

**Charakterisierung von Transkriptom und Phänotyp  
different robuster Zuchtlinien der Regenbogenforelle  
mit Fokus auf das Kreatin-System der Fische**

Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Andreas Borchel, geb. am 08.05.1987 in Marl  
aus Rostock

Rostock, April 2015

Gutachter:

1. Gutachter:

PD Dr. Tom Goldammer

Institut für Genombiologie, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

2. Gutachter:

Prof. Dr. Renate Horn

Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock, Rostock

Datum der Einreichung: 15. April 2015

Datum der Verteidigung: 26. Oktober 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die Bedeutung von Fischproduktion & Aquakultur . . . . .	1
1.2. Umweltfaktoren in der Aquakultur . . . . .	3
1.3. Die BORN-Forelle als robuste, lokale Zuchtlinie . . . . .	4
1.4. Energiebereitstellung . . . . .	6
1.4.1. Energiesysteme . . . . .	6
1.4.1.1. Das Kreatinsystem . . . . .	8
1.5. Zielsetzung . . . . .	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1. Tiere . . . . .	14
2.1.1. Regenbogenforellen . . . . .	14
2.1.1.1. Temperaturakklimation . . . . .	15
2.1.1.2. Kälteschock . . . . .	15
2.1.1.3. Besatzdichte . . . . .	15
2.1.1.4. Besatz- und Hitzestress . . . . .	16
2.1.2. Andere Tierarten . . . . .	16
2.2. Angewendete Methoden . . . . .	16
2.2.1. Probenahme . . . . .	17
2.2.2. Molekularbiologische Methoden . . . . .	18
2.2.2.1. DNA-Isolation . . . . .	18
2.2.2.2. RNA-Isolation . . . . .	18
2.2.2.3. DNA-Chips . . . . .	19
2.2.2.4. Mikrofluid-Chip-basierte Echtzeit-PCR . . . . .	22
2.2.2.5. Synthese von komplementärer DNA . . . . .	24
2.2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	24
2.2.2.7. Quantifizierung von Nukleinsäuren . . . . .	33
2.2.2.8. Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung . . . . .	33
2.2.2.9. Aufreinigung von PCR-Produkten . . . . .	34
2.2.2.10. TA-Klonierung von PCR-Produkten . . . . .	34
2.2.2.11. Mini-Prep . . . . .	35
2.2.2.12. Sequenzierung . . . . .	35
2.2.2.13. GFP-gekoppelte heterologe Proteinexpression . . . . .	35

---

2.2.2.14.	Zellkultur . . . . .	36
2.2.2.15.	<i>Western Blot</i> . . . . .	37
2.2.3.	Bioinformatische Methoden . . . . .	37
2.2.3.1.	Sequenzanalyse . . . . .	37
2.2.3.2.	Erstellung von Stammbäumen . . . . .	38
2.2.3.3.	Clusteranalyse . . . . .	38
2.2.3.4.	Proteinanalyse . . . . .	38
2.2.4.	Phänotypische Untersuchungen . . . . .	39
2.2.4.1.	Verhalten . . . . .	39
2.2.4.2.	Wachstum . . . . .	39
2.2.5.	Statistische Analyse . . . . .	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1.	Grundlegender Zuchtlinien-Vergleich . . . . .	41
3.1.1.	Holistische Transkriptomanalyse mittels DNA-Chips . . . . .	41
3.1.2.	Verifizierung . . . . .	44
3.1.3.	Überblick . . . . .	50
3.2.	Die Kreatinsysteme verschiedener Tierarten . . . . .	50
3.2.1.	Genidentifikation . . . . .	51
3.2.2.	Transkriptquantifizierung . . . . .	54
3.2.3.	Überblick . . . . .	62
3.3.	Das Kreatinsystem der Regenbogenforelle . . . . .	62
3.3.1.	Genidentifizierung . . . . .	62
3.3.2.	Transkriptquantifizierung . . . . .	67
3.3.3.	Überblick . . . . .	72
3.4.	Phänotypische Charakterisierung . . . . .	73
3.4.1.	Verhalten . . . . .	73
3.4.2.	Wachstum . . . . .	75
3.4.3.	Überblick . . . . .	77
3.5.	Ergebnisüberblick . . . . .	77
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
4.1.	Grundlegender Zuchtlinien-Vergleich . . . . .	78
4.2.	Kreatinsystem . . . . .	85
4.3.	Phänotypische Unterschiede . . . . .	93
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>Literatur</b>		<b>100</b>

---

<b>Anhang</b>	<b>115</b>
<b>A. Verwendete Primer</b>	<b>115</b>
<b>B. Verwendete Geräte und Chemikalien</b>	<b>116</b>
B.1. Geräte . . . . .	116
B.2. Kits . . . . .	116
B.3. Chemikalien . . . . .	117
<b>C. Zusätzliche Ergebnisse der holistischen Transkriptomanalyse</b>	<b>118</b>
<b>D. Veröffentlichte GenBank-Sequenzen</b>	<b>120</b>
<b>E. Codierende Sequenz des <i>SLC6A8</i>-Kandidaten</b>	<b>132</b>
<b>F. Danksagung</b>	<b>134</b>
<b>G. Curriculum Vitae</b>	<b>135</b>
<b>H. Veröffentlichungen und Fachtagungsbeiträge</b>	<b>136</b>
<b>I. Borchel <i>et al.</i> SpringerPlus 2014, 3:510</b>	<b>137</b>
<b>J. Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>146</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1. Entwicklung der weltweiten Fischproduktion . . . . .	1
1.2. Von der Umgebungstemperatur beeinflusste Parameter beim Fisch . . .	3
1.3. Zeitliche Abfolge der Aktivität der drei Energiesysteme . . . . .	6
1.4. Strukturformeln von Kreatin, Kreatinphosphat und Kreatinin . . . . .	8
1.5. Zusammenhang zwischen Kreatin- und ATP-Konzentration . . . . .	9
1.6. Das Kreatinsystem im Überblick . . . . .	10
2.1. Versuchsdesigns . . . . .	14
2.2. Exemplarische Darstellung der Besatzdichten des Besatzdichte-Versuchs	16
2.3. Überblick über die angewendeten Methoden . . . . .	17
2.4. Flussdiagramm zur Chip-Auswertung . . . . .	20
2.5. Flussdiagramm zur Mikrofluid-Chip-basierten Echtzeit-PCR . . . . .	23
2.6. Exemplarische Grafiken einer qRT-PCR . . . . .	29
2.7. Exemplarische Geschlechtsbestimmung bei der Regenbogenforelle . . . .	33
3.1. Venn-Diagramm mit der Anzahl different exprimierter Gene . . . . .	42
3.2. <i>Go-Term</i> -Anreicherungsanalyse . . . . .	43
3.3. Positive Ergebnisse der Mikrofluid-Chip-basierten Echtzeit-PCR . . . . .	47
3.4. Ergebnisse der Mikrofluid-Chip-basierten qRT-PCR für Genvarianten . .	48
3.5. Vergleich von Mikrofluid-Chip-basierter und klassischer qRT-PCR . . . .	50
3.6. Alignments der beiden <i>GAMT</i> -Varianten des Schnäpels . . . . .	52
3.7. Sequenzalignments und Kladogramme von Kreatingenen . . . . .	53
3.8. Gewebeverteilung der Kreatingene im Ostseeschnäpel . . . . .	55
3.9. Expression von Kreatingenen in rotem und weißem Muskel des Schnäpels	56
3.10. Kopienzahlen der genutzten Referenzgene in den untersuchten Tierarten	57
3.11. Normierte Kopienzahlen von <i>GATM</i> in den untersuchten Tierarten . . . .	58
3.12. Normierte Kopienzahlen von <i>GAMT</i> in den untersuchten Tierarten . . . .	60
3.13. Genexpression von <i>GAMTa</i> und <i>GAMTb</i> im Ostseeschnäpel . . . . .	60
3.14. Normierte Kopienzahlen von <i>CKM</i> in den untersuchten Tierarten . . . .	61
3.15. Sequenzhomologien von Kreatingenen zwischen verschiedenen Spezies . .	63
3.16. Vorausgesagte Proteinstruktur des durch <i>SLC6A8</i> codierten Proteins . . .	64
3.17. Zelluläre Lokalisation des <i>SLC6A8</i> -GFP-Fusionsproteins . . . . .	66
3.18. Genstrukturvergleich von <i>SLC6A8</i> . . . . .	66
3.19. Semiquantitative PCRs von Kreatingenen in einer Import-Forelle . . . . .	67
3.20. Genexpression der Gene <i>GATM</i> und <i>GAMT</i> . . . . .	69
3.21. Genexpression des Gens <i>SLC6A8</i> . . . . .	70
3.22. Genexpression der Gene <i>CKB</i> und <i>CKM</i> . . . . .	71
3.23. Vertikale Aufenthaltsbereiche von BORN- und Importforellen . . . . .	74
3.24. Verhältnis von Gewicht und Länge von BORN- und Importforellen . . . .	75
3.25. Wachstum von Forellen in verschiedenen Wasserqualitäten . . . . .	76

---

4.1. Überblick über den molekularen Linienvergleich . . . . .	79
4.2. Stammbaum der untersuchten Tierarten . . . . .	91
C.1. Gleichmäßige Genexpression gemäß Mikrofluid-Chip-basierter qRT-PCR	119

## Tabellenverzeichnis

1.1. Systematische Klassifizierung der Regenbogenforelle . . . . .	2
1.2. Übersicht über bisherige vergleichende Studien zur BORN-Forelle . . . . .	5
2.1. Standard-PCR-Ansatz . . . . .	25
2.2. Standard-PCR-Programm . . . . .	25
2.3. qRT-PCR-Ansatz . . . . .	28
2.4. qRT-PCR-Programm . . . . .	28
2.5. In der qRT-PCR verwendete Referenzgene . . . . .	31
2.6. Ligationsansatz . . . . .	34
2.7. Restriktion und Ligation . . . . .	36
2.8. Signifikanzniveaus . . . . .	40
3.1. Kandidatengene für differente Expression zwischen den Forellenlinien . . . . .	45
3.2. Geschlechts-Effekte in der BORN-Forelle . . . . .	49
3.3. Abgeleitete Spezies-übergreifende Primer . . . . .	51
C.1. Different exprimierte Gene gemäß DNA-Chip-Analyse . . . . .	118

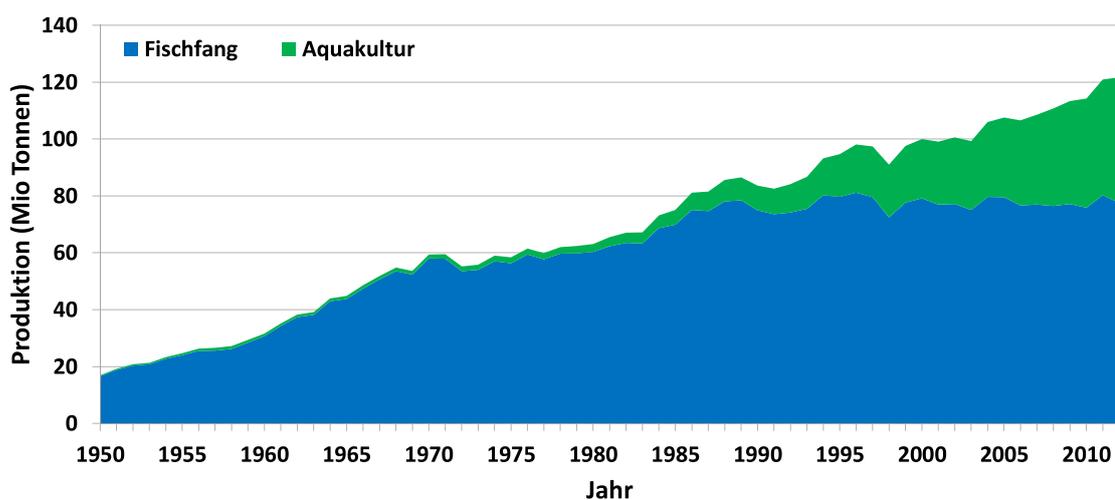
## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BI	Bandenintensität
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CEPT1	<i>Choline/ethanolamine phosphotransferase 1</i>
CK	Kreatinkinase
CKB	Kreatinkinase, Gehirn-Typ
CKM	Kreatinkinase, Muskel-Typ
CKMT	Kreatinkinase, Mitochondrien-Typ
CT1	Kreatintransporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENA	Europäisches Nukleotid-Archiv
EST	expressed sequence tag
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>false-discovery-rate</i>
G	Gewicht
GAMT	Guanidinoacetat-N-Methyltransferase
GATM	Glycin-Amidino-transferase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GIMAP7	<i>GTPase, IMAP family member 7</i>
GO	Gen-Ontologie
IFC	flüssigkeitsbasierter integrierter Schaltkreis
kDa	Kilodalton
L	Länge
mRNA	Boten-RNA
MW	Mittelwert
Mya	<i>million years ago</i>
NTC	<i>Non-template-control</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RACE	Schnelle Amplifikation von cDNA-Enden
RARRES3	<i>Retinoic acid receptor responder protein 3</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SLC6A8	<i>solute carrier family 6, member 8</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TPM1	<i>Tropomyosin-1 alpha chain</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Bedeutung von Fischproduktion & Aquakultur

Fischprodukte stellen einen wichtigen Bestandteil der Ernährung dar. Sie liefern beispielsweise als wertvoll geltende Omega-3-Fettsäuren, die auch vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen schützen sollen (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2003). Daher wird sowohl von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, wie auch den zuständigen amerikanischen Behörden ein Verzehr von zwei Fischmahlzeiten bzw. Meeresfrüchte-Mahlzeiten pro Woche empfohlen (DGE, 2013; USDA UND HHS, 2010). Mit einer steigenden Weltbevölkerung nimmt auch die Nachfrage nach Fischprodukten weltweit zu (MERINO *et al.*, 2012). Seit einigen Jahren kann die Nachfrage nach Fischprodukten jedoch nicht mehr ausschließlich durch die Fischerei gedeckt werden. Dies ist auf einen starken Rückgang der Fischbestände durch Überfischung zurückzuführen (SRINIVASAN *et al.*, 2012) sowie in Folge dessen auf Schutzmaßnahmen wie die Einführung von Fangquoten in Europa. Für eine nachhaltige Fischerei wird teilweise gar eine weitere Reduktion der Fischfangmenge um 50 % empfohlen (COLL *et al.*, 2008). Vor diesem Hintergrund ist nicht mehr mit einer weiteren Steigerung des Fischfangs zu rechnen. Dennoch nimmt die Gesamtproduktion von Fisch stetig zu. Dies ist auf das Wachstum des Aquakultursektors zurückzuführen. War seine Bedeutung bis in die 1990er Jahre noch vergleichsweise gering, macht die in Aquakultur produzierte Fischmenge mittlerweile mehr als ein Drittel des gesamten industriell genutzten Fisches aus und der Sektor wächst weiter



**Abb. 1.1: Entwicklung der weltweiten Fischproduktion von 1950-2012**  
Daten basierend auf FAO (2014)

(FAO, 2014). Abb. 1.1 zeigt die Entwicklung der weltweiten Fischproduktion seit den 1950er Jahren. Seit 1986 stagniert die durch Fischfang produzierte Fischmenge bei etwa 75 Millionen Tonnen, während die Aquakulturproduktion von 6 Millionen (1986) auf 44 Millionen Tonnen im Jahr 2012 gesteigert wurde.

In Deutschland ist die Regenbogenforelle der am stärksten in Aquakultur produzierte Fisch mit 9394 Tonnen Produktion im Jahr 2012 (FAO, 2014). In ganz Europa kommt sie auf Platz 2 hinter dem atlantischen Lachs, wobei sie international lediglich auf Platz 14 liegt. Die in Hinblick auf die Produktionsmenge wichtigsten Länder der Regenbogenforellenproduktion sind Chile, der Iran und die Türkei.

Die taxonomische Klassifizierung der Regenbogenforelle ist in Tab. 1.1 gezeigt. Sie gehört innerhalb der Klasse der Strahlenflosser (Actinopterygii) zu den Lachsartigen (Salmoniformes) und bildet unter anderem mit dem Lachs (*Salmo salar*) und dem Ostseeschnäpel (*Coregonus maraena*) die Familie der Lachsfische.

Natürlicherweise kommt die Regenbogenforelle im Nordwesten der USA vor, ist jedoch mittlerweile weltweit verbreitet. Gemäß Daten der FAO wurde im Jahr 2012 in 69 Ländern Regenbogenforellen-Aquakultur betrieben, auf jedem Kontinent mit Ausnahme von Antarktika.

Ein großer Teil der in Deutschland verkauften Forellen wird importiert. Auch die in Deutschland kultivierten Forellen werden häufig als Augeneier importiert und dann hier aufgezogen. Regionale Forellenzuchtlinien, die den kompletten Zuchtprozess vor Ort durchlaufen, sollten vermutlich besser an lokale Bedingungen angepasst sein. Wenn diese lokalen Anpassungen auf genetischer und phänotypischer Ebene verstanden werden, wozu diese Arbeit einen Beitrag leisten soll, kann dies große Vorteile für die Aquakultur dieser Spezies, aber möglicherweise auch anderer Fischarten erbringen.

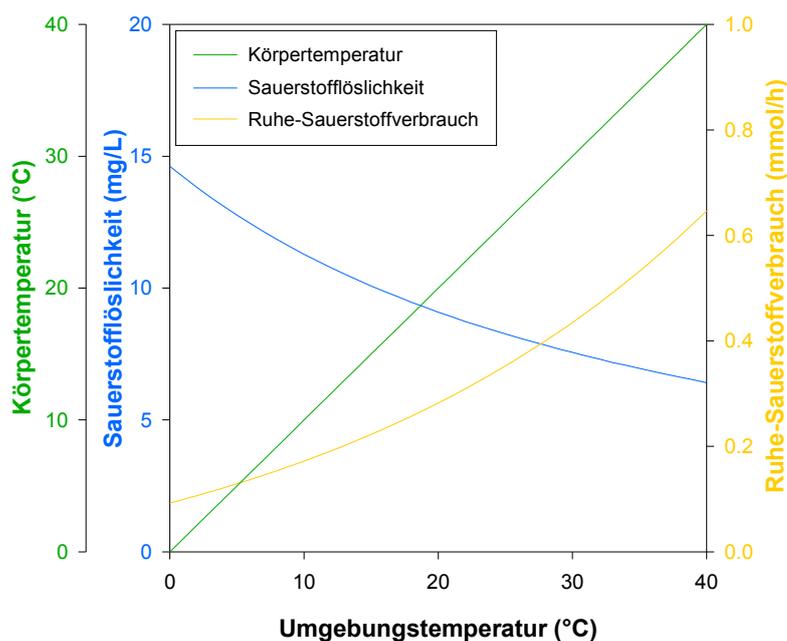
**Tab. 1.1: Systematische Klassifizierung der Regenbogenforelle nach Nelson (2006)**

Phylum	Chordata
Subphylum	Craniata
Klasse	Actinopterygii
Unterklasse	Neopterygii
Teilkategorie	Teleostei
Unter-Teilkategorie	Euteleostei
Überordnung	Protacanthopterygii
Ordnung	Salmoniformes
Familie	Salmonidae
Unterfamilie	Salmoninae
Gattung	<i>Oncorhynchus</i>
Art	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

## 1.2. Umweltfaktoren in der Aquakultur

In Aquakulturanlagen sind Fische, wie auch in der Natur, einer Vielzahl an Umweltfaktoren ausgesetzt. Diese lassen sich grundsätzlich in biotische sowie abiotische Faktoren unterteilen. Auf Seiten der biotischen Faktoren ist die Anzahl bedeutender Faktoren in der Aquakultur reduziert; Räuber spielen beispielsweise bei geschlossenen Anlagen keine, bei offenen Anlagen eine geringere Rolle. Wichtiger hingegen ist der Aspekt der Besatzdichte, der sich auf die Anzahl der Fische in der vorhandenen Wassermenge bezieht. Zu hohe Besatzdichten könnten bei den Fischen beispielsweise Stress verursachen (LUPATSCH *et al.*, 2010). Ebenfalls zu den biotischen Faktoren sind Parasiten sowie Pathogene zu zählen, deren Vorbeugung und gegebenenfalls Bekämpfung in der Aquakultur eine große Rolle spielen. Im weiteren Sinn lässt sich auch der Mensch zu den biotischen Faktoren hinzuzählen, gerade in Aquakulturanlagen spielen anthropogene Faktoren eine wichtige Rolle. Das Umsetzen von Fischen kann beispielsweise so genannten *handling stress* auslösen, welcher sich unter anderem durch einen Anstieg des Stresshormons Cortisol äußert (PICKERING *et al.*, 1982).

Auf Seiten der abiotischen Faktoren sind ebenfalls mehrere Faktoren zu nennen. Das Wasser als Lebensraum der Fische weist eine Vielzahl verschiedener Parameter auf, die gemeinsam die Wasserqualität ausmachen. Salzgehalt, pH-Wert, Sauerstoffgehalt sowie Verunreinigungen mit Giftstoffen wie Nitrit, die teilweise durch die Aquakultur selbst anfallen (LIN UND WU, 1996) spielen dabei eine wichtige Rolle. Ein weiterer bedeutsamer Faktor, der die Wasserqualität beeinflusst, ist die



**Abb. 1.2:** Von der Umgebungstemperatur beeinflusste Parameter beim Fisch. Sättigungswerte basierend auf ROUNDS *et al.* (2013), Ruhe-Sauerstoffverbrauchswerte basierend auf gemittelten Daten nach CLARKE UND JOHNSTON (1999).

Temperatur. Da Fische poikilotherm, also wechselwarm sind, wird die Temperatur auch als „ökologischer Masterfaktor“ für Fische bezeichnet (BRETT, 1971). Zum einen nimmt sie nämlich Einfluss auf andere Wasserwerte, wie den Sauerstoffgehalt. Die Sauerstofflöslichkeit in Wasser ist bei niedrigen Temperaturen höher als bei höheren Temperaturen. Zusätzlich beeinflusst die Temperatur auch die Tiere selbst, indem die Körpertemperatur sich der Wassertemperatur angleicht. Von der Körpertemperatur hängt dabei die Stoffwechselrate ab (GILLOOLY *et al.*, 2001), die ihrerseits den Sauerstoffbedarf einstellt (CLARKE UND FRASER, 2004). Je höher die Temperatur, desto höher der Sauerstoffbedarf, bei gleichzeitig geringerer Sauerstoffverfügbarkeit (Abb. 1.2).

Die Temperatur nimmt weiterhin Einfluss auf zelluläre Membranen. Diese sind bei hohen Temperaturen deutlich flücker als bei Kälte. Ein Adaptionsmechanismus von Fischen, der als homöoviskose Adaptation bekannt ist (HAZEL, 1995), besteht darin, dass bei niedriger Temperatur mehr langkettige, ungesättigte Fettsäuren in die Membranen eingebaut werden, die durch die Doppelbindungen sperriger sind und somit ein Erstarren der Membran verhindern. Schwankungen der Umweltfaktoren, gerade auch schwankende Temperaturen, stellen also eine Herausforderung für die Tiere dar, die sich mit ihren Bewältigungsstrategien an die sich verändernden Bedingungen rechtzeitig anpassen müssen. Die Optimaltemperatur für Regenbogenforellen liegt beispielsweise zwischen 12,2 und 18,9 °C mit Letaltemperaturen unter 0 °C und über 29,4 °C (BELL, 1990).

### 1.3. Die BORN-Forelle als robuste, lokale Zuchtlinie

Während die Domestizierung von Tieren und Pflanzen bereits vor mehr als 10.000 Jahren mit dem Anbruch der Jungsteinzeit im Rahmen der neolithischen Revolution begann (WEISDORF, 2005), startete die systematische Tierzucht deutlich später: Im 18. Jahrhundert während der britischen Agrarrevolution, begannen Robert Bakewell und andere mit der gezielten Zucht auf bestimmte Merkmale beispielsweise beim Schaf (WYKES, 2004). Die Aquakultur nutzt selektive Züchtung bisher in deutlich geringerem Umfang als die Pflanzen- und Farmtier-Industrie, sodass in der Aquakultur noch große Potentiale dieser Methode vermutet werden (GJEDREM *et al.*, 2012). Ein mögliches Zuchtziel stellt die Robustheit der Tiere dar, die deren Anpassungsfähigkeit an schwankende und herausfordernde Umweltbedingungen beschreibt. Eine lokale, robuste Zuchtlinie ist dabei die BORN-Forelle. Diese wird seit 1975 in Born auf Fischland-Darß-Zingst, nordöstlich von Rostock, im Brackwasser der Ostsee gezüchtet (ANDERS, 1986). Sie ist dabei aus einer importierten

Linie hervorgegangen und wurde lediglich auf das Überleben unter den lokalen Umweltbedingungen selektiert. Die üblicherweise in Deutschland kultivierten Regenbogenforellen werden in Form von Eiern aus den USA importiert. Die Firma *Troutlodge* mit Sitz in Tacoma, USA beliefert beispielsweise Aquakulturanlagen in mehr als 50 Staaten in Nord- und Südamerika, Afrika, Asien und Europa<sup>1</sup>. Diese Forellen-Linie wird im Folgenden als Import-Forelle bezeichnet. Trotz des recht kurzen Selektionszeitraums der BORN-Forelle von gerade 39 Jahren, wurden bereits einige Unterschiede zwischen beiden Linien gezeigt. Diese betreffen zum Beispiel die Immunabwehr (REBL *et al.*, 2014a, 2012b) oder auch die Anpassungen an Temperaturveränderungen (REBL *et al.*, 2013). Stressor-unabhängige Unterschiede in der Genexpression wurden in der Niere (KÖBIS *et al.*, 2013) und bezüglich des Calciummetabolismus gefunden (VERLEIH *et al.*, 2012). Die Charakterisierung der BORN-Forelle als „robust“ basiert weiterhin auf einer Untersuchung, in der gezeigt wurde, dass nach einer Infektion mit dem Pathogen *Aeromonas salmonicida* die Mortalität der BORN-Forelle nur halb so groß war, wie diejenige der Import-Forellen (GOLDAMMER *et al.*, 2013). Einen Überblick über bisher erschienene vergleichende Analysen von BORN- und Import-Forelle gibt Tab. 1.2. Auffällig ist, dass die bisherigen holistischen Untersuchungen stets nur ein Gewebe mittels DNA-Chip-Methode betrachtet haben, wohingegen die Studien, die mehrere Gewebe verglichen, stets nur auf ein einziges Gen fokussierten.

Als ursächlich für die höhere Robustheit der BORN-Forelle wird ihre Anpassung an im Brackwasser der Ostsee besonders stark schwankende Umweltfaktoren wie Eutrophierung, Salinität, Temperatur und Sauerstoffgehalt gesehen (REBL *et al.*,

<sup>1</sup><http://www.troutlodge.com>, abgerufen am 24.10.2014

**Tab. 1.2:** Übersicht über bisherige vergleichende Studien zur BORN-Forelle

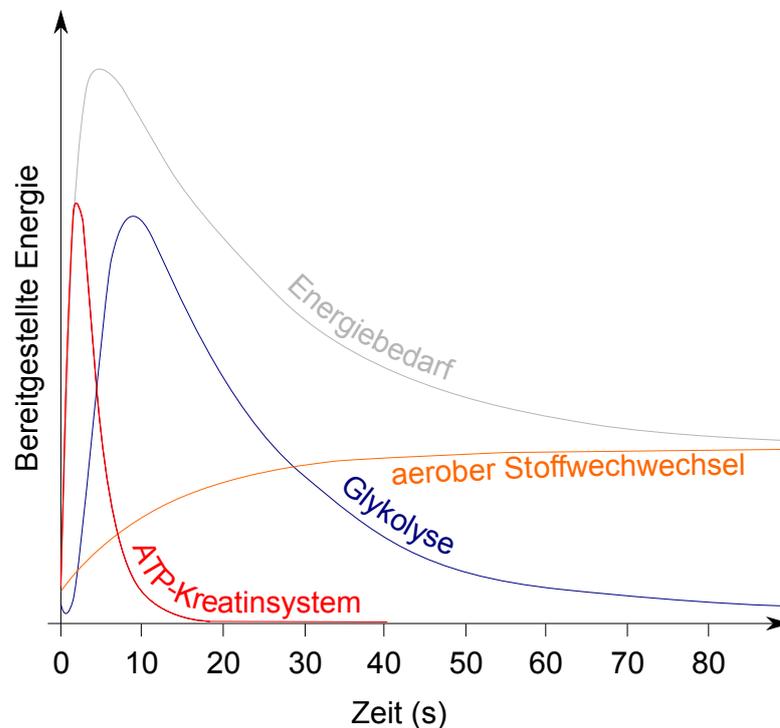
Gen	Gewebe	Umweltfaktor	Referenz
<i>Holistische Studien</i>			
verschiedene	Kieme	Infektion	REBL <i>et al.</i> (2014a)
verschiedene	Kieme	Temperatur	REBL <i>et al.</i> (2013)
verschiedene	Milz	-	KÖBIS <i>et al.</i> (2013)
verschiedene	Leber	-	REBL <i>et al.</i> (2012b)
<i>Einzelgen-Studien</i>			
<i>ISCU</i>	verschiedene	Temperatur	VERLEIH <i>et al.</i> (2013)
<i>NELL2</i>	verschiedene	Temperatur, Infektion	REBL <i>et al.</i> (2012a)
<i>MARCH5</i>	verschiedene	Infektion	REBL <i>et al.</i> (2011)
<i>RGN</i>	verschiedene	Temperatur, Infektion	VERLEIH <i>et al.</i> (2012)
<i>PRR13</i>	verschiedene	-	VERLEIH <i>et al.</i> (2010)

2012b). Wodurch genau die unterschiedliche Robustheit der beiden Forellentypen verursacht wird, ist noch weitgehend unklar, genauso wie die ganz grundsätzlichen Unterschiede zwischen beiden Linien. Vor dem Hintergrund hoher Kosten für ein starkes Immunsystem (LOCHMILLER UND DEERENBERG, 2000) sowie dem Zusammenhang von Stressresistenz und Stoffwechselrate (PARSONS, 1990) liegt ein bedeutender Beitrag des Energiesystems zur Robustheit der BORN-Forelle nahe. Von KÖBIS *et al.* (2013) wurde beispielsweise ein „Energiesparmodus der Genexpression“ der BORN-Forelle in der Milz postuliert.

## 1.4. Energiebereitstellung

### 1.4.1. Energiesysteme

Wird in einer Zelle, beispielsweise im Muskel, Energie benötigt, so wird diese aus verschiedenen Quellen gewonnen. Der direkte Energieträger, den Zellen verwenden, ist das Energieäquivalent Adenosintriphosphat (ATP). Dessen Vorrat in den Zellen ist begrenzt, sodass bei stetiger Belastung stets ATP nachgeliefert werden muss.



**Abb. 1.3:** Zeitliche Abfolge der Aktivität der drei Energiesysteme bei Spitzenbelastung des Muskels im Menschen

Die Daten wurden an Sprint-trainierten Sportlern nach einem Training unter 10-sekündiger maximaler Belastung gefolgt von abnehmender Belastung gemessen (verändert nach GASTIN, 2001).

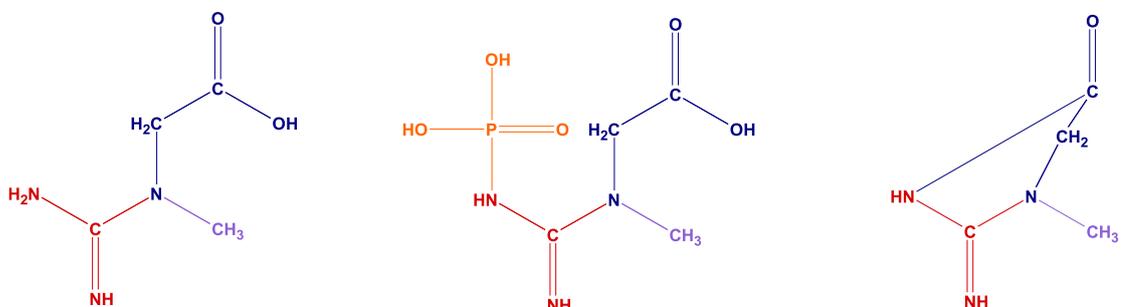
Die Quelle dieses Nachschubs variiert auch mit der Zeit (Abb. 1.3). In der ersten Phase, den ersten 10 Sekunden der Beanspruchung, wird das ATP-Kreatinsystem aktiv (GASTIN, 2001). Im Anschluss wird die Energiebereitstellung durch anaerobe Glykolyse mit angeschlossener Milchsäuregärung übernommen, bevor nach gut 30 Sekunden der aerobe Stoffwechsel überwiegt, welcher durch den umfassenden Reaktionsablauf über oxidative Decarboxylierung, Citratzyklus und Atmungskette eine längere Anlaufzeit benötigt. Kann aus 1 mol Kreatinphosphat durch das Kreatinsystem 1 mol ATP gewonnen werden, werden in der anaeroben Glykolyse aus 1 mol Glukose 2 mol ATP synthetisiert (PÜSCHEL *et al.*, 2011). Bei der aeroben Glykolyse wird hingegen aus 1 mol Glukose 32 mol ATP gewonnen.

Welche Energiequellen dabei bevorzugt genutzt werden, hängt auch vom Muskel und insbesondere der Zusammensetzung seiner Muskelfasern ab. Diese werden anhand verschiedener Kategorisierungssysteme geordnet; eine einfache Einteilung ist die Unterscheidung von schnellen und langsamen Muskelfasern (SCHIAFFINO UND REGGIANI, 2011). Auch die Muskelfarbe wird als Einteilungskriterium herangezogen, wobei weiße Muskeln als schnelle Muskeln gelten, rote hingegen als langsame (SCOTT *et al.*, 2001); diese Aussage ist jedoch nicht zu verallgemeinern (BARNARD *et al.*, 1971). Maßgabe für die Einteilung in schnell und langsam ist die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit der Fasern (THORSTENSSON *et al.*, 1976). Hinzu kommt eine unterschiedliche Stoffwechselaktivität. Langsame Muskeln erzeugen ihre Energie aus aeroben mitochondrialen Prozessen, wohingegen schnelle Muskeln ihre Energie überwiegend aus der Glykolyse beziehen. Daher sind sie auch schneller ermüdbar (SCHIAFFINO UND REGGIANI, 2011). Während die Muskeln von Säugern größtenteils aus gemischten Muskelfasertypen bestehen (ARMSTRONG UND PHELPS, 1984), sind weißer und roter Muskel in Fischen deutlich voneinander abgetrennt (KIESSLING *et al.*, 2006). Der rote Muskel liegt oberflächlich direkt unter der Haut, während der weiße Muskel weiter innen zu finden ist. Insgesamt macht die Muskelmasse gut 60 % der Fischmasse aus, wobei bei allen Fischen mindestens 70 % des Muskels den weißen Muskelfasern zugerechnet wird (SÄNGER UND STOIBER, 2001). Der rote Muskel dient dem andauernden Schwimmen bei langsamen und moderaten Geschwindigkeiten, der weiße dem so genannten *burst swimming* (PLANAS *et al.*, 2013), dem Schwimmen bei maximaler Geschwindigkeit durch schnellste Beschleunigung, beispielsweise zum Beutefang oder zur Flucht (SÄNGER UND STOIBER, 2001). Gerade für solches schnelle Schwimmen scheint das Kreatinsystem eine wichtige Rolle zu spielen, zumal durch NEWSHOLME *et al.* (1978) für fünf verschiedene Fischarten, inklusive der Regenbogenforelle, gezeigt

wurde, dass die Kreatinkinase-Aktivität im weißen Muskel deutlich höher liegt als im roten Muskel.

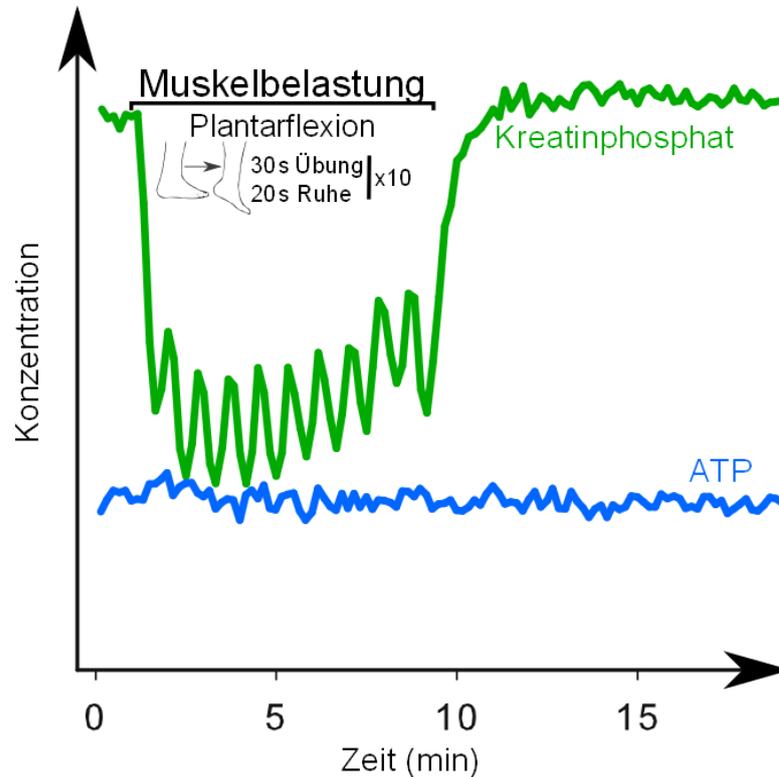
**1.4.1.1. Das Kreatinsystem** Das Kreatinsystem umfasst Kreatin, seine phosphorylierte Form Kreatinphosphat, sowie verschiedene Kreatinkinasen. Kreatinkinasen (CKs) können unter ATP-Verbrauch oder -Nutzung beide Formen (Abb. 1.4) in einem als Lohmann-Reaktion (LOHMANN, 1934) bekannten Prozess ineinander umwandeln. Kreatinphosphat stellt durch die Übernahme einer Phosphatgruppe von ATP einen Energiespeicher dar. Durch diesen Speicher kann während einer Phase hohen Energieverbrauchs das Niveau an ATP, dem eigentlichen Energieäquivalent der Zelle, weitestgehend konstant gehalten werden. Diese temporäre Energiepufferfunktion ist in Abb. 1.5 für die menschliche Fußmuskulatur gezeigt. Nach einer Absenkung des Fußes unter Muskelanspannung sinkt die Konzentration an Kreatinphosphat rapide ab, wohingegen der ATP-Gehalt konstant bleibt (KAPPENSTEIN *et al.*, 2013). In Ruhephasen wird der Kreatinphosphatvorrat wieder aufgefüllt. Während so Schwankungen im Kreatinphosphatgehalt entstehen, bleibt die ATP-Konzentration trotz muskulärer Belastung weitgehend konstant. Besonders benötigt wird Kreatin daher in Geweben mit einem hohen Energiebedarf und hohem Energiefluss wie im Gehirn und Muskel. In der menschlichen Skelettmuskulatur ist daher mehr als 95 % des gesamten körpereigenen Kreatins zu finden (BALSOM *et al.*, 1994). In Zeiten der Ruhe wird das Kreatin also phosphoryliert, um Energie zu speichern, bei Belastung stellt die Phosphatgruppe Energie für die Phosphorylierung von ADP zu ATP bereit.

Neben dieser Funktion als temporärer Energiepuffer wird dem Kreatinsystem auch eine Funktion als Energieshuttle zugeschrieben, welches Transportaufgaben übernimmt (WYSS UND KADDURAH-DAOUK, 2000). So soll in den muskulä-



**Abb. 1.4:** Strukturformeln von Kreatin (links), Kreatinphosphat (Mitte) und Kreatinin (rechts)

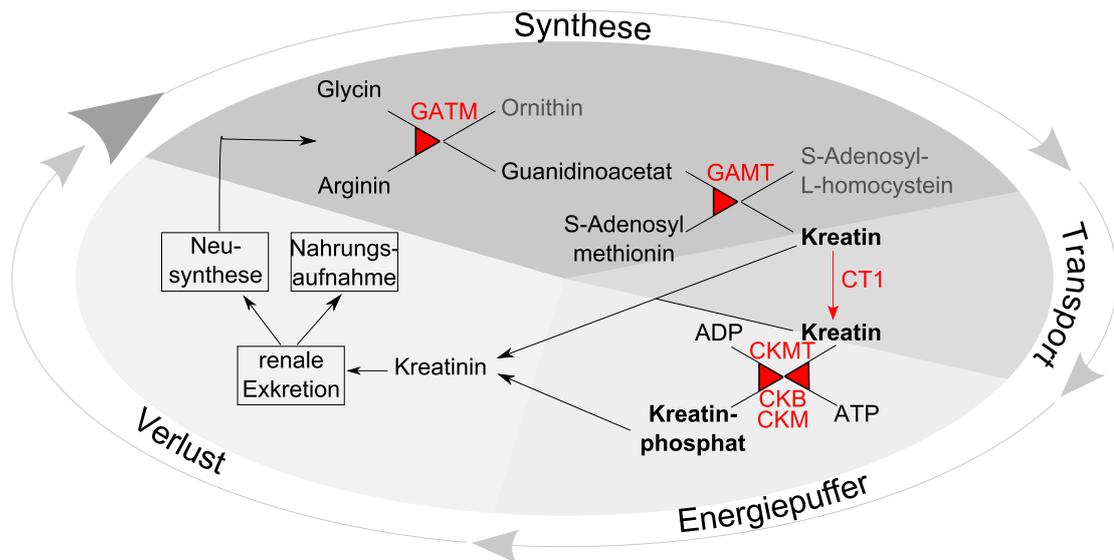
Kreatin besteht aus Teilen von Glycin (blau), Arginin (rot), SAM (lila) und in der phosphorylierten Form aus der Phosphatgruppe von ATPa



**Abb. 1.5: Zusammenhang zwischen Kreatinphosphat- und ATP-Konzentrationen** Gezeigt sind die Konzentrationen von Kreatinphosphat und ATP vor, während und nach einer Muskelkontraktion durch Beugung des Fußes in Richtung Fußsohle (Plantarflexion). Die Muskelbelastung bestand aus 10 Sätzen 30-sekündiger Anspannung gefolgt von 20 Sekunden Ruhe (Verändert nach KAPPENSTEIN *et al.*, 2013).

ren Mitochondrien gebildetes ATP direkt von mitochondrialen Kreatinkinasen (CKMTs) zur Kreatinphosphorylierung genutzt werden. Dabei entstehendes ADP kann dann direkt wieder durch oxidative Phosphorylierung in ATP umgewandelt werden. Das Kreatinphosphat wird aus den Mitochondrien geschleust und im Sarkoplasma von freien, teilweise auch an Myofibrillen gebundenen Kreatinkinasen wieder dephosphoryliert, um ATP herzustellen (JACOBUS, 1985). Durch diese Mikrokompartimentationen können die Prozesse mit hoher Geschwindigkeit ablaufen. Außerdem ist Kreatinphosphat kleiner als ATP und diffundiert weiter und schneller (CHANCE *et al.*, 2006). Evolutionär gesehen hat sich das Kreatinsystem sehr früh entwickelt (ELLINGTON UND SUZUKI, 2007). So sind Kreatin und Kreatinkinasen bereits in Schwämmen, den evolutionär ältesten noch lebenden Tieren, nachgewiesen worden (ELLINGTON, 2000). Als Vorläufer wird das Arginin kinase-System, das auf Arginin und Argininphosphat basiert, gesehen (UDA *et al.*, 2006).

Der Kreatingehalt des Körpers kann zum einen durch eine Zufuhr mit der Nahrung, zum anderen durch eine endogene Synthese gesteigert werden. Nahrungsmittel mit den stärksten Kreatingehalten sind dabei Fisch und Fleisch, weshalb Ve-



**Abb. 1.6:** Das Kreatinsystem im Überblick (verändert nach BORCHEL *et al.*, 2014)

getarier signifikant verringerte Kreatinkonzentrationen in Serum (DELANGHE *et al.*, 1989) sowie in Muskeln (BURKE *et al.*, 2003) aufweisen. Bei Personen mit einer „typischen US-amerikanischen Ernährungsweise“ (BROSNAN UND BROSNAN, 2007) werden ca. 50 % des täglich benötigten Kreatins über die Nahrung aufgenommen, die andere Hälfte wird synthetisiert. Die Kreatinsynthese ist ein zweistufiger Prozess (Abb. 1.6; WYSS UND KADDURAH-DAOUK, 2000). Im ersten Schritt katalysiert eine Glycin-Amidino-transferase (GATM, auch AGAT genannt) die Reaktion von Glycin und Arginin zu Ornithin und Guanidinoacetat. Dabei wird die Amidinogruppe der Seitenkette von Arginin auf Glycin übertragen. Eine Guanidinoacetat-N-Methyltransferase (GAMT) katalysiert dann durch die Übertragung einer Methylgruppe die Reaktion des entstandenen Guanidinoacetat mit dem Methylgruppen-Donor S-Adenosylmethionin zu Kreatin (Abb. 1.4). Auch diese Befähigung zur endogenen Kreatinsynthese ist evolutionär alt. Beim Lanzettfischchen beispielsweise wurden GATM und GAMT nachgewiesen (WANG *et al.*, 2008), ebenso bei der Schlauchseescheide (DELIGIO UND ELLINGTON, 2006). Nach der Synthese wird das Kreatin zu den Zielgeweben transportiert. Durch Membranen gelangt es mit Hilfe des Kreatintransporters CT1, der durch das Gen *SLC6A8* (*solute carrier family 6, member 8*) codiert wird. In den Zielgeweben steht das Kreatin dann letztlich den Kreatinkinasen bereit, um phosphoryliert zu werden und so die Energiespeicherfunktion erfüllen zu können. Es existieren dabei drei Isozyme, welche eine spezifische Gewebeverteilung aufweisen (EPPENBERGER *et al.*, 1964). Eine Variante kommt besonders häufig im Muskel vor, eine zweite im Herz und eine dritte im Gehirn. Es konnte gezeigt werden, dass Kreatinkinasen Dimere bilden

und sich die drei Isoformen durch die Kombinationen von zwei Untereinheiten ergeben (DAWSON *et al.*, 1965). Zusätzlich zu diesen zytosolischen CKS wurden mitochondriale CKs beschrieben, die Oktamere bilden und andere biochemische Eigenschaften aufweisen (JACOBS *et al.*, 1964). Kreatinsynthese und Kreatinaufnahme aus der Nahrung werden durch molekulare Mechanismen ausbalanciert. Die Expression von GATM, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert, wird durch Kreatin inhibiert (MCGUIRE *et al.*, 1984). Diese Endproduktrepression wird durch eine Verringerung der GATM-mRNA herbeigeführt (GUTHMILLER *et al.*, 1994). So kann bei einer erhöhten Kreatinaufnahme über die Nahrung die endogene Kreatinsyntheserate reduziert werden.

Ein gewisser Anteil des Kreatinpools reagiert spontan, ohne enzymatische Wirkung durch Ringschluss und Wasserabspaltung zu Kreatinin (Abb. 1.4) weiter. Beim Menschen sind dies etwa 1,6 % des gesamten Kreatingehalts pro Tag (HOBERMAN *et al.*, 1948). *In vivo* ist diese Reaktion irreversibel (BLOCH UND SCHOENHEIMER, 1939): Kreatinin kann nicht mehr phosphoryliert werden und somit nicht mehr als Energiepuffer fungieren. Daher wird es über die Nieren ausgeschieden. Der Serum-Kreatiningehalt gilt daher in der Medizin auch als Indikator für die Nierenfunktion (PERRONE *et al.*, 1992). Da durch die Kreatininbildung der gesamte Kreatinpool verringert wird, muss also stets Kreatin über die Nahrung wieder aufgenommen oder neu synthetisiert werden.

In Säugetieren ist die Synthese von Kreatin und dessen Nutzung weitestgehend räumlich getrennt. Gemäß WYSS UND KADDURAH-DAOUK (2000) besteht die „Haupttroute der Kreatinsynthese“ dabei aus der Synthese von Guanidinoacetat durch GATM in der Niere, gefolgt von dessen Transport über das Blut in die Leber, wo es im zweiten Schritt zu Kreatin methyliert wird. Von dort wird es zu den Kreatin-benötigenden Geweben gebracht. Dazu zählt insbesondere der Muskel. Es wird allgemein angenommen, dass im Muskel selbst keine Kreatinsynthese stattfindet (WYSS UND KADDURAH-DAOUK, 2000) und dieser von einem Kreatin-Import abhängt (BALSOM *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu Muskeln ist diese Trennung von Kreatin-synthetisierenden und -nutzenden Enzymen im Säugerhirn nicht so ausgeprägt. In Neuronen von Ratten-Gehirnen werden beispielsweise GATM, GAMT und der Kreatintransporter CT1 gemeinsam exprimiert, in anderen Zelltypen jeweils nur einzelne Gene (BRAISSANT *et al.*, 2007). In Mausneuronen findet sich aber beispielsweise auch eine starke Expression der gehirnspezifischen Kreatinkinase CKB (LIN *et al.*, 2013). Hier sind Kreatinsynthese und -nutzung also nicht getrennt; es wird auch angenommen, dass das Gehirn von der eigenständigen

Kreatinsynthese abhängt, da die Blut-Hirn-Schranke nur beschränkt durchlässig für Kreatin ist (BRAISSANT *et al.*, 2011).

Die große Relevanz des Kreatinsystems für die Energieversorgung wird deutlich, wenn man die Auswirkungen betrachtet, die ein defektes Kreatinsystem haben kann. So sind beim Menschen mehrere Krankheiten bekannt, die auf solche Störungen zurückzuführen sind. Sowohl für *GATM*, *GAMT* als auch *SLC6A8* wurden Mutationen beschrieben, die die Funktion der codierten Enzyme beeinträchtigen. Als klinisches Bild ergibt sich daraus eine Intelligenzminderung und - insbesondere bei *GAMT*-Mangel - Bewegungsstörungen (STÖCKLER-IPSIROGLU *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zum Menschen wurde das Kreatinsystem der Fische bisher kaum untersucht und es gibt nur wenige Studien zum Thema. HUNTER stellte 1929 fest, dass der Skelettmuskel von Fischen mehr Kreatin enthält, als der der Säuger. Weiterhin wurde der Effekt von Kreatin-angereichertem Futter auf die Leistungsfähigkeit von jungen Regenbogenforellen untersucht (MCFARLANE *et al.*, 2001). Molekularbiologische Studien wurden allesamt an Zebrabärblingen durchgeführt. Nach der Identifizierung von *CKB* (DICKMEIS *et al.*, 2001) und *CKM* (HARDER UND MCGOWAN, 2001), wurden auch *GATM*, *GAMT* und *SLC6A8* identifiziert (WANG *et al.*, 2007). Als Fazit einer Studie zu Expressionsprofilen dieser Gene wurde die Homologie des Kreatinsystems des Zebrabärblings und dem des Säugers festgestellt (WANG *et al.*, 2010). Hierbei wurde aber beispielsweise der Skelettmuskel als wesentliches Organ des Kreatinsystems nicht in die Untersuchung mit einbezogen, sodass dessen Rolle im Fisch bisher komplett unbeleuchtet ist.

## 1.5. Zielsetzung

Die BORN-Forelle gilt als robuster als die üblicherweise kultivierten Import-Forellen. Es ist davon auszugehen, dass sich diese Robustheit auch genetisch manifestiert. Bisherige molekularbiologische Untersuchungen zu den Ursachen der Robustheit der BORN-Forelle haben sich auf konkrete Umweltbedingungen, Stressoren und Gewebe bezogen. In dieser Arbeit sollte der Fokus erweitert werden. Es stellt sich die Frage,

- ob Gene existieren, die grundsätzlich – gleich unter welcher konkreten Bedingung – in verschiedenen Organen unterschiedlich stark in BORN- und Import-Forelle exprimiert werden.

Diese Gene könnten Kandidatengene für die Robustheit der BORN-Forelle darstellen, sowie als Biomarker zur Identifizierung der beiden Linien dienen.

Es wird weiterhin ein Zusammenhang zwischen dem Energiesystem und der Robustheit der BORN-Forelle vermutet. Da vorherige Versuche Differenzen in der Expression eines Kreatingens zeigten, wurde das Kreatinsystem als wichtiges Energie-bereitstellendes System für die Untersuchung ausgewählt.

Da dieses in Fischen bisher kaum untersucht worden war, soll verglichen werden,

- ob sich die Kreatinsysteme der Fische und der Säugetiere in ihren Funktionsweisen ähneln oder unterscheiden.

Dann gilt es zu prüfen,

- ob BORN- und Import-Forelle eine unterschiedliche Expression von Genen des Kreatinsystems aufweisen.

Mögliche genetische Unterschiede könnten sich auch im Phänotyp niederschlagen, der daher ebenfalls in dieser Arbeit charakterisiert werden soll. Das Tierwohl gewinnt immer größere Relevanz in der Tierproduktion inklusive der Aquakultur. Das Tierverhalten kann einen Hinweis darauf liefern. Deshalb soll überprüft werden,

- ob sich BORN- und Import-Forelle unter verschiedenen Stressfaktoren unterschiedlich verhalten.

Es stellt sich zusätzlich die Frage, ob die Robustheit zu Lasten der allgemeinen Wachstumsleistung der BORN-Forelle geht, da die Aufrechterhaltung der Robustheit sehr kostenintensiv sein könnte. Dies würde die Attraktivität der BORN-Forelle für die intensive Aquakultur deutlich senken. Daher soll untersucht werden,

- ob sich BORN- und Import-Forelle unter realen Produktionsbedingungen hinsichtlich ihrer Wachstumsleistung unterscheiden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tiere

#### 2.1.1. Regenbogenforellen

Es wurden Versuche mit Regenbogenforellen der Linien BORN und Import durchgeführt. Bei der BORN-Linie handelt es sich um einen regionalen Forellenstamm, der seit mehr als 35 Jahren im Brackwasser des Boddens in Born am Darß gezüchtet wird. Die Import-Forellen wurden als Eier von der Firma *Troutlodge* mit Sitz in Tacoma in den USA bezogen und in Deutschland zum Schlupf gebracht und aufgezogen. Die Tiere beider Linien wurden in der Aquakulturanlage des Instituts für Fischerei der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fi-

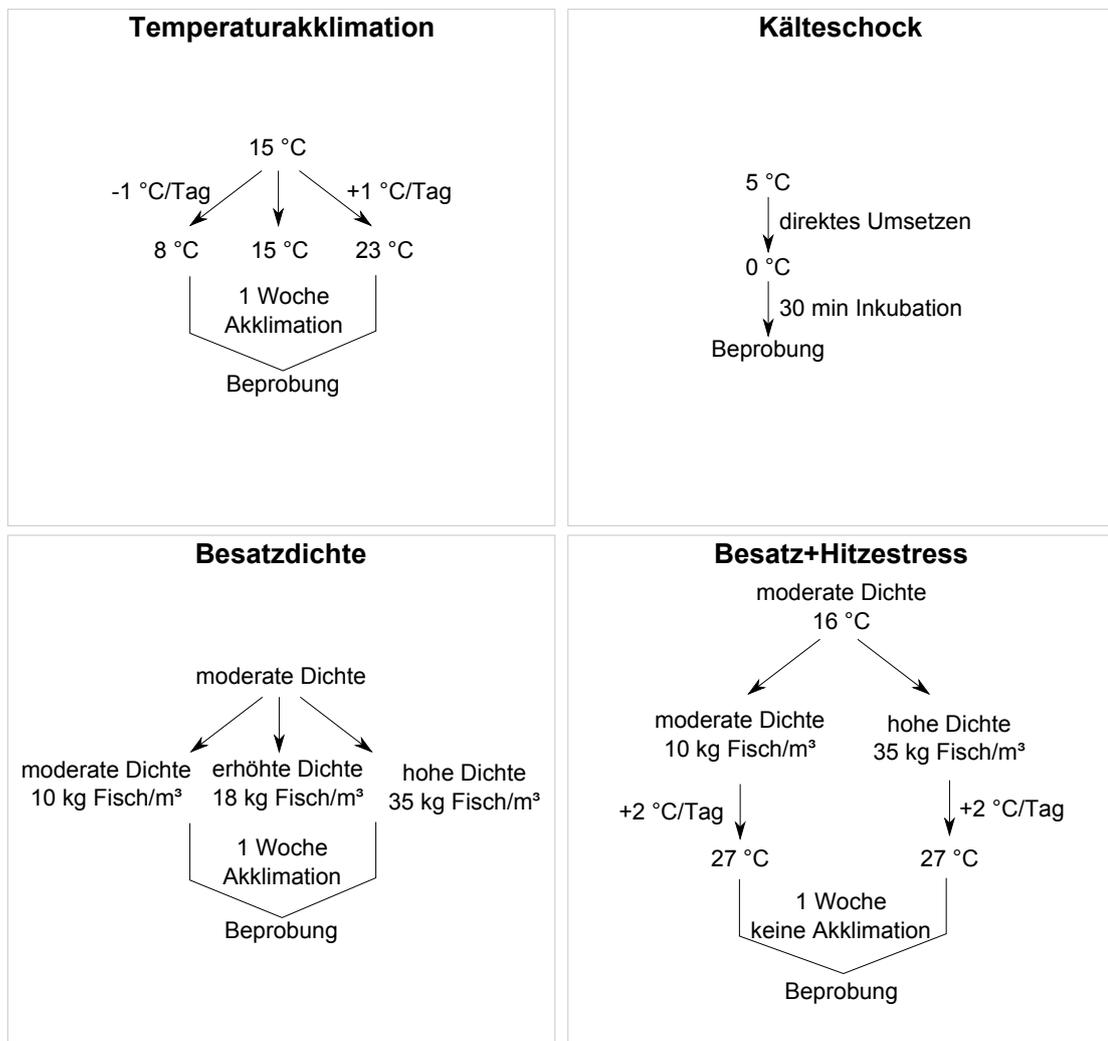


Abb. 2.1: Überblick über die Versuchsdesigns

scherei Mecklenburg-Vorpommern in Born kultiviert. Die allgemeine Haltung der Tiere erfolgte in Rinnen, die von unverändertem direkt dem Bodden entnommenen Brackwasser durchströmt wurden (Durchfluss-Anlage). Für einzelne Versuche wurde statt dieser Durchflussanlage eine Kreislauf-Anlage mit durch UV-Licht und Kiesfilter aufgereinigtes Brackwasser mit kontrollierten Umweltparametern genutzt. Es wurden vier verschiedene Experimente durchgeführt. Diese sind in Abb. 2.1 zusammengefasst und werden im Folgenden vorgestellt.

**2.1.1.1. Temperaturakklimation** Mit diesem Experiment sollten die Effekte von Akklimationen von Forellen an kalte und warme Temperaturen untersucht werden, die moderat unter- bzw. oberhalb des optimalen Temperaturbereichs von Regenbogenforellen liegen. Tiere der BORN- und Importlinie wurden gleichzeitig separat von Augeneiern zu Fingerlingen in Süßwasser herangezüchtet. Im Alter von 7-8 Monaten wurden sie an mit Süßwasser gefüllte Glasaquarien akklimiert. Der eigentliche Versuch fand dann bei einem Fischalter von 10 Monaten statt. Je 10 Tiere pro Linie wurden in separate 300 Liter fassende Aquarien umgesetzt und zwei Wochen lang an eine Temperatur von 15 °C akklimiert. Anschließend wurde das Wasser schrittweise um 1 °C pro Tag abgekühlt bzw. erwärmt, bis Temperaturen von 8 °C bzw. 23 °C erreicht waren. Nach einwöchiger Akklimation an diese Temperaturen wurden die Tiere beprobt.

**2.1.1.2. Kälteschock** In diesem Versuch sollte die Reaktion auf einen rapiden Temperaturabfall, wie er in offenen Aquakulturanlagen durch sogenannte Kaltwasserblasen hervorgerufen wird, untersucht werden. Dazu wurden BORN- und Importforellen getrennt unter gleichen Bedingungen in Becken mit konstantem Brackwasserdurchfluss aus der Ostsee bei 5 °C gehalten. Als Kontrolltiere wurden jeweils 10 Tiere entnommen und beprobt. Für den eigentlichen Versuch wurden jeweils 20 Fische pro Linie in mittels Eis auf 0 °C abgekühltes, belüftetes Wasser umgesetzt und darin für 30 Minuten inkubiert. Die Tiere der beiden Linien wurden abwechselnd beprobt bis von allen Tieren Gewebe entnommen worden waren.

**2.1.1.3. Besatzdichte** Dieser Versuch diente der Untersuchung des Einflusses der Besatzdichte auf Regenbogenforellen. Dazu wurden Tiere beider Linien in unterschiedlichen Dichten in 300-Liter-Becken mit zentralem Wasseraustausch von aufgereinigtem Boddenwasser eingesetzt und dort für eine Woche kultiviert. Die genauen Besatzdichten sind in Abb. 2.2 angegeben. Nach einer Woche bei 16 °C und der jeweiligen Besatzdichte wurden die Tiere beprobt.



Moderater Besatz

BORN 34 Fische / 9,46 kg  
Import 30 Fische / 9,60 kg

Erhöhter Besatz

BORN 64 Fische / 17,9 kg  
Import 60 Fische / 17,9 kg

Hoher Besatz

BORN 140 Fische / 35,3 kg  
Import 120 Fische / 35,0 kg

**Abb. 2.2:** Exemplarische Darstellung der Besatzdichten des unter 2.1.1.3 beschriebenen Versuchs

Die Fische wurden eine Woche lang bei den angegebenen Besatzdichten kultiviert.

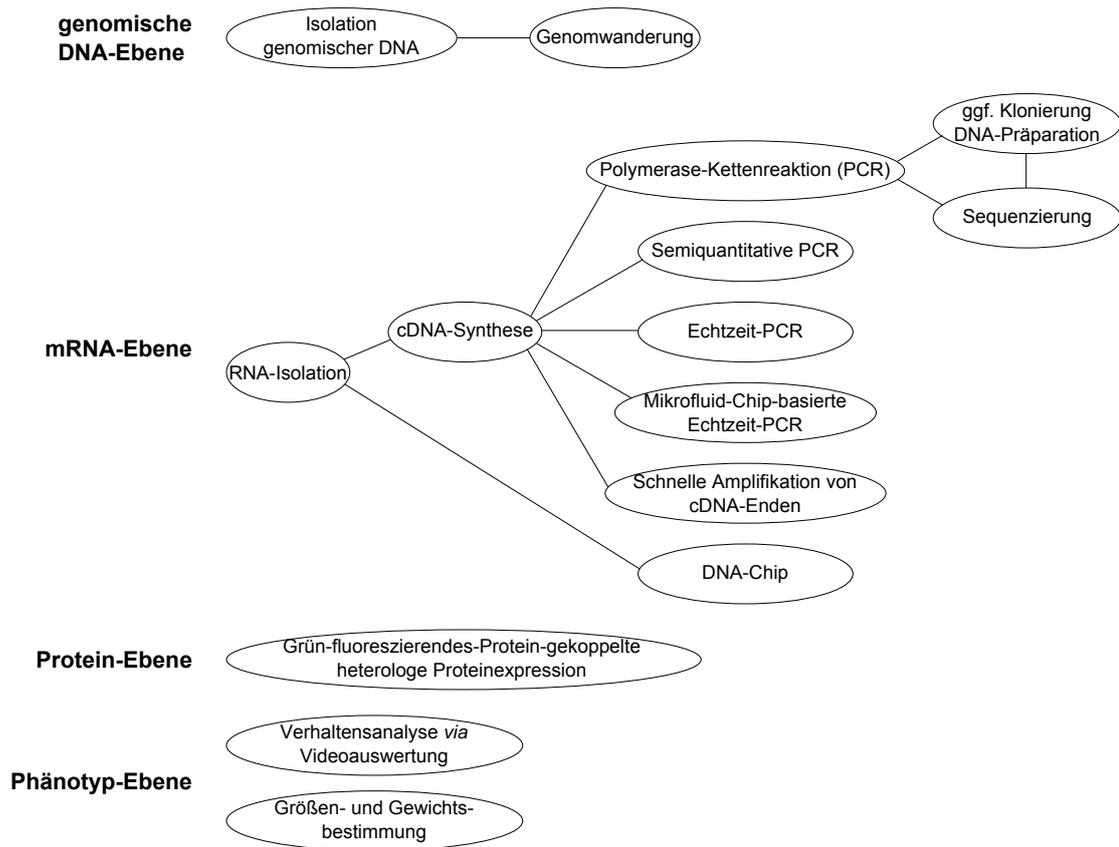
**2.1.1.4. Besatz- und Hitzestress** In einem weiteren Versuch wurde die kombinierte Wirkung zweier Stressoren gemeinsam auf beide Forellenzuchtlinien untersucht. Die Besatzdichten wurden dabei analog zu den unter Punkt 2.1.1.3 beschriebenen Dichten gewählt. Zusätzlich wurde die Temperatur ausgehend von der regulären Temperatur eine Woche lang schrittweise von 16 °C auf 27 °C gesteigert bevor die Tiere beprobt wurden.

## 2.1.2. Andere Tierarten

Zusätzlich zu den Regenbogenforellen wurden weitere Tierarten beprobt. Zu den Fischen zählten der Ostseeschnäpel (*Coregonus maraena*), der Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) sowie der Zander (*Sander lucioperca*). Diese drei Fischarten wurden durch das Landesforschungsinstitut für Fischerei unter Aquakulturbedingungen gehalten und zur Verfügung gestellt. Die beprobten Heringe (*Clupea harengus*) entstammten dem Fluss Warnow im Bereich des Rostocker Stadthafens und wurden durch einen qualifizierten Angler an Land gebracht und als Heringe identifiziert. Alle beprobten Säugetiere waren Zuchttiere des FBN Dummerstorf: Rinder (*Bos taurus*), Schweine (*Sus scrofa*) sowie Mäuse (*Mus musculus*).

## 2.2. Angewendete Methoden

Abb. 2.3 gibt einen Überblick über die wesentlichen angewendeten Methoden. Sie umfassten die Untersuchung von genomischer DNA, von mRNA, von Protein



**Abb. 2.3:** Überblick über die angewendeten Methoden

und von Phänotypen. Die konkrete Umsetzung aller genutzten Methoden wird im Folgenden erläutert.

### 2.2.1. Probenahme

Die zu beprobenden Fische wurden durch Umsetzen in einen Eimer mit einer tödlichen Dosis der Anästhetika Benzocain (Temperaturakklimation; vgl. ALTMANN *et al.*, 2014) oder Phenoxyethanol (restliche Versuche; vgl. REBL *et al.*, 2012b) getötet. Nach dem Aussetzen der Atmung wurden die Tiere gemessen und gewogen und auf äußerliche Auffälligkeiten begutachtet. Die Fische wurden dann vom After her aufgeschnitten und die benötigten Gewebe schnellstmöglich entnommen. In allen Versuchen mit Regenbogenforellen wurden Leber, Niere, Kieme und Milz entnommen, im Temperaturakklimationsversuch zusätzlich weißer Skelettmuskel (im Folgenden nur als Muskel bezeichnet) und Gehirn. Von den anderen Fischarten wurden Proben von Leber, Niere und Muskel entnommen, vom Ostseeschnäpel zusätzlich roter Skelettmuskel. Für die Mäuse wurden komplette Nieren, Teile der Leber und des Oberschenkelmuskels (*Musculus quadriceps fe-*

*moris*) entnommen. Für Schwein und Rind wurden als Nierenproben jeweils Teile der Nierenrinde verwendet; als Muskel dienten bei ihnen Teile des Rückenmuskels (*Musculus longissimus dorsi*). Weiterhin wurden Teile der Leber verwendet. Alle Gewebeproben wurden entweder in RNAlater (25 mM Natriumcitrat; 10 mM EDTA;  $0,7 \frac{g}{mL}$  Ammoniumsulfat; pH 5,2) eingelegt oder bevorzugt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

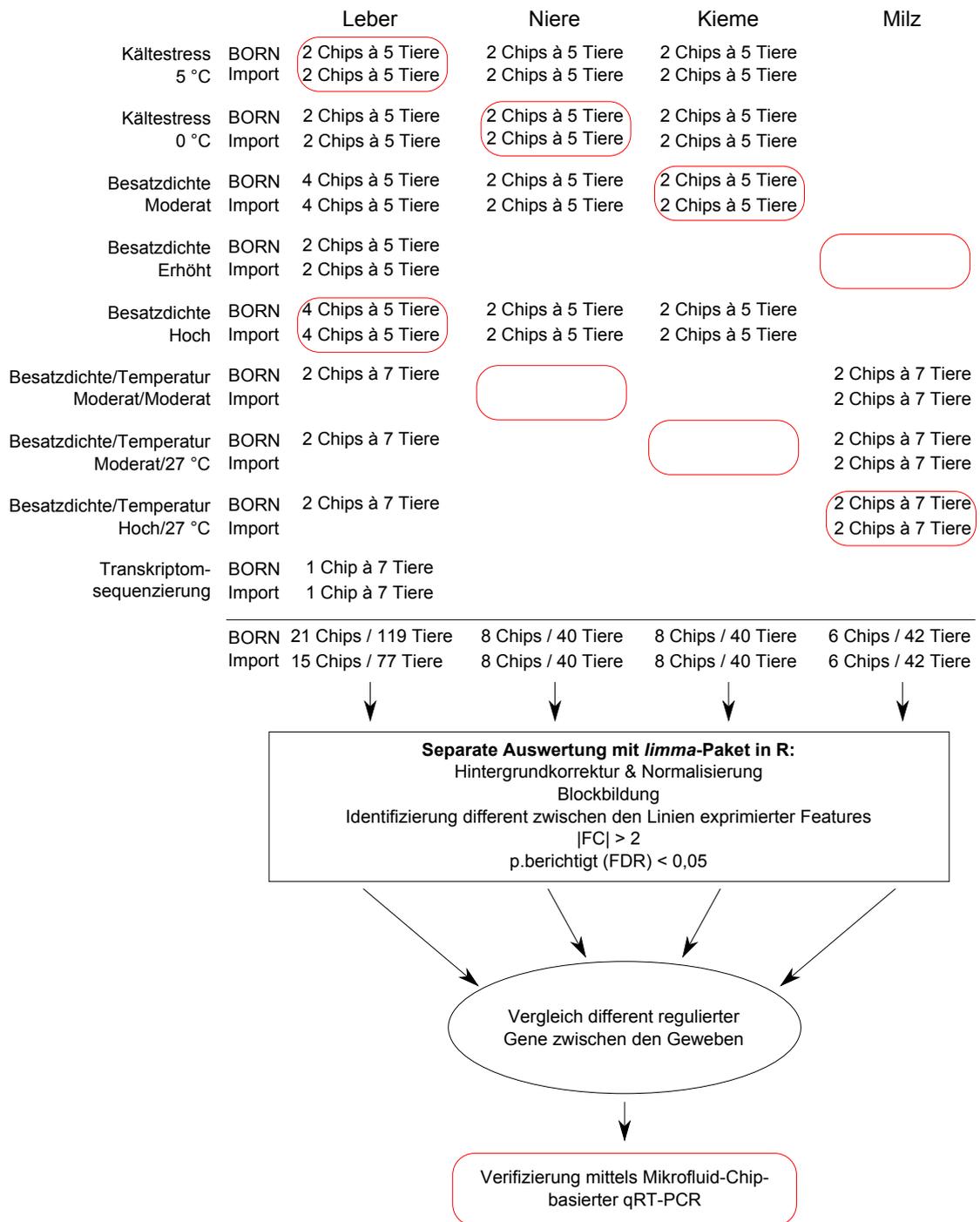
**2.2.2.1. DNA-Isolation** Genomische DNA wurde beispielsweise zur Geschlechtsbestimmung der Forellen benötigt. Die Isolation von DNA aus Geweben wie Leber, Kieme oder der Schwanzflosse erfolgte mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue*-Kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Das Prinzip basiert dabei auf der Methode von BOOM *et al.* (1990). Kleine Gewebestücke wurden mittels Skalpell weiter zerkleinert und in 180  $\mu\text{L}$  Puffer ATL aufgenommen. 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K wurden hinzugegeben und schnell gemischt. Das Gewebe wurde in dieser Lösung bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 200  $\mu\text{L}$  AL-Puffer gefolgt von 200  $\mu\text{L}$  reinem Ethanol wurden zugegeben und erneut gemischt. Das Gemisch wurde auf Säulchen pipettiert, welche darauf bei 8000 rpm abzentrifugiert wurden. Die Säulchen wurden darauf nacheinander mit 500  $\mu\text{L}$  Puffer AW1 und AW2 gespült. Anschließend wurde die Säulchenmembran durch schnelles Abzentrifugieren (14000 rpm, 3 Minuten) getrocknet. Abschließend wurde die an der Membran haftende genomische DNA mittels 200  $\mu\text{L}$  AE-Puffer eluiert.

**2.2.2.2. RNA-Isolation** RNA wurde benötigt, um die Expressionsstärke von bestimmten Genen messen zu können. Die Isolation erfolgte mittels Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach CHOMCZYNSKI UND SACCHI (1987). Zerkleinerte Gewebestücke wurden in 1 mL TRIzol aufgenommen und mit fünf sterilen Keramik-Kügelchen versehen (Precellys). Die Proben wurden dann bei 500 rpm im Precellys 24-Homogenisator aufgeschlossen. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden 200  $\mu\text{L}$  Chloroform hinzugegeben und das Gemisch drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 12000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführt. 500  $\mu\text{L}$  Isopropanol wurden zugegeben und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem zehnminütigen Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1 mL kalten 80 %igem Ethanol gewa-

schen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das Pellet in 100 µL RNase-freiem Wasser gelöst. Die isolierte RNA wurde dann mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) – basierend auf der Methode von BOOM *et al.* (1990) – aufgereinigt. Dazu wurden zu den Proben 350 µL Puffer RLT, 3,5 µL β-Mercaptoethanol und 200 µl 70 %iges Ethanol hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf ein Säulchen des Kits aufgebracht und anschließend abzentrifugiert (20 s, 1000 rpm). Auf die Säule wurden 350 µL RW1-Puffer pipettiert und erneut abzentrifugiert. Zur DNase-Behandlung wurden 10 µL DNase mit 70 µL RDD-Puffer gemischt und anschließend 15 Minuten lang auf der Säule bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurden 350 µL Puffer RW1 gegeben und wiederum abzentrifugiert. Zum Waschen wurden auf die Säule zweimal je 500 µL RPW Puffer gegeben und abzentrifugiert und schließlich die RNA in 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Die Qualität der RNA wurde in einem Agarosegel überprüft. Dazu wurden das Aussehen der Banden von 28S- und 18S-rRNA beurteilt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

**2.2.2.3. DNA-Chips** Mit Hilfe von DNA-Chips (auch *Microarray* genannt) lässt sich die Expression von einer Vielzahl von Genen in einem einzigen Experiment ermitteln (SCHENA *et al.*, 1995). Die RNA, die für DNA-Chips eingesetzt wurde, wurde zusätzlich zur Überprüfung der spektrometrischen Eigenschaften mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers unter Ermittlung des RNA-Integritäts-Werts (*RNA integrity number*, RIN) überprüft. Es wurden jeweils aus fünf Fischen RNA-Pools für die verschiedenen Stämme, Bedingungen und Gewebe hergestellt, wobei jeweils zwei Pools erzeugt wurden. Diese gepoolten Proben wurden durch die Firma Miltenyi Biotec gemäß den Herstellervorgaben mit Agilent *Whole Salmon Genome Oligo Microarrays 8x60K* hybridisiert.

Um grundsätzliche Unterschiede zwischen den beiden Forellenlinien hinsichtlich ihrer Genexpression zu finden, wurden die Chipdaten aus mehreren Versuchen zusammengeführt. Die verschiedenen Versuchsansätze zeigt Abb. 2.4. Insgesamt wurden 36 DNA-Chips mit aus Leber isolierter RNA, die 196 Tiere repräsentierte, in die Analyse einbezogen. Für Niere und Kieme waren dies je 16 DNA-Chips mit Proben von je 80 Tieren und für die Milz 12 Chips mit RNA aus 84 Tieren. Die Auswertung der Chips erfolgte mit Hilfe des *limma*-Pakets (SMYTH, 2005), das im Rahmen des *bioconductor*-Projekts (GENTLEMAN *et al.*, 2004) für die Programmiersprache R (R CORE TEAM, 2014) bereitgestellt wird. Dabei wurden signifikant zwischen den beiden Forellenlinien different regulierte Gene zunächst separat für die vier Gewebe ermittelt. Die Intensitäten der Chips wurden zunächst um den jeweiligen Hintergrund mittels *normexp*-Methode korrigiert (RITCHIE



**Abb. 2.4: Flussdiagramm zur Chip-Auswertung**

Rot markiert sind die Proben, die für die Verifizierung mittels Mikrofluid-Chip-basierter qRT-PCR verwendet wurden. Dabei wurden auch solche Proben verwendet, für die keine DNA-Chip-Daten vorhanden waren (leere rote Kästen).

*et al.*, 2007). Anschließend wurden alle DNA-Chips miteinander normalisiert und die Werte für mehrmals auf dem Chip vorhanden Gene gemittelt. Mit Hilfe linearer Modelle (SMYTH, 2004) wurden dann die verschieden exprimierten Gene ermittelt. Dabei wurde ein *Blocking*-Ansatz verwendet, das heißt, es wurden jeweils zunächst Vergleiche zwischen solchen Chips durchgeführt, die Proben von gleichen Bedingungen beinhalteten und die Ergebnisse dieser wurden dann zu einem Gesamtergebnis zusammengeführt. Dadurch sollten Veränderungen der Genexpression durch die Behandlungen aus den Daten herausgerechnet werden, um so solche Gene zu identifizieren, die sich ungeachtet der Umweltbedingungen zwischen beiden Forellenlinien unterscheiden. Als different exprimiert wurden solche Gene betrachtet, für die ein mindestens zweifacher Unterschied (*fold change*,  $|FC| \geq 2$ ) zwischen den Intensitäten vorlag, sowie der mit Hilfe der *false discovery rate* nach BENJAMINI UND HOCHBERG (1995) für multiples Testen angepasste p-Wert kleiner als 0,05 war. Mit Hilfe des Internetprogramms Venny (OLIVEROS, 2007) wurden dann diejenigen Gene identifiziert, die zwischen mehreren Geweben gleichzeitig different zwischen beiden Forellenlinien exprimiert waren.

Wegen der teils unzureichenden Annotation des DNA-Chips von Seiten des Herstellers wurden alle Annotationen der different regulierten Gene manuell verifiziert. Aufgrund der Vielzahl different regulierter Gene erfolgte der Abgleich der Sondensequenzen mit der NCBI-GenBank per Stapelverarbeitung mittels des `blast+`-Kommandozeilentools. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche wurden händisch überprüft. Nur solche Sonden, die einen Treffer in der Datenbank mit mindestens 85 % Abdeckung und 90 % Sequenzidentität zeigten, wurden weiter berücksichtigt. Mit Hilfe des Tools bioDBnet (MUDUNURI *et al.*, 2009) wurden zu den Nukleotid-*Accession-Codes* der Treffer die jeweils passenden Protein-*Accession-Codes* ermittelt. Diese wurden dann gegen die Swiss-Prot-Datenbank der *UniProt Knowledge Base* (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2015) verglichen. Abschließend wurde aus diesen Datensätzen dann das jeweils offizielle Gensymbol des menschlichen Orthologs ermittelt und der entsprechenden Sonde zugeordnet. Diese Gensymbole wurden dann für die weitere Benennung in dieser Arbeit verwendet. Anhand der durch die BLAST-Analysen ermittelten Sequenzen konnten weiterhin Primer für eine Verifizierung der DNA-Chip-Analyse mittels mikrofluidbasierter qRT-PCR abgeleitet werden.

Mit Hilfe des Tools AmiGo (CARBON *et al.*, 2009) angereichert mit Daten des PANTHER-Projekts (MI *et al.*, 2013) wurde eine *GO-Term*-Anreicherungsanalyse für die Gensymbole different regulierter Gene durchgeführt.

**2.2.2.4. Mikrofluid-Chip-basierte Echtzeit-PCR** Um eine Vielzahl von Echtzeit-PCRs (vgl. Abschnitt 2.2.2.6 auf Seite 27) zugleich durchführen zu können, wurde das Fluidigm Biomark HD-System verwendet. Durch die Nutzung von flüssigkeitsbasierten integrierten Schaltkreisen (IFC) lassen sich sehr viele Reaktionen zeitgleich im Nanoliter-Maßstab durchführen (SPURGEON *et al.*, 2008). Es wurde das 192.24-IFC verwendet, das für eine Messung von 192 Proben mit 24 Primerpaaren geeignet ist. Für einen vorteilhaften Arbeitsablauf erfolgte jeder Schritt von der RNA-Verdünnung bis zur Messung im Mikrotiterplatten-96-well-Format. Die zu untersuchenden Gene wurden auf Basis der Auswertung der DNA-Chips (Abschnitt 2.2.2.3 auf Seite 19) ausgewählt. Die Ableitung der Primer erfolgte basierend auf Sequenzen aus der GenBank (BENSON *et al.*, 2005). Waren diese für das gesuchte Gen in der Regenbogenforelle noch nicht vorhanden, wurden eine EST-Datenbank (SALEM *et al.*, 2010) sowie das Forellen-Genom (BERTHELOT *et al.*, 2014) nach der entsprechenden Sonde des DNA-Chips durchsucht. Bei einem Treffer in der EST-Datenbank konnte das Genom verwendet werden, um die Exon-Intron-Grenzen festzustellen, auf welche gezielt Primer gelegt wurden. Waren nur Treffer im Genom vorhanden, wurde anhand der umgebenden Genomsequenz mit dem Tool FgenesH++ (SOLOVYEV *et al.*, 2006) und einer entsprechenden Proteinsequenz aus einer anderen Fischart das Forellengen vorhergesagt. Wurden anhand der Datenbanken mehrere Genvarianten gefunden, wurden für diese Varianten jeweils spezifische Primer abgeleitet.

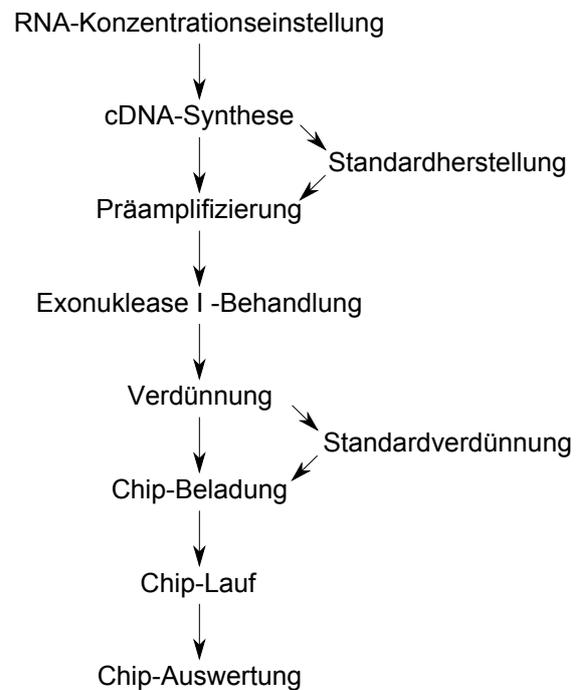
Der gesamte Versuchsablauf ist in Abb. 2.5 dargestellt. Die mittels NanoDrop gemessenen RNA-Proben wurden mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ L eingestellt. Jeweils 1  $\mu$ L der RNA-Lösungen wurde dann mit 1  $\mu$ L *Reverse Transcription Master Mix* (Fluidigm), sowie 3  $\mu$ L RNase-freiem Wasser versetzt und gemischt. Nach kurzer Anzentrifugation wurden die Platten mit den Proben dann zunächst für fünf Minuten bei 25 °C, dann für 30 Minuten bei 42 °C und bei 85 °C für fünf Minuten inkubiert und dann auf 0 °C abgekühlt.

Um auch schwach exprimierte Gene messen zu können, erfolgte nach der cDNA-Synthese eine Präamplifikation mittels *Fluidigm PreAmp Mastermix*. Dazu wurden zunächst die jeweils ein Primerpaar bildenden Primer mit einer Stammkonzentration von 200  $\mu$ M gleichmäßig zusammenpipettiert und so auf eine Konzentration von 100  $\mu$ M eingestellt. Von jedem der 24 verwendeten Primerpaare wurde dann 1  $\mu$ L entnommen und ein Mix aus allen Primern und 176  $\mu$ L DNA-Suspensionspuffer (10 mM Tris, pH 8; 0,1 mM EDTA; Affymetrix) hergestellt. 0,5  $\mu$ L dieses Primermixes wurde zusammen mit 2,25  $\mu$ L Wasser sowie 1  $\mu$ L *PreAmp Master Mix* (Fluidigm) in ein *Well* einer neuen Mikrotiterplatte vorgelegt und dann wurden

je 1,25  $\mu\text{L}$  cDNA hinzupipettiert. Nach Mischen und Abzentrifugieren erfolgte eine PCR-basierte Amplifizierung. Nach initialer Denaturierung von 2 Minuten bei 95  $^{\circ}\text{C}$  folgten zwölf Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95  $^{\circ}\text{C}$  für 15 Sekunden und einem kombinierten Annealing- und Extensionsschritt bei 60  $^{\circ}\text{C}$  für vier Minuten. Anschließend wurde die präamplifizierte cDNA abgekühlt. Um die noch vorhandenen Primer aus der präamplifizierten cDNA zu entfernen, folgte eine Exonuclease-Behandlung. Exonuclease I (Thermo Scientific) wurde mit dem zugehörigen Puffer auf eine Konzentration von 4 U/ $\mu\text{L}$  verdünnt und je 2  $\mu\text{L}$  wurden dann den einzelnen Ansätzen zugegeben. Nach Mischen und Abzentrifugation wurden die Proben für 30 Minuten bei 37  $^{\circ}\text{C}$  und anschließend für 15 Minuten bei 80  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann abgekühlt. Durch Zugabe von 43  $\mu\text{L}$  TE-Puffer (Qiagen) wurde eine insgesamt zehnfache Verdünnung hergestellt, die dann für den eigentlichen Reaktionsansatz verwendet wurde.

Gemäß Anleitung wurde zunächst mittels Spritze die Kontrolllinienflüssigkeit auf den IFC aufgetragen und das blaue Klebeband entfernt. Für die Primer-Mastermixe wurde jeweils 0,15  $\mu\text{L}$  der 100  $\mu\text{M}$  Primerpaare sowie 1,35  $\mu\text{L}$  DNA-Suspensionspuffer und 1,5  $\mu\text{L}$  Assay-Ladereagenz kombiniert und in die entsprechenden Vertiefungen auf dem Chip pipettiert. Für die Proben wurden jeweils 1,5  $\mu\text{L}$  *SSo Fast EvaGreen Supermix with low ROX* (Bio-Rad), 0,15  $\mu\text{L}$  *DeltaGene* Probenreagenz (Fluidigm) und 1,35  $\mu\text{L}$  der Exonuclease-behandelten, präamplifizierten cDNA kombiniert und ebenfalls in die entsprechenden *Inlets* pipettiert.

Gemäß Anleitung wurden dann auch die Aktivierungs- und Druckflüssigkeiten in die entsprechenden Vertiefungen des IFCs gegeben und der Chip mittels IFC Controller RX beladen. Anschließend erfolgte der eigentliche Real-Time-PCR-Vorgang mittels BioMark HD System und dem mitgelieferten Programm *GE 192.24 Fast PCR + Melt v2*. Zur relativen Quantifizierung wurde auf Standardverdünnungen zurückgegriffen. Diese wurden erstellt, indem nach der cDNA-Synthese aus mehreren cDNA-Ansätzen Probenmaterial entnommen und zusammengemischt



**Abb. 2.5:** Flussdiagramm zur Mikrofluid-Chip-basierten Echtzeit-PCR

wurde. Diese Mischung wurde dann bis zur Exonuklease-Behandlung analog zu den normalen Proben behandelt. Statt zehnfach wurde der Standard jedoch nur fünffach verdünnt und dann jeweils im Verhältnis 1:5 in sieben Verdünnungsstufen verdünnt. Alle diese Verdünnungsstufen wurden dann mit auf den IFC aufgetragen und dienen der Berechnung der relativen Konzentrationen der einzelnen RNAs. Eine Normierung der Werte erfolgte mit den Referenzgenen *ACTB*, *EEF1A1*, *RPS5* und *UBA52*. Die Berechnung der normierten Kopienzahlen erfolgte anhand relativer Standards (LARIONOV *et al.*, 2005) nach der von BALLESTER *et al.* (2013) beschriebenen Methode. Abweichend wurden jedoch geometrische anstelle arithmetischer Mittelwerte der Referenzgen-Expressionswerte gebildet, wie von VANDESOMPELE *et al.* (2002) empfohlen.

**2.2.2.5. Synthese von komplementärer DNA** Mittels Reverser Transkription lässt sich aus Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) erzeugen (STÅHLBERG *et al.*, 2004). Dazu wurde das Volumen von 1,5 µg RNA auf 10 µL mit DEPC-behandeltem Wasser (10 mL Diethylpyrocarbonat auf 1 L Wasser, über Nacht rühren, autoklavieren) aufgefüllt. Es wurden – die Herstelleranweisung befolgend – 1 µL dNTPs (je 2,5 mM pro Nukleotid) und 1 µL Oligo-d(T)-Primer (100 µM) hinzugegeben und die gemischte Lösung für fünf Minuten auf 65 °C erhitzt. Auf Eis wurden weitere 4 µL Puffer (*SuperScript II Reverse Transcriptase*-Kit, Life Technologies), 2 µL DTT, sowie 1 µL des Enzyms *SuperScript II* hinzugegeben. Die Lösung wurde für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend das Enzym durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 70 °C deaktiviert. Abschließend wurde die cDNA mittels Roche *High Pure PCR Product Purification*-Kit analog zur PCR-Produkt-Aufreinigung (Abschnitt 2.2.2.9 auf Seite 34) aufgereinigt und durch die Aufnahme in einer größeren Menge Wasser – üblicherweise 100 µL – verdünnt.

**2.2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)** Die PCR dient der Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente (SAIKI *et al.*, 1988). Dabei wird eine DNA-abhängige DNA-Polymerase genutzt, welche ausgehend von sequenzspezifischen Primern die Vorlage, das so genannte *template*, kopiert und so vervielfältigt. Durch ein PCR-Programm mit spezifischem Temperaturprofil kann die Aktivität der Polymerase dabei an die Erfordernisse angepasst werden. In einem jeden Zyklus dieses Programms verdoppelt sich die spezifische DNA. Nach einem durchschnittlichen Programm von 30 Zyklen wird die Menge des gewünschten DNA-Fragments also

um den Faktor  $2^{30}$ , also etwa das Milliardenfache gesteigert. PCRs können in verschiedenen Varianten, wie im Folgenden vorgestellt, angewendet werden.

**Standard-PCR** Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tab. 2.1 dargestellt (für die verwendete Polymerase angepasst nach MÜLHARDT, 2013). Als DNA-Polymerase wurde die *HotStarTaq Plus*-Polymerase (Qiagen) verwendet. Je nach benötigter DNA-Menge wurden 15  $\mu$ L-, 25  $\mu$ L- oder auch 50  $\mu$ L-Ansätze pipettiert. Ein typisches PCR-Programm zeigt Tab. 2.2. Es besteht aus einem initialen Denaturierungsschritt, während dem die doppelsträngige DNA in ihre beiden Einzelstränge aufschmilzt. Auch jeder einzelne Programmzyklus beginnt mit einem Denaturierungsschritt, gefolgt von einem Annealingschritt, während dem sich die Primer spezifisch an das *template* anlagern. Während der eigentlichen Elongationsphase wird letztlich die Polymerase aktiv, welche dann die dNTPs an die Primer anbaut und so den Strang zwischen den Primern auffüllt. In einem finalen, verlängerten Elongationsschritt sollte die Polymerase alle begonnenen Fragmente vervollständigen, um verkürzte Produkte zu vermeiden. Die gewählte Annealingtemperatur basierte auf den Schmelzpunkten der Primer, jedoch wurden diese in der Regel für eine Annealingtemperatur von 60 °C optimiert. Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe des Tools Primer3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012). Die Elongationszeit

**Tab. 2.1: Standard-PCR-Ansatz**

	15 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
10x Puffer	1,5	2,5	5,0
dNTPs	0,6	1,0	2,0
HotStarTaq	0,06	0,1	0,2
H <sub>2</sub> O	11,04	18,4	36,8
Forward-Primer	0,6	1,0	2,0
Reverse-Primer	0,6	1,0	2,0
<i>template</i>	0,6	1,0	2,0

**Tab. 2.2: Standard-PCR-Programm**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)	
Initiale Denaturierung	95	300	
Denaturierung	94	30	} 32x
Annealing	60	30	
Elongation	72	20	
Finale Elongation	72	600	
Pause	8	-	

wurde in Abhängigkeit von der erwarteten PCR-Produkt-Größe gewählt. Dabei wurde angenommen, dass die verwendete Polymerase 1000 bp pro Minute auffüllen konnte. Ebenso wurde die verwendete Zyklenzahl variiert, in Abhängigkeit von der erwarteten Häufigkeit des Moleküls. Bei erwartungsgemäß seltenen Molekülen wegen geringer Expressionsstärke wurden bis zu 40 Zyklen verwendet.

**Touchdown-PCR** Statt einer Standard-PCR wurde in einigen Fällen eine *Touchdown*-PCR (DON *et al.*, 1991) durchgeführt, um die Spezifität dieser PCRs zu erhöhen. Dabei wird die Annealing-Temperatur zunächst einige Grad über dem Schmelzpunkt der Primer festgesetzt, sinkt dann aber in den ersten Zyklen ab. In den meisten Fällen wurden 10 Zyklen gefahren, in denen die Annealingtemperatur um jeweils 0,5 °C abgesenkt wurde, bis sie unter der Schmelztemperatur lag, woran sich dann 30 Zyklen mit dieser Temperatur ohne weitere Temperaturabsenkung anschlossen.

**Hochspezifitäts-PCR** Gewöhnliche für PCRs verwendete DNA-Polymerasen wie die Taq-Polymerase verfügen über keine Korrekturfunktion und bauen mit einer gewissen Häufigkeit falsche Basen in den neu synthetisierten DNA-Strang. In Anwendungsfällen, in denen eine erhöhte Genauigkeit nötig ist, kann auf spezielle Polymerasen zurückgegriffen werden, die eine geringere Fehlerquote aufweisen. Diese verfügen über eine 3'->5'-Exonukleaseaktivität, welche auch als *proofreading*-Funktion bezeichnet wird. In dieser Arbeit wurde dafür die *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies) genutzt. Weiterhin wurde auch die *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB) genutzt, welche laut Hersteller eine um das hundertfach geringere Fehlerrate aufweisen soll als gewöhnliche Taq-Polymerasen. Beide Polymerasen wurden jeweils nach ihrem entsprechenden Protokoll eingesetzt.

**PCR mit degenerierten Primern** Für einige Gensequenzen aus der Forelle oder anderen Fischarten, für die bisher noch keinerlei Sequenzinformation in den einschlägigen Datenbanken vorlag und für die auch keine ESTs gefunden wurden, wurden degenerierte Primer verwendet, welche mit dem Tool *PrimaClade* (GADBERRY *et al.*, 2005) abgeleitet wurden. Dazu wurde zunächst in der Datenbank *GenBank* beim NCBI recherchiert, inwieweit Sequenzinformationen aus anderen verwandten Fischarten vorlagen. Diese Sequenzen wurden dann verwendet, um ein multiples Sequenzalignment mit der Software *ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994) durchzuführen. Ausgehend von dessen Ausgabe wurden dann die degenerierten

Primer abgeleitet. Typischerweise wurden Primer mit bis zu zwei degenerierten Basen und einem Schmelzpunkt um 60 °C verwendet. Die Amplifizierung erfolgte dann mittels Standard-PCR, wobei die Annealingtemperatur auf 55 °C gesenkt wurde, oder mittels *Touchdown*-PCR, um die Spezifität zu erhöhen.

**Semiquantitative PCR** Mittels semiquantitativer PCR konnte ein schneller Überblick über die Gewebeverteilung der Genexpression der untersuchten Gene gewonnen werden (vgl. ASHHAB *et al.*, 2001). Dabei wurde eine Standard-PCR durchgeführt, bei der die gewählte Zyklenzahl so gering war, dass bei der späteren Visualisierung die Banden nicht gesättigt waren. Weiterhin wurden alle miteinander verglichenen Proben mit demselben PCR-Mastermix im selben Thermocycler amplifiziert und identische Probenmengen auf das Gel aufgetragen. Zur Quantifizierung der Expression wurden die Bandenintensitäten mit der Software Image Lab (Bio-Rad) oder mit der Software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012) ausgewertet. Anhand der Bandenintensität konnten dann Genexpressionsprofile abgeleitet werden. Eine höhere Genauigkeit wird durch die Echtzeit-PCR ermöglicht.

**Echtzeit-PCR** Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*quantitative Realtime-PCR*, qRT-PCR; HEID *et al.*, 1996) lässt sich die innerhalb einer Probe vorhandene Anzahl definierter DNA-Moleküle bestimmen. Dazu wurden das Lightcycler 480 und das Lightcycler 96-System der Firma Roche genutzt. Als detektierender Farbstoff wurde dabei SybrGreen aus dem *SensiFast SYBR No-ROX*-Kit (Bioline) verwendet. Ein entsprechender Reaktionsansatz ist in Tab. 2.3 zu sehen, ein entsprechendes Cycling-Programm in Tab. 2.4. Primer für diese Methode wurden mit Hilfe der Software PSQ Assay Design (Biotage) abgeleitet. Die Einstellungen erlaubten die Generierung von Primern, die PCR-Produkte mit einer Amplikonlänge zwischen 150 und 200 bp generieren, mit einer Primerlänge zwischen 18 und 24 bp und Schmelztemperaturen zwischen 64 und 66 °C. Im Anschluss an das etwa einstündige Amplifizierungsprogramm erfolgte ein Aufschmelzen der PCR-Produkte durch eine stetig ansteigende Temperatur (Abb. 2.6 a). Basierend darauf, dass ab einer gewissen, molekülspezifischen Temperatur (Schmelzpunkt) das PCR-Produkt denaturiert und sich in zwei Stränge teilt, in die der Farbstoff nicht mehr interkalieren kann, sodass die Fluoreszenz abfällt (Abb. 2.6 c), wurden die Schmelzkurven (Abb. 2.6 d) als Funktion von Fluoreszenzveränderung bezogen auf die Temperaturveränderung erstellt. Es wurde überprüft, ob für jede gemessene Probe nur ein einziger Gipfel in der Schmelzkurve vorhanden war. Ebenso wurde die gesamte PCR-Reaktion auf Agarose-Gelen aufgetragen und die Qualität der

Banden visuell überprüft. Durch diese beiden Qualitätssicherungsschritte sollte sichergestellt werden, dass in jedem Reaktionsansatz nur die spezifische, erwünschte Reaktion ablief.

Weiterhin wurde aus den Fluoreszenzkurven der Cq-Wert ermittelt (Abb. 2.6 b), der denjenigen Zyklus angibt, bei dem das Fluoreszenzsignal einer Probe erstmalig über dem Hintergrundsignal lag. Aus diesem Cq-Wert kann dann auf die Kopienzahl in der Probe geschlossen werden. Je geringer der Cq-Wert, desto mehr Ausgangsmaterial war zu Beginn der PCR vorhanden. Anhand einer Eichgerade mit externen Standards (Abb. 2.6 e) kann dann für unbekannte Proben anhand des Cq-Werts auf die Kopienzahl geschlossen werden. Die Berechnung der Kopienzahl bei bekanntem Cq-Wert erfolgt dann nach Gleichung 1.

$$Kopienzahl = 10^{\frac{Cq-Achsenabschnitt}{Steigung}} \quad (1)$$

Weiterhin lässt sich aus der Eichgeraden mittels der Gleichung 2 die Reaktionseffizienz (RE) für jede einzelne Reaktion bestimmen.

$$RE = 10^{\frac{-1}{Steigung}} \quad (2)$$

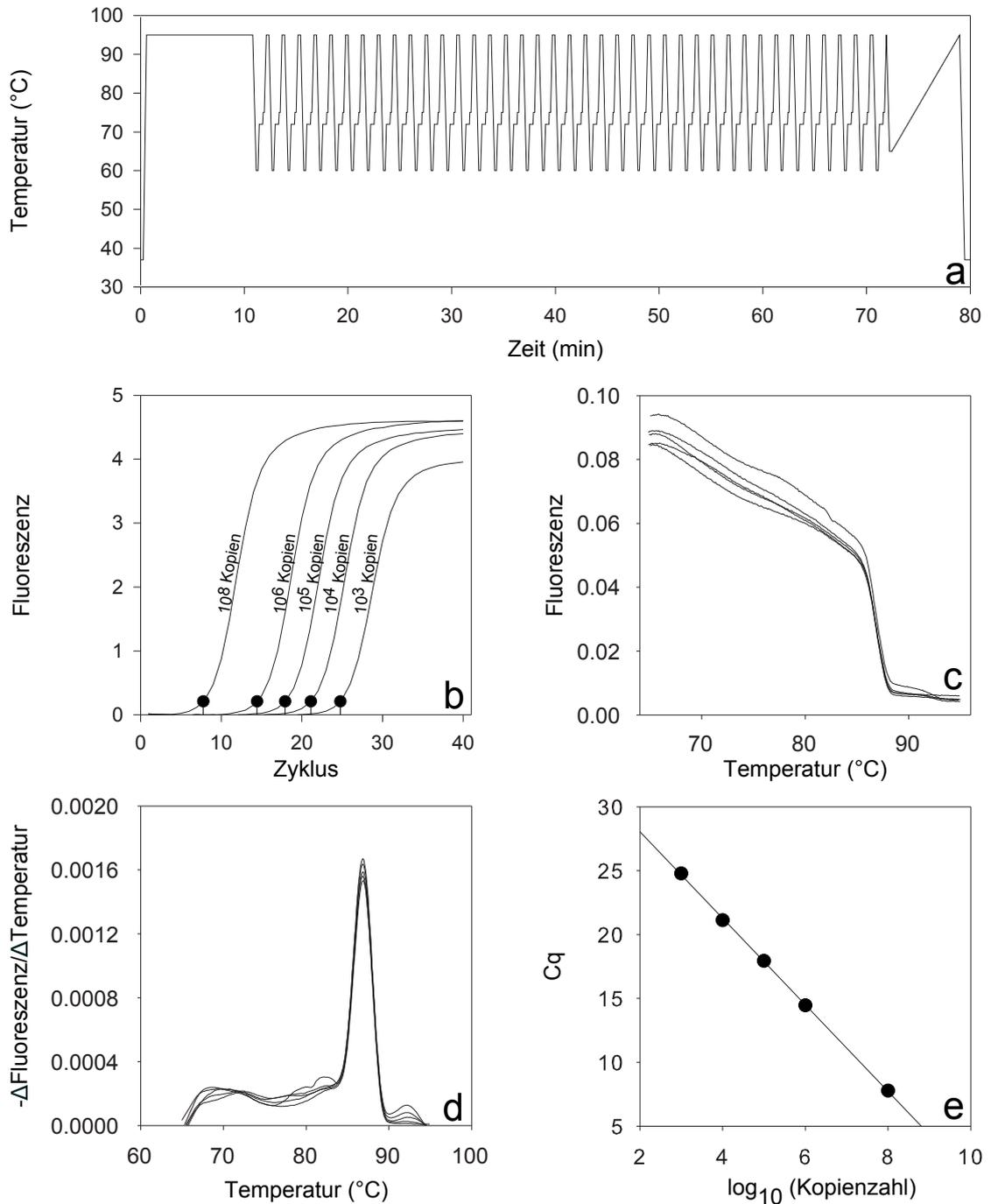
Diese sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen und gibt an, um welchen Faktor sich die DNA in jedem PCR-Zyklus vermehrt. Für die eigentlichen Standards wurde mit

**Tab. 2.3: qRT-PCR-Ansatz**

	Primer 50 $\mu$ M	Primer 20 $\mu$ M
2x Mastermix	6,0	6,0
H <sub>2</sub> O	0,6	0
<i>Forward</i> -Primer	0,2	0,5
<i>Reverse</i> -Primer	0,2	0,5
<i>template</i>	5,0	5,0

**Tab. 2.4: qRT-PCR-Programm**

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)	
Initiale Denaturierung	95	300	
Denaturierung	95	15	} 40x
Annealing	60	10	
Elongation	72	20	
Quantifikation	75	5	



**Abb. 2.6:** Exemplarische Grafiken einer qRT-PCR am Beispiel der Amplifikation eines Hering-*RPL8*-Standards

a) Ablauf des qRT-PCR-Programms. b) Zunahme der Fluoreszenz mit dem aktuellen Zyklus. Markiert sind die jeweiligen  $C_q$ -Werte. c) Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Temperatur bei Aufschmelzen. d) Aus dem Fluoreszenz-Temperatur-Verlauf abgeleitete Schmelzkurven. e) Eichgerade. Details siehe Text.

den Primern, die für die qRT-PCR verwendet wurden, in einer Standard-PCR mit 50  $\mu\text{L}$ -Ansatz das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert, aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Für die Konzentrationsbestimmung ist es dann nötig, die genaue Molekülzahl in der Probe zu kennen. Aus der Länge des PCR-Fragments lässt sich mit der Avogadro-Konstanten und der durchschnittlichen Molaren Masse eines Basenpaars von 660  $\text{g/mol}$  (MÜLHARDT, 2013) die Masse von genau einem DNA-Molekül dieser Länge bestimmen (Gleichung 3).

$$m [\text{g}] = \text{Fragmentlänge} [\text{bp}] * 660 \text{ g/mol*bp} * N_A^{-1} \quad (3)$$

Durch den in Gleichung 4 gezeigten Rechenschritt kann schließlich die genaue Molekülzahl in 1  $\mu\text{L}$  Standard errechnet werden.

$$c [\text{Moleküle}/\mu\text{L}] = \frac{c [\text{ng}/\mu\text{L}] * 10^{-9}}{m [\text{g}]} \quad (4)$$

Durch mehrere Verdünnungsschritte jeweils im Verhältnis 1:10 kann so die Eichgerade erstellt werden.

Um auszuschließen, dass sich eine variable cDNA-Synthese-Leistung auf die Vergleichbarkeit der Werte auswirkt, wurde in den Ergebnissen grundsätzlich nicht die über die Eichgerade ermittelte absolute Kopienzahl angegeben, sondern diese wurde mit Referenzgenen normiert. Dabei wurde stets das geometrische Mittel von mindestens zwei Referenzgenen zur Normierung verwendet (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Als Referenzgene dienten die in Tab. 2.5 gezeigten Gene.

**Schnelle Amplifikation von cDNA-Enden** Mittels „Schneller Amplifikation von cDNA-Enden“ (*Rapid amplification of cDNA-ends*, RACE) lassen sich auf cDNA-Ebene – ausgehend von einem bekannten Stück DNA – bisher unbekannte Teilstücke des gleichen cDNA-Fragments bestimmen. Dies kann sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung erfolgen:

### 5'-Richtung

Es wurde das *GeneRacer*-Kit (Invitrogen) genutzt. Dieses basiert auf dem RNA-Ligase-vermittelten RACE-Verfahren (RLM-RACE; LIU UND GOROVSKY 1993). Es wurden insgesamt 5  $\mu\text{g}$  RNA aus verschiedenen Geweben in 7  $\mu\text{L}$  DEPC-behandeltem Wasser gepoolt und gemäß Anleitung mit je 1  $\mu\text{L}$  CIP-Puffer, RNaseOUT und CIP versetzt. Nach kurzem Mischen und Abzentrifugieren erfolgte eine einstündige Inkubation bei 50  $^{\circ}\text{C}$ , gefolgt von einer Abkühlphase auf Eis. Um die

Tab. 2.5: In der qRT-PCR verwendete Referenzgene

Spezies	Gen	Sequenz	Referenz
<i>Bos taurus</i>	<i>EIF3K</i>	NM_001034489	DEMASIUS <i>et al.</i> (2013)
	<i>MTG1</i>	XM_005225495	DEMASIUS <i>et al.</i> (2013)
<i>Clupea harengus</i>	<i>EEF1A</i>	DQ334851	MATEJUSOVA <i>et al.</i> (2010)
	<i>RPL8</i>	<sup>a</sup>	analog zu anderen Fischen
<i>Coregonus maraena</i>	<i>EEF1A1b</i>	HE984311	ALTMANN <i>et al.</i> (2014)
	<i>RPL9</i>	HE984307	ALTMANN <i>et al.</i> (2014)
	<i>RPL32</i>	HE984306	ALTMANN <i>et al.</i> (2014)
<i>Mus musculus</i>	<i>EEF2</i>	NM_007907	KOUADJO <i>et al.</i> (2007)
	<i>RPL38</i>	XM_006534009	KOUADJO <i>et al.</i> (2007)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>EEF1A</i>	NM_001124339	BOWERS <i>et al.</i> (2008)
	<i>RPS5</i>	NM_001160519	REBL <i>et al.</i> (2014b)
	<i>ACTB</i>	NM_001124235	BOWERS <i>et al.</i> (2008)
<i>Perca fluviatilis</i>	<i>ACTB</i>	EU664997	MATHIEU <i>et al.</i> (2014)
	<i>EEF1A</i>	KC513785	MATHIEU <i>et al.</i> (2014)
<i>Sander lucioperca</i>	<i>EEF1A</i>	<sup>a</sup>	analog zu anderen Fischen
	<i>RPL8</i>	HQ259050	HERMELINK <i>et al.</i> (2011)
<i>Sus scrofa</i>	<i>TOP2B</i>	NM_001258386	GU <i>et al.</i> (2011)
	<i>HSPCB</i>	XM_005666063	GU <i>et al.</i> (2011)
	<i>YWHAZ</i>	XM_005662949	GU <i>et al.</i> (2011)

<sup>a</sup>mit Hilfe degenerierter Primer abgeleitet

RNA zu präzipitieren, wurde sie mit 90 µl DEPC-Wasser und 100 µL Phenol-Chloroform-Mischung versetzt und 30 Sekunden gemischt. Anschließend erfolgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur. 90 µL der farblosen, oberen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 2 µL Muskelglykogen und 10 µL Natriumacetat versetzt, gemixt und mit 220 µL 95 %-igem Ethanol versetzt. Nach dem Mischen wurde die Probe für 10 Minuten auf -80 °C abgekühlt und über Nacht bei -20 °C eingefroren.

Am nächsten Tag wurde die Probe bei 4 °C 20 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach zweiminütigem Abzentrifugieren des Ethanols wurde das Pellet zwei Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in 7 µL DEPC-Wasser aufgenommen.

Um die 5'-Kappe der mRNA zu entfernen, wurden der Probe 1 µL 10x TAP Puffer, 1 µL RNaseOUT sowie 1 µL TAP zugesetzt und das Gemisch für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde erneut – wie oben beschrieben – präzipitiert und in 7 µL gelöst. Anschließend wurde sie dem Reaktionsgefäß mit dem *RNA Oligo*

zugesetzt und für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Es wurden 1 µL Ligase-Puffer, 1 µL ATP, 1 µL RNaseOUT sowie 1 µL T4 RNA Ligase zugesetzt und das Gemisch wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer erneuten RNA-Präzipitation wurde die modifizierte RNA in 10 µL DEPC-Wasser aufgenommen und direkt für die cDNA-Synthese eingesetzt. Im Gegensatz zur herkömmlichen cDNA-Synthese, in der Oligo-d(T)-Primer verwendet wurden, wurden hier bis zu fünf genspezifische Primer eingesetzt.

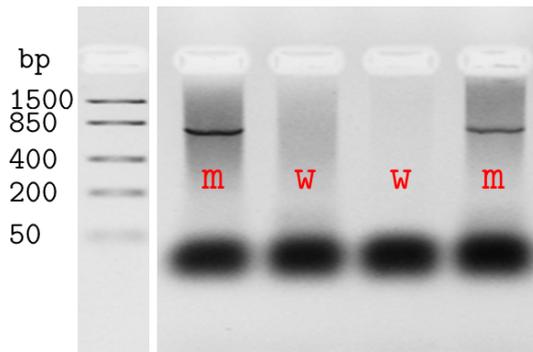
Durch das RNA-Oligo wurden an die Enden aller vorhandener mRNAs spezifische Nukleotide angehängt, die für PCR genutzt werden konnten. Es erfolgten also PCRs mit je einem Primer, der spezifisch für das Oligo war, sowie einem Primer, der in der bekannten Sequenz band. Um die Spezifität zu erhöhen, erfolgte noch eine verschachtelte PCR. Dabei wurden jeweils weiter innen liegende Primer verwendet.

### **3'-Richtung**

Die RNA wurde unmodifiziert unter Nutzung eines Oligo-d(T)-Primers, an den im 3'-Bereich ein bekanntes Sequenzmotiv angehängt war, in cDNA umgeschrieben. Dann konnte eine PCR durchgeführt werden, die einen genspezifischen Primer verwendete und einen, der an die durch den Primer eingeführte Sequenz band. Analog zur 5'-RACE wurde auch hier noch eine verschachtelte PCR durchgeführt, um die Spezifität zu erhöhen.

**Genomwanderung** Das Prinzip der Genomwanderung dient dazu, auf der Ebene genomischer DNA ausgehend von einem kleinen bereits bekannten Sequenzstück Informationen über die Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft des bekannten Stücks zu erhalten. Dazu wurde das *GenomeWalker Universal*-Kit der Firma Clontech genutzt (SIEBERT *et al.*, 1995). Genomische DNA wurde mit Hilfe der *blunt-ends* erzeugenden Restriktionsenzyme *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *StuI* in vier Ansätzen verdaut. Anschließend wurden an die DNA-Fragmente so genannte Adaptern ligiert. Diese dienten in späteren Polymerase-Kettenreaktionen (vgl. Abschnitt 2.2.2.6) als Ansatzpunkt für einen Primer, der an diesen Adapter bindet. Mittels dieses Primers und eines genspezifischen Primers konnten so bisher unbekannte DNA-Bereiche amplifiziert werden.

**Geschlechtsbestimmung bei Forellen** Die Geschlechter der Forellen ließen sich mittels PCR-Verfahren bestimmen. Dieses wurde nur für die BORN-Forellen angewendet, da es sich bei den Import-Forellen grundsätzlich um Weibchen handelt.



**Abb. 2.7: Exemplarische Geschlechtsbestimmung bei der Regenbogenforelle.** PCR-Produkte von ca. 800 bp Größe zeigen an, dass es sich bei dem beprobten Tier um ein Männchen (m) handelt.

Es wurden die Primer GTTCATATGCCAGGCTCAAC und CGATTAGAAAGG-CCTGCTTG (BRUNELLI *et al.*, 2008) für diese PCRs genutzt. Als *template* wurde genomische DNA eingesetzt. Mit männlichen Tieren kann bei dieser Standard-PCR ein ca. 800 bp langes PCR-Fragment erzeugt werden, bei weiblichen Tieren hingegen nicht. Nach der Visualisierung der Banden kann so auf das Geschlecht des Tieres geschlossen werden.

**2.2.2.7. Quantifizierung von Nukleinsäuren** Die Konzentration von RNA und DNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop ND-1000 Spektrofotometers (NanoDrop Technologies) bestimmt. Dieses ermittelt die Konzentration aus 1  $\mu$ L Probe. Weiterhin geben die Verhältnisse der Extinktion bei 260 und 280 nm sowie bei 260 und 230 nm Informationen über die Reinheit der Nukleinsäurelösungen. Deutlich niedrigere 260/280-Verhältnisse als 1,8 (DNA) bzw. 2 (RNA) können auf Verunreinigungen mit Phenol oder Proteinen hinweisen. Niedrigere 260/230-Verhältnisse als 2,0-2,2 deuten ebenfalls auf Kontaminationen hin, beispielweise mit TRIzol oder Guanidinhydrochlorid, wie es in DNA-Aufreinigungs-Kits verwendet wird.

**2.2.2.8. Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung** Um DNA verschiedener Größen voneinander abzutrennen, wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach erwarteter PCR-Fragmentgröße wurden unterschiedlich konzentrierte Gele hergestellt. Die Agarosekonzentration lag zwischen 0,5 und 2,5 %. Die Agarose wurde in 0,5 x TBE-Puffer (44,5 mM Tris-Base; 44,5 mM Bor-säure; 1 mM EDTA; pH 8) gelöst und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach leichtem Abkühlen wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,05 % hinzugegeben. Die Gele wurden in Gelschlitten mit entsprechenden Kämmen gegossen. Nach Erstarren wurden die in Probenpuffer (50 % Glycerol; 0,1 % Bromphenolblau; 120 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8) aufgenommenen Proben in die Taschen aufgetragen und die Proben bei einer Spannung von 120 V für mindestens 15 Minuten aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Bandenvisualisierung im

ChemiDoc MP (Bio-Rad) System. Dabei wurde die Belichtungsdauer so gewählt, dass die Bandenintensität nicht die Sättigung erreichte.

**2.2.2.9. Aufreinigung von PCR-Produkten** Um PCR-Produkte von uninkorporierten dNTPs sowie ungebundenen Primern abzutrennen, wurde das *High Pure PCR Product Purification*-Kit (Roche) verwendet. Dazu wurden 100 µL Bindepuffer auf den PCR-Ansatz gegeben und das Gemisch auf die zum Kit gehörigen Säulchen überführt. Bei einer Zentrifugation (10000 rpm, 1 min) band die DNA an die Silica-Membran, wurde anschließend zwei Mal mit Waschpuffer (500 µL; 200 µL) gewaschen und dann mit Wasser eluiert. In einigen Fällen wurde das Kit auch dazu genutzt, DNA-Banden nach Auftrennung in der Gelelektrophorese aus Gelbanden zu isolieren und nach Anleitung aufzureinigen.

**2.2.2.10. TA-Klonierung von PCR-Produkten** Besonders lange PCR-Produkte, die nicht direkt sequenziert werden konnten, wurden mittels TA-Klonierung (ZHOU UND GOMEZ-SANCHEZ, 2000) in Vektoren eingebracht. Dazu wurden das *InsTAClone*-Kit (Thermo Scientific) sowie das *pGem T-easy Ligation*-Kit (Promega) verwendet. Entsprechende Ansätze für die Ligation sind in Tab. 2.6 gezeigt. Analog zum *pGem T-easy*-Ansatz wurde für PCR-Fragmente von hochspezifischen DNA-Polymerasen das *CloneJET PCR Cloning*-Kit (Thermo Scientific) verwendet, da diese Fragmente nicht über den für TA-Klonierung notwendigen A-Überhang verfügen. Anschließend wurden die Ansätze kurz bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden dann kompetente *E. coli*-Zellen (Promega) mit den Plasmiden transfiziert. Dazu wurden die Ligationsansätze zunächst für fünf Minuten auf 60 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. 40 µL kompetente Zellen wurden hinzu pipettiert und anschließend für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C für 90 Sekunden und eine zweiminütige Abkühlung auf Eis. Zu jedem Ansatz wurden 160 µL SOC-Medium (2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 20 mM Glukose; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 2,5 mM KCl; pH 6,8-7) hin-

**Tab. 2.6: Ligationsansatz**

Verwendeter Vektor	pgem T-easy	InsTAClone
PCR-Produkt	8,2 µL	7,4 µL
Ligasepuffer (Konz)	1,0 µL (10x)	2 µL (5x)
T4 DNA Ligase	0,5 µL	0,2 µL
Vektor	0,3 µL	0,4 µL

zugegeben und die Reaktionsgefäße anschließend eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die kompletten Ansätze auf IPTG-, XGAL- und Ampicillin-haltige TY-Agar-Platten (1,6 % Trypton; 1 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl; 2 % Agar; 4 % X-GAL; 0,04 mM IPTG; 0,1 mg/mL Ampicillin) ausgebracht und mittels Drigalski-Spatel verteilt. Die Platten wurden dann über Kopf über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle des erfolgreichen Einbaus des PCR-Produkts in den Vektor wurde am nächsten Tag eine Kolonien-PCR durchgeführt. Dazu wurden weiße Bakterienkolonien mittels Pipette gepickt und einmal direkt in einen PCR-Ansatz mit entsprechenden Primern getaucht. Das PCR-Programm war analog zur Standard-PCR, es wurde lediglich ein 10 µL-Ansatz angesetzt und das *template* durch Wasser ersetzt. Diejenigen Klone, welche nach Gelelektrophorese die erwarteten Banden aufwiesen, wurden dann über Nacht in einer Schüttelkultur in mit Ampicillin versetztem TY-Flüssigmedium (1,6 % Trypton; 1 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl; 0,1 mg/mL Ampicillin) angezüchtet.

**2.2.2.11. Präparation von bakteriellen Plasmiden in kleinem Maßstab (Mini-Prep)** Nach der Übernacht-Kultur von Bakterien mit eingebrachtem Plasmid erfolgte die Mini-Prep mittels *ZR Plasmid Miniprep Classic*-Kit (Zymogen Research), basierend auf der von BIMBOIM UND DOLY (1979) beschriebenen Methode. Die Übernachtskulturen wurden abzentrifugiert und die Bakterienpellets anschließend in 200 µl P1 Puffer gelöst. Es wurden 200 µL P2-Puffer zugegeben und das Gemisch zwei Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 400 µL P3-Puffer wurde das Gemisch wiederum abzentrifugiert, der Überstand auf die Säulchen aufgetragen und wiederum abzentrifugiert. Darauf wurde mit Endo-Waschpuffer und anschließend Waschpuffer gewaschen und letztlich die Plasmide mit 30 µL Wasser eluiert.

**2.2.2.12. Sequenzierung** DNA-Sequenzen wurden mittels Kettenabbruchverfahren nach SANGER *et al.* (1977) ermittelt. Dieses erfolgte zum einen durch das institutseigene Servicelabor für DNA-Sequenzierung mittels ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) und zum anderen durch den Sequenzierservice der Firma Qiagen. Zur genauen Angabe der Basenabfolge wurde der Konsensus von mindestens drei unabhängigen Sequenzierungen verwendet, um die Fehlerrate der verwendeten Polymerasen auszugleichen. Fertiggestellte DNA-Sequenzen wurden im Europäischen Nukleotid-Archiv (ENA) hinterlegt.

**2.2.2.13. Grün-fluoreszierendes-Protein-gekoppelte heterologe Proteinexpression** Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation eines Proteins, kann dieses an

das grün fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt werden (GIEPMANS *et al.*, 2006). Dazu wurden Primer abgeleitet, die den gesamten codierenden Bereich des Zielgens überspannten. An diese Primer wurden zusätzlich Restriktionsschnittstellen eingebracht. So wurde vor das Start-Codon des längsten offenen Leserahmens des Gens eine *Hind*III-Erkennungssequenz ( $5' \dots \overset{\checkmark}{\text{AAGCTT}} \dots 3'$ ) und vor das Stopp-Codon eine Erkennungssequenz für *Eco*RI ( $5' \dots \overset{\checkmark}{\text{GAATTC}} \dots 3'$ ) eingebracht. Das erhaltene Fragment wurde dann zunächst in den pjet-Vektor aus dem *CloneJET PCR Cloning*-Kit (Life Technologies) inkloniert, in *E. coli* vermehrt und mittels Mini-Prep (Abschnitt 2.2.2.11) isoliert. Anschließend wurden sowohl die das Zielgen enthaltenen Plasmide, als auch der GFP-Vektor pAM505 mittels *Eco*RI und *Hind*III (jeweils Thermo Scientific) in einem Doppelverdau (Tab. 2.7a) über Nacht geschnitten. Die Verdauungen wurden auf Gele aufgetragen und mehrere Stunden lang aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden mit der erwarteten Fragmentgröße ausgeschnitten und aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.2.2.9 auf Seite 34). Darauf erfolgte eine Ligation von GFP-Vektor und PCR-Fragment über Nacht (Tab. 2.7b). Alle Ligationsansätze wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen auf Korrektheit überprüft. Diejenigen Plasmide, die korrekt waren, wurden genutzt um *E. coli* zu transformieren. Daran schloss sich eine weitere Mini-Prep an. Die so erhaltenen Plasmide wurden dann zur Transfektion von Zellen eingesetzt, die die Fusionsproteine exprimieren sollten.

**2.2.2.14. Zellkultur** Als Zellkultursystem wurden HEK-293-Zellen eingesetzt. Bei diesen handelt es sich um menschliche embryonale, adhärenz wachsende Nierenzellen, welche mit Adenovirus 5 transfiziert worden waren (GRAHAM *et al.*, 1977). Sie wurden in DME-Medium (90 % DME-Fertigmedium; 10 % FKS; 10 mM Natriumpyruvat; 40 mM L-Glutamin; 1 ‰ Gentamycin; pH 7,2-7,4) kultiviert. Zur Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Platten zur Konfluenz gezüchtet (ca.

Tab. 2.7: Restriktion und Ligation

(a) Ansatz eines <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI-Doppelverdaus		(b) Ansatz einer Ligation	
Substanz	Volumen (µL)	Substanz	Volumen (µL)
DNA-Lösung	1,5	PCR-Fragment	7,2
<i>Hind</i> III	0,5	GFP-Vektor	0,8
<i>Eco</i> RI	0,5	10x Ligasepuffer	1
Puffer <i>rot</i>	2,5	T4-DNA-Ligase	1
H <sub>2</sub> O	20		

$4 \cdot 10^5$  Zellen/*Well*). 6  $\mu$ L Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und 1  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden separat in je 100  $\mu$ L Serum- und Antibiotika-freiem DME-Medium gelöst und nach fünfminütiger Inkubation vereint. Nach 20 Minuten wurde das Gemisch auf die Zellen getropft. Die Transfektion erfolgte in antibiotikafreiem Medium bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Dazu wurde das Konfokalmikroskop LSM 780 (Carl Zeiss Microscopy) mit einem 63x Ölimmersions-DIC-Objektiv unter Verwendung einer Brutkammer, die eine Temperatur von 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxidkonzentration konstant hielt, genutzt. Zellkerne lebender Zellen wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/mL angefärbt.

**2.2.2.15. Western Blot** Zur Verifizierung der mikroskopischen Ergebnisse wurde weiterhin ein *Western Blot* (BURNETTE, 1981) durchgeführt, um die Größe des Fusionsproteins zu bestimmen. Dazu wurden aus den Zellen die Proteine isoliert und je 50  $\mu$ g Protein wurden auf vorgegossene 10 %ige Polyacrylamid-Gele (Bio-Rad) aufgetragen und aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Sandwich-Blotting-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m transferiert. Die Membran wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur in 3 %igem bovinem Serumalbumin in PBS mit 0,5 % Tween 20-Zusatz geblockt. Darauf wurde die Membran drei Mal für je fünf Minuten in TBS-T (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 7,6) gewaschen. Anschließend wurde der erste Antikörper (anti-GFP, aus Kaninchen; Invitrogen A11122) 1:500 in TBS-T verdünnt und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Es folgten wiederum drei fünfminütige Waschschrte in TBS-T, bevor der zweite Antikörper (1:5000 Anti-Kaninchen-IgG in TBS-T) aufgetragen wurde und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubierte. Nach drei zehnminütigen Waschschrten in TBS-T erfolgte der Bandennachweis mittels *Clarity Western ECL*-Substrat (Bio-Rad) im ChemiDoc MP (Bio-Rad) System.

### 2.2.3. Bioinformatische Methoden

**2.2.3.1. Sequenzanalyse** Zur allgemeinen Arbeit mit DNA- und Proteinsequenzen wurde das Tool UGene (OKONECHNIKOV *et al.*, 2012) verwendet. Das beinhaltete auch das Erstellen von Alignments, sowie das Kalkulieren von Sequenzidentitäten. Zur Ermittlung von Exon-Intron-Grenzen wurden die Tools Spidey (WHEELAN *et al.*, 2001) und insbesondere MGAlign (LEE *et al.*, 2003) verwendet, welche

cDNA und genomische DNA aneinander ausrichten und daraus Rückschlüsse auf die Genstruktur ziehen.

**2.2.3.2. Erstellung von Stammbäumen** Für die Erstellung von Stammbäumen wurden die in einen Baum zu gruppierenden Nukleinsäuresequenzen in eine FASTA-Datei zusammengefügt und dann mittels ClustalW (GOUJON *et al.*, 2010; LARKIN *et al.*, 2007) in einem multiplen Sequenzalignment aneinander ausgerichtet. Die Software MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013) wurde dann für das Erstellen von Kladogrammen verwendet. Es wurde die *Maximum Likelihood* Methode nach dem Modell von TAMURA UND NEI (1993) verwendet. Bootstrap-Konsensus-Bäume basierten auf 10000 Wiederholungen (FELSENSTEIN, 1985).

**2.2.3.3. Clusteranalyse** Die Expressionsprofile verschiedener Tierarten wurden mittels farbcodierter Diagramme, so genannter *Heatmaps*, dargestellt und geclustert. Dies erfolgte für die zur Basis 10 logarithmierten Kopienzahlen mit der *heatmap.2*-Funktion aus dem *gplots*-Paket (WARNES *et al.*, 2014) in der Programmiersprache R. Die Clusterbildung erfolgte dabei nach der UPGMA-Methode, wobei die Distanzen mit Hilfe der durch das *amap*-Paket (LUCAS, 2014) zur Verfügung gestellten zentrierten Pearson-Korrelations-Methode bestimmt wurden, welche weniger auf die Absolutwerte achtet, sondern auf die Verhältnisse. Für die Darstellung der *Heatmap* wurden die Daten zeilenweise z-transformiert, sodass der Zeilenmittelwert bei 0, bei einer Standardabweichung von 1 lag. Der z-Score gibt dann an, wie viele Standardabweichungen der Wert von 0 entfernt liegt.

**2.2.3.4. Proteinanalyse** Anhand von offenen Leserahmen konnte mit Hilfe des virtuellen Ribosoms (WERNERSSON, 2006) aus cDNA die Aminosäuresequenz des codierten Proteins abgeleitet werden. Die Visualisierung von Proteinen erfolgte mit dem Online-Tool Protter (OMASITS *et al.*, 2014), welches seinerseits die Transmembrandomänen, inneren und äußeren Bereiche, sowie Signalpeptide mit Hilfe des Phobius-Algorithmus (KÄLL *et al.*, 2004) vorhersagt. Um Schlüsselstellen des Proteins zu finden, die einer bestimmten Funktion zugeordnet werden können, wurde das Tool CD-Search (MARCHLER-BAUER UND BRYANT, 2004) genutzt. Vorhersagen über die Zugehörigkeit der Proteine zu Mitochondrien wurden mit MitoProt II (CLAROS UND VINCENS, 1996) ausgeführt.

### 2.2.4. Phänotypische Untersuchungen

**2.2.4.1. Verhalten** Das Verhalten der Fische des Besatzdichteversuchs wurde für 19 Stunden mittels Kamera aufgezeichnet. Das Lichtregime ahmte natürliche Bedingungen mit einer Dunkelphase von 10 Stunden nach und umfasste auch eine Wolkensimulation. Zehn dieser Stunden konnten daher wegen Lichtmangels nicht ausgewertet werden. Daraus resultierten neun Stunden auswertbares Videomaterial, von dem vier Stunden und zehn Minuten vor der Nacht und vier Stunden und 40 Minuten nach der Nacht aufgenommen wurden. Zur Auswertung der Position der Fische in der Wassersäule wurde jedes Becken im Video einzeln betrachtet und in drei gleich große vertikale Teile unterteilt. Im Zehn-Minuten-Intervall wurden die Standbilder des Videos analysiert und die in jedem Sektor sichtbaren Fische gezählt und in Relation zur Gesamtzahl sichtbarer Fische gesetzt. Zur statistischen Auswertung wurden die Anteile sichtbarer Fische pro Segment über alle 53 Beobachtungszeitpunkte gemittelt und die Anteile von BORN- und Import-Forellen für jedes Segment mittels t-Test verglichen.

**2.2.4.2. Wachstum** Das Wachstum von frisch geschlüpften Regenbogenforellen wurde über einen Zeitraum von ca. neun Monaten dokumentiert. Zunächst wöchentlich, später monatlich wurden das Gewicht und die Gesamtlänge (*total length*, von Maul, bis Ende der Schwanzflosse) von je zehn Forellen der Linien BORN und Import erfasst. Dabei wurde das Wachstum von Tieren, die in ungefiltertem und aufgereinigtem Brackwasser kultiviert wurden, miteinander verglichen. Darüber hinaus wurden Gewicht und Gesamtlänge auch von allen weiteren beprobten Fischen aufgenommen. Das Verhältnis von Gewicht und Länge wurde mit Hilfe der Fulton'schen Formel (RICKER, 1975)  $G = K/100 * L^3$  analysiert, wobei G das Gewicht angibt, L die Länge und K den so genannten Konditionsfaktor. Die Längen-Wachstumsleistung mit dem Alter wurde mit der von Bertalanffy-Wachstumsgleichung (BERTALANFFY, 1957) approximiert:  $L_t = L_\infty(1 - e^{-K(t-t_0)})$ .  $L_t$  gibt die Länge des Fisches im Alter t an,  $L_\infty$  ist die physiologisch mögliche Endgröße,  $t_0$  gibt das Alter zu Beginn der Wachstumskurve an und K ist ein Wachstumsparameter, der die Geschwindigkeit des Wachstums widerspiegelt.

### 2.2.5. Statistische Analyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2010 sowie Systat SigmaPlot 11. Für statistische Berechnungen wurde ebenfalls SigmaPlot verwendet. Es wurden zweifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Für Post-Hoc-Analysen wurde ein für

**Tab. 2.8: Signifikanzniveaus**

Symbol	P-Wert	Signifikanzniveau
#	p<0,10	marginal signifikant
*	p<0,05	signifikant
**	p<0,01	hochsignifikant
***	p<0,001	höchstsignifikant

multiple Testen optimiertes Holm-Sidak-Verfahren genutzt. Für die statistischen Tests in Hinblick auf Genexpression wurde stets mit den logarithmierten normierten Kopienzahlen gerechnet, zumal weniger die Differenzen zwischen zwei Werten von Interesse waren, sondern deren Verhältnisse. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet und verschiedene Signifikanzniveaus in den Abbildungen mit in Tab. 2.8 dargestellten Symbolen markiert.

## 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten im Rahmen verschiedener Versuche die regionale Forellenlinie BORN sowie die üblicherweise kultivierte Import-Forelle auf phänotypischer wie molekularbiologischer Ebene miteinander verglichen werden. Die BORN-Forelle gilt als robustere Zuchtlinie; es sollte daher untersucht werden, wodurch diese Robustheit bedingt wird, und ob sie möglicherweise weitere Folgen hat. Zunächst wurde mit Hilfe einer holistischen Transkriptomanalyse untersucht, inwiefern es grundlegende Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Forellenlinien gibt.

### 3.1. Grundlegender Zuchtlinien-Vergleich

#### 3.1.1. Holistische Transkriptomanalyse mittels DNA-Chips

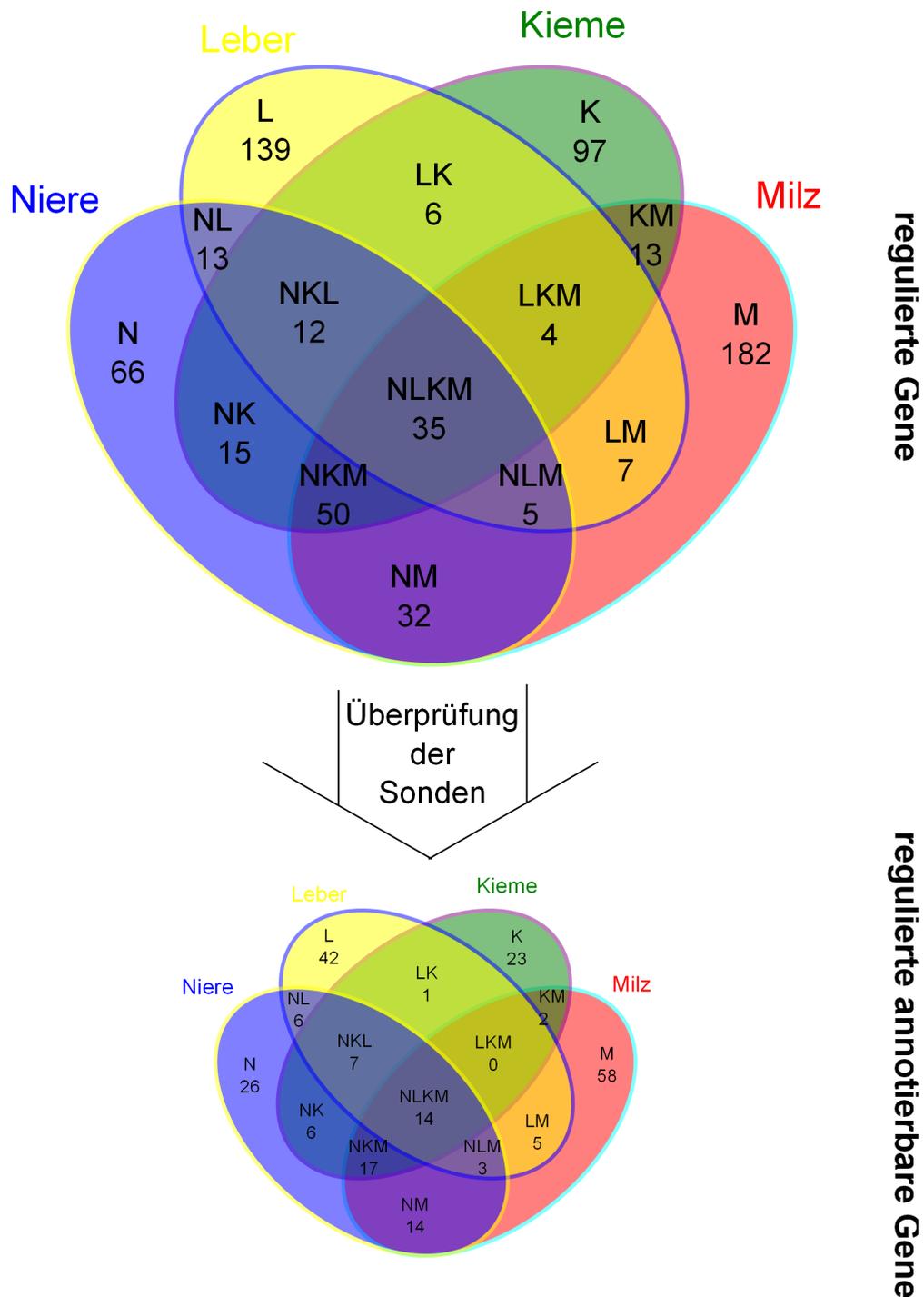
Die BORN-Forelle gilt als robuster als die Import-Forelle. Um zu überprüfen, ob dies genetisch bedingt ist, sollte untersucht werden, ob es grundsätzlich Unterschiede hinsichtlich der Genexpression zwischen beiden Linien gibt, welche einen Anteil zur Erklärung dieser Robustheit liefern könnten. Dazu wurden die insgesamt 80 DNA-Chips aus Kälteschock-, Besatzdichte- und Besatzdichte-Hitzestress-Versuch gemeinsam unter diesem Gesichtspunkt für die Organe Niere, Leber, Kieme und Milz ausgewertet. Ein Venn-Diagramm (Abb. 3.1) soll dabei verdeutlichen, inwieweit es Überschneidungen zwischen den verschiedenen Gewebetypen gab.

In der Niere wurden 228 signifikant ( $p_{(\text{FDR-Korrigiert})} < 0,05$ ) different regulierte Gene gefunden<sup>2</sup>, in der Leber 221, in der Kieme 232 und in der Milz 328. In jeweils nur einem untersuchten Gewebe wurden zwischen 66 (Niere) und 182 (Milz) Gene zwischen beiden Linien different exprimiert. Zwischen genau zwei Geweben gab es zwischen 6 (Leber + Kieme) und 32 (Niere + Milz) gemeinsam zwischen den Linien regulierte Gene. Bei Betrachtung von drei Geweben lag die Anzahl gemeinsam regulierter Gene zwischen 4 (Leber + Kieme + Milz) und 50 (Niere + Kieme + Milz). In allen vier Geweben wurde eine differente Genexpression zwischen den Zuchtlinien BORN und Import von 35 Genen detektiert.

Nur ein Bruchteil der Gene auf dem Chip war eindeutig annotierbar, es konnten deshalb nur wenige konkrete Gennamen zugeordnet werden. In der Kieme traf

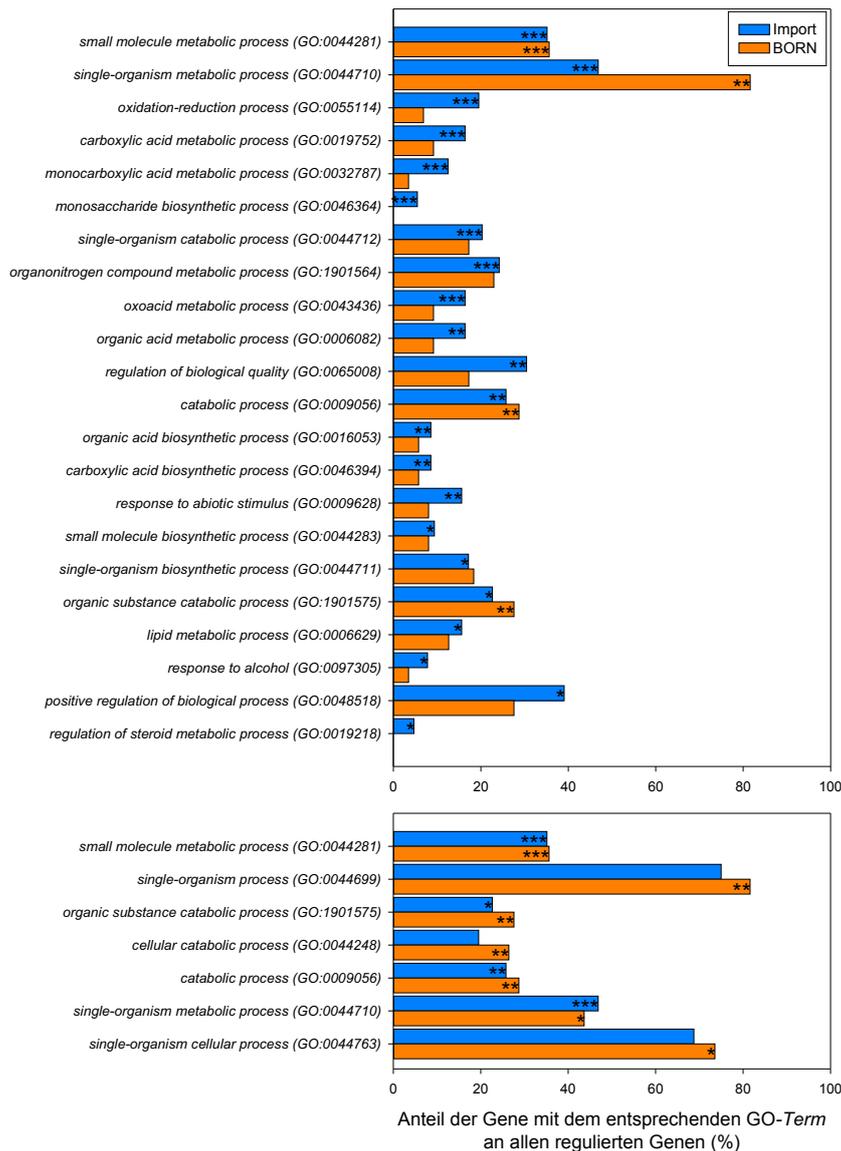
---

<sup>2</sup>Wegen der unzureichenden Chip-Annotation kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Gene mehrmals gezählt wurden, da eine Zusammenfassung mehrerer Sonden zu einem Wert so nicht möglich war.



**Abb. 3.1:** Venn-Diagramm mit der Anzahl von in verschiedenen Geweben different exprimierten Genen zwischen BORN- und Import-Forelle

Für die Analyse wurden DNA-Chips aus Nieren (N)- Leber (L)-, Kiemen (K)- und Milz (M)-Gewebe separat nach different exprimierten Genen analysiert. Die Abbildung zeigt durch die Überlappung die Anzahl von gemeinsam in mehreren Geweben regulierten Genen an. Nur ein Bruchteil der Gene war eindeutig annotierbar.



**Abb. 3.2: GO-Term-Anreicherungsanalyse**

Alle in der jeweiligen Forellenlinie stärker exprimierte Gene wurden einer GO-Term-Anreicherungsanalyse unterzogen. Oben sind alle signifikant angereicherten GO-Terms der Import-Forelle gezeigt, unten diejenigen der BORN-Forelle. Dargestellt ist der Anteil der Gene, die einen spezifischen GO-Term aufweisen, an der Gesamtzahl der jeweils stärker exprimierten Gene pro Linie. Es wurden alle different exprimierte Gene aus allen untersuchten Geweben verwendet.

dies auf 32 % der regulierten Gene zu, in der Milz auf 37 %, in der Leber auf 38 % und in der Niere auf 43 %. Im weiteren Verlauf beschränkte sich die Analyse auf diese annotierbaren Gene, da die Annotation eine Voraussetzung für tieferegehende Analysen darstellt. In allen untersuchten Geweben wurden mehr Gene gefunden, die stärker in Import-Forellen exprimiert wurden als in BORN-Forellen. In Kieme, Leber und Niere lag das Verhältnis bei etwa 2:1, in der Milz waren etwa 6 von 10 der different exprimierten Gene in Import-Forellen stärker exprimiert. Den regulierten Genen wurden auf Basis einer entsprechenden Datenbank so genannte GO-Terms zugeordnet, welche die Funktion der Gene – beispielsweise mit der Zuordnung eines Stoffwechselprozesses – beschreiben. Anschließend wurde überprüft, ob bestimmte GO-Terms überproportional häufig in der Liste mit regulierten Genen vorkamen (Abb. 3.2). Während für die BORN-Forelle nur eine Anreicherung

von recht allgemeinen *GO-Terms* wie „Kleine Moleküle betreffende Stoffwechselprozesse“ (GO:0044281) oder „katabolischer Prozess“ (GO:0009056) gefunden wurde, waren die Zuordnungen für die Import-Forelle deutlich spezifischer. Auffällig waren die Punkte „Einfachzucker-synthetisierende Prozesse“ (GO:0046364) und „Regulation des Steroidstoffwechsels“ (GO:0019218). Diese waren in der Import-Forelle signifikant angereichert; in der BORN-Forelle war hingegen kein Gen mit den entsprechenden *GO-Terms* stärker exprimiert als in der Import-Forelle. Der Zucker-Synthese wurden in der Import-Forelle sieben Gene zugeordnet: eine Aspartat-Aminotransferase (*GOT2*), das Retinol-bindende Protein 4 (*RBP4*), eine beta- und eine gamma- Enolase (*ENO3*, *ENO2*), eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*PCK2*), eine Alkoholdehydrogenase (*AKR1A1*) sowie eine Transaldolase (*TALDO1*).

Zusätzlich zu der holistischen Analyse der differentiellen Expression wurden auch gezielt Gene des Kreatinsystems als weiteres Energiesystem auf differenzielle Expression untersucht. Das Gen *GAMT*, welches das Kreatin synthetisierende Enzym codiert, wurde als differenziell exprimiert in der Leber identifiziert. Die BORN-Forellen zeigten eine 2,7-mal so starke hepatische *GAMT*-Expression wie Import-Forellen.

Von den 35 Genen, die in allen untersuchten Geweben zugleich reguliert waren, konnten vierzehn durch BLAST-Analysen der SONDENSEQUENZ eindeutig annotiert werden. Diese eindeutig annotierbaren Kandidatengene sind in Tab. 3.1 gezeigt. Am stärksten differenziell reguliert war das Gen „Calpain, regulatorische Untereinheit“ (*CAPNS1*). Dieses war in der Kieme der Import-Forelle 13,9 mal so stark exprimiert wie in vergleichbaren Proben der BORN-Forelle. Auch in der Niere war das Gen 8,5-mal so stark exprimiert. Einzig in der Leber fiel der Expressionsunterschied mit dem Faktor 2,6 deutlich geringer aus. Auffällig war, dass für jedes Kandidatengen der DNA-Chips die Veränderung der Genexpression in allen untersuchten Geweben stets gleich war, das heißt, dass ein Gen, welches in der Niere von Import-Forellen stärker exprimiert wurde als in BORN, auch in Leber, Kieme und Milz stärker von der Import-Forelle exprimiert wurde. Der Großteil der differenziell exprimierten, annotierten Gene (10/14) war in Import-Forellen stärker exprimiert als in BORN-Forellen. Lediglich die drei Gene *CEPT1*, *SERINC1* und *GIMAP7* zeigten gemäß DNA-Chips eine stärkere Expression in der BORN-Forelle als in der Import-Forelle.

### 3.1.2. Verifizierung

Die Mikrofluid-Chip-basierte Echtzeit-PCR wurde genutzt, um die Vorhersagen aus der DNA-Chip-Analyse zu bestätigen. Jedoch konnten nur für einen Bruchteil der

**Tab. 3.1:** Kandidatengene für differente Expression zwischen BORN- und Import-Forelle

Genname	Gensymbol	Niere	Leber	Kieme	Milz
<i>Calpain regulatory subunit</i>	<i>CAPNS1</i>	8,50 <sup>a</sup>	2,55	13,88	6,13
		2,5E-06 <sup>b</sup>	7,33E-08	3,86E-06	2,93E-09
<i>Profilin 2</i>	<i>PFN2</i>	7,70	3,64	7,94	14,43
		3,70E-06	2,07E-07	7,15E-05	3,70E-10
<i>Tropomyosin-1 alpha chain</i>	<i>TPM1</i>	4,14	2,05	3,93	6,61
		2,45E-07	9,75E-10	8,96E-06	1,54E-05
<i>Cold-inducible RNA-binding protein</i>	<i>CIRBP</i>	2,95	3,25	3,67	3,25
		4,47E-05	3,71E-11	5,55E-04	8,59E-05
<i>Retinoic acid receptor responder protein 3</i>	<i>RARRES3</i>	3,03	3,12	2,89	2,66
		4,47E-05	6,76E-10	3,76E-06	1,05E-07
<i>Nucleolar protein 14</i>	<i>NOP14</i>	2,94	2,23	2,79	2,14
		2,14E-04	4,77E-08	3,44E-03	4,64E-05
<i>Superoxid-Dismutase</i>	<i>SOD1</i>	3,50	4,58	2,66	2,90
		9,17E-06	1,11E-14	9,34E-06	2,93E-09
<i>Splicing factor 3A subunit 2</i>	<i>SF3A2</i>	2,48	2,38	2,64	2,99
		1,47E-03	5,71E-10	1,57E-03	4,89E-07
<i>Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1</i>	<i>STAU1</i>	2,20	2,01	2,42	2,05
		2,66E-05	2,39E-11	1,00E-05	5,90E-07
<i>Glutamate dehydrogenase</i>	<i>GLUD1</i>	2,31	2,20	2,38	2,43
		2,99E-05	9,02E-09	1,19E-05	1,29E-08
<i>Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase precursor</i>	<i>IFI30</i>	2,18	2,42	2,29	2,32
		1,27E-05	3,20E-10	5,33E-06	3,85E-08
<i>Choline/ethanolamine phosphotransferase 1</i>	<i>CEPT1</i>	-3,36	-2,43	-3,23	-3,36
		9,88E-05	1,93E-08	2,83E-03	3,84E-06
<i>Serine incorporator 1</i>	<i>SERINC1</i>	-2,97	-2,25	-3,36	-2,38
		1,20E-03	4,54E-04	2,48E-02	5,15E-04
<i>GTPase, IMAP family member 7</i>	<i>GIMAP7</i>	-5,77	-2,22	-14,78	-8,24
		9,02E-06	5,06E-13	8,81E-09	9,33E-09

<sup>a</sup> *Fold Change* (FC): >0 in Import stärker exprimiert; <0 in BORN stärker exprimiert

<sup>b</sup> FDR-korrigierter p-Wert

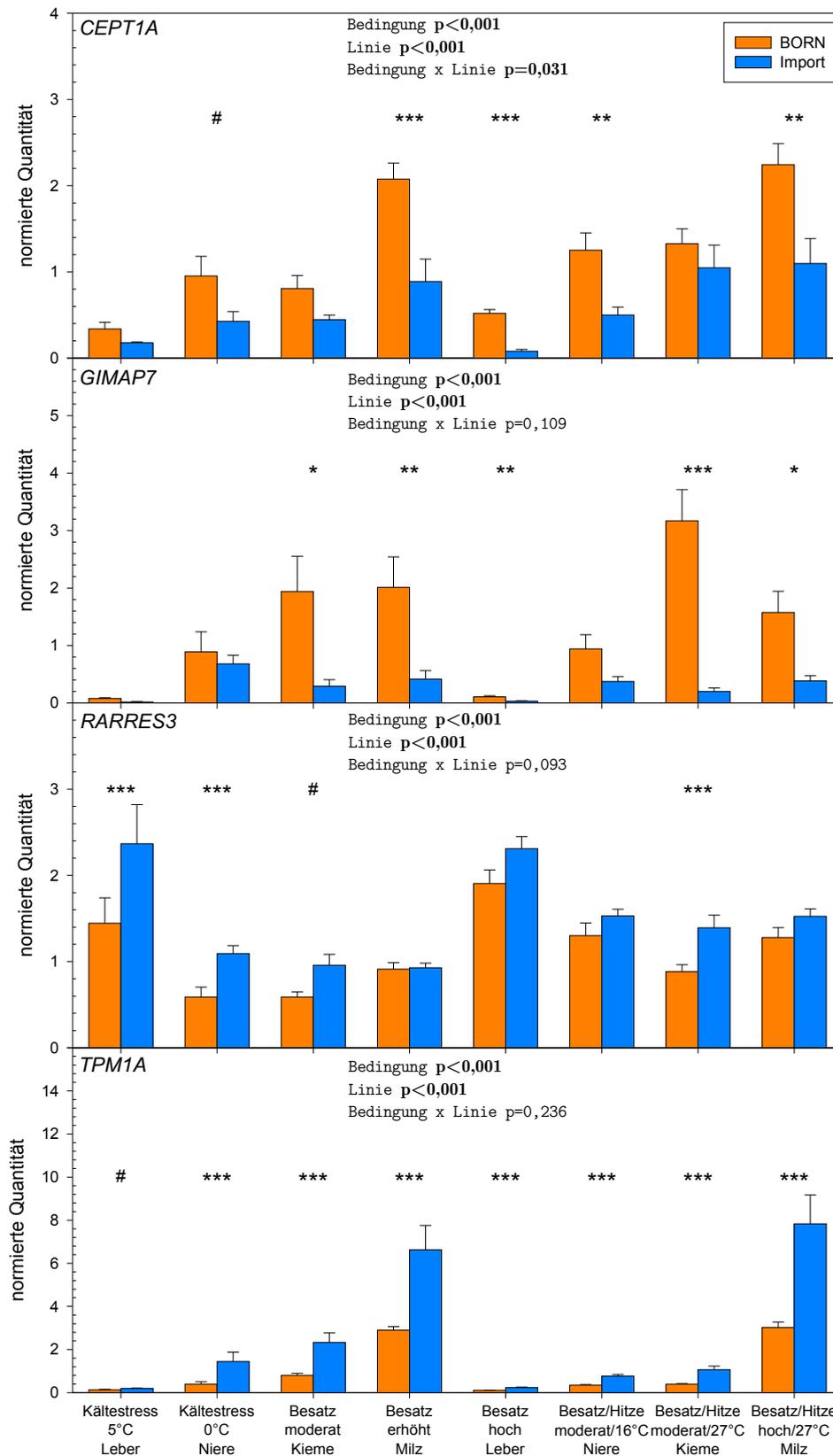
Gene die mittels DNA-Chip gefundenen Expressionsunterschiede zwischen Import- und BORN-Forelle bestätigt werden. Bei diesem Verifizierungsversuch wurden die Expressionslevel nach der Versuchsbedingung separiert. Als Bedingung wurde dabei die Kombination aus Umweltbedingung und entnommenem Gewebe aufgefasst (z. B. Kältestress 5 °C - Leber). Als signifikant different exprimiert wurden dann solche Gene aufgefasst, die unter mindestens drei von acht Bedingungen signifikante Expressionsunterschiede zwischen BORN und Import aufwiesen und für die eine Varianzanalyse signifikante Effekte der Forellen-Linie errechnete.

Von den vierzehn annotierten Kandidatengenen aus der DNA-Chip-Analyse zeigten nur vier Gene signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Expression zwischen BORN- und Import-Forelle in der Mikrofluid-Chip-basierten qRT-PCR (Abb. 3.3). Diese Gene werden im Weiteren als Kandidatengene bezeichnet. Es handelte sich dabei um die Gene Cholin/Ethanolamin-Phosphotransferase 1 (*CEPT1*), um GTPase IMAP Familienmitglied 7 (*GIMAP7*), um Retinsäure-Rezeptor-Antwort-Protein 3 (*RARRES3*) sowie Tropomyosin 1 (*TPM1*). Sowohl von *CEPT1*, als auch *TPM1* wurden zwei Genvarianten im Forellengenom gefunden. Daher wurden auch beide Varianten jeweils separat mit spezifischen Primern untersucht.

Für *CEPT1A* fand die Varianzanalyse eine signifikante Interaktion zwischen der Bedingung und der Forellenslinie, das heißt, das Verhältnis der Genexpression von BORN zu Import hing von der gerade betrachteten Bedingung ab. Beispielsweise war die Expressions-Ratio von BORN zu Import unter der Bedingung „Besatzdichte hoch - Leber“ mit 6,5 deutlich höher als für die Bedingung „Besatzdichte moderat; Hitze 27 °C - Kieme“ mit der Ratio 1,2. Obwohl eine Interaktion gefunden wurde, zeigte die BORN-Forelle unter allen Bedingungen eine stärkere Expression als die Import-Forelle. Dieser Unterschied war nach Holm-Sidak-Post-Hoc-Test mit Anpassung an multiples Testen in vier von acht Fällen signifikant ( $p < 0,05$ ).

Für die anderen drei untersuchten Gene wurde keine signifikante Interaktion zwischen Linie und Bedingung gefunden, beide Faktoren für sich genommen waren jedoch jeweils höchstsignifikant. Das heißt, sowohl die Bedingung, als auch die Forellen-Linie hatten einen Einfluss auf das Expressionslevel der Gene. Deren jeweilige Anteile an den gemessenen Expressionswerten waren aber stets gleich stark und beeinflussten sich nicht gegenseitig.

Für fünf Bedingungen wurden signifikante Unterschiede für die *GIMAP7*-Expression zwischen BORN und Import festgestellt. Unter allen Bedingungen war die Expression in BORN stärker als in Import-Forellen, der höchste Unterschied mit Faktor 15,8 wurde für die Kiemen-Proben des Besatzdichte/Hitzestress-Kombinationsver-

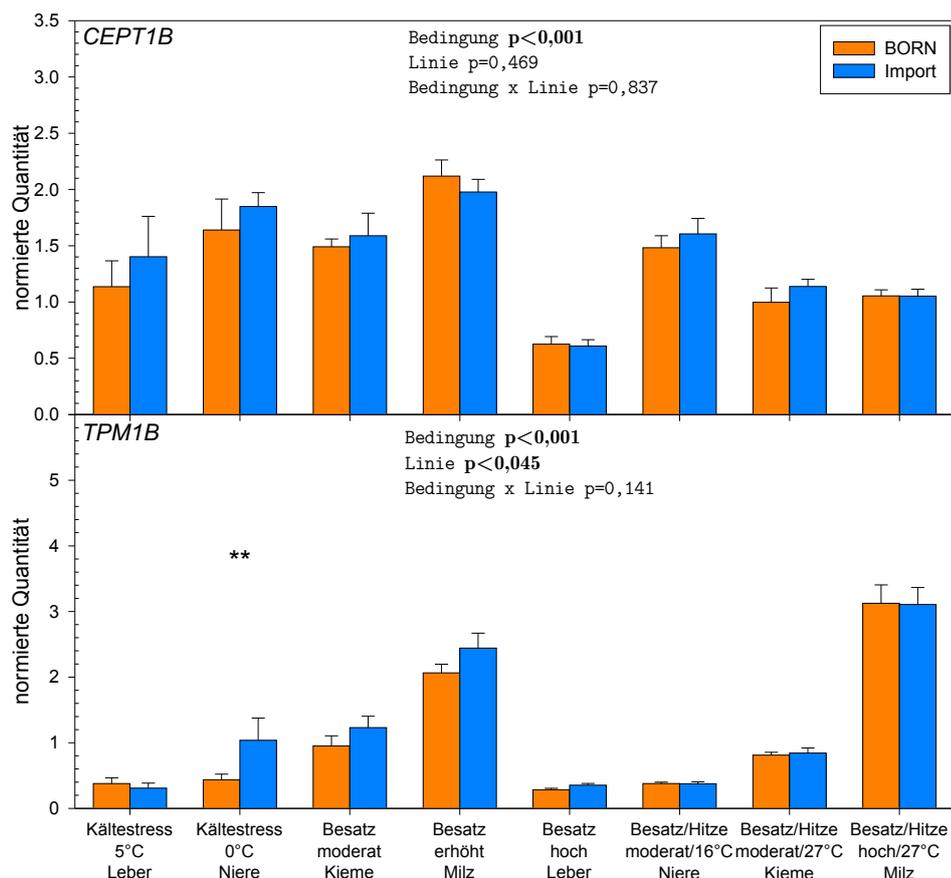


**Abb. 3.3: Positive Ergebnisse der Mikrofluid-Chip-basierten Echtzeit-PCR**

Dargestellt sind die normierten Quantitäten der Gene *CEPT1A*, *GIMAP7*, *RARRES3* und *TPM1A* als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Angegeben sind jeweils auch die Ergebnisse der Varianzanalysen. Für die 5°C-Leber-Proben der Import-Forellen wurde in zwei Fällen keinerlei *GIMAP7*-Expression gefunden. Diese Proben wurden von der Berechnung ausgenommen.

suchs bei moderatem Besatz und 27 °C beobachtet. Für *RARRES3* zeigten die Import-Forellen eine stärkere Expression als die BORN-Forellen. In drei Fällen war dies signifikant, wobei die Effekte relativ schwach ausgeprägt waren (größter Unterschied 1,9 für „Kältestress 0 °C - Niere“). Die Unterschiede für das Gen *TPM1A* waren deutlich ausgeprägter. Unter sieben von acht Bedingungen war die Expression in Import-Forellen hochsignifikant stärker als in BORN-Forellen, in einem Fall marginal signifikant. Der größte Unterschied mit Faktor 3,7 war in der Niere bei Kältestress 0 °C zu finden.

Sowohl *CEPT1B* als auch *TPM1B*, die Genkopien von *CEPT1A* bzw. *TPM1A*, zeigten ein anderes Verhalten als ihre entsprechenden Kopien (Abb. 3.4). Gemäß Varianzanalyse wurde für *CEPT1B* lediglich ein Effekt der Versuchsbedingung gefunden, jedoch kein Effekt der Forellenslinie. Für *TPM1B* war der Linieneffekt hingegen signifikant. Dieser war mit einer im Schnitt um das 1,3-fach erhöhten Expression in Import-Forellen jedoch sehr gering. Der Holm-Sidak-Test zeigte nur



**Abb. 3.4:** Ergebnisse der Mikrofluid-Chip-basierten Echtzeit-PCR für die Genvarianten *CEPT1B* und *TPM1B*

Dargestellt sind jeweils die normierten Quantitäten der Gene als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Angegeben sind jeweils auch die Ergebnisse der Varianzanalysen.

**Tab. 3.2: Zweifaktorielle Varianzanalysen hinsichtlich Geschlechts-Effekten in der BORN-Forelle**

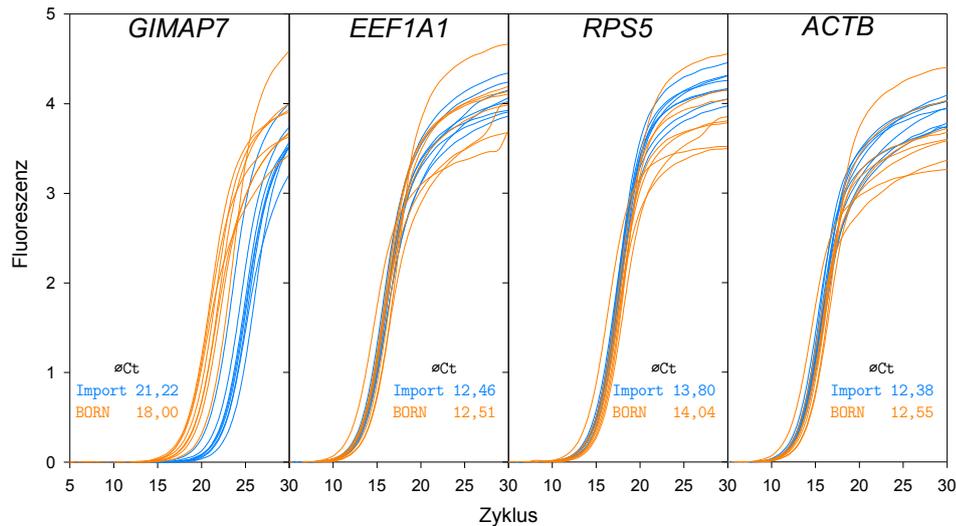
Signifikante Effekte sind unterstrichen

	<i>CEPT1A</i>	<i>GIMAP7</i>	<i>RARRES3</i>	<i>TPM1A</i>
Bedingung	<u>&lt;0,001</u>	<u>&lt;0,001</u>	<u>&lt;0,001</u>	<u>&lt;0,001</u>
Geschlecht	<u>0,040</u>	0,827	0,256	0,960
Bedingung x Geschlecht	0,673	0,997	0,507	0,988

für Nierenproben des Kältestressversuchs bei 0 °C eine signifikante Erhöhung in Import-Forellen an.

Während alle Import-Forellen Weibchen waren, war die beprobte BORN-Population gemischtgeschlechtlich. Um zu überprüfen, ob die gefundenen Unterschiede weniger auf Linienunterschiede, sondern vielmehr auf Geschlechtsunterschiede zurückzuführen waren, wurden für die BORN-Tiere Varianzanalysen (Tab. 3.2) durchgeführt. Für *CEPT1A* wurde ein signifikanter Geschlechtseffekt ermittelt. Über alle Bedingungen zusammengefasst zeigten die Männchen der BORN-Linie eine 1,7-mal so hohe *CEPT1A*-Expression wie die Weibchen. *GIMAP7*, *RARRES3* und *TPM1A* zeigten im Gegensatz dazu keinen Geschlechtseffekt und auch keine Interaktion des Geschlechts mit der Versuchsbedingung, lediglich die Bedingung zeigte einen hochsignifikanten Effekt.

Zur grundsätzlichen Überprüfung, inwieweit die Ergebnisse der Mikrofluid-Chip basierten Echtzeit-PCR mittels herkömmlicher qRT-PCR replizierbar sind, wurde für eine ausgewählte Versuchsbedingung eine Messung mittels qRT-PCR wiederholt (Abb. 3.5). Für die drei Referenzgene *EEF1A1*, *RPS5* und *ACTB* überlappten die Fluoreszenzkurven von BORN- und Import-Forellen deutlich. Entsprechend zeigte auch der durchschnittliche Ct-Wert nur geringe Schwankungen (0,05 bis 0,27 Zyklen) zwischen den Linien. Im Gegensatz dazu waren die Fluoreszenzkurven für *GIMAP7* deutlich zwischen BORN- und Import-Forellen aufgetrennt. Der durchschnittliche Ct-Wert lag für die BORN-Forelle 3,22 Zyklen niedriger als für die Import-Forelle. Bei einer angenommenen Verdopplung der DNA-Menge mit jedem Zyklus ergab sich eine  $2^{3,22} = 9,32$ -fache Transkriptmenge in der BORN-Forelle im Vergleich zur Import-Forelle. Die gleichen Proben hatten in der Mikrofluid-Chip-basierten Echtzeit-PCR eine 8,47-mal so starke Expression in der BORN-Forelle ergeben. Die über beide Methoden ermittelten Werte lagen also dicht beieinander.



**Abb. 3.5:** Verifizierung der differentiellen Expression von *GIMAP7* zwischen BORN- und Import-Forelle mittels klassischer qRT-PCR

Gemessen wurden *GIMAP7* und die Referenzgene *EEF1A1*, *RPS5* und *ACTB* in Kiemen-Proben aus dem Besatzdichte/Hitzestress-Kombinationsversuch mit moderater Besatzdichte bei 27°C. Neben den Fluoreszenz-Kurven ist jeweils der für jede Forellinie gemittelte Ct-Wert angegeben.

### 3.1.3. Überblick

Im Rahmen der holistischen Transkriptomanalyse konnten vier Gene als unter verschiedensten Bedingungen in verschiedenen Geweben differenzial zwischen BORN und Import exprimiert identifiziert werden. Die Gene *CEPT1A* und *GIMAP7* zeigten eine stärkere Expression in BORN-Forellen, die Gene *RARRES3* und *TPM1A* hingegen eine stärkere Expression in Import-Forellen. Die *GO-Term*-Analyse deutete Unterschiede in der Zuckersynthese an und auch *GAMT*, wichtiger Bestandteil des Kreatinsystems, zeigte eine differenzielle hepatische Expression.

## 3.2. Die Kreatinsysteme verschiedener Tierarten

Die holistische Transkriptomanalyse zeigte eine differenzielle Expression von *GAMT* zwischen den beiden Forellinien BORN und Import. Für das Gen *GATM*, ebenfalls Bestandteil des Kreatinsystems, war auf den DNA-Chips jedoch keine Sonde vorhanden. Da das Kreatinsystem als möglicher Faktor für die unterschiedliche Robustheit gesehen wurde und bisher kaum Informationen zum Kreatinsystem der Fische vorlagen, wurde dieses zunächst grundlegend für verschiedene Fischarten charakterisiert und zugleich mit dem der Säugetiere verglichen.

### 3.2.1. Genidentifikation

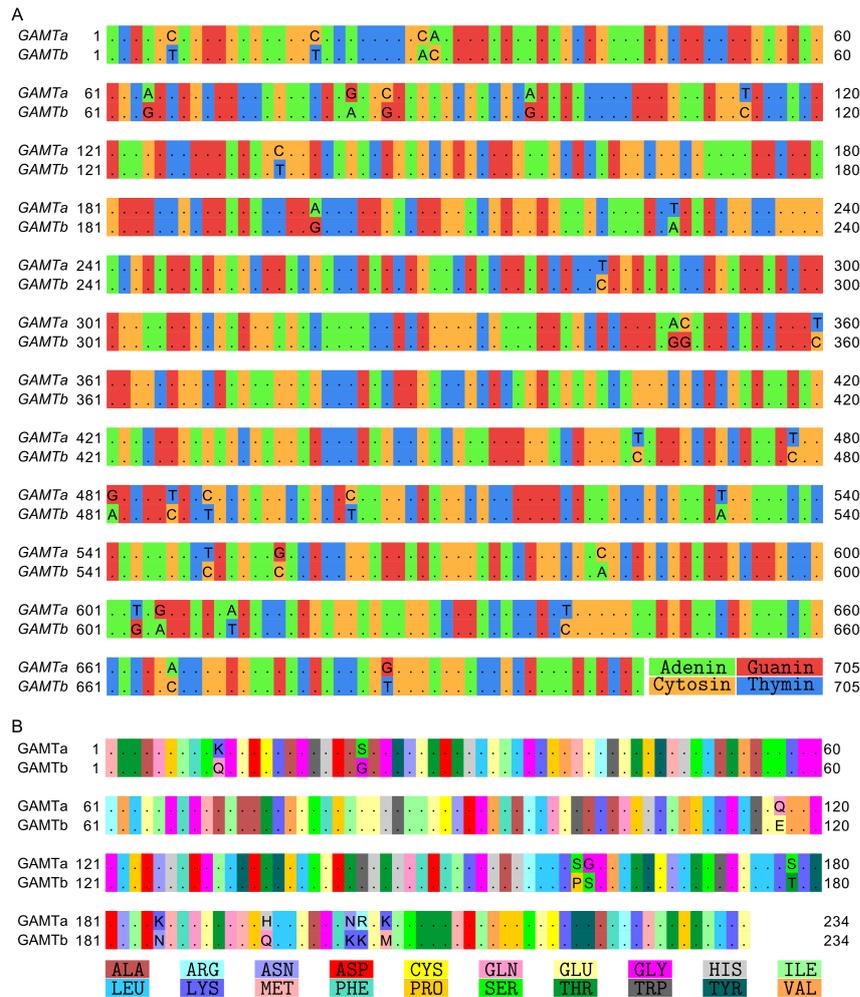
Um grundsätzliche Aussagen über das Kreatinsystem von Fischen treffen zu können, sollten Fischarten aus verschiedenen taxonomischen Einheiten wie Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Schnäpel (*Coregonus maraena*), Flussbarsch (*Perca fluviatilis*), Hering (*Clupea harengus*) und Zander (*Sander lucioperca*) untersucht werden. Für all diese Fische – mit Ausnahme der Forelle – lagen noch keinerlei Sequenzinformationen für die Gene *GATM*, *GAMT* und *CKM* vor. Daher musste mit Orthologen aus anderen Fischarten gearbeitet werden, um degenerierte Primer abzuleiten (vgl. Abschnitt 2.2.2.6). Es konnte für jedes dieser Gene ein Primerpaar gefunden werden, welches ein Fragment des jeweiligen Gens aus cDNA von jeder dieser Fischarten erzeugen konnte (Tab. 3.3). Diese Primer wiesen jeweils ein bis zwei degenerierte Basen auf und erzeugten PCR-Fragmente mit Größen zwischen 325 und 395 Basenpaaren, einem ausreichenden Größenbereich für spätere Echtzeit-PCRs. Nach Sequenzierung der Fragmente für jeden untersuchten Organismus wurden die Sequenzen im *European Nucleotide Archive* hinterlegt und wurden dazu genutzt, artspezifische Primer für die sich anschließenden semiquantitativen und Echtzeit-PCRs abzuleiten.

Für den Ostseeschnäpel war weiteres Datenmaterial vorhanden, auf welches zurückgegriffen werden konnte. So wurde das Transkriptom dieser Fischart durch die Abteilung Fischgenetik des FBN Dummerstorf bereits sequenziert (Daten noch unveröffentlicht). Mit Hilfe einer BLAST-Analyse der Sequenz des *GAMT*-PCR-Fragments konnte die gesamte codierende Sequenz des Gens gefunden werden.

**Tab. 3.3: Abgeleitete Spezies-übergreifende Primer**

Degenerierte Basen sind kursiv dargestellt: K=G/T; M=A/C; R=A/G; Y=C/T. Unterhalb der Primer sind die Spezies angegeben, deren Sequenzen zur Ableitung der Primer genutzt wurden.

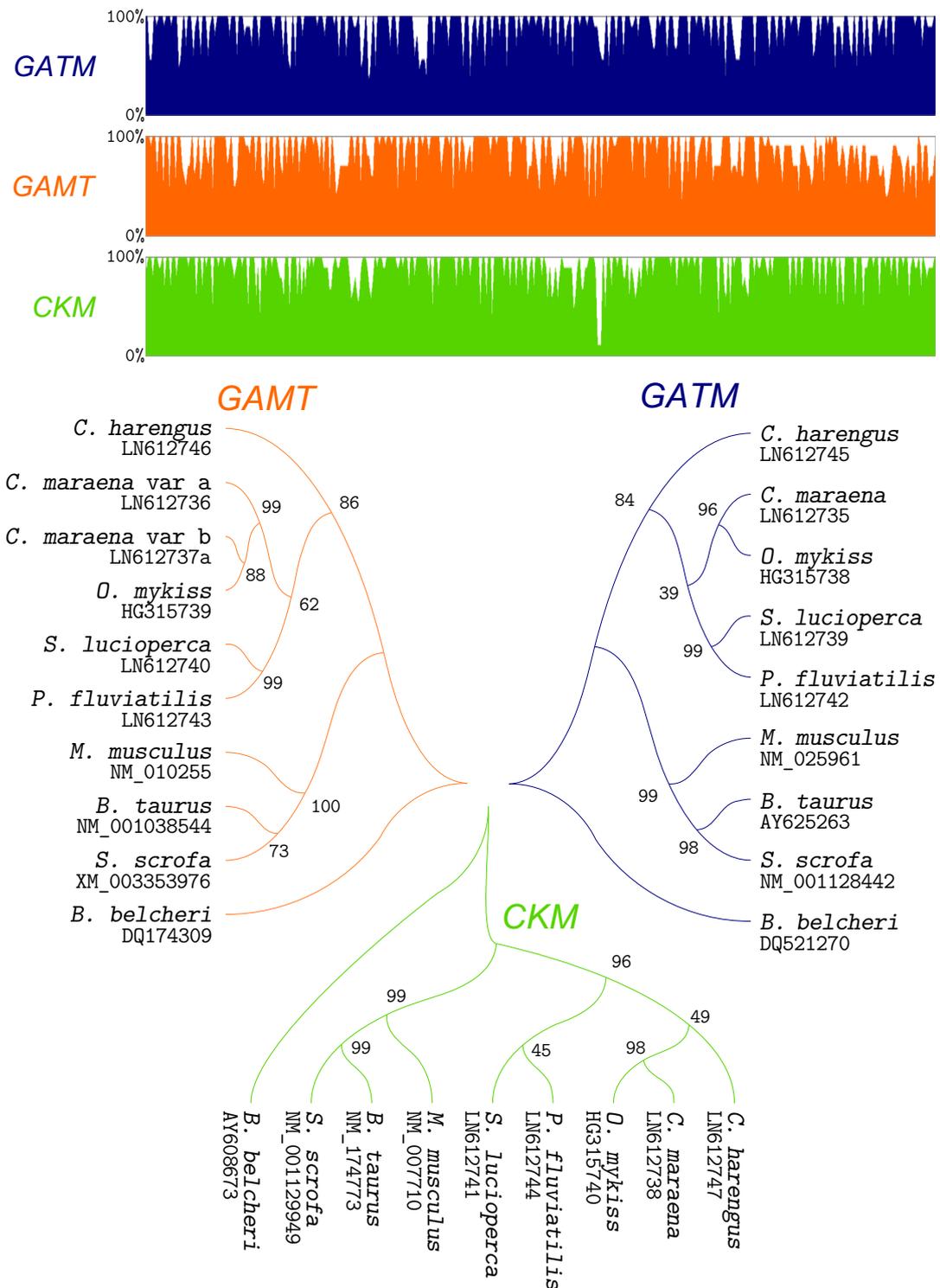
Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Fragment-Größe
GATM	GGMATGTATGCKGCCATGC	CGCATCCAYTCAATYCCC	325 bp
	<i>Anoplopoma fimbria; Haplochromis burtoni; Maylandia zebra;</i> <i>Oncorhynchus mykiss; Oryzias latipes; Pundamilia nyererei; Takifugu rubripes;</i>		
GAMT	AGGAGCACTGGATCATYGAR	TTRTTGAAGGAATAGTATTTGCATTC	384 bp
	<i>Anoplopoma fimbria; Astyanax mexicanus; Danio rerio; Haplochromis burtoni;</i> <i>Ictalurus furcatus; Ictalurus punctatus; Maylandia zebra; Neolamprologus brichardi;</i> <i>Oncorhynchus mykiss; Oreochromis niloticus; Oryzias latipes; Pundamilia nyererei;</i> <i>Takifugu rubripes; Xiphophorus maculatus</i>		
CKM	TGRTCTGGGTGAA YGAGGA	CTSTCCCTTCTCCA KCTTCTTCT	395 bp
	<i>Chaenocephalus aceratus; Oncorhynchus mykiss; Oreochromis mossambicus</i>		



**Abb. 3.6:** Sequenzalignments der (A) codierenden Nukleotid- und (B) Proteinsequenzen der beiden *GAMT*-Varianten des Ostseeschnäpels  
Unterschiede zwischen den Sequenzen sind mittels Buchstaben markiert. Basen bzw. Aminosäuren sind farbcodiert dargestellt.

Weiterhin wurde so offenkundig, dass das Gen *GAMT* im Ostseeschnäpel in zwei verschiedenen Varianten vorliegt. Die beiden Kopien wurden *GAMTa* und *GAMTb* genannt. Die beiden Sequenzen der codierenden Sequenz sowie der entsprechenden abgeleiteten Proteine sind in Abb. 3.6 gezeigt. Auf Nukleotidebene gab es 32 Basenaustausche auf der Gesamtlänge der codierenden Sequenz von jeweils 705 Basenpaaren (4,5%). Auf Proteinebene war die Varianz vergleichbar, hier gab es 11 Aminosäureaustausche bei insgesamt 234 Aminosäuren (4,7%).

Die aus den verschiedenen Fischarten gewonnenen Sequenzinformationen über *GATM*, *GAMT* und *CKM* wurden zusammen mit den bereits bekannten entsprechenden Sequenzabschnitten aus Rind (*Bos taurus*), Schwein (*Sus scrofa*), Maus (*Mus musculus*) und Lanzettfischchen (*Branchiostoma belcheri*) für ein multiples Sequenzalignment eingesetzt (Abb. 3.7, oben). Die Sequenzabschnitte zeigten eine



**Abb. 3.7:** Sequenzalignments und Kladogramme basierend auf *GATM*-, *GAMT*- und *CKM*-Nukleotid-Sequenzen

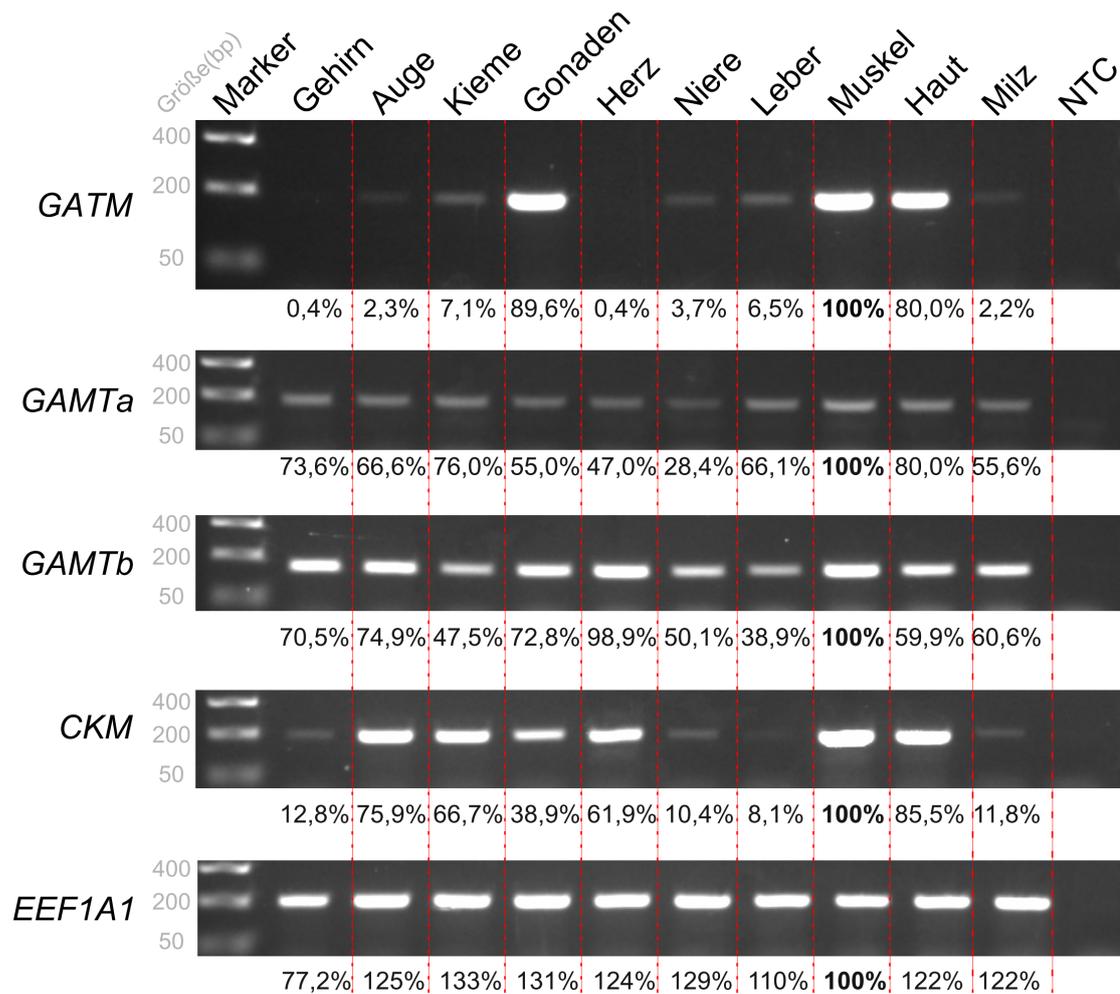
Oben schematische Darstellung der Sequenzalignments. Gezeigt wird der maximale Anteil der an der jeweiligen Position übereinstimmenden Basen in Prozent. Unten sind die *Bootstrap*-Konsensus-Bäume dargestellt. Die *Bootstrap*-Werte sind an den entsprechenden Knoten angegeben. Unterhalb der Arten befindet sich der *Accession-Code* der jeweiligen Sequenz. Das Lanzettfischchen *B. belcheri* diente jeweils als Außengruppe.

hohe Konservierung. So waren alle Sequenzabschnitte – mit Ausnahme von *CKM* beim Lanzettfischchen – gleich lang. Weiterhin gab es eine Vielzahl von Sequenzpositionen, an denen alle untersuchten Tierarten die gleiche Sequenzinformation aufwiesen. Insgesamt zeigten an den meisten untersuchten Positionen zumindest 50 % der untersuchten Spezies die gleiche Base, wobei dies insbesondere auf die verschiedenen Fischarten zutraf.

Anhand der Sequenzalignments konnten darauf Kladogramme erstellt werden, die Informationen über die Verwandtschaft der Sequenzen liefern (Abb. 3.7, unten). Die auf Basis der drei verschiedenen Gene unabhängig voneinander erstellten Stammbäume wiesen in der Grundstruktur große Ähnlichkeiten auf. Für alle Gene erfolgte eine Separierung nach Fischen und Säugetieren. Der *Bootstrap*-Wert lag für die Zusammengruppierung der Säuger zwischen 99 und 100 %; die Fische wurden mit 84 - 96 %iger Sicherheit zusammengruppiert. Innerhalb der Säuger wurden Schwein und Rind stets zusammen gruppiert (*Bootstrap*-Wert zwischen 73 und 99 %), während zur Maus eine größere evolutive Distanz gefunden wurde. In der Fischgruppe war die Zusammenordnung von Forelle und Schnäpel bei allen Genen immer sehr wahrscheinlich (96-99 %). Auch die Zusammengruppierung von Flussbarsch und Zander erfolgte für alle drei Gene, wobei die Sicherheit für *GATM* und *GAMT* sehr hoch war (je 99 %), für *CKM* jedoch deutlich niedriger (45 %). Für *GATM* und *GAMT* wurde der Hering separat von den anderen Fischen gestellt, die Sequenzen der anderen Fische wiesen also eine größere Ähnlichkeit zueinander auf. Diese Separierung erfolgte mit einer Sicherheit von 84 bzw. 86 %. Für *CKM* hingegen wurde die Heringssequenz näher der Forellen- und Schnäpelsequenz zugeordnet, die Sequenzähnlichkeit mit Flussbarsch und Zander war geringer. Die Sicherheit für diese Einstufung war jedoch mit 49 % relativ gering. Bezüglich der zwei Varianten von *GAMT* im Schnäpel wurde *GAMTb* direkt der Forellensequenz zugeordnet (*Bootstrap* 88 %), *GAMTa* wurde als nächstverwandte Sequenz eingestuft (99 %).

### 3.2.2. Transkriptquantifizierung

**Semiquantitative PCR** Um einen ersten Überblick über die gewebespezifische Expression von *GATM*, *GAMT* und *CKM* in Fischen zu erhalten, wurde eine semiquantitative PCR mit einer Vielzahl an verfügbaren Schnäpel-Proben durchgeführt. Vom Ostseeschnäpel waren mehr verschiedenartige Gewebeproben vorhanden als von den anderen Fischarten. Abb. 3.8 zeigt entsprechende repräsentative Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung. Da die Bandenintensität für die Kreatingene in den Muskelproben jeweils am stärksten erschien, wurden diese jeweils als



**Abb. 3.8: Gewebeverteilung der Kreatingene im Ostseeschnäpel**

Repräsentative Gele einer semiquantitativen PCR für die mit dem Kreatinsystem in Verbindung stehenden Gene *GATM*, *GATMa*, *GATMb*, *CKM* und das Referenzgen *EEF1A1* in verschiedenen Geweben eines Ostsee-Schnäpels. NTC=Non-template-control; Negativkontrolle mit Wasser anstelle von cDNA

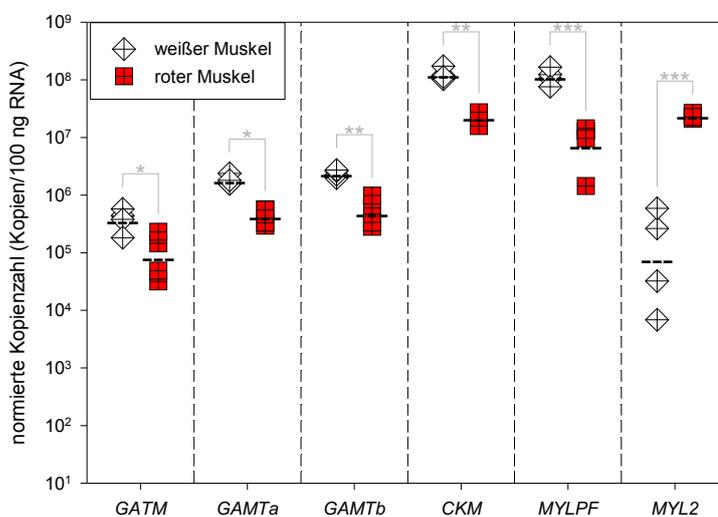
Referenzwert genutzt. Bezogen auf die Intensität im weißen Skelettmuskel wurde jeweils der prozentuale Anteil der Intensität der Banden in den anderen Geweben gemessen. Für *EEF1A1* war das Bild insgesamt ausgeglichen, die Banden erschienen ungefähr gleich groß. Bezüglich der Bandenintensität gehörte die Bande der Muskelprobe zu den schwächsten. Einzig im Gehirn war die Bande noch schwächer (77%). Die stärkste Bande in der Kieme war 33% stärker als die des Muskels. Für *GATM* wies der Muskel hingegen die stärkste Bande auf. Gonaden (90%) und Haut (80%) folgten auf den nächsten Plätzen. In den anderen Geweben waren die Banden deutlich schwächer, in der Kieme erreichte die Intensität nur 7,1% und in den anderen Geweben noch weniger. *GATMa* war deutlich verbreiteter exprimiert. Die stärkste Bande wurde wieder im Muskel gefunden, die schwächste mit 28,4% Bandenintensität in der Niere. Auch *GATMb* zeigte eine gewebeüberschreitende

Expression, mit maximaler Bandenintensität im Muskel und minimaler Intensität in der Leber mit 39 %. Die *CKM*-Bande war ebenfalls am stärksten im Muskel und am schwächsten in Leber (8 %) und Niere (10 %). In Haut (86%), Auge (76 %) und Kieme (67 %) war ebenso noch eine starke *CKM*-Expression festzustellen.

**Echtzeit-PCR** Mittels Echtzeit-PCR ist eine genauere Messung der Genexpression möglich als mit semiquantitativer PCR. Dabei wurde auf die Gewebe Niere und Leber, welche im Säuger relevant für die Kreatinsynthese sind, sowie den weißen Muskel, der in der semiquantitativen PCR die stärkste Expression aufwies und für die Kreatinnutzung relevant ist, fokussiert.

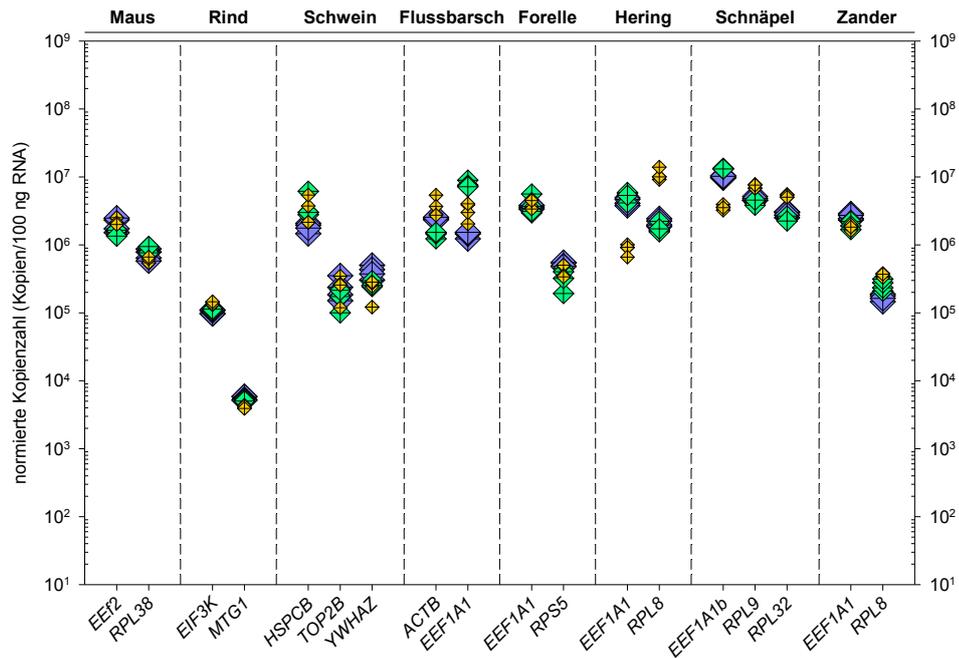
Bei Fischen ist der rote Muskel gut vom weißen Muskel unterscheidbar. Für den Ostseeschnäpel wurden zunächst beide hinsichtlich ihrer Kreatingenexpression untersucht (Abb. 3.9). Dabei stellte sich heraus, dass der rote Skelettmuskel grundsätzlich geringere Expressionen der Kreatingene aufwies als der weiße Skelettmuskel. *GATM*, *GAMTa* und *GAMTb*, sowie *CKM* waren im roten Muskel in geringerer Kopienzahl zu finden. *MYLPPF*, das für die schnelle Form des Myosins codiert, war in signifikant höherer Anzahl im weißen Muskel vorhanden, während *MYL2*, das für langsames Myosin codiert, im roten Muskel signifikant stärker vertreten war. Im Weiteren wurde wegen der stärkeren Expression und der besseren Präparierbarkeit nur der weiße Muskel der anderen Fischarten untersucht.

Um verlässlich die Expression der Kreatingene *GATM*, *GAMT* und *CKM* in Niere, Leber und weißem Muskel der verschiedenen Tierarten messen zu können, mussten zunächst geeignete Referenzgene aus der Literatur ausgewählt und auf ihre Eignung überprüft werden. Die normierten Kopienzahlen der verschiedenen Gene sind in Abb. 3.10 gezeigt. Trotz gewisser Schwankungen der Expression der



**Abb. 3.9:** Expression von Kreatingenen und Myosinvarianten in rotem und weißem Skelettmuskel des Ostseeschnäpels.

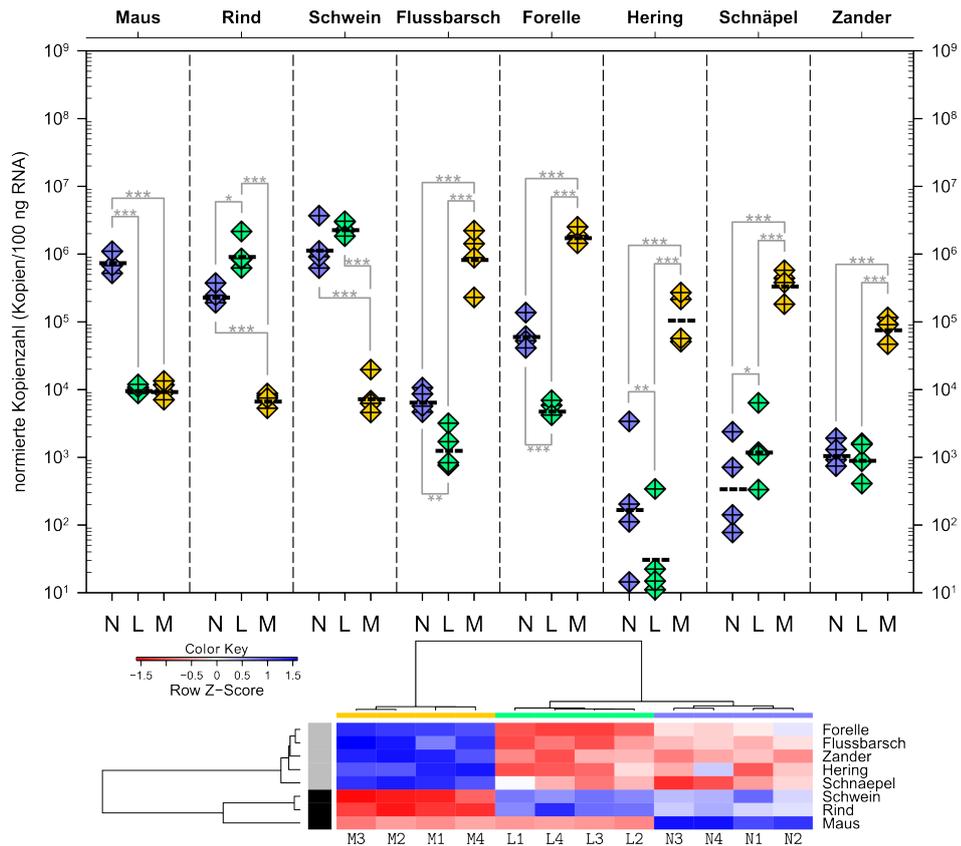
Die Werte für den weißen Muskel sind ebenfalls in Abb. 3.14, 3.11 & 3.13 verwendet worden. (n=4)



**Abb. 3.10: Normierte Kopienzahlen der genutzten Referenzgene in den untersuchten Tierarten**  
 Gemessen wurde in Niere (◆, groß), Leber (◆, mittel) und Skelettmuskel (◆, klein).  
 (n=4)

Gene zwischen den drei Geweben bei einigen Tierarten, war die Größenordnung der Kopienzahl doch zwischen den Geweben vergleichbar. Nur sehr geringfügige Schwankungen zwischen den Geweben gab es etwa bei den Referenzgenen von Maus (*EEF2*, *RPL38*) und Rind (*EIF3K*, *MTG1*). Beim Schwein schien die Streuung der Werte zwischen den Geweben etwas höher zu liegen. Bei den untersuchten Fischen war die Streubreite der Werte ebenfalls etwas höher und gerade beim Hering zeigten sich Unterschiede zwischen den Geweben, insbesondere im Muskel. So war die Kopienzahl von *EEF1A1* im Muskel vom Hering deutlich niedriger als in den anderen untersuchten Geweben, *RPL8* hingegen zeigte eine stärkere Expression im Muskel von Hering als in Niere und Leber. Bei den ausgewählten Referenzgenen der anderen untersuchten Fischarten war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt.

Das Gen *GATM* zeigte unterschiedliche Expressionsprofile im Vergleich zwischen Fischen und Säugetieren (Abb. 3.11). Entsprechend wurde durch die Varianzanalyse eine hochsignifikante Interaktion zwischen Tierart und Gewebe festgestellt ( $p < 0,001$ ). In allen drei untersuchten Säugetieren war die *GATM*-Expression im Skelettmuskel sehr gering im Vergleich zu den anderen Geweben. In der Maus wurde die stärkste *GATM*-Expression in der Niere gefunden. In Leber und Muskel betrug die Expression jeweils lediglich 1 % der renalen Expression. Auch im Rind



**Abb. 3.11: Normierte Kopienzahlen von *GATM* in den untersuchten Tierarten**

Gemessen wurde in Niere (◆), Leber(◆) und Skelettmuskel (◆). Die gestrichelten Linien zeigen geometrische Mittelwerte. Signifikante Unterschiede sind markiert. Unterhalb gezeigt sind die Ergebnisse der hierarchischen Cluster-Analyse. Säugetiere sind schwarz markiert und Fische grau. Sowohl die vertikale als auch die horizontale Reihenfolge sind durch die Clusterbildung bedingt. Blaue Felder zeigen eine besonders starke Expression, rote eine besonders schwache. (n=4)

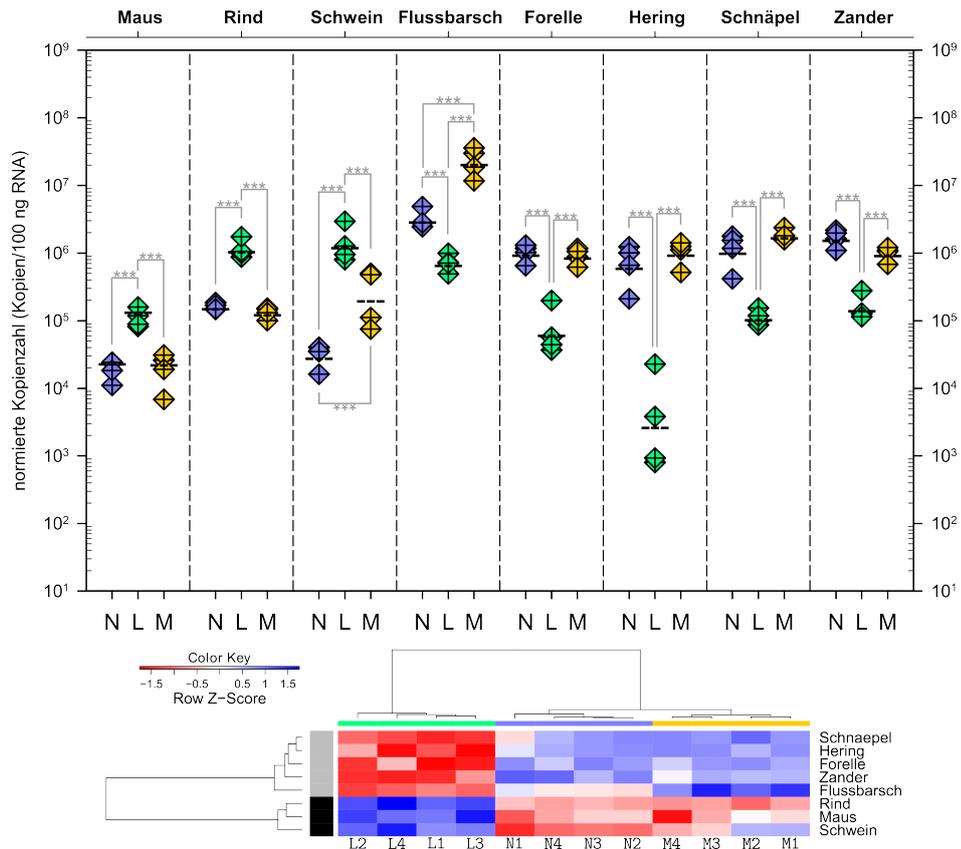
zeigte der Muskel die geringste *GATM*-Expression. Die stärkste Expression war hier jedoch nicht in der Niere, sondern in der Leber zu finden. Hier war sie viermal so stark wie in der Niere ( $p=0,02$ ) und 137-mal so stark wie im Muskel ( $p<0,001$ ). Ein sehr ähnliches Bild zeigte das Schwein. Die geringste *GATM*-Expression lag im Muskel vor, die höchste in Niere und Leber, wobei letztere eine vergleichbare Expression aufwies. Abweichende Muster wurden für die untersuchten Fische gefunden. In diesen wies der Skelettmuskel stets die stärkste Genexpression von *GATM* auf. In jeder untersuchten Fischart und jedem untersuchten Einzeltier lag die Kopienzahl im Muskel höchstsignifikant höher als in Niere und in Leber. Die Unterschiede lagen dabei zwischen 72-fach (Zander, Niere) und 3411-fach (Hering, Leber). In Flussbarsch, Forelle und Hering war die Expression in der Leber signifikant niedriger als in der Niere, im Schnäpel war das Verhältnis entgegengesetzt und im Zander gab es zwischen diesen beiden Geweben keine signifikanten Unterschiede.

Die Clusteranalyse für *GATM* führte zu einer Zusammengruppierung aller Proben eines Gewebetyps; diese wiesen also jeweils hohe Ähnlichkeit zueinander auf. Dabei wurden Niere und Leber zusammengruppiert, die Muskelproben wurden mit einem größeren Abstand in eine eigene Kategorie sortiert. Auf Tierebene wurden alle Fische zu einer Gruppe zusammengefasst und die Säugetiere zu einer zweiten. Während die Fische alle recht dicht beieinander lagen, gab es in den Säugern noch eine weitere Differenzierung: Die Maus wurde mit recht weitem Abstand von Rind und Schwein einsortiert. Diese Entfernung war größer als die maximale Entfernung zwischen allen untersuchten Fischen. Ursächlich dafür ist die differente hepatische *GATM*-Expression. Im Gegensatz zu Rind und Schwein wurde in der Mäuseleber nur eine sehr geringe *GATM*-Expression festgestellt.

Auch hinsichtlich der Genexpression von *GAMT* wurden Unterschiede zwischen Säugetieren und Fischen gefunden (Abb. 3.12). In Maus, Rind und Schwein war die *GAMT*-Expression in der Leber am stärksten. In Maus und Rind lag sie sechs- bis acht-mal so hoch wie in Niere und Muskel, zwischen denen kein Unterschied in der Genexpression gefunden wurde. Im Schwein hingegen war die *GAMT*-Expression in der Niere signifikant niedriger als im Muskel. In den untersuchten Fischen war die Expression von *GAMT* in der Leber grundsätzlich geringer als in den anderen untersuchten Organen. Sowohl Niere als auch Muskel zeigten in allen Fischarten hochsignifikant höhere Kopienzahlen als die Leber. In Hering, Schnäpel, Forelle, Zander und Flussbarsch war die Expression in Niere und Muskel vergleichbar, nur im Flussbarsch lag sie im Muskel signifikant über der renalen Expression.

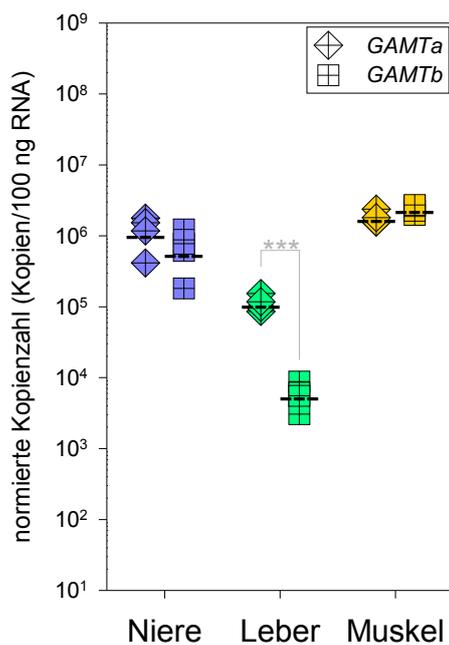
Auch für das *GAMT*-Gen wurden jeweils alle Proben des gleichen Gewebetyps im Rahmen der Clusteranalyse zu einer Gruppe zusammengefasst. Nieren- und Muskelproben wurden zusammengefasst, während die Leberproben einen größeren Abstand von den anderen Geweben aufwiesen. In Bezug auf die Tierarten erfolgte eine Gruppierung in Säugetiere und Fische, wobei innerhalb dieser Gruppen keine ausgeprägte weitere Differenzierung vorgenommen wurde.

Für den Schnäpel waren zwei *GAMT*-Varianten gefunden worden (vgl. Abb. 3.6). Unterschiede gab es zwischen den beiden Genvarianten nicht nur auf der Sequenzebene, sondern auch hinsichtlich ihrer Expression (Abb. 3.13). Waren beide Varianten in Niere und Muskel jeweils in etwa gleich stark exprimiert, betrug die gemessene Kopienzahl von *GAMTb* in der Leber nur 5% der Kopienzahl von *GAMTa*. Beide Varianten waren stärker in Niere und Muskel exprimiert als in der Leber, wobei der Unterschied für *GAMTb* deutlicher ausfiel.

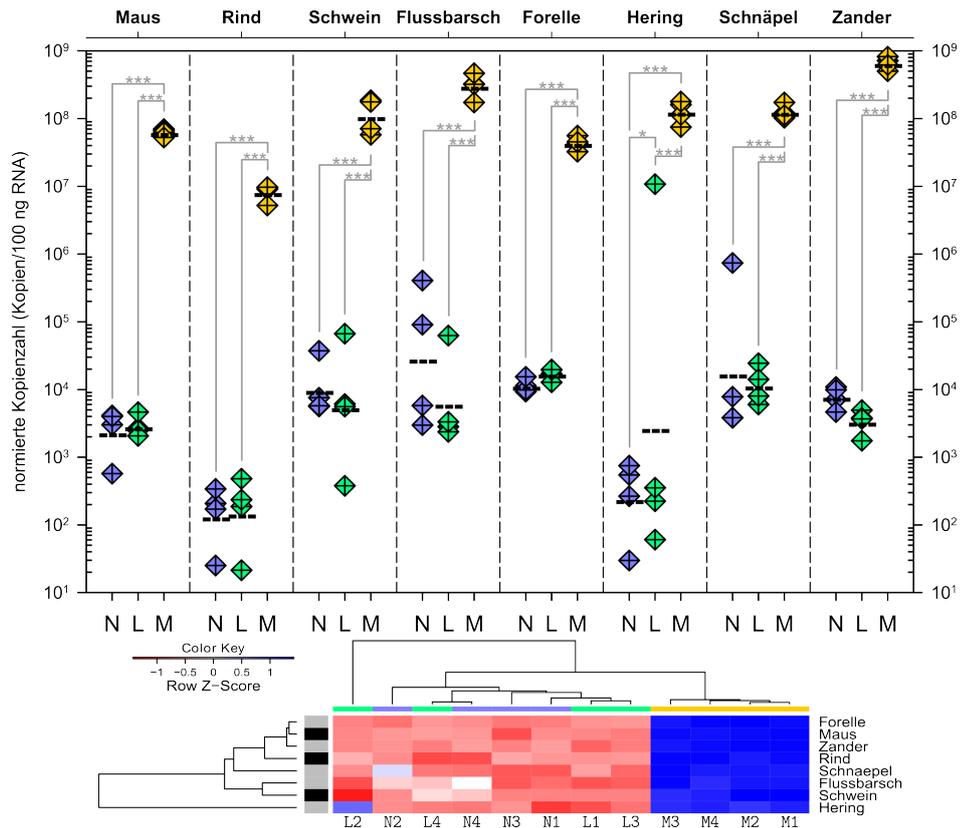


**Abb. 3.12:** Normierte Kopienzahlen von *GAMT* in den untersuchten Tierarten

Gemessen wurde in Niere (◊), Leber (◆) und Skelettmuskel (◇). Die gestrichelten Linien zeigen geometrische Mittelwerte. Unterhalb gezeigt sind die Ergebnisse der hierarchischen Cluster-Analyse. Säugetiere sind schwarz markiert und Fische grau. Sowohl die vertikale als auch die horizontale Reihenfolge sind durch die Clusterbildung bedingt. Für den Schnäpel sind die Werte von *GAMTa* gezeigt. Blaue Felder zeigen eine besonders starke Expression, rote eine besonders schwache. (n=4)



**Abb. 3.13:** Genexpression von *GAMTa* und *GAMTb* in Niere, Leber und weißem Muskel des Ostseeschnäpels. Gemäß Varianzanalyse signifikante Interaktion zwischen Gewebe- und Genvarianten-Effekten. Unterschied zwischen *GAMTa* und *GAMTb* in Leber gemäß Holm-Sidak-Test hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Gezeigt sind die normierten Kopienzahlen als Einzelwerte von vier Tieren. Das geometrische Mittel ist durch gestrichelte Linien dargestellt.



**Abb. 3.14:** Normierte Kopienzahlen von *CKM* in den untersuchten Tierarten

Gemessen wurde in Niere (◆), Leber(◆) und Skelettmuskel (◆). Die gestrichelten Linien zeigen geometrische Mittelwerte. Unterhalb gezeigt sind die Ergebnisse der hierarchischen Cluster-Analyse. Säugetiere sind schwarz markiert und Fische grau. Sowohl die vertikale als auch die horizontale Reihenfolge sind durch die Clusterbildung bedingt. Blaue Felder zeigen eine besonders starke Expression, rote eine besonders schwache. (n=4)

Die normierten Kopienzahlen für die Kreatinkinase *CKM* sind in Abb. 3.14 gezeigt. Für alle untersuchten Tierarten zeigte sich dabei ein recht ähnliches Bild: Der Muskel wies stets die deutlich stärkste *CKM*-Expression auf. Sie lag dabei zwischen vier (Niere, Schnäpel) und sechs (Niere, Hering) Größenordnungen über den Kopienzahlen, die in Niere und Leber gefunden wurden. Zwischen Leber und Niere bestanden hingegen kaum Unterschiede. Einzig für den Hering wurde eine signifikant höhere *CKM*-Expression in Leber als in der Niere gemessen ( $p=0,03$ ), wobei dies durch eine einzige Probe verursacht wurde.

Basierend auf den sich stark ähnelnden Genexpressionsprofilen zeigten sich Schwierigkeiten bei der Clusteranalyse. Während alle Muskelproben zusammengruppiert wurden, konnte durch den Algorithmus Niere nicht von Leber unterschieden werden, sodass gemischte Gruppen mit Leber- und Nierenproben entstanden. Auch die verschiedenen Tierarten wurden in der Sortierung – gleich ob Säuger oder Fisch – basierend auf zwischen allen Tierarten ähnlichen Expressionsprofilen durchmischt.

### 3.2.3. Überblick

Für die verschiedenen untersuchten Fischarten konnten Fragmente der Gene *GATM*, *GAMT* und *CKM* amplifiziert und identifiziert werden. Die beobachteten Genexpressionsmuster der Kreatin-relevanten Gene *GATM*, *GAMT* und *CKM* waren unter den Fischen vergleichbar. *GATM* wurde am stärksten im Skelettmuskel exprimiert, *GAMT* in Skelettmuskel und Niere und *CKM* im Skelettmuskel. In den untersuchten Säugern hingegen zeigte *GATM* die stärkste Expression in der Niere (Maus) bzw. Leber (Rind & Schwein). *GAMT* wurde von den drei Säugetierarten am stärksten in der Leber exprimiert und *CKM* im Skelettmuskel.

## 3.3. Das Kreatinsystem der Regenbogenforelle

Nach der grundsätzlichen Charakterisierung des Kreatinsystems in verschiedenen Fischarten, sollte das der Regenbogenforelle noch weiter in den Fokus genommen werden. Dazu gehörte die Identifizierung der vollständigen codierenden Sequenzen der Gene sowie zusätzlich die Analyse der gehirntypischen Kreatinkinase *CKB*, sowie des Kreatintransporters *SLC6A8*. Weiterhin wurde mit dem Gehirn ein weiteres Gewebe in die Analyse mit einbezogen, welches einen starken Energieverbrauch aufweist, ebenso wie der Skelettmuskel.

### 3.3.1. Genidentifizierung

Gene, welche für Enzyme des Kreatinsystems codieren, waren für die Regenbogenforelle nur in geringem Umfang bekannt. Einzig eine Sequenz für die Kreatinkinase vom Gehirn-Typ (*CKB*) war bereits in öffentlichen Datenbanken hinterlegt (NM\_001124715). Daher mussten die anderen Gene zunächst identifiziert werden, bevor sie funktional charakterisiert werden konnten. Basierend auf Sequenzen von ESTs (*expressed sequence tag*) von der Forelle oder vom Lachs, welche eine hohe Sequenzübereinstimmung mit bereits bekannten Sequenzen der gesuchten Gene in anderen Fischarten aufwiesen, wurden Primer abgeleitet, um *GATM*, *GAMT* und *CKM* der Regenbogenforelle mittels Standard-PCR zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die Sequenzen wurden als HG315738 (*GATM*), HG315739 (*GAMT*) und HG315740 (*CKM*) im europäischen Nukleotid-Archiv (*European Nucleotide Archive*, ENA) hinterlegt.

Die Sequenzen konnten darauf mit orthologen Sequenzen anderer Spezies verglichen werden. Ein Überblick dazu ist in Abb. 3.15 gezeigt. Die neu ermittelten

	GATM				GAMT				CKM			
	GenBank Accession Nummer	cDNA Länge (bp)	cDNA Identität (%)	Protein Identität (%)	GenBank Accession Nummer	cDNA Länge (bp)	cDNA Identität (%)	Protein Identität (%)	GenBank Accession Nummer	cDNA Länge (bp)	cDNA Identität (%)	Protein Identität (%)
<b>Om</b>	HG315738	1275	100	100	HG315739	705	100	100	HG315740	1146	100	100
<b>Ss</b>	-	-	-	-	NM_001141523	705	98	99	NM_001139716	1146	99	100
<b>Tr</b>	XM_003969870	1272	83	90	-	-	-	-	XM_003976477	1146	87	91
<b>Dr</b>	NM_199531	1269	79	85	NM_001105595	705	78	86	NM_130932	1146	88	91
<b>Ip</b>	-	-	-	-	NM_001200612	705	80	87	NM_001245943	1146	87	91
<b>OI</b>	XM_004066917	1272	83	90	XM_004067912	708	80	87	XM_004076031	1146	87	90
<b>Hs</b>	NM_001482	1272	74	80	NM_000156	711	69	70	NM_001824	1146	82	88
<b>Bb</b>	DQ521270	1281	72	69	DQ174309	711	68	70	AY608673	1140	74	70

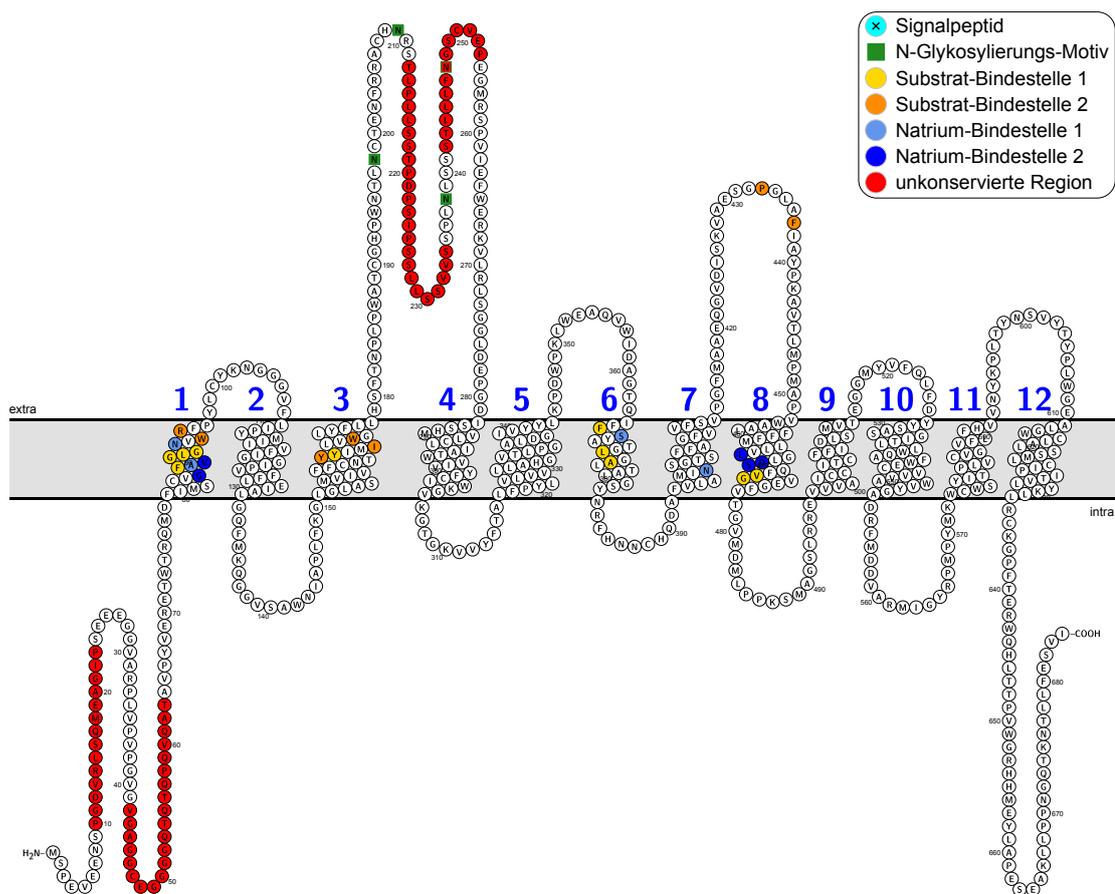
  

**Abb. 3.15:** Sequenzhomologien zwischen cDNA- und Proteinsequenzen von GATM, GAMT und CKM verschiedener Spezies

Die codierenden Sequenzen für GATM, GAMT und CKM verschiedener Spezies (Ss, *Salmo salar*, Lachs; Tr, *Takifugu rubripes*, japanischer Kugelfisch; Dr, *Danio rerio*, Zebrafärbling; Ip, *Ictalurus punctatus*, Getüpfelter Gabelwels; OI, *Oryzias latipes*, Medaka; Hs, *Homo sapiens*, Mensch; Bb, *Branchiostoma belcheri*, Lanzettfischchen) wurden mit denen der Regenbogenforelle (Om, *Oncorhynchus mykiss*) verglichen. Die jeweils erste Spalte gibt die GenBank Accession Nummer an, die nächste die Länge der codierenden Sequenz und die beiden letzten die Übereinstimmung von cDNA- bzw. Aminosäuresequenz mit der Regenbogenforelle. Der Übereinstimmungsgrad wird durch die Schattierung codiert (Dunkel=hohe Übereinstimmung). Darunter Ausschnitte aus Proteinalignments der entsprechenden Sequenzen. Rot umkreist sind solche Aminosäuren, die spezifisch für Salmoniden zu sein scheinen. Die Positionsangaben beziehen sich auf die Aminosäureposition in der Forellensequenz. (Verändert nach BORCHEL *et al.*, 2014)

Forellensequenzen wiesen die größten Übereinstimmungen mit den Sequenzen vom Lachs (98-99 %) auf. Die Sequenzen der anderen Fischarten folgten mit etwas größerem Abstand, wobei die Übereinstimmung mit Mensch und Lanzettfischchen am geringsten war (69-74 %). Die Identität der cDNA lag meistens unter der Proteinidentität. Das CKM-Protein von Forelle und Lachs erwies sich sogar als identisch, während es auf cDNA-Ebene eine 1 %ige-Abweichung gab. Trotz teilweise sehr hoher Homologie gab es dennoch im Proteinalignment (Abb. 3.15 unten) einige Aminosäureaustausche, die basierend auf den untersuchten Spezies spezifisch für die Salmoniden zu sein schienen. Besonders das Salmoniden-CKM-Protein zeigte mit Aminosäureaustauschen an Position 177 und 178 (Asparagin und Lysin ersetzen Lysin und Serin) besonders spezifische Sequenzen in einem sonst sehr stark konservierten Bereich.

**Identifizierung des Kreatintransporters SLC6A8** Für den Kreatintransporter SLC6A8 existierte bisher keine Sequenzinformation aus Salmoniden und seine Struktur in Fischen wurde bisher noch nicht charakterisiert. Die Identifizierung des Gens, welches für SLC6A8 codiert, erwies sich daher als komplexer, zumal auch kein EST, das eine hohe Sequenzübereinstimmung mit bisher bekannten *SLC6A8*-Sequenzen aus anderen Fischen aufwies, in Forelle und Lachs vorhanden war. Daher wurde die bekannte *SLC6A8*-Sequenz aus dem Zebraquärling genutzt, ähnliche Sequenzen in bereits komplett sequenzierten Fischen zu finden. Auf der Basis eines Alignments der Sequenzen von Zebraquärling, zwei Kugelfischarten und dem Reiskärling konnten zwei degenerierte Primer abgeleitet werden. Diese ergaben in der PCR zwei Fragmente, von denen das eine nach Klonierung und Sequenzierung als Teil eines Kreatintransporters und das andere als Teil eines Taurintransporters identifiziert werden konnten. Basierend auf der Kreatintransporter-Sequenz wurden dann weitere Primer abgeleitet, die in mehreren 5'- und 3'- RACEs genutzt wurden, um die Sequenzinformation über die Grenzen der codierenden Region hinaus zu

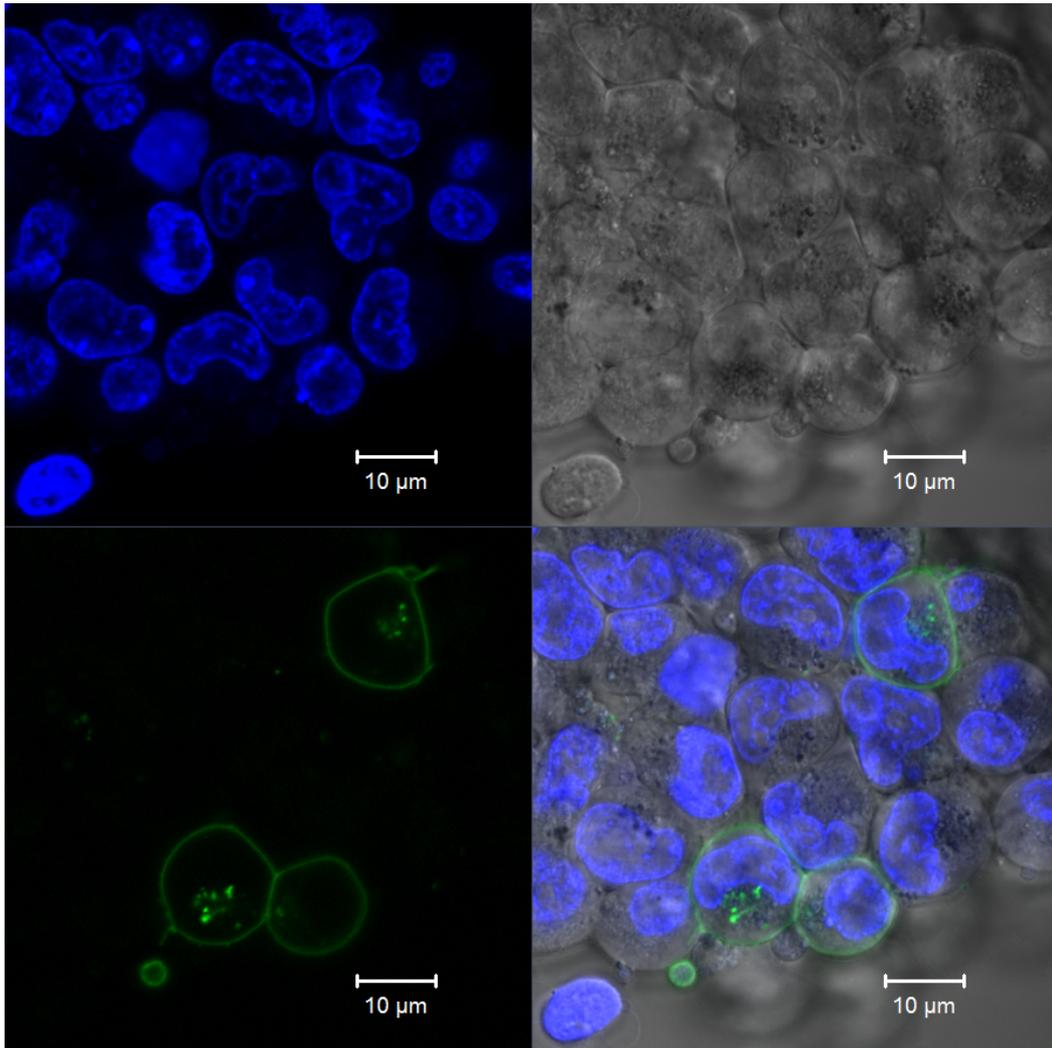


**Abb. 3.16:** Vorausgesagte Proteinstruktur des durch *SLC6A8* codierten Proteins  
Die Zahlen geben die Nummer der jeweiligen Transmembrandomäne an.

vervollständigen. Aus der codierenden Sequenz ließ sich die Proteinsequenz ableiten und die Protein-Topographie innerhalb von Membranen voraussagen (Abb. 3.16). Für das durch *SLC6A8* codierte Protein wurden insgesamt 12 Transmembrandomänen vorhergesagt, wobei N- und C-Terminus jeweils intrazellulär enden. Trotz Lokalisierung in der Membran wurde kein Signalpeptid vorhergesagt. Hingegen wurden sowohl Natrium- als auch Substrat-Bindestellen gefunden, wobei diese sich größtenteils in den Transmembrandomänen 1,3,6 und 8 konzentrierten. Nach einem Vergleich der Proteinsequenz mit der bekannten orthologen Sequenz des Kreatintransporters vom Barsch *Maylandia zebra* wurden insgesamt drei Sequenzbereiche identifiziert, die sich deutlich unterschieden, das heißt, dass mehr als drei aufeinanderfolgende Aminosäuren nicht der Barschsequenz zugeordnet werden konnten. Zwei dieser Bereiche befinden sich am N-terminalen Ende des Proteins, noch vor der ersten Transmembrandomäne; die dritte befindet sich in der größten extrazellulären Schleife, zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne.

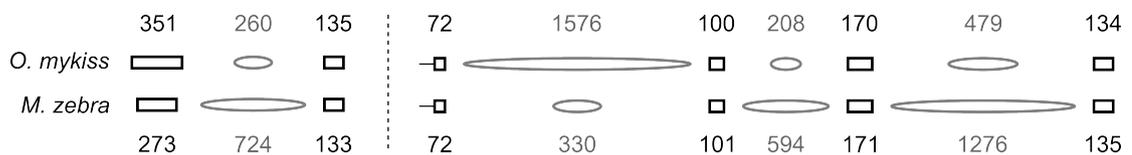
Um die vorhergesagte Lokalisation in der Membran zu überprüfen, wurde ein *SLC6A8-GFP*-Fusionsgen hergestellt und zur Transfektion von HEK-293-Zellen verwendet. Die Proteinlokalisierung ist exemplarisch in Abb. 3.17 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass nur ein geringer Anteil der Zellen eine Fluoreszenz zeigte. Diese grüne Fluoreszenz war aber deutlich auf die Zellmembran fokussiert, innerhalb der Zellen gab es nur einige kleinere Stellen, an denen Fluoreszenz vorhanden war. Um sicher zu stellen, dass es sich wirklich um das erwartete Protein handelte, wurde ein *Western Blot* mit einem anti-GFP-Antikörper durchgeführt. Bei diesem erschien eine Bande in dem Größenbereich, der für das Fusionsprotein errechnet worden war (103 kDa).

Mittels mehrerer Genomwanderungen wurde weiterhin versucht, Informationen über die Exon-Intron-Struktur von *SLC6A8* auf genomischer DNA-Ebene zu erhalten, um diese Struktur mit den Strukturen von bereits bekannten Genen aus anderen Fischen zu vergleichen. Wegen offenbar sehr großer Introns war es nicht möglich, die genomische Sequenz vollständig zu sequenzieren. Stattdessen konnten zwei jeweils mehr als 2,5 kb große Fragmente sequenziert werden, welche durch ein Alignment mit der cDNA auf Exons und Introns untersucht werden konnten. Anschließend wurde diese partielle Exon-Intron-Struktur mit der Genstruktur des bereits bekannten *SLC6A8*-Gens aus *Maylandia zebra* verglichen (Abb. 3.18). Dabei zeigte sich, dass die Größe der Exons größtenteils sehr ähnlich war, wohingegen die Größe der gefundenen Introns deutlich schwankte. Das erste untersuchte Exon war in der Forelle 78 bp länger als das entsprechende Exon aus dem Barsch. Dieses Exon war dasjenige, welches den gering konservierten Bereich in der extrazellulären



**Abb. 3.17: Zelluläre Lokalisation des SLC6A8-GFP-Fusionsproteins**

Oben links: Zellkernanfärbung mit Hoechst 33342; oben rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme; unten links: GFP-Fluoreszenz; unten rechts: fusioniertes Bild



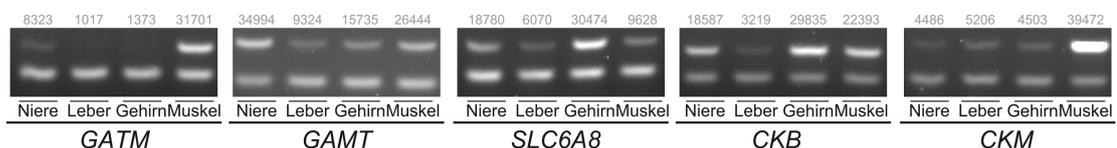
**Abb. 3.18: Genstrukturvergleich zwischen *SLC6A8* von Regenbogenforelle und Blauem Malawibarsch**

Die Genstruktur der Forelle wurde nicht vollständig aufgeklärt, die gestrichelte Linie markiert die Unterbrechung in der Sequenz. Eckig und schwarz dargestellt sind die Exons, rund und grau die Introns. Ein mit einer Linie markiertes Exon markiert die Unvollständigkeit der Exon-Sequenz.

Schleife zwischen Transmembrandomäne 3 und 4 codierte. Bei den anderen Exons gab es nur Größenunterschiede um maximal zwei Basenpaare. Bei den Introns hingegen gab es Schwankungen bis zu 80 %.

### 3.3.2. Transkriptquantifizierung

**Semiquantitative PCR** Um zu überprüfen, ob sich ähnliche Expressionsmuster der Gene des Kreatinsystems in der Forelle wie im Schnäpel zeigen würden, wurde in Niere, Leber, Gehirn und Muskel einer Import-Forelle die Expression von *GATM*, *GAMT*, *SLC6A8*, *CKB* und *CKM* mittels semiquantitativer PCR untersucht (Abb. 3.19). Dies diente als erster Vorversuch, bevor die genauen Transkriptmengen später mittels qRT-PCR bestimmt wurden. Da alle Banden für das Referenzgen *EEF1A1* in etwa gleich stark waren, konnte auf eine gleichmäßige Expression des Gens in allen Geweben geschlossen werden. Die stärkste *GATM*-Bande wurde im Muskel gefunden, ihre Intensität war gemäß ImageJ-Analyse 3,8 mal so stark wie die der Bande in der Niere (Bandenintensität BI 31701 vs. 8323). In Leber und Hirn war hingegen keine Bande sichtbar. Für *GAMT* hingegen war in jedem Gewebe eine Expression nachweisbar, am stärksten in Niere und Muskel (BI 34994; 26444); die Bande in der Leber war am schwächsten (BI 9324). Für *SLC6A8* zeigte das Gehirn die deutlich stärkste Bande (BI 30474), welche deutlich intensiver (1,6x) war als die Bande der Nieren-Probe (BI 18780). Die Banden in Leber und Muskel waren noch deutlich schwächer (BI 6070-10000). Die stärkste *CKB*-Bande wurde im Gehirn gefunden (BI 29835), gefolgt von Muskel und Niere, während die Bande in der Leber-Probe kaum zu erkennen war (BI 3219). Für *CKM* wurde der stärkste Unterschied zwischen den Geweben gefunden. Die maximale Intensität erreichte der Muskel mit 39472 Einheiten, das nächste Gewebe war die Leber mit einer Intensität von 5206 Einheiten, also gerade einem Achtel. Niere und Gehirn wiesen noch schwächere Banden auf (BI 4486; 4503).

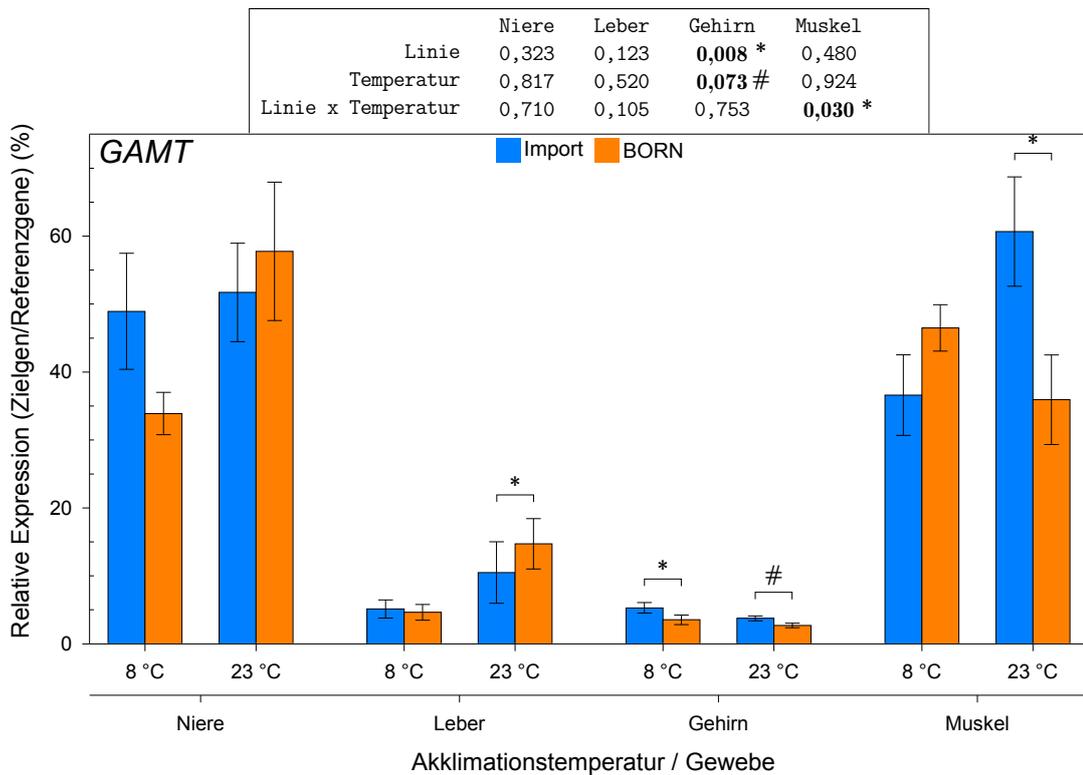
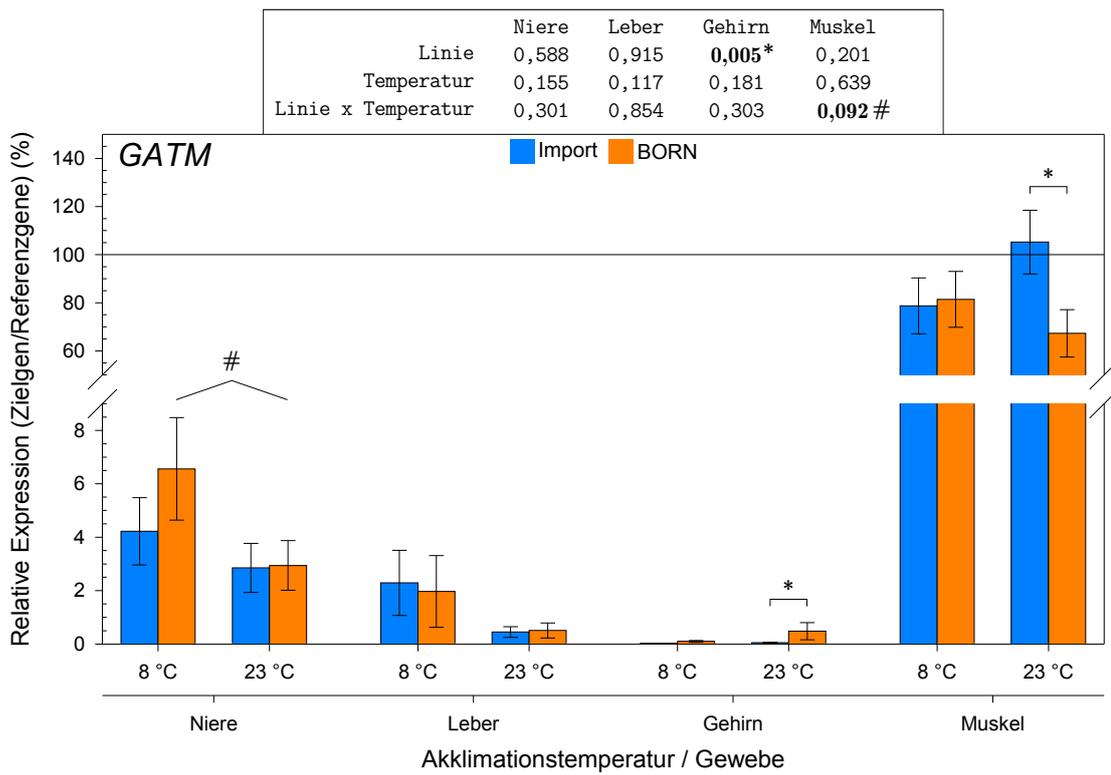


**Abb. 3.19: Repräsentative Gele von semiquantitativen PCRs von Kreatingenen in potentiellen Kandidatengeweben einer Import-Forelle**

Die oberen Banden stammen vom jeweils unterhalb angegebenen Zielgen-Fragment, die unteren Banden entsprechen dem Referenzgen *EEF1A1*. Die PCRs wurden mit cDNAs aus Niere, Leber, Gehirn und Muskel durchgeführt. Oberhalb in grau angegeben sind die mittels ImageJ ermittelten Bandenintensitäten der Zielgene. Die Zyklenzahl war für *GATM* und *SLC6A8* mit 35 Zyklen höher als für die anderen Gene mit 30 Zyklen.

**Echtzeit-PCR** Da die semiquantitative PCR als alleinige Methode ein unzureichendes Mittel für die Messung der Genexpression darstellt, wurden mittels qRT-PCR die genauen Transkriptmengen der verschiedenen Kreatingene im Verhältnis zu den ausgewählten Referenzgenen *EEF1A1* und *RPS5* ermittelt. Es wurden Proben aus dem Akklimationsversuch verwendet, um zusätzlich Aussagen darüber treffen zu können, ob das Kreatinsystem durch die Temperatur beeinflusst wird. Für die beiden in der Kreatinsynthese involvierten Gene *GATM* und *GAMT* ist dies in Abb. 3.20 gezeigt. Für *GATM*, welches für das erste Enzym in der Kreatinsynthese codiert, wurde die höchste Expression im Muskel gefunden. Hier lag sie im Mittel bezogen auf die Referenzgene zwischen  $67.3 \pm 9.85\%$  und  $105.25 \pm 13.21\%$ . In der Niere lag die Expression mit Werten zwischen 2 und 7% deutlich niedriger, in der Leber noch niedriger (0,5 - 2%) und am geringsten im Gehirn (0,05 - 0,5%). Die Varianzanalyse stellte einen signifikanten Einfluss der betrachteten Linie auf die Expression im Gehirn fest, insbesondere bei 23 °C wurde *GATM* stärker von BORN-Forellen exprimiert als von Import-Forellen ( $p=0,007$ ). Weiterhin wurde mittels Varianzanalyse eine marginal signifikante Interaktion zwischen Temperatur- und Linieneffekten festgestellt. Während bei 8 °C die *GATM*-Expression in beiden Linien gleich stark war, zeigte die Import-Forelle bei 23 °C eine um 38 Prozentpunkte stärkere Expression als die BORN-Forelle ( $p=0,04$ ).

Das Expressionsprofil von *GAMT* (Abb. 3.20, unten) wies gewisse Ähnlichkeiten mit dem von *GATM* auf. Die stärkste *GAMT*-Expression wurde für den Muskel der Import-Forelle mit einem Wert von  $60,68 \pm 8,04\%$  gefunden. In der Niere wurden Werte auf einem vergleichbaren Niveau ermittelt. Hier wurde der höchste Wert von  $57,75 \pm 10,18\%$  durch an 23 °C akklimierte BORN-Forellen erreicht. In den anderen untersuchten Geweben war die *GAMT*-Expression deutlich geringer. In der Leber und Gehirn lagen die Werte lediglich zwischen 2 und 15%. Die Varianzanalyse hat für die *GAMT*-Expression im Gehirn hochsignifikante Effekte der Forellenslinie ( $p=0,008$ ) und marginal signifikante Effekte der Temperatur ( $p=0,073$ ) ermittelt. Bei beiden Temperaturen zeigte die BORN-Forelle eine geringere Expression als die Import-Forelle (8 °C: 5,3% vs. 3,5%,  $p=0,032$ ; 23 °C: 3,8% vs. 2,7%,  $p=0,081$ ). Für beide Linien nahm die *GAMT*-Expression mit steigender Temperatur tendenziell ab. Weiterhin wurde ein signifikanter Linien-Temperatur-Effekt im Muskel gefunden. Während bei 8 °C akklimierten Tieren die *GAMT*-Expression in Import-Forellen tendenziell niedriger war als in BORN-Forellen, war die Situation bei 23 °C umgekehrt. Bei dieser Temperatur war *GAMT* im Muskel von Import-



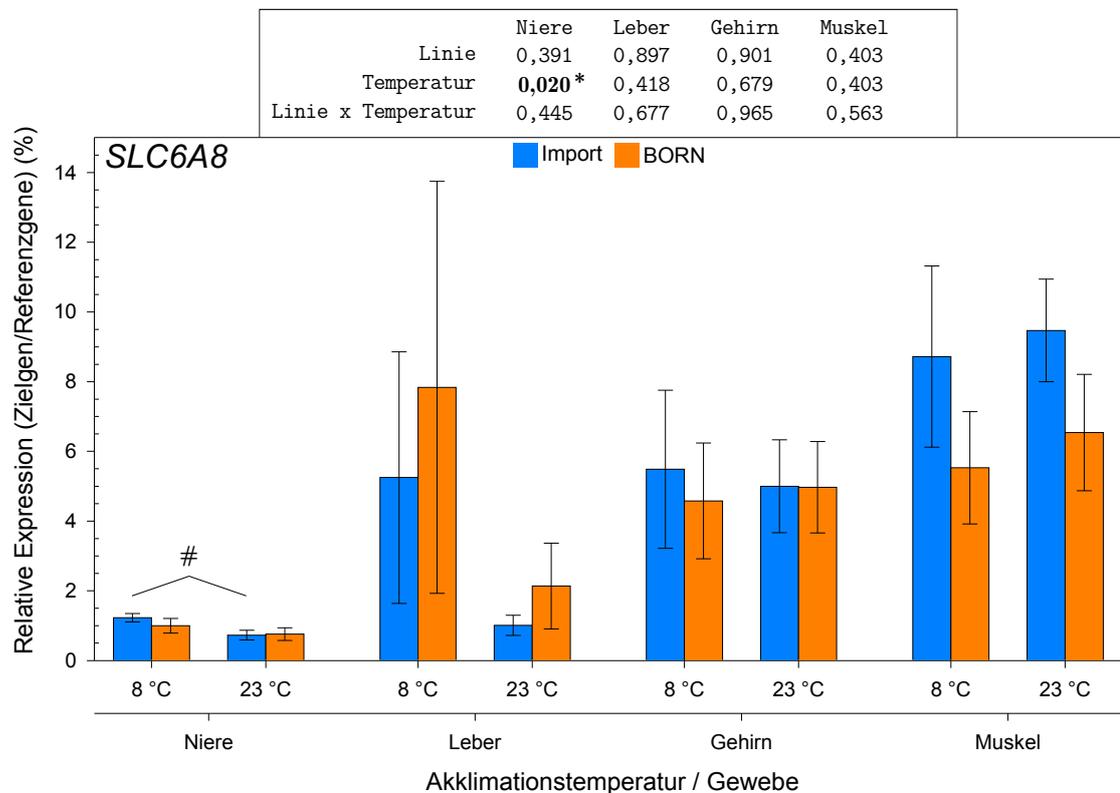
**Abb. 3.20: Genexpression der für die Kreatinsynthese relevanten Gene *GATM* und *GAMT***

Gezeigt ist die relative Genexpression bezogen auf das geometrische Mittel der Referenzgene. Werte sind MW ± SEM; Oberhalb gezeigt sind die Ergebnisse der für jedes Organ einzeln durchgeführten zweifaktoriellen Varianzanalysen. (n=8)

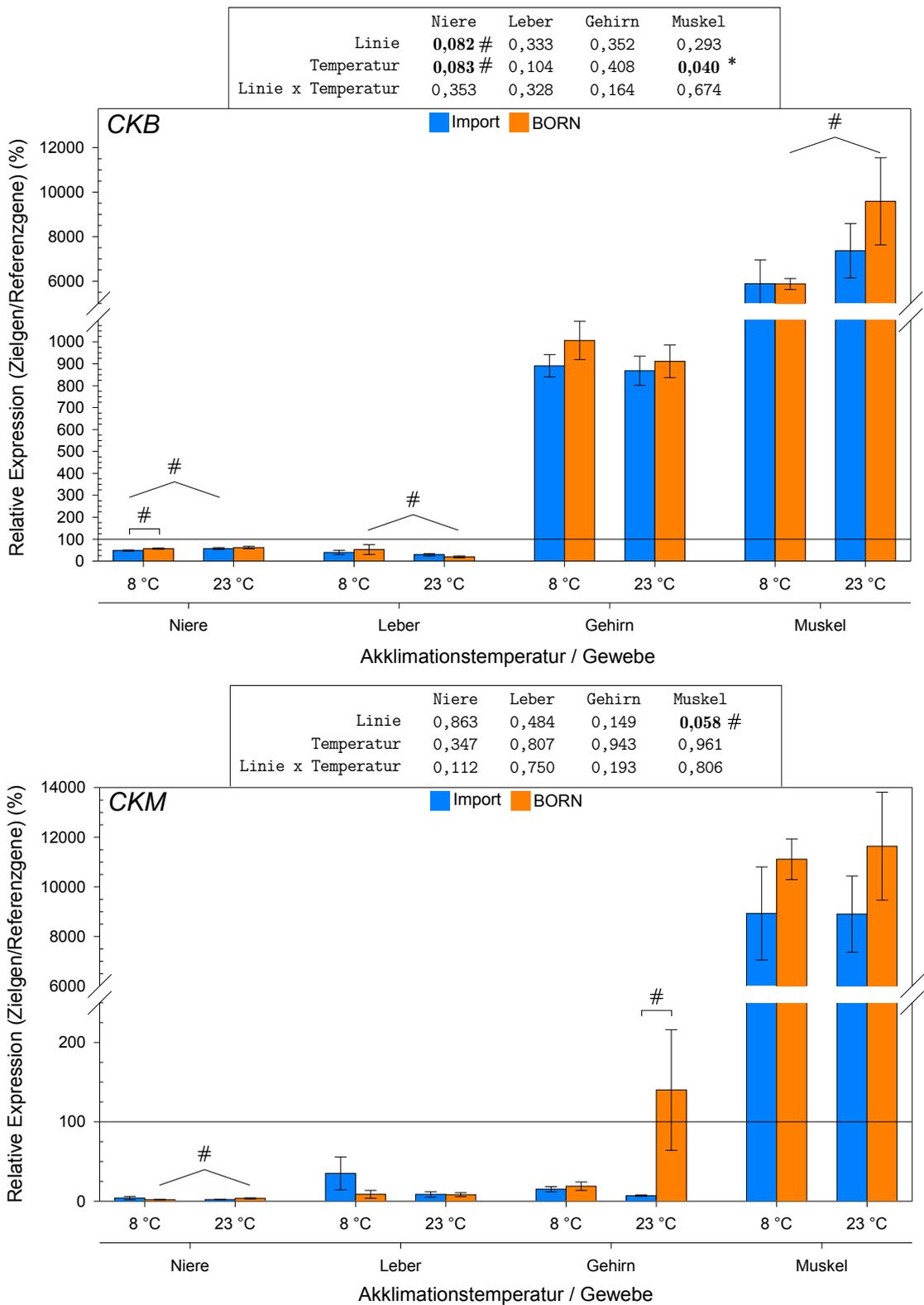
Forellen nahezu doppelt so stark exprimiert wie in BORN-Forellen (60,7% vs. 35,9%;  $p=0,042$ ).

Das Niveau, auf welchem das den Kreatintransporter codierende Gen *SLC6A8* (Abb. 3.21) exprimiert wurde, lag deutlich unterhalb den Expressionsniveaus der in der Kreatinsynthese involvierten Gene. Die maximale Expression mit ca. 9% wurde im Muskel von an 23 °C akklimierten BORN-Forellen beobachtet. In der Leber lag der maximale mittlere Wert bei 8%, im Gehirn bei 5% und in der Niere bei 1%. Die durchgeführte Varianzanalyse ermittelte die Akklimationstemperatur als sich signifikant auf die *SLC6A8*-Expression in der Niere auswirkenden Effekt ( $p=0,020$ ). Die Nieren von an 8 °C akklimierten Tieren, gleich welcher Linie, exprimierten *SLC6A8* stärker als an 23 °C akklimierte Tiere (über beide Linien gemittelt; 10,1% vs. 7,3%). In den anderen untersuchten Geweben gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien oder Akklimationstemperaturen.

Abb. 3.22 zeigt die Genexpressionsprofile der beiden für Kreatinkinasen codierenden Gene *CKB* und *CKM*. *CKB* wurde nur in geringem Umfang in der Niere und Leber exprimiert. Die Werte lagen zwischen 20 (Leber, BORN, 23 °C) und 61 %



**Abb. 3.21: Genexpression des einen Kreatintransporter codierenden Gens *SLC6A8***  
Gezeigt ist die relative Genexpression bezogen auf das geometrische Mittel der Referenzgene. Werte sind MW  $\pm$  SEM; Oberhalb gezeigt sind die Ergebnisse der für jedes Organ einzeln durchgeführten zweifaktoriellen Varianzanalysen. (n=8)



**Abb. 3.22: Genexpression der Kreatinkinasen codierenden Gene *CKB* und *CKM***

Gezeigt ist die relative Genexpression bezogen auf das geometrische Mittel der Referenzgene. Werte sind MW ± SEM; Oberhalb gezeigt sind die Ergebnisse der für jedes Organ einzeln durchgeführten zweifaktoriellen Varianzanalysen. (n=8)

(Niere, BORN, 23 °C) relativ zur Expression der Referenzgene. Mehr als 14-mal so große Werte (869-1007 %) wurden im Gehirn erreicht, wobei diese selbst um mehr als das fünffache durch die muskuläre Expression übertroffen wurden. Die stärkste *CKB*-Expression wurde für an 23 °C akklimierte BORN-Forellen im Muskel mit einem Wert von 9585 % gemessen. Gemäß Varianzanalyse gab es in der Niere marginal signifikante Linien- und Akklimationstemperatur-Effekte ( $p=0,082/0,083$ ) bezüglich der *CKB*-Expression. BORN zeigte eine tendenziell höhere renale *CKB*-Expression als Import. Ebenso zeigten die warm akklimierten Tiere eine tendenziell höhere *CKB*-Expression als kalt akklimierte Tiere. Weiterhin wurde im Muskel ein signifikanter Temperatureffekt festgestellt. Auch hier war die *CKB*-Expression tendenziell in warm akklimierten Tieren stärker als in kalt akklimierten Tieren.

*CKM* codiert eine Kreatinkinase vom Muskeltyp. Die *CKM*-Expression ist in Abb. 3.22 (unten) gezeigt. Für dieses Gen war eine gewebespezifische Expression so eindeutig wie für kein anderes der untersuchten Gene. Die *CKM*-Expression war eindeutig im Muskel am höchsten und erreichte die für alle hier untersuchten Gene höchsten Expressionswerte (8903-11641 %). Im Gegensatz dazu lagen die Werte in Niere, Leber und Gehirn zwischen 1 und 35 %, einzige Ausnahme bildete dabei das Gehirn von an 23 °C akklimierten BORN-Forellen, welches einen höheren Wert von 140,1 % aufwies. In diesen Geweben geringer *CKM*-Expression gab es gemäß Varianzanalyse keine Temperatur- oder Linieneffekte. Im Muskel hingegen gab es einen marginal signifikanten Linieneffekt ( $p=0,058$ ). Unbeachtet der Akklimationstemperatur zeigten BORN-Forellen hier eine stärkere *CKM*-Expression als Import-Forellen.

### 3.3.3. Überblick

Für die Regenbogenforelle konnten die kompletten codierenden Sequenzen von *GATM*, *GAMT*, *CKM* und einem *SLC6A8*-Kandidaten ermittelt werden. Die grundsätzlichen Expressionsprofile waren ähnlich wie in den anderen Fischen. Die Expression von den zusätzlich gemessenen Genen *SLC6A8* und *CKB* war im Gehirn und Muskel höher als in den anderen Geweben. Sowohl die Akklimationstemperatur der Tiere als auch deren Identität als BORN- oder Import-Forelle nahmen teilweise Einfluss auf die Expression der Gene. Bei an 23 °C akklimierten Tieren waren sowohl *GATM* als auch *GAMT* im Muskel der BORN-Forelle niedriger exprimiert als im Muskel der Import-Forelle.

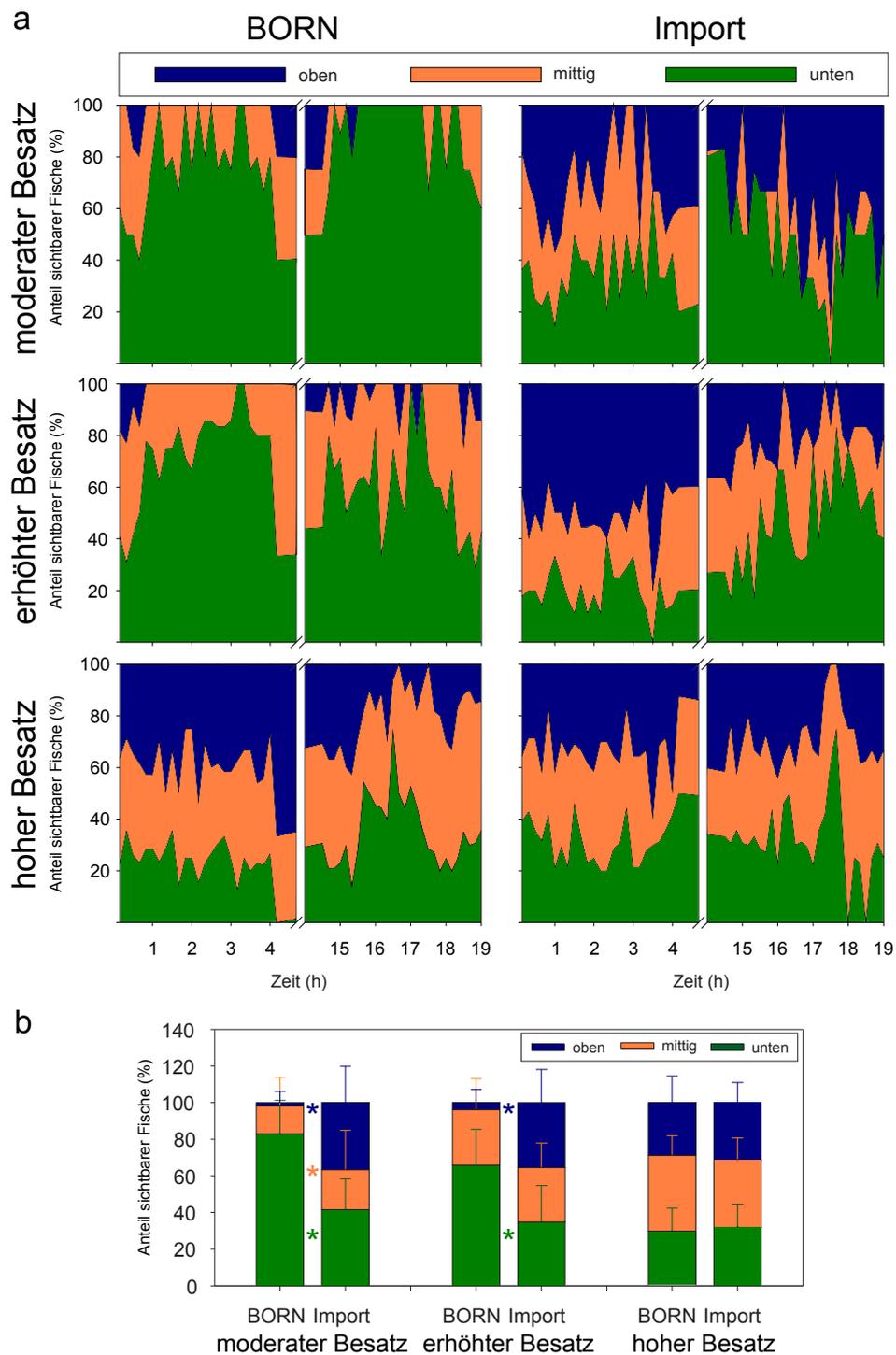
### 3.4. Phänotypische Charakterisierung

Auf genetischer Ebene wurden mehrere Unterschiede zwischen den beiden Forellen-Linien BORN und Import gefunden (vgl. Abschnitte 3.1.3 & 3.3.3). Der Genotyp bedingt zusammen mit der Umwelt den Phänotyp. Wird die Umwelt konstant gehalten, lassen sich Rückschlüsse auf die Auswirkung einer konkreten genetischen Ausprägung auf den Phänotyp ziehen. In dieser Arbeit wurde einerseits die Schwimmtiefe als Verhaltensparameter und potentieller Indikator für Tierwohl, sowie das Wachstum, welches ein für die industrielle Aquakultur sehr wichtiges Merkmal darstellt, untersucht.

#### 3.4.1. Verhalten

In Hinblick auf das Verhalten der beiden Regenbogenforellen-Linien wurde im Rahmen des Besatzdichteversuchs untersucht, inwieweit sich die beiden Linien hinsichtlich ihres vertikalen Aufenthaltsorts in der Wassersäule unterscheiden (Abb. 3.23). Bei moderatem und erhöhtem Besatz waren die beobachteten BORN-Forellen ungleichmäßig in der Wassersäule verteilt. 83 % bzw. 66 % der beobachteten Fische schwammen im untersten Drittel des Beckens, im obersten hingegen nur 2 % bzw. 4 %. Bei moderatem Besatz war der Unterschied zwischen BORN und Import signifikant ( $p < 0,001$  für „oben“ und „unten“,  $p = 0,023$  für „mittig“; Holm-Sidak-Test, nach zweifaktorieller Varianzanalyse mit signifikanten Interaktionen zwischen Linie und Besatzdichte). Bei erhöhtem Besatz lag der Anteil der oben schwimmenden Fische der BORN-Linie signifikant unter dem der Import-Linie, im Gegenzug war der Anteil der unten schwimmenden Fische signifikant erhöht (jeweils  $p < 0,001$ ). Bei hohem Besatz hingegen gab es keine Unterschiede zwischen den Linien und die Anteile lagen jeweils in etwa bei 33 %. Jedoch muss hierzu angemerkt werden, dass bei hohem Besatz die Dichte so hoch war, dass stets der komplette Sichtbereich der Kamera mit Fischen gefüllt war.

Zur Beurteilung der Verhaltensmuster der Tiere erwies sich die Bildqualität der verwendeten Kamera als unzureichend. Eine Auswertung der Aktivitäten der Fische konnte daher nicht vorgenommen werden.



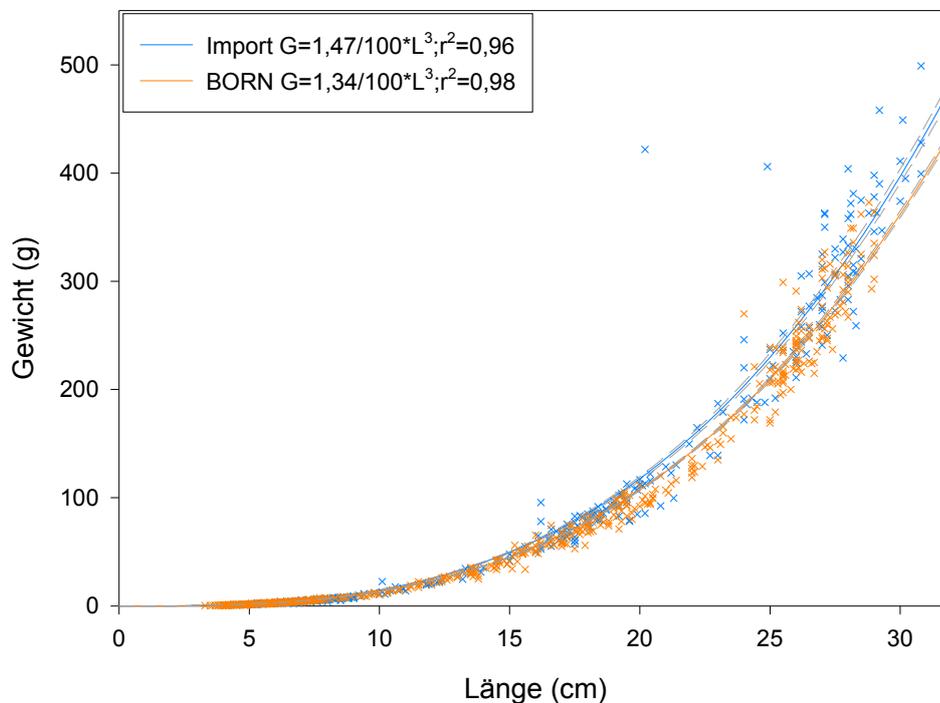
**Abb. 3.23: Vertikale Aufenthaltsbereiche von BORN- und Importforellen**

BORN- sowie Import-Forellen wurden in verschiedenen Besatzdichten (moderat, erhöht, hoch) in videoüberwachte Aquarien umgesetzt. Die vertikale Position aller zu einem Messzeitpunkt sichtbaren Fische innerhalb der Wassersäule wurde ermittelt und der Anteil der Fische, die sich zu einem Zeitpunkt „oben“, „mittig“, oder „unten“ aufhielten aufgetragen (a). Die Verteilung über alle Messzeitpunkte wurde gemittelt und mit Standardabweichung aufgetragen (b). Sternchen markieren dabei signifikante Unterschiede zwischen BORN- und Import-Forelle bei der jeweiligen Besatzdichte. Basis für die zusammengefassten Daten sind jeweils 53 Beobachtungszeitpunkte.

### 3.4.2. Wachstum

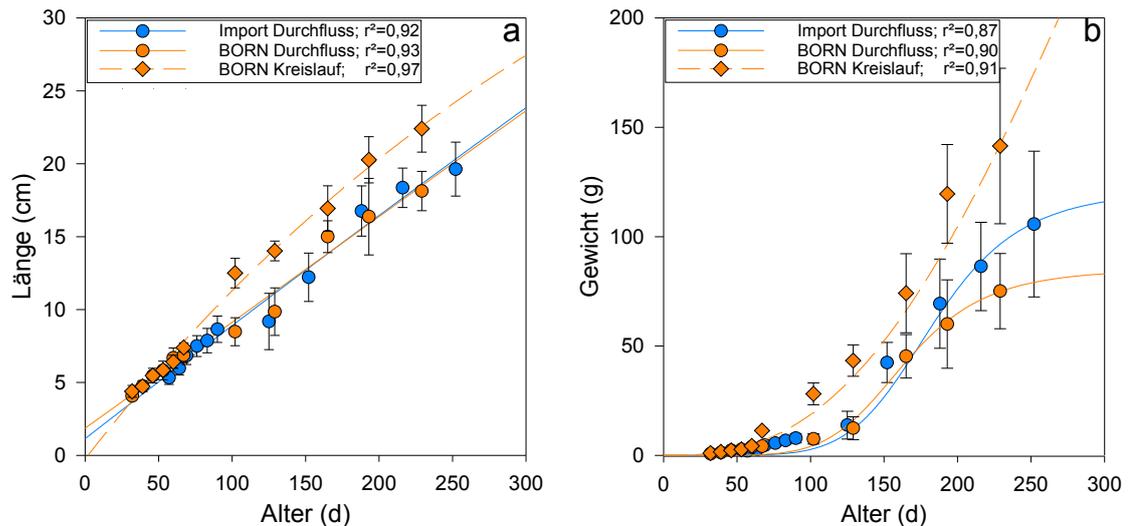
Alle in die verschiedenen Versuche eingehenden Regenbogenforellen der Zuchtlinien BORN und Import wurden gemessen und gewogen. Für jedes Tier wurde der Quotient aus Gewicht und Länge berechnet, ein Standardmaß, das in der Fischereibiologie zur Beurteilung des Fischzustands genutzt wird. Dies ist für BORN- und Import-Forellen in Abb. 3.24 dargestellt. Durch die beiden Datensätze wurden jeweils Regressionen mit der Fulton'schen Formel gelegt. Beide Regressionen unterschieden sich geringfügig. So war die Kurve der Importforellen etwas steiler als die der BORN-Forellen. Die Konfidenzintervalle überlappten dabei ab einer Länge von 15 cm nicht, sodass hier offenbar ein Unterschied vorhanden war. Das Bestimmtheitsmaß war für Import etwas geringer als für BORN (0,96 vs. 0,98). Importforellen wiesen also bei gleicher Länge etwas höhere Gewichte auf als entsprechende BORN-Forellen. Dies wird auch durch den Konditionsfaktor 1,47 für Import und 1,34 für BORN zusammengefasst.

Das Wachstum mit der Zeit ist in Abb. 3.25 gezeigt. Es zeigte sich, dass es zwischen dem Längenwachstum (Abb. 3.25a) von Import- und BORN-Forellen im Durchfluss-System keinen Unterschied gab. Die im aufgereinigten, kontrollierten



**Abb. 3.24:** Verhältnis von Gewicht und Länge von BORN- und Importforellen

Es wurden Gewicht (G) und Gesamtlänge (L) von 404 Import- und 594 BORN-Forellen ermittelt und gegeneinander aufgetragen. Durch die Daten wurde jeweils eine Regression mit der Fulton'schen Formel gelegt, deren 95% Konfidenzintervall grau dargestellt ist.



**Abb. 3.25: Wachstum von BORN- und Import-Forellen in verschiedenen Wasserqualitäten**

In zunächst wöchentlichem, später monatlichem Abstand wurden je 10 BORN- und Import-Forellen, die in Durchfluss- (natürliches Brackwasser, keine Kontrolle der Umweltparameter) oder Kreislauf-Anlagen (aufgereinigtes Brackwasser, kontrollierte Umweltparameter) gehalten wurden, gemessen und gewogen. Abb. a zeigt die Länge als  $MW \pm \text{Stabw}$ , wobei die Daten durch die von Bertalanffy-Wachstumsgleichung approximiert wurden. Abb. b zeigt das Gewicht in Abhängigkeit vom Alter. Die Daten wurden mit Hilfe einer logistischen Gleichung approximiert.

Brackwasser des Kreislauf-Systems kultivierten BORN-Forellen wuchsen jedoch deutlich schneller. An Tag 225 nach Schlupf, dem letzten Termin an dem für beide Linien tatsächliche Messdaten vorlagen, waren im aufgereinigten Brackwasser kultivierte BORN-Forellen beispielsweise 3,9 cm länger als die im Durchflussbecken gehaltenen BORN-Forellen, was einem um 17,5 % vermindertem Wachstum der Durchfluss-Tiere entspricht. Bezüglich des Gewichts (Abb. 3.25b) wuchsen die im Kreislauf-System kultivierten BORN-Forellen ebenfalls am schnellsten. Im Durchfluss-System legte die Importforelle ab Tag 200 stärker an Gewicht zu als die BORN-Forelle. An Tag 225 hatten die im Brackwasser-Durchfluss-System kultivierten BORN-Forellen lediglich 54 % des Gewichts der im geschlossenen System, mit aufgereinigtem Wasser kultivierten BORN-Forellen erreicht und 78,3 % des Gewichts der entsprechend gehaltenen Import-Forellen. Gemäß der logistischen Regression war für die Kreislauf-Tiere noch kein Ende der Gewichtszunahme zu erkennen, wohingegen für die Durchfluss-Tiere bereits eine Abnahme der Gewichtszunahme erkannt wurde. Die Sicherheit für die Vorhersage ab Tag 250 war daher für die Durchfluss-Tiere deutlich höher als für die Kreislauf-Tiere.

### 3.4.3. Überblick

Import- und BORN-Forellen unterschieden sich in ihrem Phänotyp hinsichtlich beider untersuchten Parameter. Sie zeigten ein unterschiedliches Verhalten, indem sie in unterschiedlichen Wassertiefen ihrer Aquarien schwammen. BORN-Forellen hielten sich in der Mehrheit am Beckengrund auf, während sich Import-Forellen im Becken verteilten. Außerdem zeigten sie ein unterschiedliches Wachstum. Import-Forellen wiesen bei der gleichen Körperlänge ein höheres Körpergewicht als BORN-Forellen auf.

### 3.5. Ergebnisüberblick

Auf den verschiedenen untersuchten Ebenen konnten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Forellenzuchtlinien BORN und Import ausgemacht werden. Die holistische Transkriptomanalyse identifizierte die Gene *CEPT1A*, *GIMAP7*, *RARRES3*, *TPM1A* als differenzial zwischen beiden Linien exprimiert. Bei der Untersuchung des Kreatinsystems konnte gezeigt werden, dass sich das Kreatinsystem der Fische von dem der Säugetiere hinsichtlich der Expression relevanter Gene unterscheidet. Auch gab es teilweise Unterschiede in der Expression von Kreatinogenen zwischen BORN- und Import-Forellen. Auch auf Phänotypebene wurden Unterschiede zwischen BORN- und Import-Forelle gefunden. Die beiden Zuchtlinien differierten in ihrem Verhalten und Wachstum.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Charakterisierung der beiden Forellenzuchtlinien BORN und Import. Die BORN-Forelle gilt als besonders robust und es sollte auf Genebene nach möglichen strukturellen und funktionellen Ursachen hierfür gesucht werden. Außerdem sollten mögliche Auswirkungen der Langzeitselektion mit Zuchtziel auf Überleben im Brackwasser auf den Phänotyp untersucht werden.

### 4.1. Grundlegender Zuchtlinien-Vergleich

#### **BORN- und Import-Forelle zeigen unterschiedliche Gen-Expression**

Anhand der Auswertung holistischer Transkriptomanalysen basierend auf DNA-Chips, die aus drei verschiedenen Experimenten stammten, konnten Gene identifiziert werden, welche unter allen untersuchten Bedingungen zwischen Import- und BORN-Forelle different exprimiert waren (Abb. 4.1). In den untersuchten Geweben (Niere, Leber, Kieme und Milz) wurden jeweils mehr als 200 Gene identifiziert, die eine solch differente Expression aufwiesen. Es gab jedoch deutlich weniger Gene, die in allen Geweben gleichzeitig different exprimiert waren. Dies war auch zu erwarten, da viele Gene gewebespezifisch exprimiert werden (XIAO *et al.*, 2010). Diese Gene würden in der weiteren Analyse also nicht erfasst.

Von den 35 in den vier Geweben different exprimierten Genen konnten nur 14 eindeutig annotiert werden; auch für die in nur einzelnen Geweben different exprimierten Gene bestand das gleiche Problem. Dies weist auf ein grundsätzliches Problem des verwendeten DNA-Chip-Typs hin. Viele Sonden dieses Chips wurden auf Basis von Lachssequenzen abgeleitet. Zwar sind Lachs und Forelle nahe verwandt und weisen für die meisten Gene hohe Sequenzhomologien auf, jedoch können schon geringe Abweichungen in der Basensequenz die Hybridisierung erschweren (LETOWSKI *et al.*, 2004). Weiterhin basieren viele auf dem Chip eingesetzte Sonden auf EST-Sequenzen, die selber noch nicht funktionell annotiert worden sind. Sinnvolle Informationen können jedoch nur aus annotierten Sonden gewonnen werden.

Nur vier von den vierzehn Genen mit eindeutig annotierbarer Sonde bestätigten ihre differente Expression in der Mikrofluid-Chip-basierten qRT-PCR. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zunächst ist festzuhalten, dass bei der Mikrofluid-Chip-basierten Echtzeit-PCR teilweise andere Proben verwendet wurden als auf



Gruppen eingestuft worden wäre. Grundsätzlich erscheint es daher auch möglich, Ergebnisse, die auf Grundlage beider Systeme gemessen wurden, unter Verwendung gleicher Referenzgene direkt miteinander in Beziehung zu setzen. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits zuvor durch Mitarbeiter des Mikrofluid-System-Herstellers postulierte hohe Korrelation von Mikrofluid-Chip-basierter und „klassischer“ qRT-PCR (SPURGEON *et al.*, 2008).

Insgesamt vier Gene zeigten gemäß allen Filterungs- und Verifizierungsvoraussetzungen eine differente Expression mit einem mindestens zweifachen Unterschied zwischen BORN- und Import-Forellen. Sie wurden in den untersuchten Geweben Niere, Leber, Kieme und Milz unter allen Bedingungen stets different exprimiert. Für diese gewebeübergreifende, dauerhaft feststellbare differente Expression kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht.

Denkbar wäre, dass es im codierenden Bereich der Gene zu Mutationen gekommen ist, welche sich auf die Funktionsfähigkeit des codierten Proteins auswirken. Eine direkte Kontrolle der Genexpression durch das selbst erstellte Protein wird autogene Regulation genannt (MALOY UND STEWART, 1993). Davon zu unterscheiden ist eine indirekte Beeinflussung der Genexpression durch ein verändertes Protein (GOLDBERGER, 1974). Beispielsweise reicht schon ein einziger Aminosäureaustausch an einer entscheidenden Position dazu aus, die Michaeliskonstante – ein Maß der Substrataffinität – von Transportproteinen sehr stark zu beeinflussen (vgl. TZUBERY *et al.*, 2004). Über *feedback*-Schleifen könnte ein besonders ineffektives Protein vermehrt synthetisiert werden, um diesen Mangel auszugleichen. Dies würde sich dann in einer entsprechend erhöhten mRNA-Konzentration zeigen. Selbst synonyme Mutationen in der codierenden Region können – insbesondere durch Beeinflussung der mRNA-Stabilität – einen Einfluss auf Gen- und Proteinexpression nehmen (vgl. KUDLA *et al.*, 2009).

Eine weitere mögliche Ursache für die gewebeübergreifend differente Expression wäre die Mutation eines Transkriptionsfaktors. Transkriptionsfaktoren binden an Gen-Promotoren und modulieren so die Transkription des jeweiligen Gens. Im menschlichen Genom sind mehr als 2000 verschiedene Transkriptionsfaktoren codiert (BRIVANLOU UND DARNELL, 2002). Diese Erklärung erscheint jedoch unwahrscheinlich, zumal Transkriptionsfaktoren im Allgemeinen eine Vielzahl von Zielen aufweisen. In der Chip-X-Datenbank, einer Datenbank über Transkriptionsfaktoren und ihre Zielgene, wurden beispielsweise für 92 Transkriptionsfaktoren 31932 Zielgene hinterlegt (LACHMANN *et al.*, 2010). Daher wäre bei einer deutlichen Veränderung eines einzelnen Transkriptionsfaktors mit ausgeprägteren als den gefundenen Effekten zu rechnen. Vermutlich dürften wesentlich mehr Gene eine

stark veränderte Genexpression aufweisen. Wahrscheinlicher dürfte die Möglichkeit sein, dass der Promotor der betroffenen Gene selbst verändert ist. Weist dieser eine Mutation auf, kann sich die Affinität der bindenden Transkriptionsfaktoren verändern (VOOGHT *et al.*, 2009). Durch die verringerte Induktion des Promotors wird das Gen letztlich seltener abgelesen und weist eine geringere Genexpression auf (vgl. ZANTE *et al.*, 2015).

Ungeachtet der möglichen Ursachen konnten insgesamt vier Gene nachgewiesen werden, die unter den acht untersuchten Bedingungen Linieneffekte zeigten. *CEPT1A* und *GIMAP7* waren stärker in der BORN-Forelle exprimiert als in der Import-Forelle, wohingegen *RARRES3* und *TPM1A* stärker in der Import-Forelle exprimiert waren.

Beide Fischlinien unterschieden sich in ihrer Populationsstruktur: Die BORN-Population war gemischtgeschlechtlich, die Import-Population bestand hingegen nur aus Weibchen. Daher bestand die Möglichkeit, dass die beobachteten Unterschiede weniger auf die Forellenslinie, sondern viel mehr auf das Geschlecht der Fische zurückzuführen waren. Für Fruchtfliegen wurde beispielsweise ein bedeutender Anteil an geschlechtsabhängig regulierten Genen am Gesamttranskriptom festgestellt (RANZ *et al.*, 2003). Für die in dieser Arbeit identifizierten Gene konnte dies aber weitestgehend ausgeschlossen werden. Drei der vier Gene zeigten keinerlei Unterschied zwischen den Geschlechtern, sodass die Unterschiede hier auf die Zugehörigkeit zur jeweiligen Forellen-Linie zurückgeführt wurden. Nur für *CEPT1A* wurde eine signifikant höhere Expression bei BORN-Männchen als bei BORN-Weibchen gefunden. Der Unterschied war mit einem Faktor von 1,6 aber verhältnismäßig gering. Der durchschnittliche Unterschied zwischen BORN- und Import-Forellen hinsichtlich der *CEPT1A*-Expression betrug 2,2. Der Geschlechtseffekt kann also nur einen Teil der Unterschiede zwischen BORN- und Import erklären, gerade wenn dabei bedacht wird, dass lediglich ca. 50% der BORN-Forellen Männchen waren. So ist davon auszugehen, dass der Linieneffekt für dieses Gen deutlich stärker wiegt als der Geschlechtseffekt.

### **Die different exprimierten Gene haben verschiedene Funktionen**

*CEPT1A* wurde in BORN-Forellen stärker exprimiert als in Import-Forellen. Das Gen codiert eine Cholin-/Ethanolamin-Phosphotransferase. Diese synthetisiert Phosphatidylcholine sowie Phosphatidylethanolamine (WRIGHT UND MCMASTER, 2002) und ist somit relevant für die Biomembran-Synthese. Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine sind in Eukaryoten die beiden wichtigsten Phos-

pholipide und machen gemeinsam ca. 75 % der gesamten Phospholipid-Masse einer Zelle aus (HENNEBERRY *et al.*, 2002). Beide Phospholipid-Arten werden in einem mehrstufigen Prozess synthetisiert, welcher als *Kennedy-Pathway* bekannt ist (GIBELLINI UND SMITH, 2010). CEPT1 steht am Ende dieses Stoffwechselfads und überträgt Phosphocholin von CDP-Cholin bzw. Phosphoethanolamin von CDP-Ethanolamin auf Diacylglycerin (WRIGHT UND MCMASTER, 2002). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird jedoch durch ein anderes Enzym katalysiert, durch die Cytidylyltransferase (VANCE UND CHOY, 1979). Gleichwohl dürfte auch eine Veränderung der *CEPT1*-Expression Einfluss auf die Membransynthese nehmen.

Auffällig war auch, dass nur eine Variante – *CEPT1A* – nicht aber *CEPT1B* eine stark differente Expression zwischen den Linien zeigte. Für *CEPT1A* lag die Übereinstimmung der Sondensequenz mit der Gensequenz bei 90 % mit 5 % Lücken, für *CEPT1B* bei 81 % Identität mit 12 % Lücken. Es ist daher nicht ganz klar, ob die Sonde nur *CEPT1A* mit der höheren Übereinstimmung gemessen hat, oder ob auch *CEPT1B* gebunden wurde. Eine solche potenzielle Unspezifität der DNA-Chips ist ein grundsätzliches Problem, denn wenn mehrere Varianten eines Gens existieren, aber nur eine davon beispielsweise eine Mutation im Promotor aufweist, die die Expressionsrate verändert, werden durch die Sonde beide Gene zugleich gemessen, sodass die Expressionsveränderung der einen Variante unter Umständen unbemerkt bleibt.

Der Befund, dass nur eine *CEPT1*-Variante different zwischen den Forellen-Linien exprimiert wird, deutet darauf hin, dass dieser Expressionsunterschied vermutlich durch eine Mutation in einer der Forellen-Linien in einer der *CEPT1*-Varianten verursacht wird. Eine Mutation in einem Transkriptionsfaktor erscheint unwahrscheinlicher, zumal dieser mit hoher Wahrscheinlichkeit bei einer erwarteten hohen Homologie des Promotors beider Varianten sowohl *CEPT1A* als auch *CEPT1B* beeinflussen dürfte und deren Expression somit gleichermaßen modifizieren würde.

Das zweite in BORN-Forellen stärker exprimierte Gen ist *GIMAP7*, welches eine GTPase vom IMAP-Typ (*immunity-associated protein*) codiert. Diese Familie reguliert Überleben und Homöostase von Lymphozyten durch die Regulation der Apoptose (SCHWEFEL *et al.*, 2013). Intrazellulär ist *GIMAP7* in Fetttropfchen (*lipid droplets*) lokalisiert, wo es Dimere bildet, wodurch die GTPase-Aktivität stimuliert wird (SCHWEFEL *et al.*, 2013). Außerdem kann *GIMAP7* die Funktion von anderen Mitgliedern der *GIMAP*-Familie beeinflussen. Da die Expression von Mitgliedern der *GIMAP*-Familie vor allem in Immunzellen auftritt und gesamte Organe mit gemischten Zellpopulationen in den Versuchen dieser Arbeit eingesetzt

wurden, kann nicht überprüft werden, ob tatsächlich eine andere Genexpression vorlag, oder ob sich die Zelltypzusammensetzung in den verschiedenen Organen von BORN- und Import-Forellen jeweils unterschied (vgl. MORALEJO *et al.*, 2011). Hier müsste genau die Zellpopulation untersucht werden und mittels Zellsortierung Aufschluss darüber gewonnen werden, inwieweit sich die Gewebe von BORN- und Import-Forellen hinsichtlich ihrer Zelltypzusammensetzung unterscheiden.

*RARRES3* zeigte eine stärkere Expression in Import-Forellen als in BORN-Forellen. Es codiert einen Retinsäure-Rezeptor-Responder und ist auch als *TIG3* (Tazaroten-induziertes Gen 3) oder *RIG1* (Retinoid-induzierbares Gen 1) bekannt. Es handelt sich um einen Tumor-Suppressor, dessen Expression in Tumoren reduziert ist und dem daher eine Rolle in der Krebsentstehung zugeschrieben wird (SCHARADIN *et al.*, 2011). Es wurde postuliert, dass die Expression von *RARRES3* durch Reorganisation des Zytoskeletts zur Induktion von apoptotischen Prozessen führt (SCHARADIN *et al.*, 2011). Im Menschen wird es in verschiedenen Geweben wie Niere, Leber und Lunge exprimiert (HUANG *et al.*, 2000). Es könnte weiterhin für den wachstumshemmenden Effekt von Retinoiden verantwortlich sein (DISEPIO *et al.*, 1998).

Als viertes different exprimiertes Gen wurde *TPM1A* in Import-Forellen stets stärker exprimiert als in BORN-Forellen. *TPM1A* codiert für eine Variante der  $\alpha$ -Kette von Tropomyosin. Tropomyosin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts. Es besteht aus mehreren Aktin-bindenden Proteinen. In Muskeln ist es an der Regulation der Muskelkontraktion beteiligt (SPUDICH UND WATT, 1971), doch auch in nicht-muskulären Geweben spielt es eine wichtige Rolle (PITTENGER *et al.*, 1994). In verschiedenen Zellarten werden spezifische Isoformen synthetisiert, deren Vielfalt durch mehrere Genkopien sowie alternatives Spleißen ermöglicht wird (LEES-MILLER UND HELFMAN, 1991). Im Menschen sind gestörte Tropomyosine an der Entstehung von Krankheiten beteiligt (GUNNING *et al.*, 2008). Auch für dieses Gen zeigte nur eine Variante eine differente Expression zwischen Import- und BORN-Forellen. Es wäre daher denkbar, dass beide Forellenlinien ein unterschiedliches Tropomyosin-Isoformen-Profil aufweisen.

Die vier gefundenen different regulierten Gene sind also an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt, darunter ein katalytisch wirkendes Stoffwechsel-Enzym (*CEPT1A*) und ein Zytoskelettbestandteil (*TPM1A*). Hieraus lassen sich somit schwerlich grundsätzliche Rückschlüsse auf die Unterschiede zwischen beiden Linien ziehen. Dennoch können diese Gene sich durchaus durch Interaktion mit anderen Genen auf vielfältige Weise auswirken. Grundsätzlich zeigt die differente Expression dieser Gene aber, dass es genetisch manifestierte Unterschiede zwischen

beiden Zuchtformen gibt. Darüber hinaus kommen die vier identifizierten Gene als potenzielle Biomarker in Betracht. Es wäre möglich, dass bei einer Messung der vier Gene Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob es sich bei einem beprobten Tier ungewisser Linienzugehörigkeit um eine Import- oder BORN-Forelle handelt. Weiterhin könnten diese Gene Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen bieten, beispielsweise um zu prüfen, ob es eine Assoziation zwischen Veränderungen in diesen Genen und der Robustheit der Tiere gibt, ob also diese Gene tatsächlich zur Robustheit der BORN-Forelle beitragen.

In den bisherigen Untersuchungen, welche BORN- und Import-Forelle miteinander vergleichen (Tab. 1.2 auf Seite 5), wurden die hier gefundenen different regulierten Gene nicht erwähnt. Jedoch war die Konzeption jener holistischen Studien insofern anders, dass stets ein spezifisches Organ meist unter Stresseinfluss untersucht wurde. Es wurde also auf die Veränderung der Genexpression durch den Stressor fokussiert und nachgeordnet auch zwischen den Linien verglichen. In dieser Arbeit hingegen wurden die Stressoreffekte weitestgehend aus den Daten extrahiert, um die Gene zu identifizieren, die unter verschiedensten Bedingungen zwischen beiden Linien different exprimiert sind, also auch unter normalen Bedingungen ohne definierten Stressor. Es ist gut möglich, dass in den Stress-Studien an der BORN-Forelle durch den Stress noch stärkere Unterschiede zwischen den Linien gefördert wurden, die dann in der anschließenden Datenanalyse deutlicher waren und so den grundsätzlich vorhandenen Unterschied der hier vorgestellten Kandidatengene überdeckten.

Während die in dieser Arbeit identifizierten Kandidatengene in keiner bisherigen Untersuchung zur BORN-Forelle angesprochen wurden, wurden einige Kandidatengene jener Studien auch in dieser Arbeit als different exprimiert identifiziert. Für das Gen *ISCU* beispielsweise waren zuvor linienspezifische Expressionsmuster für BORN- und Import-Forelle gefunden worden (VERLEIH *et al.*, 2013). Auch die Auswertung der DNA-Chips in dieser Arbeit fand Unterschiede zwischen BORN- und Import-Forellen hinsichtlich der *ISCU*-Expression in Milz und Niere. Weiterhin waren Unterschiede zwischen den beiden Zuchtlinien hinsichtlich des Komplementsystems gefunden worden (KÖBIS *et al.*, 2015). Auch in dieser Arbeit wurden Unterschiede in der Expression von *C1QL2* und *C1QL4*, Genen die mit dem Komplementsystem in Verbindung stehen, in der Leber – dem wichtigsten Ort der Komplementexpression in Regenbogenforellen (KÖBIS *et al.*, 2015) – gefunden. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit stehen also nicht im Widerspruch zu bisherigen Arbeiten an der BORN-Forelle, sondern bestätigen sie teilweise und erweitern sie darüber hinaus.

Insgesamt zeigen die hier durchgeführten Analysen auch, dass es offenbar eine genetische Auseinanderentwicklung der BORN- und Import-Forelle gab. Im Jahr 1975 wurde die Zucht der BORN-Forelle begonnen (ANDERS, 1986). Elterntiere waren *Steelhead*-Forellen, wie sie auch die Import-Forellen sind. Auf evolutionärer Basis sind 40 Jahre eine sehr kurze Zeit. Bei einer angenommenen Geschlechtsreife von Weibchen zwischen drei und vier Jahren (KAUSE *et al.*, 2003), sind so maximal 13 Generationen zur Anpassung möglich. Auf der anderen Seite konnte am Lachs gezeigt werden, dass Kultivierung unter Aquakulturbedingungen schon in einer Generation zu genetischer Adaptation führen kann (CHRISTIE *et al.*, 2012). Die kurze Periode von 40 Jahren scheint ausgereicht zu haben, dass sich die BORN-Population von anderen Forellenlinien genetisch entfernt hat. Auch wenn in dieser Arbeit lediglich die Genexpression verglichen wurde, ist davon auszugehen, dass bei der Analyse der grundlegenden Gene Unterschiede in der Basenfolge, also durch Mutationen verursachte SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) zu beobachten sind, welche diese Expressionsunterschiede erklären können. Es bleibt fraglich, zu welchem Anteil Selektion für die Unterschiede verantwortlich ist, und wie groß der Anteil der Gendrift ist. Als sich zu Beginn der Zucht ein großer Teil der eingesetzten Tiere unter den Umweltbedingungen der Ostsee als nicht überlebensfähig erwies und sich daher auch nicht vermehren konnte, ist sicherlich ein großer Teil der genetischen Diversität verloren gegangen. Es ist davon auszugehen dass der Flaschenhalseffekt eine große Rolle bei der Entwicklung der BORN-Forellen-Linien gespielt hat. Eine Untersuchung der genetischen Diversität dieser Forellenlinie und ihr Vergleich mit anderen Forellenlinien und auch mit natürlichen Populationen dürften weitere Informationen über die Entwicklung der BORN-Forelle liefern.

## 4.2. Kreatinsystem

Es gab Hinweise, dass differente Energiehaushalte mit ein Auslöser für die differente Robustheit der Forellenlinien BORN und Import sein könnten. Von KÖBIS *et al.* (2013) wird beispielsweise ein „Energiesparmodus der Genexpression“ der BORN-Forelle in der Milz postuliert. Das Kreatinsystem rückte weiter in den Fokus, zumal das Gen *GAMT* in bereits vorhandenen Daten älterer Versuche öfter als different reguliert zwischen den Linien identifiziert wurde. Auch in der holistischen Transkriptomanalyse dieser Arbeit wurde *GAMT* als different exprimiert in der Leber, dem Organ, in dem es im Säuger besonders wichtig ist (WYSS UND KADDURAH-DAOUK, 2000), identifiziert. Da das andere Gen des Kreatinsynthese-Stoffwechselwegs, *GATM*, durch keine Sonde auf den DNA-Chips

repräsentiert wurde, mussten andere Methoden zu dessen Messung angewendet werden. Die Untersuchungen zum Kreatinsystem der Regenbogenforellen wurden bereits in BORCHEL *et al.* (2014, Anhang I auf Seite 137) vorab publiziert; die folgenden Ausführungen basieren weitestgehend darauf. Da das Kreatinsystem von Fischen insgesamt bisher wenig Beachtung gefunden hatte (nur zwei bekannte Studien; WANG *et al.*, 2007, 2010) und so wenige Informationen vorlagen, wurde es zunächst grundlegend charakterisiert.

### Das Kreatinsystem ähnelt sich in vielen Fischarten

In insgesamt fünf verschiedenen Fischarten (Flussbarsch, Hering, Regenbogenforelle, Ostseeschnäpel, Zander) konnten zumindest Teilstücke der DNA-Sequenz, der Kreatin synthetisierenden Gene *GATM* und *GAMT* sowie des Kreatin nutzenden Gens *CKM* isoliert und sequenziert werden. Es konnten Primer abgeleitet werden, die für alle diese mehr oder weniger verwandten Fischarten funktionsfähig waren. Auch in den untersuchten anderen Tierarten konnte mit Hilfe von Sequenzalignments genau diese Position gefunden werden, in der der Primer bei den Fischsequenzen bindet. Dies deutet auf eine hohe Konservierung der im Kreatinsystem involvierten Gene hin. Eine solch hohe Konservierung ist dabei auch ein Hinweis auf die große Bedeutung dieser Gene. Evolutionär ist das Kreatinsystem alt und wird selbst schon von Schwämmen genutzt (ELLINGTON, 2000; ELLINGTON UND SUZUKI, 2007).

In der Forelle wurde zusätzlich ein Gen, das dem Gen für den Kreatintransporter *SLC6A8* ähnelt, als Teil des Kreatinsystems identifiziert und erstmalig eine Sequenz für dieses Gen in einem Salmoniden abgeleitet. Vieles spricht dafür, dass es sich bei dem identifizierten Gen wirklich um *SLC6A8* handelt. Bei der Suche nach vergleichbaren Sequenzen wurden als beste Treffer stets andere *SLC6A8*-Sequenzen gelistet, auch wenn der Unterschied der Sequenzen mit ca. 20% recht hoch war. Dafür konnte anhand der abgeleiteten Proteinsequenz die Struktur des Proteins vorhergesagt werden. Es soll zwölf Transmembrandomänen aufweisen, was typisch für Mitglieder der *SLC6*-Familie, einer Familie von Transportproteinen, ist (KRISTENSEN *et al.*, 2011). Gleiches gilt für eine große extrazelluläre glykosylierte Schleife zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 (CHEN *et al.*, 2004), was für das hypothetische Protein ebenfalls vorhergesagt wurde. Durch die Erzeugung eines GFP-Fusionsproteins konnte die zelluläre Lokalisation als Membranbestandteil bestätigt werden. Grüne Signale waren eindeutig der Membran zuzuordnen. Überraschend war, dass trotz der eindeutigen Membran-Lokalisierung durch die

einschlägigen Tools kein Signalpeptid in der Proteinsequenz erkannt werden konnte. Das gleiche traf jedoch auch auf den menschlichen Kreatintransporter zu. Es scheint sich daher eher um ein Problem bei den Vorhersage-Algorithmen zu handeln.

Alle durchgeführten Tests deuten also darauf hin, dass es sich bei dem identifizierten Gen um *SLC6A8* handeln könnte. Insbesondere die Mitgliedschaft zur SLC6-Familie scheint sicher. Da jedoch große Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Familie besteht und insbesondere der Taurintransporter sehr ähnlich ist (CHEN *et al.*, 2004), ist die Bestätigung als Kreatintransporter noch nötig. Jedoch unterscheiden sich Kreatintransporter (*SLC6A8*) und Taurintransporter (*SLC6A6*) vor allem in den Transmembrandomänen 9, 10 und 11 (CHEN *et al.*, 2004). In diesen Bereichen wurde jedoch kaum eine Abweichung des Kandidatengens von Kreatintransportern anderer Spezies festgestellt. Dies deutet also auf eine tatsächliche Funktion als Kreatintransporter hin. Um den letzten Nachweis zu erbringen, steht eine funktionale Charakterisierung des codierten Proteins – zum Beispiel im Zellmodell unter Messung der Kreatintransportleistung – noch aus.

### **Fische produzieren Kreatin im Muskel**

Man geht davon aus, dass in Säugetieren eine recht strikte Trennung zwischen Kreatinproduktion und -nutzung vorliegt. Guanidinoacetat wird vorwiegend in der Niere hergestellt, dann in die Leber verbracht und dort zu Kreatin weiterverarbeitet und wird dann letztlich in die Zielgewebe mittels eines spezifischen Transporters transportiert (WYSS UND KADDURAH-DAOUK, 2000). Dies konnte in den Messungen der Genexpression in der Maus bestätigt werden. *GATM* wies die höchste Expression in der Niere auf, *GAMT* in der Leber. In den verschiedenen untersuchten Fischarten konnte diese Gewebeverteilung jedoch nicht bestätigt werden, obwohl die Sequenzen der entsprechenden Gene eine starke Konservierung zu den Säugetierhomologen zeigten. Im Gegensatz zur Erwartung wurden sowohl *GATM*, als erstes Enzym der Kreatinsynthese, als auch *GAMT*, als zweites, sehr stark im Skelettmuskel der Fische exprimiert. Dies legt eine muskuläre Kreatinsynthese nahe, zumal eine Expression dieser Gene ohne entsprechende Funktion unnötige Kosten für den Organismus verursachen würde. Andere Studien berichten hingegen, dass im tierischen Skelettmuskel keine oder kaum Kreatinsynthese stattfindet (WYSS UND KADDURAH-DAOUK, 2000; MCFARLANE *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 1994). Die gefundenen Unterschiede zwischen Fischen und Säugern könnten dabei im Zusammenhang damit stehen, dass auch die Kreatingehalte der Muskeln zwischen Fischen und Säugern differieren. Der Kreatingehalt von Fischmuskeln

liegt über dem von Säuger-Muskeln (HUNTER, 1929). Möglicherweise ist es energetisch vorteilhaft, solch hohe Kreatinkonzentrationen an Ort und Stelle herzustellen, anstatt das Kreatin in einem aufwändigen Prozess durch den ganzen Körper zu transportieren. Ursächlich für die unterschiedlichen Kreatinkonzentrationen könnten die Unterschiede im lokomotorischen Antrieb von Fisch und Säuger sein. Es gibt jedoch einige Hinweise, dass auch im Säuger zumindest in gewissen Maßen eine Kreatinsynthese im Skelettmuskel stattfindet. DALY (1985) fand beispielsweise im Skelettmuskel der Ratte eine Aktivität von GAMT, die 10 - 20 % der hepatischen Aktivität erreichte. SCHMIDT *et al.* (2004) fanden eine hohe Expression von GAMT-mRNA und -Protein in den Muskeln von Mäusen und Menschen. In einem Patienten, der keine Kreatintransporter synthetisieren konnte, fanden DEGRAUW *et al.* (2003) Kreatin und Kreatinphosphat in seinen Muskeln. Dies könnte auf eine muskuläre Kreatinsynthese hindeuten. Auch MCCLURE *et al.* (2007) schlug eine muskuläre Kreatinsynthese im Mäusemuskel vor. Eine neue Studie von RUSSELL *et al.* (2014) konnte ebenso zeigen, dass Kreatintransporter-defiziente Mäuse in der Lage sind, in geringem Umfang Kreatin im Skelettmuskel zu synthetisieren. Jedoch konnte das Kreatinniveau von gesunden Mäusen allein durch die muskuläre Kreatinsynthese nicht erreicht werden (RUSSELL *et al.*, 2014). Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse zeigten ebenfalls eine muskuläre Expression von *GATM* und *GAMT*. Das Niveau lag um Größenordnungen niedriger als in Niere bzw. Leber, aber dennoch waren die entsprechenden Transkripte nachweisbar.

Gleichwohl wurde der Kreatintransporter *SLC6A8* in den Muskeln der Regenbogenforelle im gleichen Umfang exprimiert wie in den anderen untersuchten Geweben, was auf einen potentiellen Kreatinimport in den Muskel hindeutet. Weiterhin wäre es möglich, dass unterschiedliche muskuläre Zellen der Forelle unterschiedliche Expressionsmuster von *GATM*, *GAMT* und *SLC6A8* zeigen. Dies konnte beispielsweise im Gehirn von Ratten gezeigt werden (BRAISSANT UND HENRY, 2008). Dort existieren Zellen, die in ganz unterschiedlichem Ausmaß diese Gene exprimieren. Einige Zellen exprimieren keins dieser Gene, andere alle drei und wiederum andere nur eins oder zwei. So könnte auch ein Transport von Kreatin zwischen den verschiedenen Zelltypen nötig werden.

Insgesamt scheint der Muskel der Fische einen bedeutenden Anteil an der Kreatinproduktion auszumachen, andernfalls wären die Gene für die Kreatin synthetisierenden Enzyme sicherlich nicht so stark in diesem Gewebe exprimiert. Dabei scheinen sowohl weißer als auch roter Muskel für die Kreatinsynthese wichtig zu sein, denn zumindest im Schnäpel war der Unterschied zwischen beiden Muskeltypen im Vergleich zu den anderen Muskeltypen nur recht geringfügig. Weiterhin

zeigte die semiquantitative PCR an Schnäpel-Proben, dass der Muskel auch im Vergleich zu anderen untersuchten Geweben sehr wichtig für die Kreatinsynthese ist. *GATM* und *GAMT* zeigten in Muskelproben stärkere Banden als in allen neun anderen analysierten Geweben.

Das Gehirn von Säugern scheint nicht komplett auf den Import von Kreatin aus den anderen Geweben angewiesen zu sein. Zusätzlich zum Import existiert eine Kreatinproduktion im Zentralen Nervensystem (ZNS) selbst (BÉARD UND BRAISSANT, 2010). Wie wichtig der Import ins ZNS daher letztlich ist, ist noch umstritten. So gehen OHTSUKI *et al.* (2002) davon aus, dass der Kreatintransporter CT1 „ein bedeutender Pfad ins Gehirn“ für das Kreatin bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke sein könnte. BRAISSANT *et al.* (2010) gehen hingegen von einer „begrenzten Permeabilität“ der Blut-Hirn-Schranke für Kreatin aus, da in Astrocyten, die an den Endothelzellen der Mikrokapillaren des Gehirns anliegen, keine Genexpression des Transporters *SLC6A8* gefunden wurde. Ein aktuellerer Übersichtsartikel fasst die Ergebnisse der Diskussion so zusammen, dass Kreatin in begrenzten Mengen über die Blut-Hirn-Schranke hinweg importiert werden kann, dass das Gehirn aber dennoch auch von einer endogenen Kreatinsynthese abhängig bleibt (BRAISSANT, 2012).

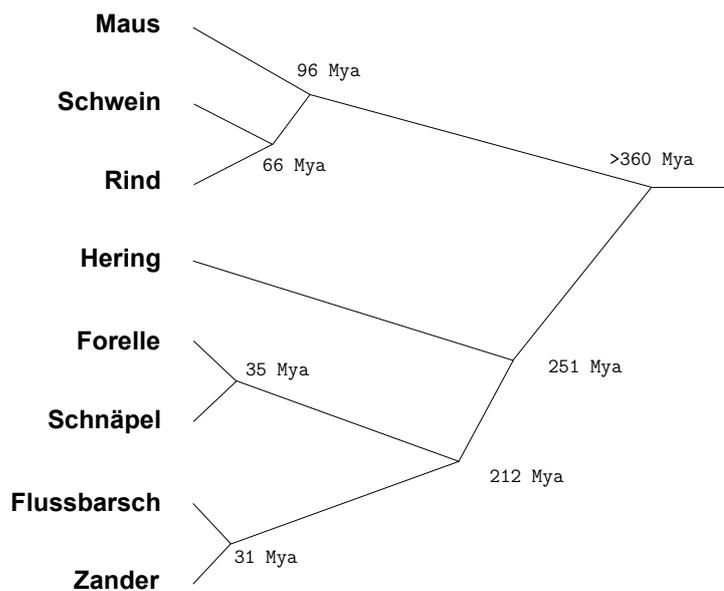
In der Regenbogenforelle wurde eine starke Expression der Kreatinkinasen, insbesondere von *CKB*, im Gehirn gefunden, was auf einen hohen Kreatinbedarf dieses Organs hindeutet. Auch *SLC6A8* und *GAMT* waren in einem gleichen Maß exprimiert wie in den anderen Geweben. Nur *GATM* war deutlich geringer im Gehirn exprimiert als in den anderen Geweben und auch im Vergleich zu der sonstigen Expression der kreatinrelevanten Gene im Gehirn. Dies war insofern überraschend, dass die Bildung von Guanidinoacetat durch *GATM* der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Kreatinsynthese ist (SANDELL *et al.*, 2003; WYSS UND WALLIMANN, 1994). Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass der Kreatintransporter CT1, codiert durch *SLC6A8*, nicht nur Kreatin ins Gehirn transportiert, sondern auch dessen Vorstufe Guanidinoacetat. Dies wurde beispielsweise von TACHIKAWA *et al.* (2009) für Ratten postuliert. In diesem Fall wäre die Hauptaufgabe von CT1 im Forellengehirn wohl weniger der Kreatintransport, sondern vielmehr der Antransport von Guanidinoacetat, welches dann durch das verbreitet exprimierte *GAMT* weiter zu Kreatin verstoffwechselt würde.

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zum Kreatinsystem von Fischen. Die Verteilung von *GATM*, *GAMT* und *SLC6A8* wurde bisher nur am Zebraquarienfisch (*D. rerio*) untersucht (WANG *et al.*, 2010, 2007). Diese Studien zeigten abweichende Ergebnisse von den Befunden dieser Arbeit. In den von WANG *et al.* (2010) unter-

suchten Geweben wurde die stärkste Expression von *GATM* im Gehirn gefunden, aber es gab keine Expression in der Leber. Die *GAMT-Expression* war sehr stark in Herz und Leber, aber fast abwesend im Gehirn. Die Expression des Kreatintransporters war am stärksten im Gehirn und nur marginal in der Leber. Hinsichtlich des Kreatinsystems scheinen sich Zebrabärbling und die in dieser Arbeit untersuchten Fischarten also zu unterscheiden, wobei die hier untersuchten Fische insgesamt eine geringere Organspezifität hinsichtlich der Expression der Kreatingene aufweisen. Denkbare Hintergründe sind die deutlich unterschiedlichen Größen der Fische sowie die deutlich unterschiedlichen Lebensräume. Der Zebrabärbling ist im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Fischen ein Warmwasserfisch. Zu den Studien von WANG *et al.* (2007, 2010) ist jedoch grundsätzlich anzumerken, dass der Skelettmuskel des Zebrabärblings nicht untersucht wurde, sodass unklar bleibt, welche Rolle dieser in der Kreatinsynthese der Zebrabärblinge spielt. Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gefundenen starken muskulären Expression von *GATM* und *GAMT* in verschiedenen Fischarten unterschiedlichster Verwandtschaft erscheint diese auch für den Zebrabärbling wahrscheinlich.

### **Die muskuläre Expression von Kreatingenen ist evolutionär im Fisch konserviert**

Die zentralen Befunde zum Kreatinsystem der Fische ließen sich in allen untersuchten Fischarten bestätigen. Für sie war der Muskel ein Gewebe mit sehr starker *GATM*-Expression, und auch *GAMT* wurde hier, neben der Niere, sehr stark exprimiert. Dies spricht dafür, dass viele Fische dazu in der Lage sind, Kreatin in ihrem Skelettmuskel zu synthetisieren. Insbesondere der Hering weist evolutionär eine große Distanz zu den anderen untersuchten Fischen auf (Abb. 4.2) und befindet sich in der gleichen taxonomischen Gruppe wie Zebrabärblinge, der Unter-Teilklasse der Ostarioclupeomorpha (NELSON, 2006). Dennoch zeigt er die gleichen Expressionsprofile der Kreatingene wie die anderen Fische. Während die Heringe evolutiv einer alten Gruppe entstammen, handelt es sich bei den Barschen um eine sehr neue Gruppe (BETANCUR-R. *et al.*, 2013), welche ebenfalls das gleiche Expressionsprofil zeigt. Es ist daher davon auszugehen, dass der Großteil der Fische diese Expressionsprofile aufweist. Einzig einige kleinere Taxa könnten ein abweichendes Profil aufweisen, wenn dieses spezifisch innerhalb dieser Gruppe entstanden ist. Dies wäre beispielsweise für die Zebrabärblinge denkbar, erscheint aber dennoch unwahrscheinlich.



**Abb. 4.2: Stammbaum der untersuchten Tierarten**

Die Astlängen repräsentieren den zeitlichen Abstand. An den Abzweigungspunkten der Äste ist jeweils der Zeitraum angegeben, wann der letzte gemeinsame Vorfahr der jeweiligen Tiere gelebt hat (X Mya= X Million years ago, vor X Millionen Jahren) Daten für die Fische basieren auf BETANCUR-R. *et al.* (2013), für Säuger auf BININDA-EMONDS *et al.* (2007), und die ungefähre Auftrennung von Säugern und Fischen auf LONG UND GORDON (2004)

Der Befund, dass der Ostseeschnäpel zwei Varianten des *GAMT*-Gens aufweist, ist typisch für Salmoniden. Diese haben eine zusätzliche Genomduplikation erfahren und gelten als pseudotetraploid (BOER *et al.*, 2007). Es ist zu vermuten, dass auch Regenbogenforellen eine zweite *GAMT*-Variante besitzen, dass diese hier jedoch nicht identifiziert werden konnte. Die Gegenwart mehrerer Genvarianten ist ein grundsätzliches Problem bei den Nachweisen von Transkriptmengen, da darauf geachtet werden muss, dass Primer bzw. Sonden hochspezifisch für jeweils eine Variante sind. Binden sie an mehrere Varianten, können so die Ergebnisse verzerrt werden.

Im Gegensatz zu den Fischen gab es bei den Säugern Unterschiede in ihrem Expressionsprofil. Das von WYSS UND KADDURAH-DAOUK (2000) postulierte Modell (*GATM* in der Niere, *GAMT* in der Leber) wurde durch die Messungen an der Maus bestätigt. Rind und Schwein zeigten hingegen eine mindestens ebenso starke hepatische wie renale *GATM*-Expression. Diese Erkenntnis, dass es innerhalb der Säuger Expressionsunterschiede gibt, ist umso erstaunlicher zumal die evolutionäre Aufspaltung von Nagetieren und Paarhufern vor deutlich kürzerer Zeit stattgefunden hat, als beispielsweise die Auftrennung von Barschen und Salmoniden (96 Millionen Jahre *vs.* 212 Millionen Jahre; Abb. 4.2). Es müssten noch weitere Säugetiere aus verschiedenen Taxa untersucht werden, um zu erkennen, wann die Umstellung von der muskulären Kreatinsynthese auf die arbeitsteilige Herstellung erfolgt ist. Es ist anzunehmen, dass die muskuläre Synthese, wie sie von Fischen durchgeführt wird, evolutionär älter und ursprünglicher ist. Ob es Säuger gibt, die ebenfalls in großen Mengen im Muskel Kreatin synthetisieren, bleibt unklar. Untersuchungen beispielsweise am Schnabeltier, als Vertreter der ursprünglichsten

Säugetiere, könnten dazu weitere Erkenntnisse liefern. Der Unterschied zwischen Maus und Rind und Schwein verdeutlicht aber auch, wie schwierig es um die Übertragbarkeit von Erkenntnissen an der Maus auf andere Tiere und somit auch den Menschen bestellt ist. Maus und Mensch haben sich evolutionär vor 92 Millionen Jahren getrennt, also vor unwesentlich kürzerer Zeit als Maus und Schwein. Insgesamt sind solche vergleichenden Arbeiten wie hier vorgestellt daher von großer Relevanz, zumal sie auch Informationen über die Übertragbarkeit von Ergebnissen liefern.

### **BORN- und Import-Forelle unterscheiden sich in der Expression von Kreatingenen**

Nicht nur im Rahmen der Auswertung der holistischen Transkriptomanalyse wurden Unterschiede zwischen den beiden Linien gefunden, sondern auch im Rahmen der Analyse des Kreatinsystems. Zwischen BORN- und Import-Forellen wurden mehrere signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Expression von Kreatingenen in den untersuchten Geweben gefunden. Jedoch ergaben diese kein klares Bild, zumal die Ergebnisse teils widersprüchlich waren und zusätzlich von der Temperatur abhingen. Ein Bild, welches sich jedoch festigte, war, dass in an 23 °C akklimierten Forellen sowohl die muskuläre *GATM*- als auch die muskuläre *GAMT*-Expression in Import-Forellen signifikant höher lag als in BORN-Forellen. Dies lässt auf eine höhere Kreatinsyntheserate im Muskel der Importforelle bei 23 °C schließen, zumal beide an dem Prozess beteiligten Enzyme, inklusive des geschwindigkeitsbestimmenden (MCGUIRE *et al.*, 1984) *GATMs*, eine stärkere Genexpression aufwiesen. Hinsichtlich der Kreatinkinase gab es diese Unterschiede nicht, hier zeigte sich eher ein entgegengesetzter Trend. Diese Ergebnisse deuten auf gewisse Unterschiede zwischen beiden Linien hin. Da das Kreatinsystem ein wichtiges Energiesystem darstellt, deutet dies auch Unterschiede im Energiehaushalt der beiden Linien an. Dies könnte entweder ursächlich für oder verursacht durch die bisher gefundenen Unterschiede der beiden Forellenlinien sein. Zu der Hypothese von unterschiedlichen Energiesystemen passt weiterhin, dass in der holistischen Transkriptomanalyse im Rahmen der *GO-Term*-Anreicherungsanalyse eine Anreicherung von *GO-Terms* zur Synthese von Einfachzuckern in der Import-Forelle gefunden wurde, in der BORN-Forelle hingegen nicht. Unterschiedliche Energiesysteme könnten in Zusammenhang mit unterschiedlicher Leistung des Immunsystems verbunden sein, da der Unterhalt dieses Systems sehr kostenintensiv ist und in einem *Trade-off* mit anderen kostenintensiven Prozessen wie Wachstum steht (LOCHMILLER UND DEERENBERG, 2000). Darüber hinaus ist die Kreatin-Synthese kostenintensiv,

zumal sie 40 % der Methylgruppen von S-Adenosylmethionin und 20-30 % der Amidinogruppen von Arginin verbraucht (BROSNAN *et al.*, 2011). Auch dies unterstreicht, wie relevant unterschiedlich regulierte Kreatinsysteme für den gesamten Stoffwechsel der beiden Forellenlinien sein könnten.

Zusätzlich zu den Unterschieden zwischen beiden Forellenlinien gab es Unterschiede zwischen den beiden Akklimationstemperaturen. Die Expressionsunterschiede der Kreatinsynthese-Gene zeigten sich beispielsweise nur bei 23 °C akklimierten Tieren. Ein gewisser Temperatureffekt war auch zu erwarten, zumal der Energiebedarf von der Körpertemperatur abhängt, die in Fischen mit der Umgebungstemperatur korreliert. Weiterhin steht auch die Kreatininbildung mit der Temperatur im Zusammenhang; sie steigt mit hoher Temperatur (LEMPERT, 1959) und entzieht so Kreatin aus dem Kreatin/Kreatinphosphat-Pool. Auch die Aktivität der Kreatinkinase wurde als abhängig von der Akklimationstemperatur in der Ratte beschrieben (TERBLANCHE *et al.*, 1998), was auf Einflüsse der Temperatur auf das Kreatinsystem hindeutet.

### 4.3. Phänotypische Unterschiede

Da in dieser Arbeit mehrere Unterschiede hinsichtlich der Genexpression der BORN- und Importforelle entdeckt worden sind, die vermutlich auf Unterschieden im Genotyp beruhen, stellte sich die Frage, inwieweit diese Unterschiede im Genotyp auch zu einer Veränderung des Phänotyps jenseits des Merkmals Robustheit beitragen. Dazu wurde das Verhalten, welches auch mit dem Tierwohl in Verbindung steht (HUNTINGFORD UND ADAMS, 2005), sowie das Wachstum, ein Parameter der sehr wichtig für die kommerzielle Aquakultur ist, untersucht.

#### **BORN- und Import-Forellen verhalten sich unterschiedlich**

Bei der Analyse der Schwimmtiefe beider Forellenlinien in Aquarien zeigten sich Unterschiede. Bei moderater und erhöhter Besatzdichte war deutlich zu erkennen, dass die BORN-Forellen sich den Großteil der Zeit im unteren Drittel der Aquarien aufhielten, wohingegen sich die Import-Forellen relativ gleichverteilt in allen Wasserschichten aufhielten. Lediglich bei einer hohen Besatzdichte von 35 kg Fisch/m<sup>3</sup> Wasser waren keine Unterschiede mehr zwischen den Linien zu erkennen. Letzterer Befund ist sicherlich eine Folge der Fülle der Aquarien. Bei dieser Besatzdichte waren so viele Fische im Becken, dass die ganze Frontscheibe vollständig von Fischen ausgefüllt wurde. Ob dabei tatsächlich eine Präferenz der Fische für einen

bestimmten Wasserbereich umsetzbar gewesen wäre, ist fraglich. Von daher ist dieser Versuchsteil von der weiteren Betrachtung auszuklammern. Aus Tierwohlgründen erscheint es außerdem fraglich, ob eine dauerhafte Haltung bei einer solchen Besatzdichte vertretbar wäre, zumal die Tiere so nicht ihre natürlichen Präferenzen ausleben können. Besatzdichten von 30-40 kg/m<sup>3</sup> scheinen zu hoch für Forellen zu sein und können ihr Tierwohl beeinträchtigen (UK DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD & RURAL AFFAIRS, 1996).

Grundsätzlich ist zu dem hier vorgestellten Versuch anzumerken, dass die Beobachtung der Fische durch das sehr trübe Wasser erschwert wurde. Die beschränkte Sichtweite, die nicht ansatzweise bis zum Ende des Aquariums reichte, war daher eine grundsätzliche Einschränkung des hier verwendeten Versuchsdesigns. Durch die sehr geringe Sichtweite konnte nur die vertikale Position derjenigen Fische bestimmt werden, die sich sehr nah an der Frontscheibe der Aquarien aufhielten. Vermutlich hätte unter diesen Bedingungen jedoch auch ein vergleichsweise komplexeres Versuchsdesign mit mehreren Unterwasserkameras wie von STIEN *et al.* (2007) beschrieben, keine besseren Ergebnisse erzielt. Dennoch scheint in Anbetracht der selbst mit bloßem Auge erkennbaren Unterschiede zwischen den Forellen-Linien die Vermutung, dass sich beide Linien in ihrer bevorzugten vertikalen Position im Becken unterschieden, valide zu sein.

Die Schwimmtiefe von Salmoniden ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Für Lachse konnte gezeigt werden, dass diese in Netzkäfigen im Meer ihre Körpertemperatur regulieren, indem sie ihre Schwimmtiefe anpassen (JOHANSSON *et al.*, 2009). Für die Forellen in diesem Versuch kommt diese Erklärung kaum in Frage, da die Temperatur in den relativ flachen Aquarien bei guter Zirkulation keine allzu starken Temperaturgradienten ausgebildet haben dürfte. Ein weiterer Zusammenhang wurde zwischen Schwimmtiefen von Fischen und der Verfügbarkeit von gelöstem Sauerstoff in unterschiedlichen Wassertiefen hergestellt (KRAMER, 1987), wobei auch dies für das Experiment eher unwahrscheinlich erscheint. Wahrscheinlicher erscheint der Faktor der Lichtvermeidung. Lachse meiden hohe Lichtintensitäten. Bei starkem Licht schwimmen sie in größere Tiefen (HUSE UND HOLM, 1993). Als Ursache für die Lichtvermeidung wird die gesteigerte Gefahr genannt, in das Blickfeld von Prädatoren zu geraten (FERNÖ *et al.*, 1995). Insgesamt erscheint die vertikale Fischposition dabei als *Trade-off* zwischen Lichtvermeidung und Nahrungsaufnahme, zumal in höheren Wasserschichten mehr Nahrung vorhanden ist. Möglicherweise könnten sich unterschiedliche Lichtpräferenzen auch durch die unterschiedlichen Lebensumstände der beiden Zuchtlinien in mehr oder minder trübem Wasser erklären lassen, die sich genetisch manifestieren haben könnten. Um

zu überprüfen, inwieweit sich die Lichtvermeidung von Import- und BORN-Forelle tatsächlich unterscheiden, und ob sie die beobachteten Verhaltensunterschiede erklären können, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Denkbar wären die Beobachtung der Fischposition im Dunkeln sowie die Beobachtung bei verschiedenen Lichtintensitäten. Dies könnte weitere Hinweise über Ursachen für das unterschiedliche Verhalten beider Forellenlinien liefern.

### **BORN- und Import-Forellen wachsen unterschiedlich**

Um zu überprüfen, ob BORN-Forelle und Import-Forelle ein gleichartiges Wachstumsprofil aufweisen und somit gleichermaßen für die industrielle Aquakultur geeignet sind, wurden beide Forellenlinien unter gleichen Bedingungen kultiviert und über einen Zeitraum von ungefähr neun Monaten vermessen und gewogen. Es konnte gezeigt werden, dass die Import-Forelle bei der gleichen Größe ein etwas höheres Gewicht als die BORN-Forelle aufweist. Dies stellt einen wichtigen produktionsrelevanten Vorteil der Import-Forelle für die Aquakultur dar, zumal die Fische so schneller bis zu einem definierten Schlachtgewicht aufgezogen werden können. Das Längenwachstum zwischen beiden Forellenlinien war gleich, lediglich die Gewichtszunahme erfolgte schneller. Es ist daher davon auszugehen, dass die Import-Forelle im Allgemeinen breiter ist als eine gleich alte und gleich lange BORN-Forelle. Es wäre möglich, dass die verlangsamte Gewichtszunahme der BORN-Forelle mit ihrer Robustheit in Verbindung steht. Es ist vorstellbar, dass das Aufrechterhalten der Robustheit solche Kosten für den Organismus verursacht, dass für das Wachstum weniger Energie zur Verfügung steht, dass hier also ein Trade-off vorliegt. Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei der BORN-Population um eine gemischtgeschlechtliche Population handelte, während die Import-Forellen alle weiblich waren. Ein potentiell unterschiedliches Wachstum von Männchen und Weibchen könnte also ebenfalls die Unterschiede zwischen beiden Linien erklären. Bisherige Untersuchungen zum Thema sind teilweise widersprüchlich. Für wildlebende Forellen der Art *Salmo trutta* konnte beispielsweise kein Unterschied zwischen dem Gewichts-Längen-Verhältnis von Männchen und Weibchen gefunden werden (ARSLAN *et al.*, 2004). Von geschlechtsreifen Regenbogenforellen in Aquakultur wurde berichtet, dass Männchen länger und schwerer als Weibchen waren, wobei der Gewichtsunterschied größer war als der Längenunterschied (SYLVÉN UND ELVINGSON, 1992). So wäre also für die BORN-Population ein höheres Gewichts/Längen-Verhältnis zu erwarten gewesen. Bei in Aquakultur gehaltenen Lachsen konnte gezeigt werden, dass noch nicht geschlechtsreife Männchen schneller an Länge und Gewicht zunahmten als Weibchen, dafür aber einen geringeren *condi-*

*tion score*, ein geringeres Verhältnis von Gewicht zu Länge aufwiesen (LECLERCQ *et al.*, 2010). Da der Beitrag des Geschlechts zum unterschiedlichen Wachstum so nicht konkretisiert werden kann, wird die Beurteilung der Wachstumsleistung erschwert. Es sollte daher in weiteren Versuchen eine vergleichbare Populationsstruktur zwischen beiden Forellenlinien sichergestellt werden. Grundsätzlich ist jedoch auch zu beachten, dass nicht nur die Wachstumsleistung relevant für die Aquakultur ist, sondern auch die Fleischqualität, deren Definition jedoch komplex ist (GJEDREM, 1997). Auch dieser Aspekt sollte – ebenso wie der Anteil des Filets am Fischgewicht (BUGEON *et al.*, 2010) – in weiteren Untersuchungen beachtet werden.

Das Experiment verdeutlicht, welche große Bedeutung der Haltungsform für das Wachstum der Tiere zukommt. Die im Kreislauf-System mit aufgereinigtem Wasser und kontrollierten Bedingungen gehaltenen BORN-Forellen nahmen deutlich schneller an Länge und Gewicht zu, als die im Durchfluss-System kultivierten BORN- und auch Import-Forellen. Auch wenn sich wegen der Vielzahl differenter Parameter nicht genau festlegen lässt, welcher Parameter genau die Wachstumsunterschiede verursacht hat, oder ob es die Interaktion aller Parameter war, liegt die große Bedeutung des Faktors Temperatur als „abiotischer Masterfaktor“ (BRETT, 1971) nahe. Gerade zu den letzten zwei Messpunkten, die einen Abfall der Gewichtszunahme für die Durchfluss-kultivierten Forellen anzeigten, gab es einen starken Temperaturabfall auf bis zu 1 °C. Für den Ostseeschnäpel wurde in einem ähnlich angelegten Versuch Vergleichbares beobachtet (NIPKOW *et al.*, 2014).

## 5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat neue Erkenntnisse zu den Unterschieden von Import- und BORN-Forellen erbracht. Es bleiben dennoch einige Aspekte weiter unklar.

Die vier different exprimierten Gene *CEPT1A*, *GIMAP7*, *RARRES3* und *TPM1A* sind weiter in der Forelle zu charakterisieren. Vergleichende Sequenzierungen der mRNA könnten Hinweise auf Mutationen geben, die Einfluss auf die Expressionsstärke haben könnten. Identifizierung und Sequenzierung der Promotorregion in der genomischen DNA könnte ebenso zur Aufklärung der Hintergründe der differentiellen Expression beitragen. Diese Gene könnten Kandidaten für Assoziationsstudien hinsichtlich der Robustheit der BORN-Forelle sein.

Bezüglich des Kreatinsystems sollten die Befunde zur muskulären Kreatinsynthese auch auf Proteinebene bestätigt werden. *Western Blots* könnten die Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentration in den verschiedenen Geweben ermöglichen. Für GAMT existiert ein kommerzieller Antikörper, der nachgewiesenermaßen in Mensch, Rind und Zebraquappe spezifisch an das korrekte Protein bindet. Er sollte daher auch für die Regenbogenforelle einsetzbar sein. Nach dem Nachweis der Kreatin-synthetisierenden Enzyme im Muskel könnte sich der Nachweis der Enzymaktivität im Muskel anschließen. Sowohl die Aktivitäten von GATM (VAN PILSUM *et al.*, 1970) als auch GAMT (OGAWA *et al.*, 1983) lassen sich mittels spezifischer Nachweise messen. Im Anschluss an diese Versuche wäre die Kreatinsynthese im Fischmuskel komplett bewiesen.

Darüber hinaus sollte für das als *SLC6A8* identifizierte Gen abschließend der Nachweis erbracht werden, dass es tatsächlich für ein Protein mit Kreatintransportfunktion codiert. Während der Arbeit haben sich Hinweise auf die Existenz mehrerer Transkriptvarianten ergeben; die Untersuchung ihrer jeweiligen Funktionalität könnte Erkenntnisse über die Relevanz der verschiedenen Transmembrandomänen liefern.

Zur Analyse der Ursachen für das unterschiedliche Verhalten, das auch als Indikator für Wohlbefinden dienen kann, sind weitere Untersuchungen nötig.

Hinsichtlich der Wachstumsleistung beider Linien ist zu untersuchen, inwieweit beobachtete Unterschiede auf verschiedene Geschlechterkonstellationen zurückzuführen sind. Ebenfalls sind die Faktoren Fleischqualität und Filetanteil zu berücksichtigen.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Forellenzuchtlinien BORN und Import hinsichtlich molekularer und phänotypischer Unterschiede untersucht. Bei der BORN-Forelle handelt es sich um eine lokale Zuchtlinie, die als robuster als die Import-Forelle und besonders gut angepasst an die lokalen Umweltbedingungen gilt.

Die vorliegende Arbeit konnte neue Erkenntnisse zu den Unterschieden von BORN- und Import-Forelle erbringen.

Ausgehend von einer holistischen Transkriptomanalyse wurden vier Gene identifiziert, welche in vier Geweben unter verschiedensten Besatzdichte- und Temperaturbedingungen different zwischen beiden Linien exprimiert waren. *CEPT1A* sowie *GIMAP7* waren stärker in der BORN-Forelle exprimiert, während *RARRES3* und *TPM1A* stärker in der Import-Forelle exprimiert wurden. Damit wurden erstmals Gene identifiziert, welche unabhängig von den konkreten Umweltbedingungen, in denen die Tiere lebten, in vier Geweben gleichzeitig different exprimiert waren. Dies deutet auf genetische Unterschiede zwischen den beiden Forellenzuchtlinien hin. 40 Jahre Zucht mit dem Selektionsziel Überleben in Brackwasser haben offenbar die Herausbildung dieser genetischen Unterschiede bewirkt. Die identifizierten Gene könnten relevant für die Robustheit der BORN-Forelle sein, auch wenn die Kausalität in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Dennoch können diese Gene als Biomarker zur Unterscheidung der beiden Forellenzuchtlinien dienen.

Weiterhin konnte das Kreatinsystem der Fische grundlegend charakterisiert werden. In insgesamt fünf verschiedenen Fischarten konnten Gene des Kreatinsystems ansequenziert werden. Für die Regenbogenforelle wurden die gesamten codierenden Bereiche der Gene *GATM*, *GAMT* und *CKM* identifiziert. Weiterhin wurde in der Forelle erstmalig für einen Salmoniden die Sequenz des Kreatintransporters *SLC6A8* bestimmt. Auf Basis der Sequenzinformation konnte dann die Genexpression untersucht werden. Fische sind offenbar dazu in der Lage, Kreatin, einen zellulären Energiespeicher, im Muskel zu synthetisieren. Die Genexpressionsprofile waren für alle Fischarten vergleichbar und deuteten im Vergleich zu Niere und Leber auf eine große Relevanz des Muskels hin. In Säugetieren hingegen zeigten sich Niere und Leber wichtiger für diesen Prozess. Evolutionär scheint sich diese unterschiedliche Kreatinsynthese schon sehr früh etabliert zu haben. Während alle Fische sehr ähnliche Genexpressionsprofile der Kreatingene zeigten, unterschieden sich diejenigen von Paarhufern und Maus, was auf eine relativ neue Anpassung im Kreatinsystem der verschiedenen Säuger-Gruppen hindeutet. Die zwei bisherigen

Untersuchungen zum Kreatinsystem von Fischen hatten den Skelettmuskel nicht in die Untersuchung mit einbezogen. Daher war eine muskuläre Kreatinsynthese im Fisch bisher noch nicht postuliert worden.

Beim Vergleich der Kreatinsysteme der beiden Forellenlinien gab es ebenfalls Hinweise auf Unterschiede. Zumindest bei warmen Temperaturen schien die muskuläre Kreatinsynthese auf Basis der Genexpression der dafür benötigten Enzyme in BORN-Forellen unterhalb derjenigen von Import-Forellen zu liegen. Weiterhin gab es Hinweise auf eine unterschiedliche Zuckersynthese in den beiden Linien, was ebenfalls auf Unterschiede im Energiehaushalt der Forellenlinien hindeutet.

Auch im Phänotyp, der grundsätzlich neben der Umwelt auch ein Produkt des Genotyps ist, zeigten sich Unterschiede. Bezüglich des Verhaltens weisen beide Forellenlinien eine unterschiedliche Präferenz hinsichtlich der Schwimmtiefe auf. Es muss weiter untersucht werden, wodurch diese hervorgerufen werden. Zudem wurde die Wachstumsleistung der Tiere verglichen. BORN-Forellen wuchsen etwas langsamer als Import-Forellen, welche bei gleicher Länge auch etwas schwerer waren. Ein Befund, der die Attraktivität der BORN-Forelle für die kommerzielle Aquakultur verringern dürfte, wobei nachfolgende Experimente jedoch noch den Geschlechtsfaktor stärker berücksichtigen müssten.

Insgesamt konnte somit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Regenbogenforellen-Zuchtlinien BORN und Import sowohl hinsichtlich ihres Transkriptoms als auch ihres Phänotyps voneinander unterscheiden.

## Literatur

- ALTMANN, S., REBL, A., KÜHN, C., UND GOLDAMMER, T. (2014). Identification and de novo sequencing of housekeeping genes appropriate for gene expression analyses in farmed maraena whitefish (*Coregonus maraena*) during crowding stress. *Fish Physiology and Biochemistry* **41** 397–412.
- ANDERS, E. (1986). Stand der Züchtung und Reproduktion brackwasseradaptierter Regenbogenforellenbestände im Küstenbereich der DDR. *Fischerei-Forschung* **24**.
- ARMSTRONG, R. B. UND PHELPS, R. O. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *American Journal of Anatomy* **171** 259–272.
- ARSLAN, M., YILDIRIM, A., UND BEKTAŞ, S. (2004). Length-weight relationship of brown trout, *Salmo trutta* L., inhabiting Kan stream, Coruh Basin, north-eastern Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **4**.
- ASHHAB, Y., ALIAN, A., POLLIACK, A., PANET, A., UND YEHUDA, D. B. (2001). Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Letters* **495** 56–60.
- BALLESTER, M., CORDÓN, R., UND FOLCH, J. M. (2013). DAG Expression: High-Throughput Gene Expression Analysis of Real-Time PCR Data Using Standard Curves for Relative Quantification. *PLoS ONE* **8** e80385.
- BALSOM, P. D., SÖDERLUND, K., UND EKBLÖM, B. (1994). Creatine in Humans with Special Reference to Creatine Supplementation. *Sports Medicine* **18** 268–280.
- BARNARD, R. J., EDGERTON, V. R., FURUKAWA, T., UND PETER, J. B. (1971). Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *American Journal of Physiology* **220** 410–414.
- BÉARD, E. UND BRAISSANT, O. (2010). Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *Journal of Neurochemistry* **115** 297–313.
- BELL, M. C. (1990). Fisheries Handbook of Engineering Requirements and Biological Criteria. Techn. Ber.
- BENJAMINI, Y. UND HOCHBERG, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57** 289–300.
- BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J., UND WHEELER, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research* **33** D34–D38.
- BERTALANFFY, L. V. (1957). Quantitative Laws in Metabolism and Growth. *The Quarterly Review of Biology* **32** 217–231.
- BERTHELOT, C., BRUNET, F., CHALOPIN, D., JUANCHICH, A., BERNARD, M., NOËL, B., BENTO, P., DA SILVA, C., LABADIE, K., ALBERTI, A., AURY, J.-M., LOUIS, A., DEHAIS, P., BARDOU, P., MONTFORT, J., KLOPP, C., CABAU, C., GASPIN, C., THORGAARD, G. H., BOUSSAHA, M., QUILLET, E., GUYOMARD, R., GALIANA, D., BOBE, J., VOLFF, J.-N., GENËT, C., WINCKER, P., JAILLON, O., CROLLIUS, H. R., UND GUIGUEN, Y. (2014). The

- rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications* **5**.
- BETANCUR-R., R., BROUGHTON, R. E., WILEY, E. O., CARPENTER, K., LOPEZ, J. A., LI, C., HOLCROFT, N. I., ARCILA, D., SANCIANGCO, M., CURETON II, J. C., ZHANG, F., BUSER, T., CAMPBELL, M. A., BALLESTEROS, J. A., ROA-VARON, A., WILLIS, S., BORDEN, W. C., ROWLEY, T., RENEAU, P. C., HOUGH, D. J., LU, G., GRANDE, T., ARRATIA, G., UND ORTI, G. (2013). The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *PLoS Currents* **5**.
- BIMBOIM, H. C. UND DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7** 1513–1523.
- BININDA-EMONDS, O. R. P., CARDILLO, M., JONES, K. E., MACPHEE, R. D. E., BECK, R. M. D., GRENYER, R., PRICE, S. A., VOS, R. A., GITTLEMAN, J. L., UND PURVIS, A. (2007). The delayed rise of present-day mammals. *Nature* **446** 507–512.
- BLOCH, K. UND SCHOENHEIMER, R. (1939). Studies in Protein Metabolism XI. the Metabolic Relation of Creatine and Creatinine Studied with Isotopic Nitrogen. *Journal of Biological Chemistry* **131** 111–119.
- BOER, J. G. D., YAZAWA, R., DAVIDSON, W. S., UND KOOP, B. F. (2007). Bursts and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids. *BMC Genomics* **8**.
- BOOM, R., SOL, C. J., SALIMANS, M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M., UND VAN DER NOORDAA, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* **28** 495–503.
- BORCHEL, A., VERLEIH, M., REBL, A., KÜHN, C., UND GOLDAMMER, T. (2014). Creatine metabolism differs between mammals and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *SpringerPlus* **3** 510.
- BOWERS, R. M., LAPATRA, S. E., UND DHAR, A. K. (2008). Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *Journal of Virological Methods* **147** 226–234.
- BRAISSANT, O. (2012). Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **35** 655–664.
- BRAISSANT, O., BACHMANN, C., UND HENRY, H. (2007). Expression and Function of Agat, Gamt and CT1 in the Mammalian Brain. In: SALOMONS, G. S. UND WYSS, M. (Hg.), *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease*, Nr. 46 in Subcellular Biochemistry, 67–81. Springer Netherlands, Dordrecht.
- BRAISSANT, O., BÉARD, E., TORRENT, C., UND HENRY, H. (2010). Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: Relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiology of Disease* **37** 423–433.
- BRAISSANT, O. UND HENRY, H. (2008). AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **31** 230–239.

- BRAISSANT, O., HENRY, H., BÉARD, E., UND ULDRY, J. (2011). Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids* **40** 1315–1324.
- BRETT, J. R. (1971). Energetic Responses of Salmon to Temperature. A Study of Some Thermal Relations in the Physiology and Freshwater Ecology of Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*). *American Zoologist* **11** 99–113.
- BRIVANLOU, A. H. UND DARNELL, J. E. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* **295** 813–818.
- BROSNAN, J. T. UND BROSNAN, M. E. (2007). Creatine: Endogenous Metabolite, Dietary, and Therapeutic Supplement. *Annual Review of Nutrition* **27** 241–261.
- BROSNAN, J. T., SILVA, R. P. D., UND BROSNAN, M. E. (2011). The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids* **40** 1325–1331.
- BRUNELLI, J. P., WERTZLER, K. J., SUNDIN, K., UND THORGAARD, G. H. (2008). Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and Chinook salmon. *Genome* **51** 739–748.
- BUGEON, J., LEFEVRE, F., CARDINAL, M., UYANIK, A., DAVENEL, A., UND HAFFRAY, P. (2010). Flesh quality in large rainbow trout with high or low fillet yield. *Journal of Muscle Foods* **21** 702–721.
- BURKE, D. G., CHILIBECK, P. D., PARISE, G., CANDOW, D. G., MAHONEY, D., UND TARNOPOLSKY, M. (2003). Effect of Creatine and Weight Training on Muscle Creatine and Performance in Vegetarians. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **35** 1946–1955.
- BURNETTE, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **112** 195–203.
- CARBON, S., IRELAND, A., MUNGALL, C. J., SHU, S., MARSHALL, B., UND LEWIS, S. (2009). AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25** 288–289.
- CHANCE, B., IM, J., NIOKA, S., UND KUSHMERICK, M. (2006). Skeletal muscle energetics with PNMR: personal views and historic perspectives. *NMR in Biomedicine* **19** 904–926.
- CHEN, N.-H., REITH, M. E. A., UND QUICK, M. W. (2004). Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Archiv* **447** 519–531.
- CHOMCZYNSKI, P. UND SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156–159.
- CHRISTIE, M. R., MARINE, M. L., FRENCH, R. A., UND BLOUIN, M. S. (2012). Genetic adaptation to captivity can occur in a single generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109** 238–242.
- CLARKE, A. UND FRASER, K. P. P. (2004). Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology* **18** 243–251.
- CLARKE, A. UND JOHNSTON, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* **68** 893–905.

- CLAROS, M. G. UND VINCENS, P. (1996). Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and their Targeting Sequences. *European Journal of Biochemistry* **241** 779–786.
- COLL, M., LIBRALATO, S., TUDELA, S., PALOMERA, I., UND PRANOVI, F. (2008). Ecosystem Overfishing in the Ocean. *PLoS ONE* **3** e3881.
- DALY, M. M. (1985). Guanidinoacetate methyltransferase activity in tissues and cultured cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **236** 576–584.
- DAWSON, D. M., EPPENBERGER, H. M., UND KAPLAN, N. O. (1965). Creatine kinase: Evidence for a dimeric structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **21** 346–353.
- DEGRAUW, T. J., CECIL, K. M., BYARS, A. W., SALOMONS, G. S., BALL, W. S., UND JAKOBS, C. (2003). The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Molecular and Cellular Biochemistry* **244** 45–48.
- DELANGHE, J., SLYPERE, J. P. D., BUYZERE, M. D., ROBBRECHT, J., WIEME, R., UND VERMEULEN, A. (1989). Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. *Clinical Chemistry* **35** 1802–1803.
- DELIGIO, J. T. UND ELLINGTON, W. R. (2006). The capacity for the de novo biosynthesis of creatine is present in the tunicate *Ciona intestinalis* and is likely widespread in other protochordate and invertebrate groups. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **1** 167–178.
- DEMASIUS, W., WEIKARD, R., HADLICH, F., MULLER, K. E., UND KUHN, C. (2013). Monitoring the immune response to vaccination with an inactivated vaccine associated to bovine neonatal pancytopenia by deep sequencing transcriptome analysis in cattle. *Veterinary Research* **44** 93.
- DGE (2013). *Vollwertig essen und trinken nach den 10 Regeln der DGE*. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Bonn, 9. Aufl.
- DICKMEIS, T., RASTEGAR, S., AANSTAD, P., CLARK, M., FISCHER, N., PLESSY, C., ROSA, F., KORZH, V., UND STRÄHLE, U. (2001). Expression of brain subtype creatine kinase in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* **109** 409–412.
- DISEPIO, D., GHOSN, C., ECKERT, R. L., DEUCHER, A., ROBINSON, N., DUVIC, M., CHANDRARATNA, R. A. S., UND NAGPAL, S. (1998). Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95** 14811–14815.
- DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K., UND MATTICK, J. S. (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19** 4008.
- ELLINGTON, W. R. (2000). A dimeric creatine kinase from a sponge: implications in terms of phosphagen kinase evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **126** 1–7.
- ELLINGTON, W. R. UND SUZUKI, T. (2007). Early Evolution of the Creatine Kinase Gene Family and the Capacity for Creatine Biosynthesis and Membrane Transport. In: SALOMONS,

- G. S. UND WYSS, M. (Hg.), *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease*, Nr. 46 in Subcellular Biochemistry, 17–26. Springer Netherlands, Dordrecht.
- EPPENBERGER, H. M., EPPENBERGER, M., RICHTERICH, R., UND AEBI, H. (1964). The ontogeny of creatine kinase isozymes. *Developmental Biology* **10** 1–16.
- FAO (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture - 2014*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom.
- FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39** 783–791.
- FERNÖ, A., HUSE, I., JUELL, J.-E., UND BJORDAL, Å. (1995). Vertical distribution of Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) in net pens: trade-off between surface light avoidance and food attraction. *Aquaculture* **132** 285–296.
- GADBERRY, M. D., MALCOMBER, S. T., DOUST, A. N., UND KELLOGG, E. A. (2005). Prismaclade—a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* **21** 1263–1264.
- GASTIN, D. P. B. (2001). Energy System Interaction and Relative Contribution During Maximal Exercise. *Sports Medicine* **31** 725–741.
- GENTLEMAN, R. C., CAREY, V. J., BATES, D. M., BOLSTAD, B., DETTLING, M., DUDOIT, S., ELLIS, B., GAUTIER, L., GE, Y., GENTRY, J., HORNIK, K., HOTHORN, T., HUBER, W., IACUS, S., IRIZARRY, R., LEISCH, F., LI, C., MAECHLER, M., ROSSINI, A. J., SAWITZKI, G., SMITH, C., SMYTH, G., TIERNEY, L., YANG, J. Y., UND ZHANG, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* **5** R80.
- GIBELLINI, F. UND SMITH, T. K. (2010). The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **62** 414–428.
- GIEPMANS, B. N. G., ADAMS, S. R., ELLISMAN, M. H., UND TSIEN, R. Y. (2006). The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function. *Science* **312** 217–224.
- GILLOOLY, J. F., BROWN, J. H., WEST, G. B., SAVAGE, V. M., UND CHARNOV, E. L. (2001). Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science* **293** 2248–2251.
- GJEDREM, T. (1997). Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquaculture International* **5** 197–206.
- GJEDREM, T., ROBINSON, N., UND RYE, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture* **350–353** 117–129.
- GOLDAMMER, T., KÖLLNER, B., ANDERS, E., UND KÜHN, C. (2013). Die BORN Forelle als Tiermodell für vergleichende, genomische, funktionelle und phänotypische Analysen der Anpassung von Fischen an regionale Aquakulturbedingungen. *Beiträge zur Fischerei - Mitteilungen der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei* **51** 118–131.
- GOLDBERGER, R. F. (1974). Autogenous Regulation of Gene Expression. *Science* **183** 810–816.
- GOUJON, M., MCWILLIAM, H., LI, W., VALENTIN, F., SQUIZZATO, S., PAERN, J., UND LOPEZ, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Research* **38** W695–W699.

- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C., UND NAIRN, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology* **36** 59–72.
- GU, Y., LI, M., ZHANG, K., CHEN, L., JIANG, A., WANG, J., UND LI, X. (2011). Evaluation of endogenous control genes for gene expression studies across multiple tissues and in the specific sets of fat- and muscle-type samples of the pig. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **128** 319–325.
- GUNNING, P., O'NEILL, G., UND HARDEMAN, E. (2008). Tropomyosin-Based Regulation of the Actin Cytoskeleton in Time and Space. *Physiological Reviews* **88** 1–35.
- GUTHMILLER, P., PILSUM, J. F. V., BOEN, J. R., UND MCGUIRE, D. M. (1994). Cloning and sequencing of rat kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *Journal of Biological Chemistry* **269** 17556–17560.
- HARDER, G. UND MCGOWAN, R. (2001). Isolation and characterization of the muscle-specific isoform of creatine kinase from the zebrafish, *Danio rerio*. *Biochemistry and Cell Biology* **79** 779–782.
- HAZEL, J. R. (1995). Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annual Review of Physiology* **57** 19–42.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., UND WILLIAMS, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6** 986–994.
- HENNEBERRY, A. L., WRIGHT, M. M., UND MCMASTER, C. R. (2002). The Major Sites of Cellular Phospholipid Synthesis and Molecular Determinants of Fatty Acid and Lipid Head Group Specificity. *Molecular Biology of the Cell* **13** 3148–3161.
- HERMELINK, B., WUERTZ, S., TRUBIROHA, A., RENNERT, B., KLOAS, W., UND SCHULZ, C. (2011). Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *General and Comparative Endocrinology* **172** 282–292.
- HOBERMAN, H. D., SIMS, E. A. H., UND PETERS, J. H. (1948). Creatine and Creatinine Metabolism in the Normal Male Adult Studied with the Aid of Isotopic Nitrogen. *Journal of Biological Chemistry* **172** 45–58.
- HUANG, S.-L., SHYU, R.-Y., YEH, M.-Y., UND JIANG, S.-Y. (2000). Cloning and characterization of a novel retinoid-inducible gene 1(RIG1) deriving from human gastric cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **159** 15–24.
- HUNTER, A. (1929). The creatine content of the muscles and some other tissues in fishes. *Journal of Biological Chemistry* **81** 513–523.
- HUNTINGFORD, F. UND ADAMS, C. (2005). Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behaviour* **142** 1207–1221.
- HUSE, I. UND HOLM, J. C. (1993). Vertical distribution of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a function of illumination. *Journal of Fish Biology* **43** 147–156.
- JACOBS, H., HELDT, H. W., UND KLINGENBERG, M. (1964). High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **16** 516–521.

- JACOBUS, W. E. (1985). Respiratory Control and the Integration of Heart High-Energy Phosphate Metabolism by Mitochondrial Creatine Kinase. *Annual Review of Physiology* **47** 707–725.
- JOHANSSON, D., RUOHONEN, K., JUELL, J.-E., UND OPPELAL, F. (2009). Swimming depth and thermal history of individual Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in production cages under different ambient temperature conditions. *Aquaculture* **290** 296–303.
- KÄLL, L., KROGH, A., UND SONNHAMMER, E. L. L. (2004). A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *Journal of Molecular Biology* **338** 1027–1036.
- KAPPENSTEIN, J., FERRAUTI, A., RUNKEL, B., FERNANDEZ-FERNANDEZ, J., MÜLLER, K., UND ZANGE, J. (2013). Changes in phosphocreatine concentration of skeletal muscle during high-intensity intermittent exercise in children and adults. *European Journal of Applied Physiology* **113** 2769–2779.
- KAUSE, A., RITOLA, O., PAAANANEN, T., MÄNTYSAARI, E., UND ESKELINEN, U. (2003). Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype-by-environment interactions. *Aquaculture* **228** 53–68.
- KIESSLING, A., RUOHONEN, K., UND BJØRNEVIK, M. (2006). Muscle fibre growth and quality in fish. *Archiv Tierzucht* **49** 137–146.
- KÖBIS, J. M., REBL, A., KÜHN, C., UND GOLDAMMER, T. (2013). Comparison of splenic transcriptome activity of two rainbow trout strains differing in robustness under regional aquaculture conditions. *Molecular Biology Reports* **40** 1955–1966.
- KÖBIS, J. M., REBL, A., KÜHN, C., KORYTÁŘ, T., KÖLLNER, B., UND GOLDAMMER, T. (2015). Comprehensive and comparative transcription analyses of the complement pathway in rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* **42** 98–107.
- KOUADJO, K. E., NISHIDA, Y., CADRIN-GIRARD, J. F., YOSHIOKA, M., UND ST-AMAND, J. (2007). Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics* **8** 127.
- KRAMER, D. L. (1987). Dissolved oxygen and fish behavior. *Environmental Biology of Fishes* **18** 81–92.
- KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S., UND APPEL, L. J. (2003). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23** e20–e30.
- KRISTENSEN, A. S., ANDERSEN, J., JØRGENSEN, T. N., SØRENSEN, L., ERIKSEN, J., LOLAND, C. J., STRØMGAAARD, K., UND GETHER, U. (2011). SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacological Reviews* **63** 585–640.
- KUDLA, G., MURRAY, A. W., TOLLERVEY, D., UND PLOTKIN, J. B. (2009). Coding-Sequence Determinants of Gene Expression in *Escherichia coli*. *Science* **324** 255–258.
- LACHMANN, A., XU, H., KRISHNAN, J., BERGER, S. I., MAZLOOM, A. R., UND MA'AYAN, A. (2010). ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics* **26** 2438–2444.
- LARIONOV, A., KRAUSE, A., UND MILLER, W. (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6** 62.

- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., UND HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23** 2947–2948.
- LECLERCQ, E., TAYLOR, J. F., HUNTER, D., UND MIGAUD, H. (2010). Body size dimorphism of sea-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Implications for the management of sexual maturation and harvest quality. *Aquaculture* **301** 47–56.
- LEE, B. T. K., TAN, T. W., UND RANGANATHAN, S. (2003). MGAlignIt: a web service for the alignment of mRNA/EST and genomic sequences. *Nucleic Acids Research* **31** 3533–3536.
- LEE, H., OGAWA, H., FUJIOKA, M., UND GERTON, G. L. (1994). Guanidinoacetate methyltransferase in the mouse: extensive expression in Sertoli cells of testis and in microvilli of caput epididymis. *Biology of Reproduction* **50** 152–162.
- LEES-MILLER, J. P. UND HELFMAN, D. M. (1991). The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *BioEssays* **13** 429–437.
- LEMPERT, C. (1959). The Chemistry Of The Glycocyamidines. *Chemical Reviews* **59** 667–736.
- LETOWSKI, J., BROUSSEAU, R., UND MASSON, L. (2004). Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *Journal of Microbiological Methods* **57** 269–278.
- LIN, S. H. UND WU, C. L. (1996). Electrochemical removal of nitrite and ammonia for aquaculture. *Water Research* **30** 715–721.
- LIN, Y.-S., CHENG, T.-H., CHANG, C.-P., CHEN, H.-M., UND CHERN, Y. (2013). Enhancement of brain-type creatine kinase activity ameliorates neuronal deficits in Huntington’s disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832** 742–753.
- LIU, X. UND GOROVSKY, M. A. (1993). Mapping the 5’ and 3’ ends of *Tetrahymena thermophila* mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE). *Nucleic Acids Research* **21** 4954–4960.
- LOCHMILLER, R. L. UND DEERENBERG, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88** 87–98.
- LOHMANN, K. (1934). Über den Chemismus der Muskelkontraktion. *Naturwissenschaften* **22** 409–411.
- LONG, J. A. UND GORDON, M. S. (2004). The Greatest Step in Vertebrate History: A Paleobiological Review of the Fish-Tetrapod Transition. *Physiological and Biochemical Zoology* **77** 700–719.
- LUCAS, A. (2014). *amap: Another Multidimensional Analysis Package*. R package version 0.8-12.
- LUPATSCH, I., SANTOS, G. A., SCHRAMA, J. W., UND VERRETH, J. A. J. (2010). Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **298** 245–250.
- MALOY, S. UND STEWART, V. (1993). Autogenous regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology* **175** 307–316.

- MARCHLER-BAUER, A. UND BRYANT, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research* **32** W327–W331.
- MATEJUSOVA, I., MCKAY, P., BLAND, F., UND SNOW, M. (2010). Application of a sensitive, specific and controlled real-time PCR assay to surveillance indicates a low prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in wild herring, *Clupea harengus* L., in Scottish waters. *Journal of Fish Diseases* **33** 841–847.
- MATHIEU, C., MILLA, S., MANDIKI, S. N. M., DOUXFILS, J., UND KESTEMONT, P. (2014). In vivo response of some immune and endocrine variables to LPS in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) and modulation of this response by two corticosteroids, cortisol and 11-deoxycorticosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **167** 25–34.
- MCCLURE, W. C., RABON, R. E., OGAWA, H., UND TSENG, B. S. (2007). Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice. *Neuromuscular Disorders* **17** 639–650.
- McFARLANE, W. J., HEIGENHAUSER, G. J. F., UND McDONALD, D. G. (2001). Creatine supplementation affects sprint endurance in juvenile rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **130** 857–866.
- MCGUIRE, D. M., GROSS, M. D., VAN PILSUM, J. F., UND TOWLE, H. C. (1984). Repression of rat kidney L-arginine: glycine amidinotransferase synthesis by creatine at a pretranslational level. *Journal of Biological Chemistry* **259** 12034–12038.
- MERINO, G., BARANGE, M., BLANCHARD, J. L., HARLE, J., HOLMES, R., ALLEN, I., ALLISON, E. H., BADJECK, M. C., DULVY, N. K., HOLT, J., JENNINGS, S., MULLON, C., UND RODWELL, L. D. (2012). Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate? *Global Environmental Change* **22** 795–806.
- MI, H., MURUGANUJAN, A., CASAGRANDE, J. T., UND THOMAS, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols* **8** 1551–1566.
- MORALEJO, D. H., FULLER, J. M., RUTLEDGE, E. A., VAN YSERLOO, B., ETTINGER, R. A., JENSEN, R., OSBORNE, W., KWITEK, A., UND LERNMARK, Å. (2011). BB rat Gimap gene expression in sorted lymphoid T and B cells. *Life Sciences* **89** 748–754.
- MUDUNURI, U., CHE, A., YI, M., UND STEPHENS, R. M. (2009). bioDBnet: the biological database network. *Bioinformatics* **25** 555–556.
- MÜLHARDT, C. (2013). *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 7. Aufl.
- NELSON, J. S. (2006). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 4. Aufl.
- NEWSHOLME, E. A., BEIS, I., LEECH, A. R., UND ZAMMIT, V. A. (1978). The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle. *Biochemical Journal* **172** 533–537.
- NIPKOW, M., ALTMANN, S., KÖBIS, J. M., UND GOLDAMMER, T. (2014). Charakterisierung des Stressverhaltens von *Coregonus maraena* (Ostseeschnäpel) in Aquakultur. In: *Vortragstagung der DGfZ und GfT*. Dummerstorf.

- OGAWA, H., ISHIGURO, Y., UND FUJIOKA, M. (1983). Guanidoacetate methyltransferase from rat liver: Purification, properties, and evidence for the involvement of sulfhydryl groups for activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **226** 265–275.
- OHTSUKI, S., TACHIKAWA, M., TAKANAGA, H., SHIMIZU, H., WATANABE, M., HOSOYA, K.-I., UND TERASAKI, T. (2002). The Blood–Brain Barrier Creatine Transporter Is a Major Pathway for Supplying Creatine to the Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **22** 1327–1335.
- OKONECHNIKOV, K., GOLOSOVA, O., UND FURSOV, M. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **28** 1166–1167.
- OLIVEROS, J. C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- OMASITS, U., AHRENS, C. H., MÜLLER, S., UND WOLLSCHIED, B. (2014). Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* **30** 884–886.
- PARSONS, P. A. (1990). The metabolic cost of multiple environmental stresses: Implications for climatic change and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **5** 315–317.
- PERRONE, R. D., MADIAS, N. E., UND LEVEY, A. S. (1992). Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clinical Chemistry* **38** 1933–1953.
- PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G., UND CHRISTIE, P. (1982). Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology* **20** 229–244.
- PITTENGER, M. F., KAZZAZ, J. A., UND HELFMAN, D. M. (1994). Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* **6** 96–104.
- PLANAS, J. V., MARTÍN-PÉREZ, M., MAGNONI, L. J., BLASCO, J., IBARZ, A., FERNANDEZ-BORRAS, J., UND PALSTRA, A. P. (2013). Transcriptomic and Proteomic Response of Skeletal Muscle to Swimming-Induced Exercise in Fish. In: PALSTRA, A. P. UND PLANAS, J. V. (Hg.), *Swimming Physiology of Fish*, 237–256. Springer Berlin Heidelberg.
- PÜSCHEL, G. P., KÜHN, H., KIETZMANN, T., UND HÖHNE, W. (2011). *Taschenlehrbuch Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Aufl.
- R CORE TEAM (2014). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RANZ, J. M., CASTILLO-DAVIS, C. I., MEIKLEJOHN, C. D., UND HARTL, D. L. (2003). Sex-Dependent Gene Expression and Evolution of the *Drosophila* Transcriptome. *Science* **300** 1742–1745.
- REBL, A., KÖBIS, J. M., FISCHER, U., TAKIZAWA, F., VERLEIH, M., WIMMERS, K., UND GOLDAMMER, T. (2011). MARCH5 gene is duplicated in rainbow trout, but only fish-specific gene copy is up-regulated after VHSV infection. *Fish and Shellfish Immunology* **31** 1041–1050.
- REBL, A., KORYTÁŘ, T., KÖBIS, J. M., VERLEIH, M., KRASNOV, A., JAROS, J., KÜHN, C., KÖLLNER, B., UND GOLDAMMER, T. (2014a). Transcriptome Profiling Reveals Insight into Distinct Immune Responses to *Aeromonas salmonicida* in Gill of Two Rainbow Trout Strains. *Marine Biotechnology* **16** 333–348.

- REBL, A., REBL, H., KORYTÁŘ, T., GOLDAMMER, T., UND SEYFERT, H.-M. (2014b). The proximal promoter of a novel interleukin-8-encoding gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is strongly induced by CEBPA, but not NF- $\kappa$ B p65. *Developmental and Comparative Immunology* **46** 155–164.
- REBL, A., VERLEIH, M., KÖBIS, J. M., KÜHN, C., WIMMERS, K., KÖLLNER, B., UND GOLDAMMER, T. (2013). Transcriptome Profiling of Gill Tissue in Regionally Bred and Globally Farmed Rainbow Trout Strains Reveals Different Strategies for Coping with Thermal Stress. *Marine Biotechnology* **15** 445–460.
- REBL, A., VERLEIH, M., KÖLLNER, B., KORYTÁŘ, T., UND GOLDAMMER, T. (2012a). Duplicated NELL2 genes show different expression patterns in two rainbow trout strains after temperature and pathogen challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **163** 65–73.
- REBL, A., VERLEIH, M., KORYTÁŘ, T., KÜHN, C., WIMMERS, K., KÖLLNER, B., UND GOLDAMMER, T. (2012b). Identification of differentially expressed protective genes in liver of two rainbow trout strains. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **145** 305–315.
- RICKER, W. (1975). *Computation and Interpretation of Biological Statistics of Fish Populations*. Department of the Environment Fisheries and Marine Service, Ottawa.
- RITCHIE, M. E., SILVER, J., OSHLACK, A., HOLMES, M., DIYAGAMA, D., HOLLOWAY, A., UND SMYTH, G. K. (2007). A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* **23** 2700–2707.
- ROUNDS, S. A., WILDE, F. D., UND RITZ, G. F. (2013). Dissolved oxygen. In: *U.S. Geological Survey Techniques of Water- Resources Investigations, Buch 9, Kapitel A6*.
- RUSSELL, A. P., GHOBRIAL, L., WRIGHT, C. R., LAMON, S., BROWN, E. L., KON, M., SKELTON, M. R., UND SNOW, R. J. (2014). Creatine transporter (SLC6A8) knockout mice display an increased capacity for in vitro creatine biosynthesis in skeletal muscle. *Frontiers in Physiology* **5** 314.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., UND ERLICH, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239** 487–491.
- SALEM, M., REXROAD, C. E., WANG, J., THORGAARD, G. H., UND YAO, J. (2010). Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches. *BMC Genomics* **11** 564.
- SANDELL, L. L., GUAN, X.-J., INGRAM, R., UND TILGHMAN, S. M. (2003). Gatm, a creatine synthesis enzyme, is imprinted in mouse placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** 4622–4627.
- SÄNGER, A. M. UND STOIBER, W. (2001). Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I. (Hg.), *Muscle Development and Growth*, Bd. 18 von *Fish Physiology*, 187–250. Academic Press, San Diego.
- SANGER, F., NICKLEN, S., UND COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** 5463–5467.

- SCHARADIN, T. M., JIANG, H., JANS, R., RORKE, E. A., UND ECKERT, R. L. (2011). TIG3 Tumor Suppressor-Dependent Organelle Redistribution and Apoptosis in Skin Cancer Cells. *PLoS ONE* **6** e23230.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W., UND BROWN, P. O. (1995). Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* **270** 467–470.
- SCHIAFFINO, S. UND REGGIANI, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews* **91** 1447–1531.
- SCHMIDT, A., MARESCAU, B., BOEHM, E. A., RENEMA, W. K. J., PECO, R., DAS, A., STEINFELD, R., CHAN, S., WALLIS, J., DAVIDOFF, M., ULLRICH, K., WALDSCHÜTZ, R., HEERSCHAP, A., DEYN, P. P. D., NEUBAUER, S., UND ISBRANDT, D. (2004). Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency. *Human Molecular Genetics* **13** 905–921.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., UND ELICEIRI, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9** 671–675.
- SCHWEFEL, D., ARASU, B. S., MARINO, S. F., LAMPRECHT, B., KÖCHERT, K., ROSENBAUM, E., EICHHORST, J., WIESNER, B., BEHLKE, J., ROCKS, O., MATHAS, S., UND DAUMKE, O. (2013). Structural Insights into the Mechanism of GTPase Activation in the GIMAP Family. *Structure* **21** 550–559.
- SCOTT, W., STEVENS, J., UND BINDER–MACLEOD, S. A. (2001). Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Physical Therapy* **81** 1810–1816.
- SIEBERT, P. D., CHENCHIK, A., KELLOGG, D. E., LUKYANOV, K. A., UND LUKYANOV, S. A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **23** 1087–1088.
- SMYTH, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **3** 1–25.
- SMYTH, G. K. (2005). Limma: linear models for microarray data. In: GENTLEMAN, R., CAREY, V., DUDOIT, S., IRIZARRY, R., UND HUBER, W. (Hg.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, 397–420. Springer, New York.
- SOLOVYEV, V., KOSAREV, P., SELEDOV, I., UND VOROBYEV, D. (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biology* **7** S10.
- SPUDICH, J. A. UND WATT, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *Journal of Biological Chemistry* **246** 4866–4871.
- SPURGEON, S. L., JONES, R. C., UND RAMAKRISHNAN, R. (2008). High Throughput Gene Expression Measurement with Real Time PCR in a Microfluidic Dynamic Array. *PLoS ONE* **3** e1662.
- SRINIVASAN, U. T., WATSON, R., UND SUMAILA, U. R. (2012). Global fisheries losses at the exclusive economic zone level, 1950 to present. *Marine Policy* **36** 544–549.

- STÅHLBERG, A., KUBISTA, M., UND PFAFFL, M. (2004). Comparison of Reverse Transcriptases in Gene Expression Analysis. *Clinical Chemistry* **50** 1678–1680.
- STIEN, L. H., BRATLAND, S., AUSTEVOLL, I., OPPEDAL, F., UND KRISTIENSEN, T. S. (2007). A video analysis procedure for assessing vertical fish distribution in aquaculture tanks. *Aquacultural Engineering* **37** 115–124.
- STÖCKLER-IPSIROGLU, S., MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S., UND SALOMONS, G. S. (2012). Creatine Deficiency Syndromes. In: SAUDUBRAY, J.-M., BERGHE, G. V. D., UND WALTER, J. H. (Hg.), *Inborn Metabolic Diseases*, 239–247. Springer Berlin Heidelberg.
- SYLVÉN, S. UND ELVINGSON, P. (1992). Comparison of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains for body weight, length and age at maturity in different Swedish production systems. *Aquaculture* **104** 37–50.
- TACHIKAWA, M., KASAI, Y., YOKOYAMA, R., FUJINAWA, J., GANAPATHY, V., TERASAKI, T., UND HOSOYA, K.-I. (2009). The blood–brain barrier transport and cerebral distribution of guanidinoacetate in rats: involvement of creatine and taurine transporters. *Journal of Neurochemistry* **111** 499–509.
- TAMURA, K. UND NEI, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10** 512–526.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., UND KUMAR, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30** 2725–2729.
- TERBLANCHE, S., MASONDO, T. C., UND NEL, W. (1998). Effects of cold acclimation on the activity levels of creatine kinase, lactate dehydrogenase and lactate dehydrogenase isoenzymes in various tissues of the rat. *Cell Biology International* **22** 701–707.
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research* **43** D204–D212.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., UND GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22** 4673–4680.
- THORSTENSSON, A., GRIMBY, G., UND KARLSSON, J. (1976). Force-velocity relations and fiber composition in human knee extensor muscles. *Journal of Applied Physiology* **40** 12–16.
- TZUBERY, T., RIMON, A., UND PADAN, E. (2004). Mutation E252C increases drastically the  $K_m$  value for  $\text{Na}^+$  and causes an alkaline shift of the pH dependence of NhaA  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **279** 3265–3272.
- UDA, K., FUJIMOTO, N., AKIYAMA, Y., MIZUTA, K., TANAKA, K., ELLINGTON, W. R., UND SUZUKI, T. (2006). Evolution of the arginine kinase gene family. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **1** 209–218.
- UK DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD & RURAL AFFAIRS (1996). FAWC report on the welfare of farmed fish. Techn. Ber.

- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M., UND ROZEN, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40** e115.
- USDA UND HHS (2010). *Dietary Guidelines for Americans, 2010*. U.S. Department of Agriculture; U.S. Department of Health and Human Services; U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 7. Aufl.
- VAN PILSUM, J. F., TAYLOR, D., ZAKIS, B., UND MCCORMICK, P. (1970). Simplified assay for transaminase activities of rat kidney homogenates. *Analytical Biochemistry* **35** 277–286.
- VANCE, D. E. UND CHOY, P. C. (1979). How is phosphatidylcholine biosynthesis regulated? *Trends in Biochemical Sciences* **4** 145–148.
- VANDESOMPELE, J., PRETER, K. D., PATTYN, F., POPPE, B., ROY, N. V., PAEPE, A. D., UND SPELEMAN, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3** research0034.
- VERLEIH, M., REBL, A., KÖLLNER, B., KORYTÁŘ, T., ANDERS, E., WIMMERS, K., UND GOLDAMMER, T. (2012). Comparative molecular characterization of the regucalcin (*RGN*) gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and maraena whitefish (*Coregonus maraena*). *Molecular Biology Reports* **39** 4291–4300.
- VERLEIH, M., REBL, A., KÖLLNER, B., KORYTÁŘ, T., KÖBIS, J. M., KÜHN, C., WIMMERS, K., UND GOLDAMMER, T. (2013). Iron–sulfur cluster scaffold (ISCU) gene is duplicated in salmonid fish and tissue and temperature dependent expressed in rainbow trout. *Gene* **512** 251–258.
- VERLEIH, M., REBL, A., KÖLLNER, B., KORYTÁŘ, T., KOTTERBA, G., ANDERS, E., WIMMERS, K., UND GOLDAMMER, T. (2010). Molecular characterization of PRR13 and its tissue-specific expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* **36** 1271–1276.
- VOOGHT, K. M. K. D., WIJK, R. v., UND SOLINGE, W. W. v. (2009). Management of Gene Promoter Mutations in Molecular Diagnostics. *Clinical Chemistry* **55** 698–708.
- WANG, L., CHEN, D., YANG, L., HUANG, S., ZHANG, Y., UND ZHANG, H. (2010). Expression patterns of the creatine metabolism-related molecules AGAT, GAMT and CT1 in adult zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* **76** 1212–1219.
- WANG, L., CHEN, D., ZHANG, Y., LIN, Y., LI, J., UND ZHANG, H. (2008). Characterization of AGAT, GAMT and CT1 in amphioxus: implications for the evolutionary conservation of creatine metabolism related molecules at the invertebrate-to-vertebrate transition. *Development Genes and Evolution* **218** 681–689.
- WANG, L., ZHANG, Y., SHAO, M., UND ZHANG, H. (2007). Spatiotemporal expression of the creatine metabolism related genes *agat*, *gamt* and *ct1* during zebrafish embryogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* **51** 247–253.
- WARNES, G. R., BOLKER, B., BONEBAKKER, L., GENTLEMAN, R., LIAW, W. H. A., LUMLEY, T., MAECHLER, M., MAGNUSSON, A., MOELLER, S., SCHWARTZ, M., UND VENABLES, B. (2014). *gplots: Various R programming tools for plotting data*. R package version 2.15.0.

- WEISDORF, J. L. (2005). From Foraging To Farming: Explaining The Neolithic Revolution. *Journal of Economic Surveys* **19** 561–586.
- WERNERSSON, R. (2006). Virtual Ribosome—a comprehensive DNA translation tool with support for integration of sequence feature annotation. *Nucleic Acids Research* **34** W385–W388.
- WHEELAN, S. J., CHURCH, D. M., UND OSTELL, J. M. (2001). Spidey: A Tool for mRNA-to-Genomic Alignments. *Genome Research* **11** 1952–1957.
- WRIGHT, M. M. UND MCMASTER, C. R. (2002). PC and PE synthesis: Mixed micellar analysis of the cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase activities of human choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1). *Lipids* **37** 663–672.
- WYKES, D. L. (2004). Robert Bakewell (1725-1795) of Dishley: Farmer and Livestock Improver. *The Agricultural History Review* **52** 38–55.
- WYSS, M. UND KADDURAH-DAOUK, R. (2000). Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews* **80** 1107–1213.
- WYSS, M. UND WALLIMANN, T. (1994). Creatine metabolism and the consequences of creatine depletion in muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry* **133/134** 51–66.
- XIAO, S.-J., ZHANG, C., ZOU, Q., UND JI, Z.-L. (2010). TiSGeD: a database for tissue-specific genes. *Bioinformatics* **26** 1273–1275.
- ZANTE, M. D., BORCHEL, A., BRUNNER, R. M., GOLDAMMER, T., UND REBL, A. (2015). Cloning and characterization of the proximal promoter region of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6 gene. *Fish and Shellfish Immunology* **43** 249–256.
- ZHOU, M. Y. UND GOMEZ-SANCHEZ, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current Issues in Molecular Biology* **2** 1–7.

# Anhang

## A. Verwendete Primer

Es sind jeweils Vorwärts- und Rückwärts-Primer angegeben; bei den RACE-PCR-Primern, jeweils erster und verschachtelter Primer. Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert.

### Kreatin-CDS-PCR-Primer

#### Regenbogenforelle (*O. mykiss*)

<i>GATM</i>	CCGCGCTAGAATATCCCAAAT	TGCAGATTGTTGATTGGGACTTT
<i>GAMT</i>	AGACAGCAACTCCGTCCATC	GCACTTGAGAAGGCATGACA
<i>CKM</i>	GGCTCTGGTGAACAGGATCTGA	GGTTGGCTCAATGGCACATAAC

#### Ostseeschnäpel (*C. maraena*)

<i>GAMT<sub>a</sub></i>	TCCCCAGCGATTAGAGAATAA	CATCGCTGAGTGCTTATGGATT
<i>GAMT<sub>b</sub></i>	TCCGTCATCCCCCATATATTA	AAAAATTGCGATGGCATCAAG

### Kreatin-*SLC6A8* -Identifizierungs-PCR-Primer

#### Regenbogenforelle (*O. mykiss*) - *SLC6A8*

Degen.1	CCTCCATGGTGATTGTSTTCT	CRCTGGCWGAGTAGTAGTCAAA
Degen.2	TGGTAAACAGAGGGAGGGATG	GGGATRCAGAGCATSGAGGA
genomisch 1	ACTATTCTGCCAGTGGGATCA	GATTCTGTGGGGCTCAGATG
genomisch 2	TGGAGTCAAAGTGGGTCTGT	ATATCCACGGCAGCAGGAAT
Genomwand. 1	CTGCCAGTATTGAGTTCTGG	TGTTTACTTCTGCATCTGGAAG
Genomwand. 2	GGTTGGTGAAGGAGTGAAGC	AGGAAGTACAGGCCCCACAC
Genomwand. 3	CGTGACAAAGCCCTCCAC	AGAAGAAGAGCGCTGCCACGA

5' RACE	GGTTGGTGAAGGAGTGAAGC	GGATCATGATGATAGGTGTTACAGA
5' RACE	AAAGAGAGGGGCAATGTTCC	GGGAATACCTCCGATGAACA
5' RACE	GGGAATACCTCCGATGAACA	TTGTAGCAGAGGTAAGGGAAGC
5' RACE	TTGTAGCAGAGGTAAGGGAAGC	TGGTCCAGGTCTCTCTCCAC
5' RACE	TGGTCCAGGTCTCTCTCCAC	ACCTGGGAGTCTCTCTCCACTT
3' RACE	GGCTCGTATGATTGGCTACC	TGAACTACAAGCCCTGACC
CDS	CCACCTAACGTTACCCGGTTTATT	GATTCTGTGGGGCTCAGATG

### Kreatin-qRT-PCR-Primer

#### Regenbogenforelle (*O. mykiss*)

<i>GATM</i>	ACCTCTACTGGCATGTATGCTG	CTTGGCACCCCTTCTGAAGTAC
<i>GAMT</i>	TCGACAACATGTTCCAGGAGAC	GCAGTGGCATCAAGCCATTCA
<i>SLC6A8</i>	GGAAAGCCAGGTGTGGATTGA	AAAGAACTGGTCCCAGTGTGA
<i>CKM</i>	ATAAACCAGGCCACCCCTTCA	TGGGTTCAAGTCCGCTTGTG
<i>CKM</i>	TGCGTTGGTCTGAAAGGATTGA	TCTCTCAAACCTGGGGTGTGT
<i>EEF1A1</i>	TGATCTACAAGTCCGGAGGCA	CAGCACCCAGGCATCTGTAA
<i>RPS5</i>	ATGACATCTCACTGACGATTAC	ATCAGCTCTTGGCGTGTGTG
<i>ACTB</i>	ACCCAGCTTCTCAGTCTCATT	TCAGCTGCATGATAGAATCTC

#### Ostseeschnäpel (*C. maraena*)

<i>GATM</i>	GCCTGACGATCAGGAGTACCC	CATCCACTCAATCCCATGTAG
<i>GAMT<sub>a</sub></i>	GTGGTGTCTCACCTACTGC	TTTGCATTCCGTTGGGGAAAC
<i>GAMT<sub>b</sub></i>	CTGAAGCCAGTGGGTTTCT	GGTTGGTGTCTAATCATCTCC
<i>CKM</i>	CGCTGCAGAAAGCGTGGCAC	TGCTGTCCAGTGGCCTCTCCC
<i>EEF1A1</i>	CCTCCACTTGGTGGTTCG	CGCAGGATGATGGGCAGCAGA
<i>RPL9</i>	ACCACATCAACCTGGAACCTCA	CGCATCTTGTAAACGGAAACC
<i>RPL32</i>	CAGGCGGTTTAAAGGTCAG	ATCTCAGCAGCATGGGTC

### Hering (*C. harengus*)

<i>GATM</i>	ACCATGTCTGATGAGCTGTATGA	TGTAACCTGACTCTCTGTACAA
<i>GAMT</i>	CAACCACCTTTGACGGCATTCTG	ATTTACCCCTTCAGCAGCTCTCC
<i>CKM</i>	GCAAAAAGATTGAGGCCATCTTCA	TGCAGACGCAGCCCTTTTCAGG
<i>EEF1A1</i>	GGCTTCAAATTTAAGAAGCTGTC	GGTGCAATAGCCAGCAGTATC
<i>RPL8</i>	TAAGGGAATCGTGAAGGACATCA	TGGGCCTCTTGGCCACAGTAG

### Flussbarsch (*P. fluviatilis*)

<i>GATM</i>	AAACGGTGCCAAATGGAOACT	CTCGAATGAAGTCAGCAGCATC
<i>GAMT</i>	CAGACTTCAACATCCTGTGAGC	TCGTCCCTCTGAAGGCCTTT
<i>CKM</i>	GGCTTGGCCTGAAGAAGATTGA	TCTCTCGAACTTGGCGTGTG
<i>EEF1A1</i>	GGAAATTCGTCTGGATACG	GGGTGGTTCAGGATGATGAC
<i>ACTB</i>	ACCTTCTACAAGAGCTGAGAGTT	AGTGGTAGCCAGGAGGCATAC

### Maus (*M. musculus*)

<i>GATM</i>	TACTCTCCAACACCAGTCATC	CTGATACCCAGCTTCTCAAACAT
<i>GAMT</i>	TTGGCGCCGGCAGGAGACT	AGACCCCGCCCTCTGGA
<i>CKM</i>	ACGTGAAGCTGGGAAACCTGA	CTGTTGACTTCCGATGAGCC
<i>RPL38</i>	CCGGGGAAAGGATGCCAAGT	ACTGCCAAACCCGGGGTAG
<i>EEF2</i>	CCGGAACATGTCATCATCGC	GATGGCGTGGATTGATTGTG

### Rind (*B. taurus*)

<i>GATM</i>	ACTCCTCCAACACCAATCATCC	ACTGATACCCAGCTTTTCAAACAT
<i>GAMT</i>	CACCTTTGATGGATCCTGTACG	TGGTGGTATGCTGAATACTTG
<i>CKM</i>	CCGTGGCATCTGGCAATGA	CGGTGGCCGGCTTTCTTGA
<i>EIF3K</i>	CCAGGCCCAAGAAAGAAC	GACATGGCAGATAAATTTTCGG
<i>MTG1</i>	CTGGCTGACTTCTCTCTAC	CCGTGAGCCTTCAACCTTC

### Schwein (*S. scrofa*)

<i>GATM</i>	CCTGATTTTGGTCTACGGTTT	CCCACGGCGGAAGTAGTCTTT
<i>GAMT</i>	TGCAATGACGGCTCTTCCAG	CCTCAGACAGCGGGTACGTG
<i>CKM</i>	AGAACCCTCAAGGGTGGAGAGC	CTTGAACCTCTCCCGTACGGCT
<i>TOP2B</i>	ATGATGCTGGTGGCAACACTC	TTATGAGAAGCCTCCCGCACAT
<i>HSPCB</i>	GCACCTCACAGTTCATAGGTTATC	ATCTGAGCCACATCTTCAACTCT
<i>YWHAZ</i>	GTACTGTCTCTTTGGAAAAGTTC	TGATTTCAAAGCTTCCGTGATAT

### Mikrofluid-Chip-basierte Echtzeit-PCR-Primer

#### Regenbogenforelle (*O. mykiss*)

<i>CAPNS1</i>	ATGGACAGCGACAGCACAGGA	GAAGAGCTGGTGGTGGAGG
<i>CEPT1A</i>	ATGAATACCTGGTGTGGATT	GGGGGGGAGAAAGAGTAATAGT
<i>CEPT1B</i>	GGTGTCTGGATTGGCTGAT	ATAGACAGTAATGGCGTCCGTG
<i>CIIRBPC</i>	GGAAAGCTTTCCCAAGTATGGA	CCATCGACAGACTTGGCCGTTTC
<i>CIIRBPD</i>	TGGCTGAAGCTTTGGCTAAGTAT	GTCAACTGACTTGGCGTTCATG
<i>GIMAP7</i>	GACAAGACCCAAATATGACTGGT	CAGAGAAACAGGGGAAAGTTAG
<i>GLUD1</i>	ATTGTCCCAACCGCTGACTTC	TTGACGTACCGAGCCGTCGG
<i>IFI30A</i>	ATAAATGGGGAACACACCCGATGA	CGGTATTGGTAAGATGTCGATTAT
<i>IFI30B</i>	ATTGTCAATAATGGGAGCACAC	TTGAGACGTAGATGGTTTACTCG
<i>PFN2</i>	ACATAACGGTTGACGAAATCGAC	GCTCTCTCTTGAATCTTTGT

<i>RARRES3</i>	AGGCTGAGTCTGACAGGTTCC	ACAGGTGCTCACTTATATTTCTCC
<i>SERINC1</i>	GACCAATGAGCCAGACAGGAAA	TTAGAGGAGTTTCCGATGCTTGA
<i>SF3A2A</i>	GCATACGAGCAGCGCATTGAG	TTGGAGGAAAAACTGCTTTGTATC
<i>SF3A2B</i>	TGCGCTTCAAGGTGCCAAGCA	TTATACCCATGGGGGTACGG
<i>SOD1A</i>	CTGATGCTGTTGGCACGTAG	TTCCACAGATCATCAGCCTTCTC
<i>SOD1B</i>	GACCCAAAGATGATGTCAGGC	TTCCCAAGGTATCAGCTTTCT
<i>STAU1A</i>	CTCCTCCAGCCGCTCTTCA	GTTTGGCACACCAGAGGTTG
<i>TPM1A</i>	CCAAACTTGAGAAGACCATGAC	AGGGTTGGTTCATGGCATGGC
<i>TPM1B</i>	CGCTGAGAGATCAGTAACCAAG	TGCAATAACAAGAACCCAAACC
<i>NOF14</i>	ACATCTTCAATCAAAAAGTATTC	AGTCCAGCAGCTCCCAACTTCT

## B. Verwendete Geräte und Chemikalien

### B.1. Geräte

#### Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Biomark HD	Fluidigm Corporation, South San Francisco, USA
Block Heater Stuart SBH130D	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
ChemiDoc MP	Bio-Rad, Hercules, USA
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Memmert, Schwabach
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus	Scientific Support, Inc, Hayward, USA
Elektrophorese-Kammer (Electro-4)	FisherScientific, Schwerte
Feinwaage Delta Range® PM480	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
HERAsafe HS Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Homogenisator Precellys 24	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
IFC Controller RX	Fluidigm Corporation, South San Francisco, USA
Konfokalmikroskop LSM 780	Carl Zeiss Microscopy
LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Mannheim
LightCycler 96 Real-Time PCR System	Roche, Mannheim
Medingen Wasserbad W6	Labortechnik Medingen, Dresden
Microfuge MicroV	FisherScientific, Schwerte
Milli-Q Integral Water Purification System	Millipore, Billerica, USA
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Netzteil PowerPack P25	Biometra, Göttingen
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen
Thermocycler Tprofessional	Biometra, Göttingen
TSc ThermoShaker	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

### B.2. Kits

192.24 GE DELTAgene Sample and Assay Reagent Kit	Fluidigm Corporation, South San Francisco, USA
CloneJET PCR Cloning Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Control Line Fluid Kit 192.24	Fluidigm Corporation, South San Francisco, USA
DNA-Suspensionspuffer	Affymetrix
DNeasy Blood & Tissue-Kit	Qiagen, Hilden
Exonuclease I	ThermoScientific, Waltham, USA
GeneRacer Kit	Invitrogen, Karlsruhe
GenomeWalker Universal Kit	Clontech, Heidelberg
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Basel, Schweiz
HotStarTaq Plus	Qiagen, Hilden
InsTAClone-Kit	ThermoScientific, Waltham, USA
pGem T-easy Ligation-Kit	Promega, Fitchburg, USA
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	Life Technologies, Carlsbad, USA
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Rgt Kit, Pre Amp and Reverse Transcription Master Mix	Fluidigm Corporation, South San Francisco, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SensiFast SYBR No-ROX Kit	Bioline, London, UK
SSo Fast EvaGreen Supermix with low ROX	Bio-Rad, Hercules, USA
SuperScriptII Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TE-Puffer	Qiagen, Hilden
ZR Plasmid Miniprep-Classic	Zymo Research, Freiburg

### B.3. Chemikalien

Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biodeal, Markkleeberg
Ampicillin	AppliGene, Illkirch Graffenstaden
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Clarity Western ECL-Substrat	Bio-Rad, Hercules, USA
DME-Fertigmedium	Sigma Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Roche, Basel, Schweiz
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
FKS	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Hoechst 33342	Sigma Aldrich, Taufkirchen
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin
Polyacylamid-Gele (10%ig)	Bio-Rad, Hercules, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	AppliChem, Darmstadt
TriZol	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
X-GAL	Carl Roth, Karlsruhe





## D. Veröffentlichte GenBank-Sequenzen

LOCUS LN612747 395 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Clupea harengus partial mRNA for creatine kinase, muscle (ckm gene).

CDS <1..>395

/gene="ckm"

/function="converts creatine to creatine phosphate"

/codon\_start=2

/product="creatine kinase, muscle"

/protein\_id="CEG06601.1"

/db\_xref="GI:723005174"

/translation="DHLRVISMQQGGMKEVFKRFCTGLQKIEAIFKKNHGFWSNEH

LGYYLTCPSNLGTGLRGGVHVKLPKLSVHAKFDEILKRLRLQKRGTGGVDTASVGGVF

DISNADRLGSSEVAQVQMVDGVKLMVAM"

ORIGIN

```
1 ggatcacttg cgtgtcatct ctatgcagca gggaggcaac atgaaggagg ttttcaagcg
61 cttttgtact ggtctgcaaa agattgaggc catcttcaag aagcacaacc atggcttcag
121 ttggaatgaa catctgggct acgtcctgac ctgcccctcc aacttgggaa ctggcctgcg
181 tgggtggtgc catgtcaagc tgcccaagct gagcgtacat gccaagtttg acgagatcct
241 gaaaaggctg cgtctgcaga agcgtggaac aggtggtgtg gacactgcct ctgtgggtgg
301 agtctttgac atctccaacg ctgaccgtct gggatcctcc gaggtggcac aggtgcagat
361 ggtcgtcgat ggagtcaagc tcatggttgc catgg
//
```

LOCUS LN612746 384 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Clupea harengus partial mRNA for guanidinoacetate N-methyltransferase (gamt gene).

CDS <1..>384

/gene="gamt"

/function="synthesizes creatine"

/codon\_start=1

/product="guanidinoacetate N-methyltransferase"

/protein\_id="CEG06600.1"

/db\_xref="GI:723005172"

/translation="CNDGVFQRLQEWAQVQPHKIVPLKGLWEDVVATLPDNHFDGILY

DTYPLTEDTWHTHQFNFIQGHANRLKSGGVLTTCNLTSWGELLKGYDNIKMFQES

QVPHLIKAGFKKENISTTLMDIIPPA"

## ORIGIN

```
1 tgcaatgacg gagtgtcca gaggctacag gaatgggcca aggttcagcc tcacaaaatt
61 gtgccattga aaggcctgtg ggaggatggt gtcgccaccc taccagacaa ccactttgac
121 ggcattctgt atgacacata ccctctgact gaggatacat ggcacactca tcagtttaac
181 ttcattcagg gtcatgcaa cagattgctg aatctggag gagttctcac ctactgcaat
241 cttacctcct ggggagagct gctgaagggt aaatatgaca acattgagaa aatgttccag
301 gagtccaag tgctcatct gatcaaggct ggcttcaaga aggagaacat cagcacaacc
361 ctgatggaca tcattcccc tgct
//
```

LOCUS LN612745 325 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Clupea harengus partial mRNA for glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase) (gatm gene).

CDS <1..>325

/gene="gatm"

/function="synthesizes guanidinoacetate"

/codon\_start=3

/product="glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)"

/protein\_id="CEG06599.1"

/db\_xref="GI:723005170"

/translation="RDILVVIGNEIIEAPMAWRSRFFEYRAYRPLIKDYFRGAKWTT  
APKPTMSDELYDQDYPVRTVEDRHKLAAQGKFVTEHEPCFDAADFIRAGTDIFVQRS  
QVTNY"

## ORIGIN

```
1 ccagagatat tctcgtcgtc attgggaatg agattattga ggctcccatg gcatggaggt
61 cccggttctt tgagtacaga gcatatagcc ctctcatcaa ggactacttc aggagagggg
121 caaagtggac tacagctcca aaacctacca tgtctgatga gctgtatgat caagactacc
181 ccatccgtac tgtggaggac aggcacaagc tggctgcca gggcaagttt gtgaccacgg
241 agcatgagcc ctgcttcgat gctgctgatt tcataagggc tgggacagat atctttgtac
301 agaggagtca ggttacaat tacat
//
```

LOCUS LN612744 395 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Perca fluviatilis partial mRNA for creatine kinase, muscle (ckm gene).

CDS <1..>395

/gene="ckm"

```
/function="converts creatine to creatine phosphate"  
/codon_start=2  
/product="creatine kinase, muscle"  
/protein_id="CEG06598.1"  
/db_xref="GI:723005168"  
/translation="DHLRVISMQQGGMKEVFRFRFCVGLKKIEEIFKKNHGFWMNEH  
LGYILTCPSNLGTGLRGGVHVKLPKLSTHAKFEEILTRLRLQKRGTGGVDTASVGGVF  
DISNADRLGSSEVDQVQLVVDGVKLMVEM"  
ORIGIN  
1 ggatcacctg cgtgtcatct ccatgcagca gggaggcaac atgaaggagg tcttcagacg  
61 cttctgcggtt ggcctgaaga agattgagga gatcttcaag aagcacaacc acggcttcat  
121 gtggaacgag catctgggct acatcctgac ctgcccctcc aacctgggaa cggcctgcg  
181 cggtggtgtg cacgtcaagc tgccaagct cagcacacac gccaagtctg aggagatcct  
241 gaccaggctg cgtctgcaga agcgtggcac aggcggcgtg gacacagcct ctgtgggtgg  
301 tgtgttcgac atctccaacg ctgaccgtct gggctcctcc gaggtggacc aggtccagct  
361 ggtggttgac ggtgtcaagc tgatggttga gatgg  
//
```

LOCUS LN612743 384 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Perca fluviatilis partial mRNA for guanidinoacetate  
N-methyltransferase (gamt gene).

CDS <1..>384

```
/gene="gamt"  
/function="synthesizes creatine"  
/codon_start=1  
/product="guanidinoacetate N-methyltransferase"  
/protein_id="CEG06597.1"  
/db_xref="GI:723005166"  
/translation="CNDGVFARLENWAKSQPHKVVPLKGLWENVVPTLPDNHFDGILY  
DTYPLSEETWHTHQFDFIKGHAHRMLKSGGVLTYCNLTSWGELLKTKYDNIKMFEEET  
QVPHLLQAGFKREKISTTTMDIAPPT"  
ORIGIN  
1 tgcaacgacg gtgtctttgc cagactggag aattgggcca agtctcagcc acataagtc  
61 gtccctctga aggcctttg ggagaacgtt gttccacac ttccagataa cactttgat  
121 ggtatcctgt atgacacata ccctttgtca gaagagacat ggcacactca ccagttcgac  
181 ttcattaagg gtcacgctca caggatgttg aagtctggcg ggtcctcac ctactgcaac  
241 ctgacctcct gggcgagct actcaagacc aaatacgaca acattgagaa gatgtttgag  
301 gagaccagg tgctcatct gctccaagcc ggcttcaaga gggagaagat tagcaccacc
```

```
361 accatggaca ttgcaccacc cacc
```

```
//
```

```
LOCUS LN612742 325 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014
```

```
DEFINITION Perca fluviatilis partial mRNA for glycine amidinotransferase  
(L-arginine:glycine amidinotransferase) (gatm gene).
```

```
CDS <1..>325
```

```
/gene="gatm"
```

```
/function="synthesizes guanidinoacetate"
```

```
/codon_start=3
```

```
/product="glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine  
amidinotransferase)"
```

```
/protein_id="CEG06596.1"
```

```
/db_xref="GI:723005164"
```

```
/translation="RDILLVVGNEIIEAPMAWRARFFEYRAYRPLIKEYFRNGAKWTT  
APKPTMADELYDQDYPIRTVEDRHMLAAEGKFVTEHEPCFDAADFIRAGRDLFVQRS  
QVTNY"
```

```
ORIGIN
```

```
1 ccagagacat cttctggtt gtcgggaatg agattattga ggctcctatg gcctggaggg  
61 ctcgcttctt tgaataccga gcctacaggc ctttgatcaa ggagtacttc agaaacggtg  
121 ccaaatggac cactgctcct aaaccacta tggccgatga gctgtatgat caggactacc  
181 ccatccgcac agtggaggac agacacatgc tggcagccga ggggaagttc gtgaccacag  
241 agcatgagcc ctgcttcgat gctgctgact tcattcgagc tgggagggac ctgtttgtcc  
301 agaggagtca ggttacaaat tacat
```

```
//
```

```
LOCUS LN612741 395 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014
```

```
DEFINITION Sander lucioperca partial mRNA for creatine kinase, muscle (ckm  
gene).
```

```
CDS <1..>395
```

```
/gene="ckm"
```

```
/function="converts creatine to creatine phosphate"
```

```
/codon_start=2
```

```
/product="creatine kinase, muscle"
```

```
/protein_id="CEG06595.1"
```

```
/db_xref="GI:723005162"
```

```
/translation="DHLRVISMQQGGMREVFRRFCVGLQKIEEIFKKNHGFWMNEH  
LGYILTCPSNLGTGLRGVHVHVKLPKLSHPKFDEILTRLRLQKRGTTGGVDTASVGGVF
```

DISNADRLGSSEVAQVQLVVDGVKLMVEM"

ORIGIN

```
1 ggatcacctg cgtgtcatct ccatgcagca ggggtggcaac atgagggagg tcttcaggcg
61 tttctgcggtt ggcctgcaga agattgagga gatcttcaag aagcacaacc acggcttcat
121 gtggaacgag catctgggct acatcctgac ctgccctcc aacctgggta ccggcctgcg
181 tggtagcgctc cacgtcaagc tgcccaagct gagcacacac cccaagttcg acgagatcct
241 caccaggctg cgtctgcaga aacgtggcac aggtgggtgtg gacaccgcct ccgtgggtgg
301 tgtgttcgac atctccaacg ccgaccgtct gggctcctcc gaggtggccc aggtccagtt
361 ggtggtgat ggtgtcaagc tgatggtgga gatgg
```

//

LOCUS LN612740 384 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Sander lucioperca partial mRNA for guanidinoacetate  
N-methyltransferase (gamt gene).

CDS <1..>384

/gene="gamt"

/function="synthesizes creatine"

/codon\_start=1

/product="guanidinoacetate N-methyltransferase"

/protein\_id="CEG06594.1"

/db\_xref="GI:723005160"

/translation="CNDGVFARLENWAKSQPHKVVPLKGLWENVVPTLPDNHFDGILY

DTYPLSEETWHTHQFDFIKGHAHRMLKSGGVLTTCNLTSWGELLKTKYDNIEKMFEEET

QVPHLLQAGFKREKIRTTAMDIAPPT"

ORIGIN

```
1 tgcaacgacg gtgtctttgc cagactggag aactgggcca agtctcagcc acataaggtt
61 gtcctctga agggcctttg ggagaacgtt gttccacac ttccagataa ccactttgat
121 ggtatcctgt atgacacata ccctttgtca gaagagacat ggcacactca ccagtttgac
181 ttcattaagg gtcacgctca caggatgttg aagtctggcg gggtcctcac ctactgcaac
241 ctgacctcct ggggagcagct actcaagacc aaatacgaca acattgagaa gatgtttgag
301 gagactcagg tgcctcatct gctccaagcc ggcttcaaga gggagaagat taggaccacc
361 gccatggaca ttgaccacc cacc
```

//

LOCUS LN612739 325 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Sander lucioperca partial mRNA for glycine amidinotransferase  
(L-arginine:glycine amidinotransferase) (gatm gene).

CDS <1..>325

```
/gene="gatm"  
/function="synthesizes guanidinoacetate"  
/codon_start=3  
/product="glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine  
amidinotransferase)"  
/protein_id="CEG06593.1"  
/db_xref="GI:723005158"  
/translation="RDILLVVGNEIIEAPMAWRARFFEYRAYRPLIKEYFRNGAKWTT  
APKPTMADELYDQDYPVRTVEDRHKLAAEGKFVTEHEPCFDAADFIRAGRDLFVQRS  
QVTNY"  
ORIGIN  
1 ccagagacat cttctgggtt gtcgggaatg agattattga ggctcctatg gcctggaggg  
61 ctcgcttctt tgaataccga gcctacaggc ctttgatcaa ggagtacttc agaaacgggtg  
121 ccaaattggac cactgctcct aaaccacta tggccgatga gctgtatgat caggactacc  
181 ccatccgcac agtggaggac agacacaagc tggcagccga ggggaagttt gtgaccacag  
241 agcatgagcc ctgcttcgat gctgctgact tcattcgagc tgggagggac ctttttgtcc  
301 agaggagtca ggttacaat tacat  
//  
  
LOCUS LN612738 395 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014  
DEFINITION Coregonus maraena partial mRNA for creatine kinase, muscle (ckm  
gene).  
CDS <1..>395  
/gene="ckm"  
/function="converts creatine to creatine phosphate"  
/codon_start=2  
/product="creatine kinase, muscle"  
/protein_id="CEG06592.1"  
/db_xref="GI:723005156"  
/translation="DHLRVISMEKGGNMKEVFRRFCVGLKRIEETFKKHNGFMWNEH  
LGYVLTCPNSLGTGLRGGVHVHKLPLKSTHAKFEEILTRLRLQKRGTTGGVDTASVGGVF  
DISNADRLGSSEVDQVQMVVDGVKLMVEM"  
ORIGIN  
1 ggatcacctg cgtgtcatct ccatggagaa ggggtggcaac atgaaggagg tcttcagacg  
61 cttctgcggtt ggtctgaaaa ggattgagga gactttcaag aagcacaacc acggcttcat  
121 gtggaacgag catcttggct acgtactgac ctgcccctcc aacctgggaa ctggtctgcg  
181 tgggtggcgtg cacgtcaagc tgcccaagct gactacacac gccaaagttt aggagatctt  
241 gaccaggctg cgtctgcaga agcgtggcac aggtggcgtg gacaccgcct ccgtgggtgg
```

```
301 agtgttcgac atctccaacg ctgaccgtct gggatcctct gaggtagatc aggtccagat
361 ggtggtggat ggtgtcaagc tcatggtgga gatgg
//
```

LOCUS LN612737 718 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Coregonus maraena mRNA for guanidinoacetate N-methyltransferase, variant b (gamtb gene).

CDS 11..715

/gene="gamtb"

/function="synthesizes creatine"

/codon\_start=1

/product="guanidinoacetate N-methyltransferase, variant b"

/protein\_id="CEG06591.1"

/db\_xref="GI:723005154"

/translation="MTTAQPIFSQGEDCKAGWHDAGYNETDTHLEILGKPVMERWE  
TPYMHSLATVASSKGRVLEIGFGMAIAATKVESFPIEEHWIIECNDGVFARLQEWAK  
AQPHKIVPLKGLWEEVVGGLPDNHFDGILYDTPLESDTWHTHQFDFIKGHAHRLKLP  
SGVLTYCNLTSWGELLKTKYDNIDNMFQETQMPQLLEAGFKKEMISTTTMDIVPPSEC  
KYAFAFRKMITPTILKE"

ORIGIN

```
1 aaccacaaa atgactacgg cacaacctat attttcacag ggagaagact gcaaagctgg
61 ttggcacgac gctggtgctg gttacaatga aacggacact catctggaga ttttgggcaa
121 gcccgttatg gaacgttggg agactccgta catgcactcg ctggcaactg tagcctcctc
181 aaaaggtgga cgggttctgg agattgggtt tggcatggcc atcgccgcaa ctaaagtaga
241 gtccttcccc atcgaggagc actggatcat tgagtgcaat gatggagtgt tcgcgagatt
301 gcaggagtgg gccaaggctc agccacataa aatttgccc ctcaaaggac tgtgggagga
361 ggtagtgggc ggctgcctg acaaccactt tgatggcatt ctgtacgaca catacctct
421 gtcagaagac acatggcaca ctcaccagt t gacttcac aagggccatg cccacaggct
481 gctgaagccc agtggcgctt tcacctactg taacctgacc tcttgggggtg aacttctcaa
541 gaccaaatac gacaacatcg acaacatgtt ccaggagacc cagatgcctc aactgctcga
601 ggctggcttc aagaaggaga tgattagcac cacaacctg gatattgtcc cccaagcga
661 atgcaaatac tatgccttcc gcaagatgat tactcccacc attctgaaag agtgaaaa
//
```

LOCUS LN612736 781 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Coregonus maraena mRNA for guanidinoacetate N-methyltransferase, variant a (gamta gene).

CDS 25..729

```
/gene="ganta"  
/function="synthesizes creatine"  
/codon_start=1  
/product="guanidinoacetate N-methyltransferase, variant a"  
/protein_id="CEG06590.1"  
/db_xref="GI:723005152"  
/translation="MTTAQPIFSKGEDCKAGWHDASAGYNETDTHLEILGKPVMERWE  
TPYMHSLATVASSKGRVLEIGFGMAIAATKVESFPIEEHWIIECNDGVFARLQEWAK  
AQPHKIVPLKGLWEQVVGGLPDNHFHDGILYDTPLESDTWHTHQFDFIKGHAHRLKLS  
GGVLTTCNLTSWGELLKSKYDNIDKMFQETQMPHLLLEAGFNREKISTTTMDIVPPSEC  
KYYAFRKMITPTILKE"
```

ORIGIN

```
1 gattagagaa taactatcac caaatgacc acggcacaac ccatatcttc caaggagaa  
61 gactgcaaag ctggttgca cgacgctagt gctggttaca atgagaccga cactcatcta  
121 gagatcttgg gcaagcctgt tatggaacgt tgggagacc cgtacatgca ctcgctggca  
181 actgtagcct cctcaaaagg tggacgggtt ctggagattg gatttggcat ggccatcgcc  
241 gcaactaaag ttgagtcctt ccccatcgag gagcactgga tcattgagtg caatgatgga  
301 gtgtttgcca gattgcagga gtgggccaag gctcagccac ataaaattgt gccctcaaa  
361 ggactgtggg aacaggtagt ggggtggcctg cctgacaacc actttgatgg cattctgtac  
421 gacacatacc ctctgtcaga agacacatgg cacactcacc agtttgactt catcaagggc  
481 catgcccata ggctgctgaa gtccgggtgt gtcctcacct actgcaacct gacctcttg  
541 ggtgaacttc tcaagtcaa atatgacaac attgacaaga tgttcagga gaccagatg  
601 cctcacctgc tcgaggctgg cttcaatagg gagaagatta gcaccacaac catggatatt  
661 gttcccccaa gcgaatgcaa atactatgca ttccgcaaga tgattacgcc caccattctg  
721 aaagagttaa gtggcttgat gccactgcaa cgttttaatt tatttaattc tcaagtgcct  
781 g  
//
```

LOCUS LN612735 325 bp mRNA linear VRT 16-NOV-2014

DEFINITION Coregonus maraena partial mRNA for glycine amidinotransferase  
(L-arginine:glycine amidinotransferase) (gatm gene).

CDS <1..>325

```
/gene="gatm"  
/function="synthesizes guanidinoacetate"  
/codon_start=3  
/product="glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine  
amidinotransferase)"  
/protein_id="CEG06589.1"
```

```
/db_xref="GI:723005150"  
/translation="RDILMVVGNEIIEAPMAWRSRFFEYRAYRPLIKEYFRKGAKWTT  
APKPTMSDELYDQEYPIRTVEDRHKLAAQGKFVTEHEPCFDAADFIRAGRDLFVQRS  
QVTNY"  
ORIGIN  
1 ccagagacat cctcatggtg gtggggaatg agattatcga agcccccatg gcctggaggt  
61 cccgcttctt tgagtaccgg gcctacagac cactcatcaa ggagtacttc agaaagggtg  
121 ccaagtggac caccgccccca aaaccacca tgtctgatga gctgtacgat caggagtacc  
181 ccatccgtac ggtggaggac agacacaagc tggctgcccc gggaaagttt gtcaccaccg  
241 aacacgagcc gtgcttcgac gcggtgact tcatcagagc tggcagggat ctgttcgtcc  
301 agaggagtca ggttacaac tacat  
//
```

LOCUS HG315741 1134 bp mRNA linear VRT 20-JUN-2013

DEFINITION Oncorhynchus mykiss partial mRNA for sodium- and chloride-dependent creatine transporter 1 (SLC6A8 gene).

CDS <1..>1134

/gene="SLC6A8"

/function="creatine uptake into cells"

/codon\_start=3

/product="sodium-and chloride-dependent creatine  
transporter 1"

/protein\_id="CDF77025.1"

/db\_xref="GI:514052105"

```
/translation="SMVIVFFCNTYYIMILVWGLYFLLHSFTNPLPWATCGHPWNTLN  
CTENFRRACHNRSTLPLLSSTPDPSIPSSLLSSVSSPLNLSSTLLLLFNGSCVEPEG  
MRSPVIEFWERKVLRLSGGLDEPGDISSHMVLCLIATWVIVYFCIWKGVKGTGKVYF  
TALFPYLVLVLLAHGVTLPALDGIYVYLPDWPKLWEAQVWIDAGTQIFFSYATGL  
GALTALGSYNRFHNNCHQDAFVLAMINSGTSFFAGFVVFVSPGFMAAEQGVDSKVAE  
SGPGLAFIAYPKAVTLMMPVWAALFFFMLLVGLDSQFVGVVEGFVTGVMMLPPKS  
MAGSLRREVVAICCITCFFIDLMSVTEGGMYVFQLFDYYSAS"
```

ORIGIN

```
1 cctccatggt gattgtgttc ttctgtaaca cctactacat catgatcctg gtgtggggcc  
61 tgtacttctt gcttactcc ttcaccaacc cgttaccctg ggctacctgc gggcaccctt  
121 ggaacaccct caactgcacc gaaaacttcc gccgggcttg ccacaaccgc agcaccctgc  
181 ctctcctctc ctccaccccc gatccgtcta tccccagctc ctcctctctg tcgggtgtat  
241 cctccccgct caacctctca tcctctactc tgctcctctt caacggcagc tgcgtggaac  
301 cagaggcat gcgctcgcca gtcattgagt tctgggagcg taagggtgctc cgtctctctg
```

```
361 gtggtctgga tgagcctggg gacatcagct ctacatggg cctctgtctg atcgccacct
421 gggttattgt ttacttctgc atctggaagg gagtcaaagg cacaggcaag gtagtgact
481 tcacagctct gtttccttac ctggtcctgg tggttctggt ggcccatggg gtaaccttac
541 ctggagcgct ggatgggatt gtgtactatc tgaaccaga ctggcccaa ctctgggaag
601 cccaggtgtg gattgatgct ggcaactcaga tcttcttctc ctatgccact ggtctgggtg
661 ctttaactgc cttggcagc tacaaccgct tccacaaca ctgccacaa gatgcgtttg
721 ttctagccat gatcaacagt gggaccagt tctttgcagg gtttgggtg ttctccgtgc
781 cgggcttcat ggctgcagag cagggggtcg acatcagcaa ggtggccgag agtggccag
841 gcctggcctt catagcctat cccaaggctg ttactctgat gcctatggct ccagtctggg
901 cagcgctctt cttcttcatg ctggttggtac tgggcctgga tagccagttt gttgggtgg
961 agggctttgt cacgggggtc atggacatgc taccgccaa atctatggcg ggctcgtgc
1021 gtcgtgaggt tgctgtggcg atatgctgca tcacctgctt tttcatcgac ctctccatgg
1081 taacagaggg agggatgtat gtgttcagc tgtttgacta ctactcagcc agcg
//
```

LOCUS HG315740 1193 bp mRNA linear VRT 20-JUN-2013

DEFINITION Oncorhynchus mykiss mRNA for creatine kinase, muscle (CKM gene).

CDS 41..1186

/gene="CKM"

/function="converts creatine to creatine phosphate"

/codon\_start=1

/product="creatine kinase, muscle"

/protein\_id="CDF77024.1"

/db\_xref="GI:514052103"

/translation="MPFGNTHNNFKLNFKVEEYDPLTKHNNHMAKVLTKDMYAKLRD  
KQTPSGFTLDDVIQTGVDPNGHPFIMTVGCVAGDEESYEIFKDLLDPIISDRHSGYKP  
TDKHKHTDLNLFENLKGDDLDPNYVLSRVRTGRSFKGYTLPPHNSRGERRAVEKLSVE  
ALNTLDGEFKGKYYPNKM TDAEQQLIADHFLFDKPVSPLLL GAGMARDWPDARGIW  
HNDAKSFLVWVNEEDHLRVISMEKGGNMKEVFRFCVGLKRIEETFKKHNGFMWNEH  
LGYVLTCPNSLGTGLRGVHVHVKLPKLSHHPKFEIILTRLRLQKRGTTGGVDTASVGGVF  
DISNADRLGSSEVDQVMVVDGVKLMVEMEKLEKGEAIDGMIPAQK"

ORIGIN

```
1 ctttttctt tgtctggtgt gcagtgttag aaacgcaatc atgcctttcg gtaacacca
61 caacaacttc aaactcaact tcaaagttga ggaggagtac cctgacctca ccaagcacia
121 caaccacatg gccaaggtgc tgaccaagga catgtacgcc aagctgaggg acaagcagac
181 cccctctggc ttcaccttgg atgacgtcat ccagaccggt gtcgacaacc ctggtcacc
241 cttcatcatg actgttggct gtgtggctgg tgatgaggag tcctacgaga tcttcaagga
301 tctgttggtg cccatcatct cagaccgtca tagtggatac aagcccacag acaagcacia
```

```

361 gaccgacctg aactttgaga acctgaaggg aggtgatgat ctggacccca actacgtcct
421 gtccagccgt gtgcgtactg gccgcagcat caaggatac accctgcccc cccacaacag
481 ccgtggcgag cgcagagcag tggagaaact gtccgtcgag gctctgaaca ccctggatgg
541 tgaattcaag ggaaagtact accccctgaa taagatgacc gatgccgagc aggagcagct
601 tatcgtgac catttcttgt ttgacaagcc cgtctcccc ctgctgctgg gtgctggtat
661 ggcccgtgac tggcccgatg caagaggaat ctggcataac gatgccaaga gcttcttgg
721 ctgggtgaat gaggaggatc acctgcgtgt catctccatg gagaaggcg gcaacatgaa
781 ggaggtcttc agacgcttct gcgttggctc gaaaaggatt gaggagactt tcaagaagca
841 caaccacggc ttcatgtgga acgagcatct tggctacgtg ctgacctgcc cctccaactt
901 gggaactggt ctgcgtggtg gcgtgcacgt caagctgccc aagctgagca cacacccaa
961 gtttgaggag atcctgacca ggctgcgtct gcagaagcgt ggcacaggtg gcgtggacac
1021 cgcctccgtg ggtggagtgt tcgacatctc caacgtgac cgtctgggat cttctgaggt
1081 agatcaggtc cagatggtgg tggatggtgt caagctcatg gtggaaatgg agaagaagct
1141 ggagaaggga gaggccatcg acggcatgat ccccgcccag aagtaaagag ttg
//

```

LOCUS HG315739 726 bp mRNA linear VRT 20-JUN-2013

DEFINITION Oncorhynchus mykiss mRNA for guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT gene).

CDS 2..706

/gene="GAMT"

/function="synthesizes creatine"

/codon\_start=1

/product="guanidinoacetate N-methyltransferase"

/protein\_id="CDF77023.1"

/db\_xref="GI:514052101"

/translation="MTTAQPIFSKGEDCKAGWHDAGAGYNETDTHLEILGKPVMERWE  
TPYMHSLAIVASSKGGVRVLEIGFGMAIAATKVESFPIEEHWIIECNDGVFARLQEWAK  
AQPHKIVPLKGLWEEVVGGLPDNHF DGILYDTYPLSEDTWHTHQFDFIKGHAHRLKPK  
GGVLTVCNLT SWGELLKTKYDNIDNMFQETQMPQLLEAGFKKEMISTTTMDIVPPSEC  
KYYAFRKMITPTILKE"

ORIGIN

```

1  aatgactacg gcacaacca tattttccaa gggagaagac tgcaaagctg gctggcacga
61  cgctggtgct ggttacaatg agaccgacac tcatctcgag attttgggca agcccgttat
121 ggaacgttgg gagactccgt acatgcactc gctggcaatt gtagcctcct caaaaggtgg
181 acgggttctg gagattgggt ttggcatggc catcgcggca actaaagtcg agtccttccc
241 catcgaggag cactggatca ttgagtgcaa tgatggagtg ttcgcaagat tgcaggagtg
301 ggccaaggct cagccacata aaattgtgcc cctcaaagga ctgtgggagg aggtagtggg

```

```

361 cggcctgcct gacaaccact ttgatggcat tctgtacgac acataccctc tgtctgaaga
421 cacatggcac actcaccagt ttgacttcat caagggccat gccacaggc tgctgaagcc
481 aggtggcggt ctcacctact gtaacctgac ctcctggggg gaacttctca agaccaaata
541 tgacaacatc gacaacatgt tccaggagac ccagatgcct caactgcttg aggctggctt
601 caagaaggag atgattagca ccacaacat ggatattgtc ccccaagcg aatgcaaata
661 ctatgccttc cgcaagatga ttactccac cattctgaaa gagtgaaatg gcttgatgcc
721 actgca
//

```

LOCUS HG315738 1365 bp mRNA linear VRT 20-JUN-2013

DEFINITION Oncorhynchus mykiss mRNA for glycine amidinotransferase  
(L-arginine:glycine amidinotransferase) (GATM gene).

CDS 49..1323

/gene="GATM"

/function="synthesizes guanidinoacetate"

/codon\_start=1

/product="glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine  
amidinotransferase)"

/protein\_id="CDF77022.1"

/db\_xref="GI:514052099"

/translation="MLRVRCLRGGSRGAEAAHLIGSMLGRAMTGWVQGAFFQSYSSSAA  
AAQPQRALEENAVTEPERQECPCVAYNEWDPLEEVIVGRAENARVPPFTVEVKANTYE  
KHWPFYQKYGGQSFPEHLKKAVAEIEEMCNILRMEGVTVQRPEPMDWSFEYNTPDFT  
STGMYAAMPRLDILMVVNEIIEAPMAWRSRFFEYRAYRPLIKEYFRKGAKWTPPKPT  
MSDELYDQDYPVRTVEDRHKLAQKGFVTTEHEPCFDAADFIRAGRDLFVQRSQVTNY  
MGIEWMRRHLAPDYKVHIISFKDPNPMHIDATFNIIGPLVLSNPDRPCRQVEMFEKA  
GWTVVKPPTPLIPDDHPLWSSKWLSMNVMLDPKRVMCANEHTIHKMFENLGIKTI  
KVNIRHANSLGGGFHCWTTDVRRRGSLESYFH"

ORIGIN

```

1 ccgccgctag aatatcccaa atagccatca ccattatcag gtcggacaat gctgcgagtc
61 aggtgtctca gaggagtag caggggggcc gaggccgcc atctgatcgg atctatgctc
121 ggccgcgcca tgactggctg ggtgcagggc gcgttccaga gctactcag ttccgctgct
181 gccgcgcgac cgcaacgcgc cctggaggag aacgctgtca ctgagcctga gcgacaggag
241 tgcctgtct gcgctacaa cgaatgggac ccgctcgaag agtgatcgt aggccgcgcc
301 gagaacgcgc gcgtccctcc tttcacagta gagtcaagg ctaacacata tgagaagcat
361 tggccttct accagaagta tgggggcaa agctttcctg aggaccactt gaagaaagcc
421 gttgctgaga ttgaagaaat gtgcaatatt ctccgatgg aggagttac agtccagaga
481 cctgaacca tggactggtc ctttgagtac aactccag acttcacctc tactggcatg

```

541 tatgctgccca tgcccagaga catcctcatg gtagtgggga atgagatcat cgaggctccc  
 601 atggcctgga ggtcccgtt ctttgagtac cgagcctaca gaccctcat caaggagtac  
 661 ttcagaaagg gtgccaagtg gaccaccccc ccaaaaccca ccatgtctga tgagctgtac  
 721 gatcaggact acctatccg cacgggtggag gacagacaca agctggctgc ccagggaaag  
 781 tttgtcacca ccgaacacga gccgtgcttc gacgccgctg acttcatcag agctggcagg  
 841 gatctgttcg tccagaggag tcaggttaca aactacatgg ggattgagtg gatgcgtcgc  
 901 catcttggcc cggactacaa ggtccacatc atctcattca aggaccccaa ccccatgcac  
 961 attgacgcca cttcaacat catcgggccg ggactggctgc tgtccaaccc tgatcgtccc  
 1021 tgtcgtcagg tggagatggt tgagaaggcc ggctggaccg tggatgaagcc tccaaccctt  
 1081 ctgattccag atgaccacc tctgtggatg tcctctaagt ggctgtccat gaatgtcttg  
 1141 atgctggacc ccaaacgggt catgtgtgat gccaacgagc acaccatcca caagatgttt  
 1201 gagaaccttg gtatcaagac catcaagggt aacatccgcc acgccaactc cctgggagga  
 1261 ggcttcact gctggactac cgacgtcgt cgccgtggtt ccctcgagtc ctacttccac  
 1321 tagccgtgcc agaaacagac agtttttatt gagcttaagt aaggt  
 //

## E. Codierende Sequenz des SLC6A8-Kandidaten

1 atgtcgcag aagtggaaga gaactcccca ggtgatgtgc ggctctccca gatggaagca  
 61 gggattccat ctgaggagga ggggtggtg gctcgcctct tagtccctgt gcctggggtt  
 121 ggggtggggg caggggggtg tgaggagggg ggaggacaga ccaaacaca gcctcaggtc  
 181 caggctacag cagtaccgta tgtggagaga gagacctgga ccagacagat ggacttcatc  
 241 atgtcctgtg tgggcttcgc tgtggggctg ggcaactctt ggcgcttccc ttacctctgc  
 301 tacaagaacg gtggaggcgt gttcctgatc ccctacatga ttattgtggt catcggagggt  
 361 attcccgtgt tcttctgga aatcgtctt ggtcagttca tgaagcaagg aggggtctct  
 421 gcatggaaca ttgcccctct ctttaaagggt cttggcctgg cctccatggt aatagtgttc  
 481 ttctgtaaca cctactacat catgatcctg gtgtggggcc tgtacttctt gcttactcc  
 541 ttaccaacc cgttacctg ggctacctg gggcacccct ggaacaccct caactgcacc  
 601 gaaaacttcc gccgggcttg ccacaaccgc agcacctgc ctctcctctc ctccacccc  
 661 gatccgtcta tcccagctc cctcctctc tcggtggtat cctccccgct caacctctca  
 721 tcctctactc tgctcctctt caacggcagc tgcgtggaac cagaggcat gcgctcgcca  
 781 gtattgagt tctgggagcg taagggtctc cgtctctctg tggtctgga tgagcctggt  
 841 gacatcagct ctacatggt cctctgtctg atcgccacct gggttattgt ttacttctgc  
 901 atctggaagg gactcaaagg cacaggcaag gtagtgtact tcacagctct gtttccttac  
 961 ctggtcctgg tggttctggt ggccatggt gtaaccttac ctggagcgt ggtgggatt  
 1021 gtgtactatc tgaaccaga ctggccaaa ctctgggaag cccagggtgtg gattgatgct  
 1081 ggcaactcaga tcttcttctc ctatgccact ggtctgggtg ctttaactgc cttggcagc

---

1141 tacaaccgct tccacaacaa ctgccaccaa gatgcgtttg ttctagccat gatcaacagt  
1201 gggaccagtt tctttgcagg gtttgtggg ttctccgtgc cgggcttcat ggctgcagag  
1261 cagggggtcg acatcagcaa ggtggccgag agtgggtccag gcctggcctt catagcctat  
1321 cccaaggctg ttactctgat gcctatggct ccagtctggg cagcgctctt cttcttcatg  
1381 ctgttggtag tgggcctgga tagccagttt gttgggggtgg agggctttgt cacgggggtc  
1441 atggacatgc taccgccaa atctatggcg ggctcgctgc gtcgtgaggt tgcgtggcg  
1501 atatgctgca tcacctgctt tttcatcgac ctctccatgg taacagaggg agggatgtat  
1561 gtgttccagc tgtttgacta ctattctgcc agtgggatca cactgctctg gcaggccttc  
1621 tgggagtgtg tgggtggggc ctgggtctat ggtgcagatc gtttcatgga tgatgtggct  
1681 cgtatgattg gctaccggcc gatgccctac atgaagtggg gctggtccta catcacgcc  
1741 cttgtttgtg tgggagtgtt cctgttccac gtggtgaact acaagcccct gacctataac  
1801 tcagtgtata cctaccctt gtggggggag gcactgggct ggtgtctggc ctttctctc  
1861 atgctctgca tccaatcac tgcctctac aaactactgc gctgcaaagg acccttcaca  
1921 gagcgttggc agcacctgac cactccggtg tggggtcgac atcacatgga gtacttggct  
1981 cctgagtctg aggccaaact gctgcccct aatggccaga ccaaaaacac tttgctgttt  
2041 gagagtgtca tc

## F. Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt **PD Dr. Tom Goldammer** dafür, dass er mich in seine Arbeitsgruppe voller sympathischer Menschen, die mir stets in angenehmer Erinnerung bleiben werden, aufgenommen hat und für seine anschließende Betreuung dieses Dissertationsprojekts. Es war ausgesprochen angenehm, innerhalb des vorgegeben Rahmens sehr frei forschen und auch selbstständig denken zu dürfen. Ich konnte mich stets auf sein hilfreiches, kritisches Feedback verlassen und freue mich auf weitere Zusammenarbeit.

**Prof. Dr. Renate Horn** gilt mein Dank für die Übernahme der Betreuung von Seiten der Universität Rostock. Der von ihr ermöglichte Vortrag im Seminar der Universität sowie die anschließende Diskussion mit ihr haben stark zur Entwicklung des Konzepts für diese Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt ebenfalls **Dr. Marieke Verleih** sowie **Dr. Alexander Rebl**, die sich beide meine Ideen angehört haben und sich mit viel Engagement mit ihnen auseinandergesetzt und mich bei der täglichen Arbeit umfassend unterstützt haben. Auch danke ich ihnen für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und auch die vielen interessanten wie unterhaltsamen Mittagspausen.

Dem Techniker-Team bestehend aus **Brigitte Schöpel**, **Ingrid Hennings** und **Luisa Falkenthal** gilt ebenfalls mein Dank für die umfassende Unterstützung in allen Labor-Fragen und darüber hinaus. **Marlies Fuchs** gilt mein Dank für die verlässliche Durchführung der vielen Sequenzierungsreaktionen.

Dem gesamten Team des **Fischereiinstituts der Landesforschungsanstalt M-V** in Born gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und die problemlose Bereitstellung der Tiere.

**Dr. Martina Langhammer** gilt mein Dank für die Bereitstellung von Maus-Proben und **Dr. Eduard Murani** für die Schweine-Proben.

Auch den anderen Mitgliedern der Abteilung Fischgenetik wie **Dr. Judith Köbis** und **Mareen Nipkow** danke ich ebenso wie Mitgliedern anderer Abteilungen wie **Andreas Brietzke** und **Jacqueline Knaust** für viele interessante Fach- und Nicht-Fachgespräche.

Großer Dank gebührt natürlich auch meiner **Familie** und meinen **Freunden**, die es stets heroisch ertragen haben, sich auf den neuesten Stand dieser Dissertation bringen zu lassen.

## **G. Curriculum Vitae**

## **H. Veröffentlichungen und Fachtagungsbeiträge**

# I. Borchel et al. *SpringerPlus* 2014, 3:510

Borchel et al. *SpringerPlus* 2014, 3:510  
<http://www.springerplus.com/content/3/1/510>

 SpringerPlus  
a SpringerOpen Journal

## RESEARCH

## Open Access

# Creatine metabolism differs between mammals and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Andreas Borchel<sup>1</sup>, Marieke Verleih<sup>1</sup>, Alexander Rebl<sup>1</sup>, Carsten Kühn<sup>2</sup> and Tom Goldammer<sup>1\*</sup>

### Abstract

Creatine plays an important role in the cell as an energy buffer. As the energy system is a basic element of the organism it may possibly contribute to differences between rainbow trout strains selected for the traits growth and robustness, respectively. The cDNA sequences of creatine-related genes encoding glycine amidinotransferase (GATM), guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT), creatine kinase muscle-type (CKM) and creatine transporter 1 (CT1, encoded by gene solute carrier family 6, member 8 (SLC6A8)) were characterized in rainbow trout. Transcripts of the respective genes were quantified in kidney, liver, brain and skeletal muscle in both trout strains that had been acclimated to different temperatures. Several differences between the compared trout strains were found as well as between temperatures indicating that the energy system may contribute to differences between both strains. In addition to that, the expression data showed clear differences between the creatine system in rainbow trout and mammals, as the spatial distribution of the enzyme-encoding gene expression was clearly different from the patterns described for mammals. In rainbow trout, creatine synthesis seems to take place to a big extent in the skeletal muscle.

**Keywords:** L-arginine:glycine amidinotransferase (GATM); S-adenosylmethionine: guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT); Creatine kinase muscle-type (CKM); Creatine kinase brain-type (CKB); Teleost; Rainbow trout; Energy metabolism

### Introduction

Products of the fishery industry crucially contribute to world's nutrition. Since the 1990s the amount of captured fish has been stagnating while the amount of fish produced in aquaculture facilities has been increasing until today (FAO 2012). However, diseases (Meyer 1991) as well as environmental factors like changing seasonal temperatures and concomitant changes in relevant water parameters like oxygen level or pathogen concentration may adversely affect health or even lead to the death of the cultured fish. Such incidents pose a major risk for fish farms and can lead to big economic losses. Therefore, the selection and farming of as robust animals as possible that are adapted to local environments can contribute to sustainable regional aquaculture and ensure a balanced economic efficiency of aquaculture facilities.

The brackish water of the Baltic Sea is challenging regarding pathogens, eutrophication, salinity, temperature

and oxygen. A local rainbow trout strain which seems to be robust under and especially adaptable to these fluctuating environmental conditions (Rebl et al. 2012) is the anadromous BORN trout. It has been bred in the brackish water of the Baltic Sea by the Fishery Institute of LFA M-V in the coastal town Born in Germany since 1975 (Anders 1986). Several genes are differentially regulated in BORN trout compared to the typically cultured imported Steelhead trout, which are bred under their native biological conditions, concerning several key aspects like immune system (Köbis et al. 2013; Rebl et al. 2011) or calcium metabolism (Verleih et al. 2012). These differences in gene expression have in part also been shown to be dependent on temperature (Rebl et al. 2013), which is an important abiotic factor or the 'ecological master factor' (Brett 1971). This is especially true for poikilothermic animals like fish, as their body temperature is directly correlated to the water temperature. Likewise, temperature influences the growth of pathogens and the outcome of infections (Gilad et al. 2003) and it has a direct impact on the metabolism and hence the oxygen demand (Caulton 1977).

\* Correspondence: [tomgoldammer@fhn-dummerstorf.de](mailto:tomgoldammer@fhn-dummerstorf.de)

<sup>1</sup>Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Genombiologie, Wilhelm-Stahl-Allee 2, Dummerstorf 18196, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

An important molecule affecting the homeostasis of the energy budget and the complete cellular metabolism is creatine (Wyss & Kaddurah-Daouk 2000). In combination with its phosphorylated form, creatine acts as an energy buffer and also allows the energy transport between different cell components as well as organs. Creatine phosphate is used for the regeneration of ADP to ATP by providing the necessary phosphate groups, thereby maintaining an adequate ATP level. As creatine is an energy-buffer, it can mainly be found in tissues with a high energy demand and a high energy flux. Highest levels can therefore be found in skeletal muscle as well as spermatozoa and also the brain in mammals. Up to 94% of the total creatine content can be found in the muscles (Wyss & Kaddurah-Daouk 2000), whereas the basal total creatine concentration is low in kidney and liver (Ipsiroglu et al. 2001).

Creatine can be obtained exogenously from nutrition or it can be synthesized intrinsically. The synthesis of creatine is a two-step mechanism (Figure 1), involving the enzymes glycine amidinotransferase (GATM alias AGAT) and guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT). Sodium- and chloride-dependent creatine transporter 1 (CT1, encoded by gene solute carrier family 6, member 8 (*SLC6A8*)) is in charge of the transport of creatine through the membranes of the target cells. Phosphorylation and dephosphorylation of creatine is performed by creatine kinases (CKs) of brain-type (CKB) or muscle-type (CKM) as well as mitochondrial creatine kinases (CKMT). CKMT directly phosphorylate creatine in the mitochondria, whereas the converse reaction is performed by the cytosolic kinases CKB and CKM (Fritz-Wolf et al. 1996). In humans, deficiency of one of the enzymes of the creatine pathway leads to severe health-related problems, summarized as cerebral creatine

deficiency syndrome (CCDS) including intellectual disability, slowed development and epilepsy (Mercimek-Mahmutoglu et al. 2009).

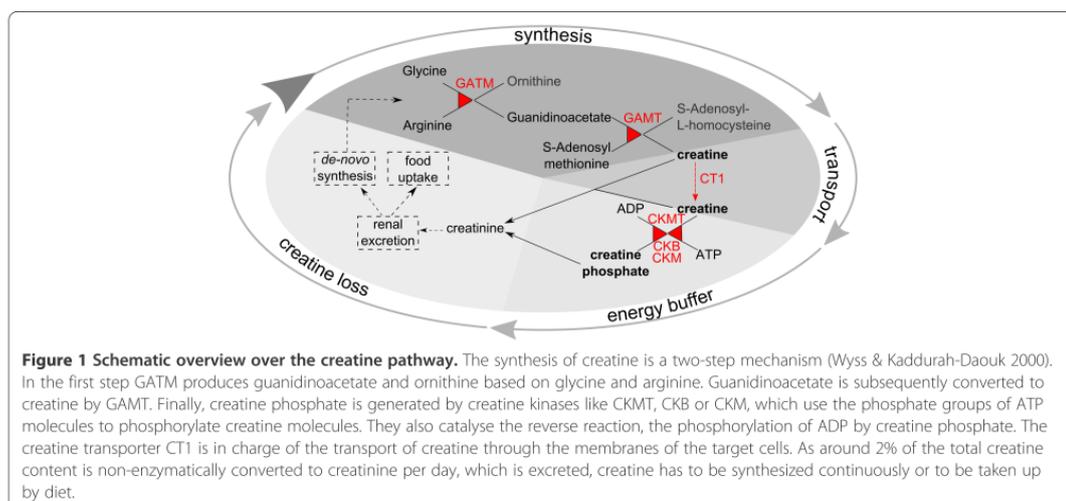
The importance of the creatine system for fish has not been focused so far. Nevertheless it was shown in 1929 that fish muscles have a higher creatine content than mammalian muscles (Hunter 1929) indicating a high relevance. Additionally it was shown that creatine supplementation leads to higher endurance in a fixed velocity test in rainbow trout (McFarlane et al. 2001). Considering zebrafish, the tissue distribution of GATM, GAMT and CT1 is comparable with humans (Wang et al. 2010).

This manuscript investigates the creatine system of two rainbow trout strains, the locally adapted strain BORN and an import strain. Therefore we isolated and characterized the open reading frames (ORFs) of *GAMT*, *GATM*, *CKM* and a fragment of *SLC6A8* including the quantification in both trout strains at different temperatures and in different tissues. To examine the effect of temperature upon the creatine system, we used a temperature challenge experiment and compared gene expression of *GAMT*, *GATM*, *CKM*, *CKB* and *SLC6A8* in kidney, liver, brain and muscle, as these organs are known to be important in the mammalian creatine system.

## Materials and methods

### Experimental animals, temperature challenge and sampling

Rainbow trout of strain BORN and import strain were grown at the same time from eyed eggs to fingerlings under similar conditions in fresh water, followed by an adaptation to fresh water glass tanks at the age of 7–8 month. 10-month old rainbow trout of both strains were



used for the experiment. Ten fish per strain were transferred into two separate 300-l freshwater tanks and adapted to 15°C for two weeks. After this first acclimation, the water temperature was gradually adjusted by 1°C per day until respective temperatures of 8°C and 23°C were reached. The fish were kept at these temperatures for one week and were then sacrificed with an overdose of benzocaine. The fish were dissected and kidney, liver, skeletal muscle and brain tissue were obtained from all fish and stored in RNAlater (25 mM Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>; 9.9 mM EDTA; 5.3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at -80°C until further use. These organs were chosen as they are known to be important in the mammalian creatine system. DNA was isolated from kidney tissue using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), in order to determine the gender. While the Import strain is a completely female strain, BORN trout sampled at 8°C comprised seven females and three males; BORN trout acclimated to 23°C included six males and four females.

#### RNA extraction & cDNA synthesis

Flash-frozen animal tissues were homogenized in 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). RNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). On-column DNase treatment of the samples ensured the absence of genomic DNA. RNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis and quantity was measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). On average, 260/280 as well as 260/230 ratios were larger than 2, indicating high quality RNA. 1.5 µg of the RNA were then deployed in cDNA synthesis using Superscript II (Invitrogen) as reverse transcriptase and Oligo-d(T)<sub>24</sub>-primers. The cDNA was treated with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Germany) to purify the nucleotides and diluted in 100 µl nuclease free water.

#### Isolation of *GATM*, *GAMT*, *SLC6A8* and *CKM*

Unlike *CKB*, *GATM*, *GAMT*, *SLC6A8* and *CKM* have not been isolated in rainbow trout so far. BLAST algorithm (Altschul et al. 1990) was used to determine gene-specific ESTs in the database of the Gene Index Project (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) based on corresponding sequences of other teleosts like salmon or Japanese rice fish. Then, gene-specific primers flanking the complete coding region were deduced. All primers used in this study are listed in Table 1. PCR was carried out using HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen). After a five minute activation at 95°C, 35 cycles were performed including 30 seconds denaturation at 94°C, 30 seconds annealing at 60°C and 90 seconds elongation at 72°C, completed by a five minute final elongation step at 72°C. Resulting PCR-products were cloned into pGEM-

T Easy (Promega, LaJolla, CA, USA), if necessary and sequenced for at least three times. Sequences were translated using the virtual ribosome (Wernersson 2006). Sequence comparison was performed using ClustalW (Thompson et al. 1994) and the distance matrix function of UGENE (Okonechnikov et al. 2012). Conserved domains were identified using CD-Search (Marchler-Bauer & Bryant 2004) and the probability of protein export to mitochondria was calculated using MitoProt II (Claros & Vincens 1996).

As no EST containing the creatine transporter gene *SLC6A8* of rainbow trout was available, a different approach was used for this gene. Degenerated primers were derived from evolutionarily conserved sequence regions of other closely related teleost species using the Primacade software (Gadberry et al. 2005). The *SLC6A8*-sequence of the zebrafish *Danio rerio* (ENSDART00000037922) was obtained from ENSEMBL and was aligned with the fitting sequences from *Tetraodon nigroviridis* (ENSTNIT00000009059), *Takifugu rubripes* (ENSTRUT00000032470) and *Oryzias latipes* (ENSORLT00000023266) using ClustalW (Thompson et al. 1994). Two primers suggested by Primacade were used to generate a 1134-bp long fragment that was cloned into pGEM-T Easy and sequenced.

#### Transcript quantification

Semiquantitative PCR was performed including 5 minutes of initial denaturation at 95°C followed by 30 (*GAMT*, *CKB*, *CKM*) or 35 (*GATM*, *SLC6A8*) cycles of 30 seconds denaturation at 94°C, followed by 30 seconds annealing at 60°C, and 20 seconds elongation at 72°C. PCR was finished with a final 5-minute elongation step at 72°C. Primers were deduced from the trout sequences using the PSQ Assay Design software (Biotage, Uppsala, Sweden). *EEF1A1* was used as a reference gene in parallel and was applied together with the other PCR products onto 2.5% agarose gels containing ethidium bromide, enabling visualization under UV-light. For this first experiment one fish of the import line that had been acclimated to 8°C was used. Band intensities were quantified densitometrically with the tool ImageJ (Schneider et al. 2012).

Transcript quantification was performed using quantitative real-time PCR on a LightCycler 480 system (Roche) and the SensiFast SYBR No-ROX Kit (Biolone, London, UK). 5 µl of cDNA were used per assay. As qRT-PCR program, we used an initial activation step of 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95°C, 10 s annealing at 60°C, 20 s elongation at 72°C and final quantification for 5 s at 75°C. Product size and quality of the resulting PCR products were visualized through separation in 3% agarose gels. The copy numbers for each gene were calculated based on specific external standards and normalized with the geometric mean of the expression of the reference genes *EEF1A1* and *RPSS*. Significance levels

**Table 1 Primers used in this study**

Primer name	Source sequence	Sequence (5'-3')
<i>Amplification of coding sequences from rainbow trout</i>		
OM_GATM_CDS_f	BX868137	CCGCCGCTAGAAATATCCCAAAT
OM_GATM_CDS_r	DV201821	TGCAGATTGTTGATTGGGACTTT
OM_GAMT_CDS_f	CR374244	AGACAGCAACTCCGTCATC
OM_GAMT_CDS_r	BX076691	GCACTTGAGAAGGCATGACA
OM_CKM_CDS_f	CT569995	GGCTCTGGTGAACAGGATCTGA
OM_CKM_CDS_r	CT569258	GGTTGGCTCAATGGCACATAAC
<i>Amplification of SLC6A8-fragment from rainbow trout<sup>a</sup></i>		
OM_SLC6A8_frag_f	cf. methods	CCTCCATGGTGATTGTSTTCT
OM_SLC6A8_frag_r	cf. methods	CRCTGGCWGAGTAGTAGTCAAA
<i>Quantification of transcripts</i>		
OM_GATM_qPCR_f	<b>HG315738</b>	ACCTCTACTGGCATGTATGCTG
OM_GATM_qPCR_r	<b>HG315738</b>	CTTGGCACCCCTTCTGAAGTAC
OM_GAMT_qPCR_f	<b>HG315739</b>	TCGACAACATGTTCCAGGAGAC
OM_GAMT_qPCR_r	<b>HG315739</b>	GCAGTGGCATCAAGCCATTTC
OM_CKB_qPCR_f	FJ548753	ATAACCCAGGCCACCCCTCA
OM_CKB_qPCR_r	FJ548753	TGGGTTCCAGGTCGGTCTGTG
OM_CKM_qPCR_f	<b>HG315740</b>	TGCGTTGGTCTGAAAAGGATTGA
OM_CKM_qPCR_r	<b>HG315740</b>	TCTCCTCAAACCTGGGGTGTGT
OM_SLC6A8_qPCR_f	<b>HG315741</b>	GGAAAGCCAGGTGTGGATTGA
OM_SLC6A8_qPCR_r	<b>HG315741</b>	AAAGAACTGGTCCCAGTGTGA
OM_EEF1A1_qPCR_f	NM_001124339	TGATCTACAAGTGGCAGGCA
OM_EEF1A1_qPCR_r	NM_001124339	CAGCACCCAGGCATAGTGA
OM_RPS5_qPCR_f	NM_001160519	ATGACATCTCACTGCAGGATTAC
OM_RPS5_qPCR_r	NM_001160519	ATCAGCTTCTGCCGTTGTGC

<sup>a</sup>Degenerated primers.

Sequences obtained in this study are printed bold.

of observed differences were calculated using t-tests, considering p-values < 0.05 significant.

## Results

### Isolation and characterization of *GATM*, *GAMT* and *CKM*

*GATM*, *GAMT*, *CKB* and *CKM* are enzymes relevant in creatine metabolism. As only the gene encoding *CKB* has been identified in rainbow trout so far, we isolated *GATM*, *GAMT* and *CKM*.

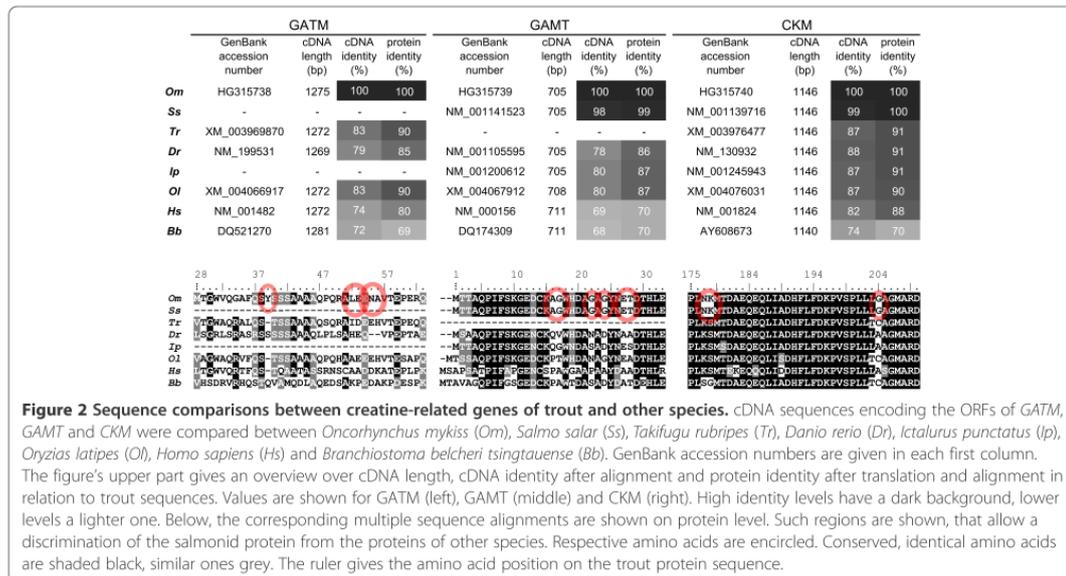
The open reading frame of *GATM* was longest with 1275 bp (accession number HG315738), followed by *CKM* (1146 bp, HG315740) and *GAMT* (705 bp, HG315739). Complete multiple sequence alignments of the corresponding protein sequences and of orthologues of other species are given in Additional file 1. A summary is given in Figure 2.

Rainbow trout's *GATM* was similar to the *GATM* of other fishes (up to 90% protein identity) and humans (80% protein identity) but had fewer matches with the sequence of Belcher's lancelet (*Branchiostoma belcheri*,

69% protein identity). Compared with the sequences of other fishes, trout's *GATM* showed an insertion of one amino acid at position 39 (tyrosine). While the complete alignment showed an overall very high conservation, the sequences were quite diverse between position 30 and 65 of the alignment. The probability of export to mitochondria for trout's *GATM* was calculated as 97%.

For *GAMT* the protein sequence was to 99% identical with the sequence of salmon, showing only one amino acid exchange, while on mRNA level 10 base exchanges were observed (not shown). The protein sequence showed also a high accordance with the sequences of the other regarded fishes (≥86% protein identity) but also with human (70% identity) and even lancelet (70% protein identity). The amino acids recognized as S-adenosylmethionine binding sites seemed to be very strongly conserved.

Also the *CKM* cDNA from trout encoded for the identical protein as the one that has been found in



**Figure 2** Sequence comparisons between creatine-related genes of trout and other species. cDNA sequences encoding the ORFs of *GATM*, *GAMT* and *CKM* were compared between *Oncorhynchus mykiss* (*Om*), *Salmo salar* (*Ss*), *Takifugu rubripes* (*Tr*), *Danio rerio* (*Dr*), *Ictalurus punctatus* (*Ip*), *Oryzias latipes* (*Oi*), *Homo sapiens* (*Hs*) and *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (*Bb*). GenBank accession numbers are given in each first column. The figure's upper part gives an overview over cDNA length, cDNA identity after alignment and protein identity after translation and alignment in relation to trout sequences. Values are shown for *GATM* (left), *GAMT* (middle) and *CKM* (right). High identity levels have a dark background, lower levels a lighter one. Below, the corresponding multiple sequence alignments are shown on protein level. Such regions are shown, that allow a discrimination of the salmonid protein from the proteins of other species. Respective amino acids are encircled. Conserved, identical amino acids are shaded black, similar ones grey. The ruler gives the amino acid position on the trout protein sequence.

salmon. The protein sequence is 100% identical in spite of 12 base exchanges on mRNA level. All recognized ADP-binding sites as well as creatine-binding sites were completely conserved between the examined species. In the substrate specificity loop 16 out of 20 amino acids were found to be completely conserved. Very strong conservation was observed inside the vertebrate group with a protein identity of 88% between trout and human. Only the lancelet had a comparatively low identity of 70%.

The sequence information obtained, enabled us to deduce primers for PCR and to quantitate the respective transcripts.

**Tissue distribution via semiquantitative PCR**

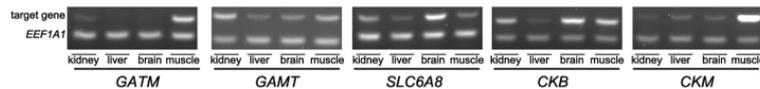
As kidney and liver are the main organs of creatine synthesis and brain and muscle are the main organs of creatine usage in mammals, we decided to have a look at the gene expression of the genes involved in creatine metabolism in these tissues. At first, semiquantitative PCR was used to get a general overview over the tissue distribution. In fact, the expression of these genes was tissue-specific (Figure 3), while the expression of *EEF1A1* that was used as reference gene was constant between the regarded tissues (densitometric analysis: intensities between 36000 and 40000). A very prominent *GATM* band (intensity 31701) was observed after PCR of muscular cDNA, while the band of kidney was plainly fainter (8322). In liver as well as in brain no *GATM* band appeared. Considering *GAMT*, the strongest bands were obtained in kidney and muscle (34993 and 26444), while the bands of liver and

brain were less intense (9323 and 15735). *SLC6A8* had its maximum in the brain (30474) but was found in the other tissues as well. *CKB* was found in great amounts in the brain (29834), the muscle (22392) and to a lesser extent the kidney (18587) and very little in the liver (3218). *CKM* showed a very clear maximum in the muscle (39472) and showed only faint bands in the other tissues (4400–5200).

**Tissue distribution via qRT-PCR**

Quantitative RT-PCR confirmed the findings of the semi-quantitative PCR for *GATM*, *GAMT*, *CKB* and *CKM*. Only *SLC6A8* showed a slight difference (Figure 4). Comparatively high expression of *GATM* was found in muscle (average relative expression 0.67-1.05) being up to 35 times as high as expression in kidney, which was the organ with the second highest *GATM*-expression (0.03-0.07). In contrast to that, *GATM* expression in brain was almost negligible (0.0003-0.004). The expression of the gene *GAMT* was high in kidney (0.34-0.58) and muscle (0.36-0.61) and reached only one tenth of these values in liver (0.05-0.15) and brain (0.03-0.05). Creatine transporter gene *SLC6A8* showed quite comparable expression levels in liver, brain and muscle (0.01-0.09), whereas the expression in kidney was lower (0.007-0.01).

Both examined creatine kinases, *CKB* and *CKM*, were expressed strongest in muscle. While a quite high basal expression of *CKB* could be detected in all examined tissues, *CKM* expression seemed more tissue-specific showing a high expression almost exclusively in muscle (89–116), reaching the highest expression values measured in this experiment. While *CKB* showed a high



**Figure 3** Representative gels of semiquantitative PCR of five transcript fragments encoding factors of the creatine pathway. Expression of *GATM*, *GAT*, *SLC6A8*, *CKB* and *CKM* in kidney, liver, brain and muscle was studied using semiquantitative PCR. *EEF1A1* was used as a reference gene. The gel photos show results of one import trout. The cycle number was higher for *GATM* and *SLC6A8* (35 cycles) than for the other genes (30 cycles). The lower bands represent *EEF1A1* and the upper bands the target genes.

expression in brain (9–10) as well as muscle (59–96), a strikingly high expression for *CKM* was only observed in muscle being 90–100 times as high as the expression of the reference genes. In kidney and liver expression of *CKB* was stronger than expression of *CKM*.

#### Differences between trout strains and acclimation temperatures

In addition to the distribution pattern of creatine-related genes, we found several significant differences in their expression between both trout strains and between acclimation temperatures. Animals of strain BORN that were acclimated to 23°C showed decreased *GAMT*-expression in brain (Fold-change (FC) = -1.4;  $p = 0.047$ ) and muscle (FC = -1.7;  $p = 0.033$ ) in comparison to the import strain. In addition to that, BORN trout showed an up-regulation of the *GAMT* expression at 23°C in kidney (FC = 1.7;  $p = 0.041$ ) and liver (FC = 3.17;  $p = 0.031$ ). Import trout acclimated at 8°C showed a significant lower *GAMT* expression in the muscle in comparison to 23°C acclimated animals (FC = -0.6;  $p = 0.032$ ).

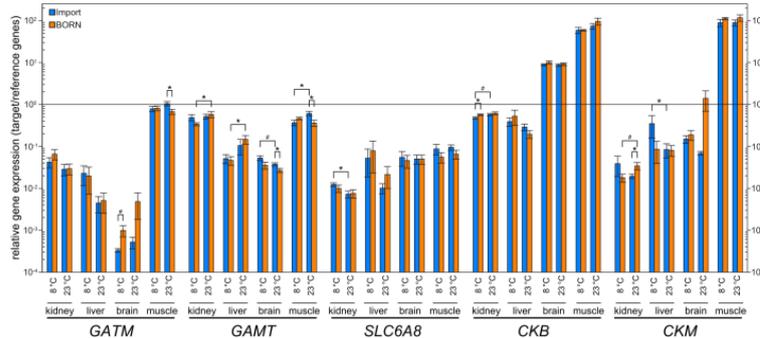
Further strain-specific differences were found for *GATM* in the muscles of 23°C acclimated animals, for *CKB* in kidneys of 8°C acclimated animals, and for *CKM* in the kidneys of 23°C acclimated animals. Additional significant

effects of acclimation temperature could be observed for *SLC6A8* as well as *CKB* in the kidney of import trout, and for *CKM* in the liver of import trout.

Considering the temperature dependence of the gene expression, most genes were regulated in the same way in most tissues. Only in muscle, BORN and import trout showed a different regulation of their creatine metabolism related genes at 8 or 23°C, respectively. While *GATM* and *GAMT* expression were higher in muscle at 23°C than at 8°C in import trout, it was the other way around for BORN trout. For *SLC6A8* and *CKM* the pattern was opposite. In addition to that, *CKM* was differentially regulated in all tissues except the liver. In kidney, brain and muscle BORN trout had a higher gene expression of *CKM* at 23°C, whereas import trout showed higher expression at 8°C.

#### Discussion

In mammals, there is a quite strong spatial separation of the different steps of creatine synthesis and consumption. Guanidinoacetate (GAA) is produced by *GATM* in the kidney, then converted to creatine by *GAMT* in the liver and finally transported to the consumer tissues via a transporter (Wyss & Kaddurah-Daouk 2000). Surprisingly, we did not find a comparable tissue distribution of



**Figure 4** Expression profiles of five genes encoding factors of the creatine pathway in four tissues. Relative copy number of *GATM*, *GAMT*, *SLC6A8*, *CKB* and *CKM* was measured in kidney, liver, brain and muscle (8 fish per condition) in relation to the reference genes *EEF1A1* and *RPS5* using qRT-PCR. Import and BORN trout had been acclimated to 8 and 23°C. Values are shown on a logarithmic scale and are means  $\pm$  SEM. The line indicates an as high expression of the target gene as the expression of the reference genes. Significance levels between strains and temperatures are marked with an asterisk (\*,  $p < 0.05$ ) and hash sign (#,  $p < 0.1$ ).

the expression of genes involved in creatine metabolism, despite the very strong sequence conservation among vertebrates including fish. Instead, the highest expression of the two genes encoding enzymes involved in creatine synthesis was observed in muscle, in which also the highest gene expression of creatine kinases was found. This indicates that the muscle is independent of the import of creatine at least to a certain extent. Instead, it seems to produce creatine by itself, contradicting findings in mammals that there is no or only negligible synthesis of creatine in muscle (Wyss & Kaddurah-Daouk 2000; McFarlane et al. 2001; Lee et al. 1994). One reason for these differences may be the different creatine amounts in the muscle. Fish muscles have higher creatine contents than mammalian muscles (Hunter 1929). It may be energetically beneficial to maintain such a high creatine level directly at the place of usage instead of transporting it through various organs. Reason for the different creatine levels might be the generally different locomotor activity of fish and mammals. In rat skeletal muscle, only 10% of GATM activity of the according rat liver was observed (Daly 1985). Nevertheless, there are some studies indicating a more important role of muscular creatine synthesis than generally assumed. Schmidt et al. (Schmidt et al. 2004) found strong expression of *GAMT* mRNA and protein in skeletal muscle of humans and found a similar pattern in mice. Also in humans, deGrauw (deGrauw et al. 2003) and his colleagues found significant amounts of creatine in the skeletal muscle of a patient with a creatine transporter deficiency, which may also indicate creatine synthesis in muscle. Finally, also McClure concluded from his studies with mice that 'de novo creatine synthesis can occur in skeletal muscles of mature *mdx* mouse' (McClure et al. 2007).

However, we found an expression of the gene encoding the creatine transporter *SLC6A8* being as high in muscle as in the other tissues we examined, indicating that an import also takes place. It is also possible, that the expression of *GATM*, *GAMT* and *SLC6A8* may be specific for different cell-types in trout's muscle. In rat's brain it was observed that different cell types showed different expression patterns of creatine-related genes (Braissant & Henry 2008). Different cells expressed different combinations of the three genes *GATM*, *GAMT* and *SLC6A8*, reaching from no expression at all over the expression of one or two genes, up to the expression of the complete set of these genes. It was supposed that a transport of creatine between these different cells may still be necessary and therefore a creatine transporter is needed. By and large, muscle seems not only to be an important user of creatine, but also to be a major organ of creatine production in rainbow trout. This should be confirmed on protein level in further examinations.

Although the theory of spatially distributed creatine production and consumption is quite old, newer studies revealed that in mammals the supply with creatine for the brain is not totally dependent on import processes. In addition, there is also a creatine production in the central nervous system (CNS) itself (Béard & Braissant 2010). The discussion about the importance of creatine import into the CNS is controversial. On the one hand the creatine transporter CT1 might be a 'major pathway to the brain' (Ohtsuki et al. 2002) for creatine via the blood-brain barrier. On the other hand there might be 'a limited permeability' (Braissant et al. 2010) of the blood-brain barrier for creatine due to missing *SLC6A8* expression in astrocytes attached to microcapillary endothelial cells.

A recent review states that creatine is taken up through the blood-brain barrier in limited amounts, but that the CNS remains dependent on endogenous synthesis (Braissant 2012). We found a strong expression of creatine kinases in the brain of rainbow trout, indicating an expectedly strong energy demand and also an average expression of *SLC6A8* as well as *GAMT*. Only *GAMT* showed a considerably lower expression in comparison to its expression in other tissues as well as in comparison to the expression of the other creatine-related genes in the brain. As the formation of GAA is the rate-limiting step of creatine synthesis (Sandell et al. 2003; Wyss & Wallimann 1994), this finding is quite unexpected. One possible explanation is that the creatine transporter CT1 not only transports creatine to the brain but is also capable of transporting the precursor GAA as it has been described elsewhere (Tachikawa et al. 2009). In this case, the main function of CT1 would be the transport of GAA into the brain, where it then is metabolized to creatine by the abundant *GAMT*.

All examined genes were expressed in liver and kidney. In contrast to findings in mammals, where *GAMT* expression is highest in liver, its expression in rainbow trout was higher in kidney. Interestingly, renal *GAMT* expression was even higher than that of *GAMT* which was shown to have a very strong and almost exclusive expression in the kidney of mammals.

There are not many examinations of the piscine creatine system yet. To our knowledge, studies on the distribution of *GATM*, *GAMT* and *SLC6A8* have only been conducted in the zebrafish *D. rerio* (Wang et al. 2010; Wang et al. 2007), where quite different results were observed. In the examined tissues, *GAMT* was expressed strongest in the brain, but absent from liver. Expression of *GAMT* was very strong in the heart and also in the liver but almost absent from brain. *SLC6A8* expression was marginal in the liver but was most abundant in brain (Wang et al. 2010). Regarding the creatine system, rainbow trout seems to be rather different from

zebrafish showing a broader gene expression of all creatine-related genes in all tissues. However, the evolutionary distance between rainbow trout and zebrafish is quite large. The last common ancestor lived around 250 million years ago (Betancur-R et al. 2013). This could explain differences between both creatine systems. As muscle was not examined in the studies on zebrafish (Wang et al. 2010; Wang et al. 2007), it remains unclear if the strong muscular expression of creatine-related genes is a characteristic of the species rainbow trout alone or if it is typical for fish in general. Therefore, further studies have to be performed in the group of fish to get a broader view of the piscine creatine system.

Several significant differences between BORN and import trout have been observed. They did not deliver a really clear image, as differences were in part contradicting to each other and were also dependent on temperature. Nevertheless, these findings indicate a somehow differential creatine system between BORN and import trout. As the creatine system is a very important energy system this suggests energetic differences between BORN and import trout. This may be either the conclusion of or the reason for some of the differences, which have been found between both strains of rainbow trout yet. A different energy budget may influence the immune system, as the maintenance of this system is rather energy intensive and always is a trade-off between immunity and other energy-demanding processes like growth (Lochmiller & Deerenberg 2000). Furthermore, the synthesis of creatine is expensive as creatine synthesis accounts for 40% of the methyl groups of S-adenosylmethionine and uses 20–30% of the amidino groups of arginine (Brosnan et al. 2011). This underlines the meaning of creatine synthesis in amino acid metabolism. Further research on this field may lead to the disclosure of the reasons of the differences between BORN and import trout.

In addition to the difference between both trout lines, differences between the acclimation temperatures of the fish (8°C; 23°C) were observed. A certain effect of temperature on the expression of creatine-related genes was quite expectable, as energy demand and energy usage are dependent on the body temperature, which in fish is dependent on the surrounding temperature. In addition, the formation of creatinine from creatine is temperature dependent. A high temperature increases the formation of creatinine (Lempert 1959), thus withdrawing creatine from the creatine/creatine phosphate pool. Furthermore, creatine kinase activity depends on acclimation temperature in rat (Terblanche et al. 1998), indicating changes in the creatine system.

## Conclusion

In summary, we firstly identified the open reading frames of the creatine-related genes *GATM*, *GAMT*, *CKM* as well

as a fragment of *SLC6A8* in rainbow trout. Differences in their gene expression between BORN and import rainbow trout may be due to or may contribute to the so far found differences between both strains. Furthermore, differences in their gene-expression regarding acclimation temperatures indicate a regulation of creatine synthesis and usage under different temperatures. However, rainbow trout of both strains showed a tissue- and temperature-dependent expression pattern that was clearly different from the patterns described in mammals and other teleost's so far. In rainbow trout not only creatine usage seems to take place in the muscle but also a big part of creatine synthesis.

## Additional file

**Additional file 1: Multiple sequence alignments of protein sequences of creatine-related enzymes.** Protein sequences of *GATM* (a), *GAMT* (b) and *CKM* (c) from *Oncorhynchus mykiss* (Om), *Salmo salar* (Ss), *Takifugu rubripes* (Tr), *Danio rerio* (Dr), *Ictalurus punctatus* (Ip), *Oryzias latipes* (Ol), *Homo sapiens* (Hs), and *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (Bb) were aligned to each other. The rulers give positions of the alignment. Conserved, identical amino acids are shaded black, similar ones grey. S marks amino acids of S-adenosylmethionine binding sites, A ADP binding sites, C creatine binding sites, and L predicted members of the substrate specificity loop.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

TG conceived of the study, and participated in its design and coordination. CK was involved in the production of farmed fish and provided the experimental fish. MV, AR, AB, contributed to the design of the study and performed the temperature experiment including probe take. AB performed the laboratory experiments, interpreted the data and wrote the paper. All authors have read and given approval of the final version of the manuscript.

## Acknowledgments

This work is coordinated by the Campus bioFISCH-MV and is funded by the European Fisheries Fund (EFF) and the Ministry of Agriculture, the Environment and Consumer Protection Mecklenburg-Western Pomerania (pilot project: Rainbow trout BORN). We wish to acknowledge I. Hennings, B. Schöpel and M. Fuchs for expert technical assistance.

## Author details

<sup>1</sup>Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Genombiologie, Wilhelm-Stahl-Allee 2, Dummerstorf 18196, Germany.  
<sup>2</sup>Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LFA M-V), Institut für Fischerei, Born, Germany.

Received: 2 September 2014 Accepted: 3 September 2014

Published: 9 September 2014

## References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Anders E (1986) Stand der Züchtung und Reproduktion brackwasseradaptierter Regenbogenforellenbestände im Küstenbereich der DDR. *Fisch Forsch* 24:72
- Béard E, Braissant O (2010) Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem* 115:297–313, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06935.x
- Betancur-R R, Broughton RE, Wiley EO, Carpenter K, Lopez JA, Li C, Holcroft NI, Arcila D, Sanciangco M, Cureton II JC, Zhang F, Buser T, Campbell MA, Ballesteros JA, Roa-Varon A, Willis S, Borden WC, Rowley T, Reneau PC, Hough

- DJ, Lu G, Grande T, Arratia G, Ortí G (2013) The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *PLoS Curr*, doi:10.1371/currents.tol.53ba26640df0cace75bb165c8c26288
- Braissant O (2012) Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Inherit Metab Dis* 35:655–664, doi:10.1007/s10545-011-9433-2
- Braissant O, Henry H (2008) AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: A review. *J Inherit Metab Dis* 31:230–239, doi:10.1007/s10545-008-0826-9
- Braissant O, Béard E, Torrent C, Henry H (2010) Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: Relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiol Dis* 37:423–433, doi:10.1016/j.nbd.2009.10.022
- Brett JR (1971) Energetic Responses of Salmon to Temperature. A Study of Some Thermal Relations in the Physiology and Freshwater Ecology of Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Am Zool* 11:99–113, doi:10.1093/icb/11.1.99
- Brosnan JT, da Silva RP, Brosnan ME (2011) The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids* 40:1325–1331, doi:10.1007/s00726-011-0853-y
- Cauton MS (1977) The effect of temperature on routine metabolism in *Tilapia rendalli* bouleenger. *J Fish Biol* 11:549–553, doi:10.1111/j.1095-8649.1977.tb05711.x
- Claros MG, Vincens P (1996) Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and their Targeting Sequences. *Eur J Biochem* 241:779–786, doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00779.x
- Daly MM (1985) Guanidinoacetate methyltransferase activity in tissues and cultured cells. *Arch Biochem Biophys* 236:576–584, doi:10.1016/0003-9861(85)90661-7
- deGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C (2003) The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem* 244:45–48, doi:10.1023/A:1022487218904
- FAO (2012) The State of World Fisheries and Aquaculture - 2012. Rome, p 209. ISBN 978-92-5-107225-7
- Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, Kabsch W (1996) Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* 381:341–345, doi:10.1038/381341a0
- Gadberry MD, Malcomber ST, Doust AN, Kellogg EA (2005) Prismaclade—a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species. *Bioinformatics* 21:1263–1264, doi:10.1093/bioinformatics/bti134
- Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, Hedrick RP (2003) Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J Gen Virol* 84:2661–2667, doi:10.1099/vir.0.19323-0
- Hunter A (1929) The creatine content of the muscles and some other tissues in fishes. *J Biol Chem* 81:513–523
- Ipsiroglu OS, Stromberger C, Ilas J, Höger H, Mühl A, Stöckler-Ipsiroglu S (2001) Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-mono-hydrate in various animal species. *Life Sci* 69:1805–1815, doi:10.1016/S0024-3205(01)01268-1
- Köbis JM, Rebl A, Kühn C, Goldammer T (2013) Comparison of splenic transcriptome activity of two rainbow trout strains differing in robustness under regional aquaculture conditions. *Mol Biol Rep* 40:1955–1966, doi:10.1007/s11033-012-2252-1
- Lee H, Ogawa H, Fujioka M, Gerton GL (1994) Guanidinoacetate methyltransferase in the mouse: extensive expression in Sertoli cells of testis and in microvilli of caput epididymis. *Biol Reprod* 50:152–162, doi:10.1095/biolreprod50.1.152
- Lempert C (1959) The Chemistry Of The Glycocyamidines. *Chem Rev* 59:667–736, doi:10.1021/cr50028a005
- Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88:87–98, doi:10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32:W327–W331, doi:10.1093/nar/gkh454
- McClure WC, Rabon RE, Ogawa H, Tseng BS (2007) Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice. *Neuromuscul Disord* 17:639–650, doi:10.1016/j.nmd.2007.04.008
- McFarlane W, Heigenhauser GJ, McDonald D (2001) Creatine supplementation affects sprint endurance in juvenile rainbow trout. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130:857–866, doi:10.1016/S1095-6433(01)00448-2
- Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S, Salomons GS (2009) Creatine Deficiency Syndromes, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3794/>. Accessed 8 Jan 2013
- Meyer FP (1991) Aquaculture disease and health management. *J Anim Sci* 69:4201–4208
- Ohtsuki S, Tachikawa M, Takana H, Shimizu H, Watanabe M, Hosoya K, Terasaki T (2002) The Blood–Brain Barrier Creatine Transporter Is a Major Pathway for Supplying Creatine to the Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1327–1335, doi:10.1097/01.WCB.0000033966.83623.7D
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28:1166–1167, doi:10.1093/bioinformatics/bts091
- Rebl A, Köbis JM, Fischer U, Takizawa F, Verleih M, Wimmers K, Goldammer T (2011) MARCH5 gene is duplicated in rainbow trout, but only fish-specific gene copy is up-regulated after VHSV infection. *Fish Shellfish Immunol* 31:1041–1050, doi:10.1016/j.fsi.2011.09.004
- Rebl A, Verleih M, Korytář T, Kühn C, Wimmers K, Köllner B, Goldammer T (2012) Identification of differentially expressed protective genes in liver of two rainbow trout strains. *Vet Immunol Immunopathol* 145:305–315, doi:10.1016/j.vetimm.2011.11.023
- Rebl A, Verleih M, Köbis JM, Kühn C, Wimmers K, Köllner B, Goldammer T (2013) Transcriptome Profiling of Gill Tissue in Regionally Bred and Globally Farmed Rainbow Trout Strains Reveals Different Strategies for Coping with Thermal Stress. *Mar Biotechnol* :1–16, doi:10.1007/s10126-013-9501-8
- Sandell LL, Guan X-J, Ingram R, Tilghman SM (2003) GATm, a creatine synthesis enzyme, is imprinted in mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci* 100:4622–4627, doi:10.1073/pnas.0230424100
- Schmidt A, Marescau B, Boehm EA, Renema WKJ, Peco R, Das A, Steinfeld R, Chan S, Wallis J, Davidoff M, Ullrich K, Waldschütz R, Heerschap A, De Deyn PP, Neubauer S, Isbrandt D (2004) Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency. *Hum Mol Genet* 13:905–921, doi:10.1093/hmg/ddh112
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675, doi:10.1038/nmeth.2089
- Tachikawa M, Kasai Y, Yokoyama R, Fujinawa J, Ganapathy V, Terasaki T, Hosoya K (2009) The blood–brain barrier transport and cerebral distribution of guanidinoacetate in rats: involvement of creatine and taurine transporters. *J Neurochem* 111:499–509, doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06332.x
- Terblanche S, Masondo TC, Nel W (1998) Effects of cold acclimation on the activity levels of creatine kinase, lactate dehydrogenase and lactate dehydrogenase isoenzymes in various tissues of the rat. *Cell Biol Int* 22:701–707, doi:10.1006/cbir.1998.0310
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680, doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Verleih M, Rebl A, Köllner B, Korytář T, Anders E, Wimmers K, Goldammer T (2012) Comparative molecular characterization of the regucalcin (*RGN*) gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and maraena whitefish (*Coregonus maraena*). *Mol Biol Rep* 39:4291–4300, doi:10.1007/s11033-011-1216-1
- Wang L, Zhang Y, Shao M, Zhang H (2007) Spatiotemporal expression of the creatine metabolism related genes agat, gamt and ct1 during zebrafish embryogenesis. *Int J Dev Biol* 51:247–253, doi:10.1387/ijdb.062218lw
- Wang L, Chen D, Yang L, Huang S, Zhang Y, Zhang H (2010) Expression patterns of the creatine metabolism-related molecules AGAT, GAMT and CT1 in adult zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol* 76:1212–1219, doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02555.x
- Wernersson R (2006) Virtual Ribosome—a comprehensive DNA translation tool with support for integration of sequence feature annotation. *Nucleic Acids Res* 34:W385–W388, doi:10.1093/nar/gkl252
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiol Rev* 80:1107–1213
- Wyss M, Wallimann T (1994) Creatine metabolism and the consequences of creatine depletion in muscle. *Mol Cell Biochem* 133-134:51–66, doi:10.1007/BF01267947

doi:10.1186/2193-1801-3-510

Cite this article as: Borchel et al.: Creatine metabolism differs between mammals and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *SpringerPlus* 2014 3:510.

## **J. Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock,

Andreas Borchel