson, A. (1952). Some effects of administering ergothioneine to rats. *Biochem J* 50, 530.
22. Grundemann, D., Harlfinger, S., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Berkels, R., Jung, N., Rubbert, A., and Schomig, E. (2005). Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5256-5261.
23. Grigat, S., Harlfinger, S., Pal, S., Striebinger, R., Golz, S., Geerts, A., Lazar, A., Schomig, E., and Grundemann, D. (2007). Probing the substrate specificity of the ergothioneine transporter with methimazole, hercynine, and organic cations. *Biochem Pharmacol* 74, 309-316.
24. Taubert, D., Grimberg, G., Jung, N., Rubbert, A., and Schömig, E. (2005). Functional role of the 503F variant of the organic cation transporter OCTN1 in Crohn's disease. *Gut* 54, 1505-1506.
25. Nakamura, T., Sugiura, S., Kobayashi, D., Yoshida, K., Yabuuchi, H., Aizawa, S., Maeda, T., and Tamai, I. (2007). Decreased proliferation and erythroid differentiation of K562 cells by siRNA-induced depression of OCTN1 (SLC22A4) transporter gene. *Pharm. Res.* 24, 1628-1635.
26. Nakamura, T., Yoshida, K., Yabuuchi, H., Maeda, T., and Tamai, I. (2008). Functional characterization of ergothioneine transport by rat organic cation/carnitine transporter *Octn1* (*slc22a4*). *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1580-1584.
27. Kato, Y., Kubo, Y., Iwata, D., Kato, S., Sudo, T., Sugiura, T., Kagaya, T., Wakayama, T., Hirayama, A., Sugimoto, M., et al. (2010). Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm. Res.* 27, 832-840.
28. Hartman, P.E. (1990). Ergothioneine as antioxidant. *Methods Enzymol* 186, 310-318.

29. Crossland, J., Mitchell, J., and Woodruff, G. (1966). The presence of ergothioneine in the central nervous system and its probable identity with the cerebellar factor. *The Journal of Physiology* 182, 427-438.
30. Briggs, I. (1972). Ergothioneine in the central nervous system. *J Neurochem* 19, 27-35.
31. Kaneko, I., Takeuchi, Yamaoka, Y., Tanaka, Y., Fukuda, F., Fukumori, Y., , and Mayumi, T., Hama, T. (1980). Quantitative determination of ergothioneine in plasma and tissues by TLC-densitometry. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 28, 3093-3097.
32. Wu, X., George, R.L., Huang, W., Wang, H., Conway, S.J., Leibach, F.H., and Ganapathy, V. (2000). Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1466, 315-327.
33. Kobayashi, D., Aizawa, S., Maeda, T., Tsuboi, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Tsuji, A., and Tamai, I. (2004). Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 32, 1156-1162.
34. Lawson, A., Morley, H., and Woolf, L. (1950). The determination of ergothioneine. The non-occurrence of ergothioneine in urine. *Biochem J* 47, 513.
35. Melville, D.B. (1959). Ergothioneine. *Vitamins & Hormones* 17, 155-204.
36. Kawano, H., Otani, M., Takeyama, K., Kawai, Y., Mayumi, T., and Hama, T. (1982). Studies on ergothioneine. VI. Distribution and fluctuations of ergothioneine in rats. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 30, 1760.
37. Song, T.Y., Chen, C.L., Liao, J.W., Ou, H.C., and Tsai, M.S. (2010). Ergothioneine protects against neuronal injury induced by cisplatin both in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 48, 3492-3499.
38. Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O.I., and Halliwell, B. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* 288, 10-16.
39. Leone, E., and Mann, T. (1951). Ergothioneine in the seminal vesicle secretion.
40. Shires, T.K., Brummel, M.C., Pulido, J.S., and Stegink, L.D. (1997). Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 117, 117-120.
41. Motohashi, N., and Mori, I. (1986). Thiol-induced hydroxyl radical formation and scavenger effect of thiocarbamides on hydroxyl radicals. *J Inorg Biochem* 26, 205-212.
42. Rougee, M., Bensasson, R., Land, E.J., and Pariente, R. (1988). Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. *Photochem Photobiol* 47, 485-489.

43. Franzoni, F., Colognato, R., Galetta, F., Laurenza, I., Barsotti, M., Di Stefano, R., Bocchetti, R., Regoli, F., Carpi, A., Balbarini, A., et al. (2006). An in vitro study on the free radical scavenging capacity of ergothioneine: comparison with reduced glutathione, uric acid and trolox. *Biomed Pharmacother* 60, 453-457.
44. Arduini, A., Eddy, L., and Hochstein, P. (1990). The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function for ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* 281, 41-43.
45. Zhu, B.Z., Mao, L., Fan, R.M., Zhu, J.G., Zhang, Y.N., Wang, J., Kalyanaraman, B., and Frei, B. (2010). Ergothioneine Prevents Copper-Induced Oxidative Damage to DNA and Protein by Forming a Redox-Inactive Ergothioneine- Copper Complex. *Chem Res Toxicol* 24, 30-34.
46. Mann, T., and 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. *Biochem J* 53, 140.
47. Obayashi, K.K., Okano, Y.; Masaki, H.; Yarosh, D. B. (2005). L-Ergothionein scavenges superoxid and singlet oxygen and suppresses TNF-alpha and MMP-1 expressions in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *J. Cosmet. Sci.* 56, 17 - 27.
48. Botta, C., Di Giorgio, C., Sabatier, A.S., and De Meo, M. (2008). Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J. Photochem. Photobiol. B* 91, 24-34.
49. Markova, N.G., Karaman-Jurukovska, N., Dong, K.K., Damaghi, N., Smiles, K.A., and Yarosh, D.B. (2009). Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med* 46, 1168-1176.
50. Motohashi, N., Mori, I., Sugiura, Y., and Tanaka, H. (1973). Effect of ergothioneine on gamma-irradiation of metmyoglobin. *Radioisotopes (Tokyo)*, v. 22, no. 8, pp. 451-452 22.
51. Motohashi, N., Mori, I., Sugiura, Y., and Tanaka, H. (1977). Radioprotective effect of ergothioneine on gamma-irradiation of metmyoglobin: comparison with cysteine on sulfmyoglobin-formation. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 25, 2516.
52. Hartman, P.E., Hartman, Z., and Citardi, M.J. (1988). Ergothioneine, Histidine, and Two Naturally Occurring Histidine Dipeptides as Radioprotectors against γ -Irradiation Inactivation of Bacteriophages T4 and P22. *Radiat Res* 114, 319-330.
53. Heath, H., and Toennies, G. (1958). The preparation and properties of ergothioneine disulphide. *Biochem J* 68, 204.
54. Kawano, H., Murata, H., Iriguchi, S., Mayumi, T., and Hama, T. (1983). Studies on ergothioneine. XI. Inhibitory effect on lipid peroxide formation in mouse liver. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 31, 1682.

55. Asmus, K.D., Bensasson, R., Bernier, J., Houssin, R., and Land, E.J. (1996). One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C. *Biochem J* 315, 625.
56. Mitsuyama, H. (1999). Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes. *Clin. Sci.* 97, 407-411.
57. Hayeshi, R., Mukanganyama, S., Hazra, B., Abegaz, B., and Hasler, J. (2004). The interaction of selected natural products with human recombinant glutathione transferases. *Phytother Res* 18, 877-883.
58. Tokuhira, S., Yamada, R., Chang, X., Suzuki, A., Kochi, Y., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Ohtsuki, M., Ono, M., et al. (2003). An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 35, 341-348.
59. Taubert, D., Lazar, A., Grimberg, G., Jung, N., Rubbert, A., Delank, K.S., Perniok, A., Erdmann, E., and Schömig, E. (2006). Association of rheumatoid arthritis with ergothioneine levels in red blood cells: a case control study. *The Journal of rheumatology* 33, 2139-2145.
60. Peltekova, V.D., Wintle, R.F., Rubin, L.A., Amos, C.I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., et al. (2004). Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 36, 471-475.
61. Leung, E., Hong, J., Fraser, A.G., Merriman, T.R., Vishnu, P., and Krissansen, G.W. (2006). Polymorphisms in the organic cation transporter genes SLC22A4 and SLC22A5 and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Immunol Cell Biol* 84, 233-236.
62. Petermann, I., Triggs, C.M., Huebner, C., Han, D.Y., Gearry, R.B., Barclay, M.L., Demmers, P.S., McCulloch, A., and Ferguson, L.R. (2009). Mushroom intolerance: a novel diet-gene interaction in Crohn's disease. *Br J Nutr* 102, 506-508.
63. Taubert, D., Jung, N., Goeser, T., and Schomig, E. (2009). Increased ergothioneine tissue concentrations in carriers of the Crohn's disease risk-associated 503F variant of the organic cation transporter OCTN1. *Gut* 58, 312-314.
64. Rahman, I., Gilmour, P.S., Jimenez, L.A., Biswas, S.K., Antonicelli, F., and Aruoma, O.I. (2003). Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha induced NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 860-864.
65. Maeda, T., Hirayama, M., Kobayashi, D., Miyazawa, K., and Tamai, I. (2007). Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines. *Drug Metab Dispos* 35, 394-401.

66. Laurenza, I., Prato, S.D., Benzi, L., Colognato, R., and Migliore, L. (2008). Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an anti-inflammatory action. *Biofactors* 33, 237-247.
67. Salt, H.B. (1931). The ergothioneine content of the blood in health and disease. *Biochem J* 25, 1712.
68. Fraser, R., and Jegard, S. (1950). Blood ergothioneine levels in diabetes mellitus. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 35, 960.
69. Beatty, C.H. (1952). Levels of ergothioneine in the red blood cell in experimental diabetes. *J Biol Chem* 199, 553-561.
70. Epanand, R. (1982). The role of dietary ergothioneine in the development of diabetes mellitus. *Med Hypotheses* 9, 207-213.
71. Guijarro, M., Indart, A., Aruoma, O., Viana, M., and Bonet, B. (2002). Effects of ergothioneine on diabetic embryopathy in pregnant rats. *Food Chem Toxicol* 40, 1751-1755.
72. Moncaster, J., Walsh, D., Gentleman, S., Jen, L., and Aruoma, O. (2002). Ergothioneine treatment protects neurons against N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in an in vivo rat retinal model. *Neurosci Lett* 328, 55.
73. Bedirli, A., Sakrak, O., Muhtaroglu, S., Soyuer, I., Guler, I., Riza Erdogan, A., and Sozuer, E.M. (2004). Ergothioneine pretreatment protects the liver from ischemia-reperfusion injury caused by increasing hepatic heat shock protein 70. *J Surg Res* 122, 96-102.
74. Sakrak, O., Kerem, M., Bedirli, A., Pasaoglu, H., Akyurek, N., Ofluoglu, E., and Gultekin, F.A. (2008). Ergothioneine modulates proinflammatory cytokines and heat shock protein 70 in mesenteric ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 144, 36-42.
75. Martin, K. (2010). The bioactive agent ergothioneine, a key component of dietary mushrooms, inhibits monocyte binding to endothelial cells characteristic of early cardiovascular disease. *J Med Food* 13, 1340.
76. Shukla, Y., Kulshrestha, O., and Khuteta, K. (1981). Ergothioneine content in normal and senile human cataractous lenses. *The Indian journal of medical research* 73, 472.
77. Shukla, Y., Kulshrestha, O., and Khuteta, K. (1982). Study of content of redox substances ergothioneine, glutathione and ascorbic acid in normal and senile cataractous lenses in human eyes. *Indian J Ophthalmol* 30, 441.
78. Nishigori, H., Hayashi, R., Lee, J.W., and Iwatsuru, M. (1984). Effect of MPG on glucocorticoid-induced cataract formation in developing chick embryo. *Investigative ophthalmology & visual science* 25, 1051-1055.

79. Creaser, C.W. (1934). The technic of handling the zebra fish (*Brachydanio rerio*) for the production of eggs which are favorable for embryological research and are available at any specified time throughout the year. *Copeia*, 159-161.
80. Nüsslein-Volhard, C.D., R.; (2002). *Zebrafish A Practical Approach*, (Oxford University Press).
81. Meunier, R. (2012). Stages in the development of a model organism as a platform for mechanistic models in developmental biology: Zebrafish, 1970-2000. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* 43, 522-531.
82. Barbazuk, W.B. (2000). The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Res* 10, 1351-1358.
83. Glass, A.S., and Dahm, R. (2004). The zebrafish as a model organism for eye development. *Ophthalmic Res* 36, 4-24.
84. Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8, 353-367.
85. Milan, D.J. (2003). Drugs That Induce Repolarization Abnormalities Cause Bradycardia in Zebrafish. *Circulation* 107, 1355-1358.
86. Thorpe, J.L., Doitsidou, M., Ho, S.Y., Raz, E., and Farber, S.A. (2004). Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGCoA reductase activity and prenylation. *Dev Cell* 6, 295-302.
87. Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Lohr, C.V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., and Tanguay, R.L. (2007). Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. *J Biol Chem* 282, 35202-35210.
88. Emelyanov, A., and Parinov, S. (2008). Mifepristone-inducible LexPR system to drive and control gene expression in transgenic zebrafish. *Dev Biol* 320, 113-121.
89. Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., and Chung, B.C. (2009). A *cyp19a1b*-GFP (Aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47, 67-73.
90. Delvecchio, C., Tiefenbach, J., and Krause, H.M. (2011). The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* 9, 354-361.
91. Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M., and Hopkins, N. (1999). A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev* 13, 2713.
92. Bach, M., Identifizierung des orthologen Ergothionein-Transporters des Zebrafischs, Etablierung und Phänotypisierung des Knockout-Modells, Universität zu Köln, 2009
93. Amores, A., Force, A., Yan, Y., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R., Langeland, J., Prince, V., and Wang, Y. (1998). Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution. *Science (New York, NY)* 282, 1711.

94. Baldrige, R.C., and Lewis, H.B. (1953). Diet and the ergothioneine content of blood. *J Biol Chem* 202, 169-176.
95. Dong, K.K., Damaghi, N., Kibitel, J., Canning, M.T., Smiles, K.A., and Yarosh, D.B. (2007). A comparison of the relative antioxidant potency of L-ergothioneine and idebenone. *J. Cosmet. Dermatol.* 6, 183-188.
96. Deiana, M. (2004). L-Ergothioneine modulates oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of polyunsaturated fatty acids. *Clin. Nutr.* 23, 183-193.
97. Cheah, I.K., and Halliwell, B. (2012). Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1822, 784-793.
98. <http://www.ccac.uni-koeln.de>
99. <http://www.uni-goettingen.de/de/184982.html>
100. <http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Zebrafish.pdf>
101. OECD (1992). Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, (OECD Publishing).
102. Schliewen, U. (2000). *Einzigartige Aqurienwelt*, (München: Gräfe und Unzer Verlag GmbH).
103. Speranza, A., Seeley, R., Seeley, V., and Perlmutter, A. (1977). The effect of sublethal concentrations of zinc on reproduction in the zebrafish, *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan. *Environ. Pollut.* 12, 217-222.
104. Dave, G., and Xiu, R. (1991). Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch Environ Contam Toxicol* 21, 126-134.
105. Timme-Laragy, A.R., Van Tiem, L.A., Linney, E.A., and Di Giulio, R.T. (2009). Antioxidant responses and NRF2 in synergistic developmental toxicity of PAHs in zebrafish. *Toxicol Sci* 109, 217-227.
106. Mobarak, Y.M.S., and Sharaf, M.M. (2011). Lead Acetate-induced Histopathological Changes in the Gills and Digestive System of Silver Sailfin Molly (*Poecilia latipinna*).
107. Mülhardt, C. (2008). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, (Spektrum Akademischer Verlag).
108. Wittwer, C., Ririe, K., Andrew, R., David, D., Gundry, R., and Balis, U. (1997). The LightCycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques* 22, 176-181.
109. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994.

110. Täpp, I., Malmberg, L., Rennel, E., and Wik, M. (2000). Homogeneous Scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5-nuclease TaqMan® assay and molecular beacon probes. *BioTechniques* 28, 732-738.
111. Gründemann, D., Babin-Ebell, J., Martel, F., Örding, N., Schmidt, A., and Schömig, E. (1997). Primary Structure and Functional Expression of the Apical Organic Cation Transporter from Kidney Epithelial LLC-PK1 Cells. *J Biol Chem* 272, 10408-10413.
112. Andreoli, R., Manini, P., Corradi, M., Mutti, A., and Niessen, W. (2003). Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 637-645.
113. Harlfinger, S., Identifizierung des physiologischen Substrates und funktionelle Charakterisierung des organischen Kationentransporters OCTN1 mittels LC-MS/MS, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, 2005
114. <http://www.massbank.jp>
115. <http://metlin.scripps.edu>
116. Spicer, S., Wooley, J., and Kessler, V. (1951). Ergothioneine depletion in rabbit erythrocytes and its effect on methemoglobin formation and reversion. Volume 77. (Royal Society of Medicine), pp. 418-420.
117. Dubost, N., Ou, B., and Beelman, R. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem* 105, 727-735.
118. Pfeiffer, C., Bauer, T., Surek, B., Schömig, E., and Gründemann, D. (2011). Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine. *Food Chem* 129, 1766-1769.
119. Askari, A., and Melville, D.B. (1962). The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis: hercynine as an intermediate. *J Biol Chem* 237, 1615-1618.
120. Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11, 81.
121. Syslova, K., Kacer, P., Kuzma, M., Najmanova, V., Fenclova, Z., Vlckova, S., Lebedova, J., and Pelclova, D. (2009). Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877, 2477-2486.
122. Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424, 83-95.
123. Bach, M., Grigat, S., Pawlik, B., Fork, C., Utermohlen, O., Pal, S., Banczyk, D., Lazar, A., Schomig, E., and Grundemann, D. (2007). Fast set-up of doxycycline-inducible

- protein expression in human cell lines with a single plasmid based on Epstein-Barr virus replication and the simple tetracycline repressor. *FEBS J* 274, 783-790.
124. Rebouche, C.J., and Seim, H. (1998). Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr* 18, 39-61.
 125. Vaz, F.M., and Wanders, R.J.A. (2002). Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 361, 417.
 126. Rebouche, C.J. (2004). Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1033, 30-41.
 127. Stone, T.W., and Darlington, L.G. (2002). Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 609-620.
 128. Cheng, K., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., and 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.
 129. Jaruga, P., Zastawny, T.H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M., and Olinski, R. (1994). Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 341, 59-64.
 130. Spencer, J.P.E., Jenner, A., Chimel, K., Aruoma, O.I., Cross, C.E., Wu, R., and Halliwell, B. (1995). DNA strand breakage and base modification induced by hydrogen peroxide treatment of human respiratory tract epithelial cells. *FEBS Lett* 374, 233-236.
 131. Zastawny, T.H., Altman, S.A., Randers-Eichhorn, L., Madurawe, R., Lumpkin, J.A., Dizdaroglu, M., and Rao, G. (1995). DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 1013-1022.
 132. Boldogh, I., Hajas, G., Aguilera-Aguirre, L., Hegde, M.L., Radak, Z., Bacsı, A., Sur, S., Hazra, T.K., and Mitra, S. (2012). Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. *J Biol Chem* 287, 20769-20773.
 133. Loft, S., Danielsen, P., Lohr, M., Jantzen, K., Hemmingsen, J.G., Roursgaard, M., Karotki, D.G., and Moller, P. (2012). Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. *Arch Biochem Biophys* 518, 142-150.
 134. Roszkowski, K., and Olinski, R. (2012). Urinary 8-oxoguanine as a predictor of survival in patients undergoing radiotherapy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21, 629-634.
 135. Ackermann, D., Timpe, O., and Poller, K. (1929). Über das Anserin, einen neuen Bestandteil der Vogelmuskulatur. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 183, 1-10.

136. Tolkatschewskaia, N. (1929). Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. 28. Mitteilung. Über die Extraktivstoffe des Hühnerfleisches. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie *185*, 28-32.
137. Hosein, E., and Smart, M. (1960). The presence of anserine and carnosine in brain tissue. Can J Biochem Physiol *38*, 569-573.
138. HORISAKA, V.K. (1963). Über das freie Histidin und seine Derivate in verschiedenen Fischmuskeln I. Über die Isolierung des Histidins und seiner Derivate aus der Muskulatur von *Anguilla japonica*, *Neothynnus macropterus*, *Gymnothorax kidako*, *Ophicephalus argus* and *Cypselurus agoo*. J. Biochem. (Tokyo) *54*, 349-354.
139. Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C., and Ames, B.N. (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. Proceedings of the National Academy of Sciences *85*, 3175-3179.
140. Boldyrev, A.A., and Severin, S.E. (1990). The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. Adv Enzyme Regul *30*, 175-188.
141. Barger, G., and Ewins, A.J. (1911). CCLVII.—The constitution of ergothioneine: a betaine related to histidine. Journal of the Chemical Society, Transactions *99*, 2336-2341.
142. Dale, H.H., and Laidlaw, P.P. (1910). The physiological action of β -iminazolyethylamine. The Journal of Physiology *41*, 318-344.
143. Boldyrev, A., Bulygina, E., Leinsoo, T., Petrushanko, I., Tsubone, S., and Abe, H. (2004). Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology *137*, 81-88.
144. Asatoor, A., and Armstrong, M.D. (1967). 3-Methylhistidine, a component of actin. Biochem Biophys Res Commun *26*, 168-174.
145. Johnson, P., Harris, C., and Perry, S. (1967). 3-Methylhistidine in actin and other muscle proteins. Biochem J *105*, 361.
146. Derave, W., Özdemir, M.S., Harris, R.C., Pottier, A., Reyngoudt, H., Koppo, K., Wise, J.A., and Achten, E. (2007). β -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. J Appl Physiol *103*, 1736-1743.
147. Hill, C., Harris, R., Kim, H., Harris, B., Sale, C., Boobis, L., Kim, C., and Wise, J. (2007). Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. Amino Acids *32*, 225-233.
148. Gurer, H., and Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? Free Radic. Biol. Med. *29*, 927-945.

149. Gurer-Orhan, H., Sabır, H.U., and Özgünes, H. (2004). Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology* 195, 147-154.
150. Becker, B.F. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 615-631.
151. Tiedemann, F., and Gmelin, L. (1827). Einige neue Bestandtheile der Galle des Ochsen. *Annalen der Physik* 85, 326-337.
152. Huxtable, R. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72, 101-163.
153. Snell, E.E. (1953). Summary of known metabolic functions of nicotinic acid, riboflavin and vitamin B6. *Physiol Rev* 33, 509-524.
154. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., and Uhler, M.D. (1999). Biosynthesis of Catecholamines.
155. Maerker-Alzer, G., Diemer, O., Strümper, R., and Rohe, M. (1986). Neopterin production in inflamed knee joints: high levels in synovial fluids. *Rheumatol Int* 6, 151-154.
156. Reibnegger, G., Egg, D., Fuchs, D., Günther, R., Hausen, A., Werner, E.R., and Wachter, H. (2005). Urinary neopterin reflects clinical activity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 29, 1063-1070.
157. Reibnegger, G., Bollbach, R., Fuchs, D., Hausen, A., Judmaier, G., Prior, C., Rotthauwe, H., Werner, E., and Wachter, H. (1986). A simple index relating clinical activity in Crohn's disease with T cell activation: hematocrit, frequency of liquid stools and urinary neopterin as parameters. *Immunobiology* 173, 1-11.
158. Tibble, J., Teahon, K., Thjodleifsson, B., Roseth, A., Sigthorsson, G., Bridger, S., Foster, R., Sherwood, R., Fagerhol, M., and Bjarnason, I. (2000). A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 47, 506-513.
159. Schwarcz, R. (2004). The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target. *Curr Opin Pharmacol* 4, 12-17.
160. Dandona, P., Mohanty, P., Ghanim, H., Aljada, A., Browne, R., Hamouda, W., Prabhala, A., Afzal, A., and Garg, R. (2001). The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 355-362.
161. Sakata, D., Yao, C., and Narumiya, S. (2010). Prostaglandin E2, an immunoactivator. *J Pharmacol Sci* 112, 1-5.
162. Gümğüm, B., Ünlü, E., Tez, Z., and Gülsün, Z. (1994). Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris River in Turkey. *Chemosphere* 29, 111-116.

163. Canli, M., and Atli, G. (2003). The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ Pollut* *121*, 129-136.
164. Dural, M., Göksu, M.Z.L., and Özak, A.A. (2007). Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the Tuzla lagoon. *Food Chem* *102*, 415-421.
165. Creti, P., Trinchella, F., and Scudiero, R. (2010). Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ Monit Assess* *165*, 321-329.
166. Liu, J., Yeo, H.C., Doniger, S.J., and Ames, B.N. (1997). Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography–mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem* *245*, 161-166.
167. Wallace, K.B. (1997). *Free radical toxicology*, (Informa HealthCare).
168. Esterbauer, H. (1970). Kinetik der Reaktion von Sulfhydrylverbindungen mit α , β -ungesättigten Aldehyden in wässrigem System. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly* *101*, 782-810.
169. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* *160*, 1-40.
170. Olinski, R., Zastawny, T., Budzbon, J., Skokowski, J., Zegarski, W., and Dizdaroglu, M. (1992). DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett* *309*, 193-198.
171. Fromme, J.C., Banerjee, A., and Verdine, G.L. (2004). DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol* *14*, 43-49.
172. Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y., and Wu, J.T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* *339*, 1-9.
173. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Gold, L.S. (1993). DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* *101*, 35.
174. Weimann, A., Belling, D., and Poulsen, H.E. (2002). Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* *30*, e7-e7.
175. Nishimura, S. (2006). 8-Hydroxyguanine: From its discovery in 1983 to the present status. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* *82*, 127-141.
176. Colognato, R., Laurenza, I., Fontana, I., Coppede, F., Siciliano, G., Coecke, S., Aruoma, O.I., Benzi, L., and Migliore, L. (2006). Modulation of hydrogen peroxide-

- induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. *Clin. Nutr.* 25, 135-145.
177. Nikodemus, D., Lazic, D., Bach, M., Bauer, T., Pfeiffer, C., Wiltzer, L., Lain, E., Schömig, E., and Gruendemann, D. (2011). Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma. *J Physiol Pharmacol* 62, 411.
178. Çoyan, K., Bucak, M.N., Başpınar, N., Taşpınar, M., and Aydos, S. (2012). Ergothioneine attenuates the DNA damage of post-thawed Merino ram sperm. *Small Ruminant Res* 106, 165-167.
179. Costa, C.A., Trivelato, G.C., Pinto, A.M.P., and Bechara, E.J.H. (1997). Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem* 43, 1196-1202.
180. Huber, C., Fuchs, D., Niederwieser, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Nilsson, K., and Wachter, H. (1984). Neopterin, ein neuer biochemischer Marker zur klinischen Erfassung zellulärer Immunreaktionen. *J. Mol. Med.* 62, 103-113.
181. Song, H.D., Sun, X.J., Deng, M., Zhang, G.W., Zhou, Y., Wu, X.Y., Sheng, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Jiang, C.L., et al. (2004). Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16240-16245.

Erklärung

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

Gedankengut oder Daten die aus fremden Quellen entliehen wurden sind kenntlich gemacht. Diese Dissertation ist von mir noch an keiner anderen Stelle vorgelegt worden. Ich habe vormals noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Wermelskirchen den 26.10.2012