

Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten
(Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Dr. J. Braun)
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. M. El-Matbouli

Untersuchungen über die Bedeutung von Nramp
(natural resistance-associated macrophage protein)
für die Resistenz von Forellenstämmen
gegen *Myxobolus cerebralis*,
dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden*

Kumulative Dissertation zur Erlangung
der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität

vorgelegt von
Ute Rucker
aus Augsburg

München 2008

* Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes „Resistant Trout“ durch die Whirling Disease Foundation und den U.S. Fish and Wildlife Service (U.S.A.) gefördert.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Prof. Dr. Dr. J. Braun

Referent: Prof. Dr. Dr. M. El-Matbouli

Korreferent: Prof. Dr. Dr. J. Peters

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Die vorliegende Arbeit ist nach § 6 Abs. 2 Promotionsordnung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 15.01.2007 als kumulative Dissertation gestaltet worden. Die im Abschnitt 6 dargestellten Ergebnisse sind in dem englischsprachigen peer-reviewed Journal “*Diseases of Aquatic Organisms*” publiziert worden.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	5
2. Literaturbesprechung	7
2.1. Die Drehkrankheit der Salmoniden	7
2.1.1. Taxonomie	7
2.1.2. Allgemeines	8
2.1.3. Entwicklungszyklus und Morphologie	8
2.1.4. Pathogenese und Klinik	12
2.1.5. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie	13
2.2. Resistenz gegen <i>Myxobolus cerebralis</i>	15
2.2.1. Selektion.....	15
2.2.2. Einkreuzung.....	15
2.2.3. Deutsche Regenbogenforellen als Resistenzträger.....	16
2.2.4. Wirtsreaktionen auf <i>Myxobolus cerebralis</i>	16
2.3. Nramp (natural resistance-associated macrophage protein)	18
2.3.1. Geschichte (nach Buschman & Skamene, 2001)	18
2.3.2. Nramp 1 bei Säugetieren.....	20
2.3.3. Nramp bei Fischen.....	24
2.4. Versuchsrelevante Einflüsse auf das Immunsystem bei Fischen	25
2.4.1. Alter	25
2.4.2. Stress	26
3. Zielsetzung	27
4. Material und Methoden.....	28
4.1. Versuchsübersicht	28
4.2. Material	29
4.2.1. Versuchstiere.....	29
4.2.2. <i>Tubifex</i> und <i>Triactinomyxon</i> -Sporen	30
4.2.3. verwendete Geräte	31
4.2.4. verwendete Kits	32
4.3. Methoden.....	32
4.3.1. Expositionsversuch.....	32

4.3.2. Probennahme	33
4.3.3. RNA-Extraktion	34
4.3.4. Spektrophotometrie	34
4.3.5. cDNA-Synthese	34
4.3.6. Oligonukleotide und Optimierung.....	35
4.4. Quantitative real-time-PCR	39
4.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
4.4.2. Real time-PCR.....	39
4.4.3. Standardkurven und Effizienz.....	40
4.4.4. Detektion der Genexpression	44
4.4.5. Effizienz-korrigierte, relative Quantifizierung	44
4.5. Isolierung und Sequenzierung von OmNramp α	45
5. Ergebnisse.....	46
5.1. Verifizierung der Infektion der Forellenbrütlinge	46
5.2. Effizienz und Spezifität der <i>real-time-PCR</i>	46
5.3. Genexpression.....	50
5.4. Sequenzierung von OmNramp α in drei Regenbogenforellen-Linien.	52
6. Publikation.....	54
7. Diskussion.....	62
7.1. Relative Quantifizierung der Expression von OmNramp α und β	62
7.2. Sequenzierung von OmNramp α in drei Regenbogenforellenlinien ...	64
8. Zusammenfassung	67
9. Summary.....	68
10. Literaturverzeichnis	69
Danksagung.....	80
Curriculum vitae.....	81

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AMV	Avian Reverse Transcriptase
Asp	Aspartat
C	Cytosin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	komplementäre Deoxyribonucleinsäure
COX-2	Cyclooxygenase-2
CP	Crossing Point
Ct	Threshold Cycle
d	Tag/e
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanin
Gly	Glycin
h	Stunde/n
HKG	Housekeeping Gene
IFAT	Indirekte Fluoreszenzantikörpertechnik
IFN-γ	Interferon gamma
IL-8	Interleukin-8
IL-β	Interleukin- β
iNOS	Stickoxid-Synthase
IPN	Infektiöse Pankreasnekrose
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
<i>M. cerebralis</i>	<i>Myxobolus cerebralis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Nramp	natural resistance-associated macrophage protein
OD	Optische Dichte
OmNramp α	Oncorhynchus mykiss Nramp α
OmNramp β	Oncorhynchus mykiss Nramp β
ORF	open reading frame
p.exp.	post expositionem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PKD	Proliferative Nierenerkrankung
QTL	Quantitative Trait Loci
RFU	RelativeFluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonucleinsäure
SPF	Spezifisch pathogenfrei
T	Thymin
T°	Tagesgradalter
T _a	Annealingtemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VHS	Virale Hämorrhagische Septikämie
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid

1. Einleitung

Die Drehkrankheit der Salmoniden (engl.: „Whirling Disease“) wurde erstmals 1903 von Hofer beschrieben. Die Erkrankung wird durch *Myxobolus cerebralis* hervorgerufen, einen mehrzelligen Parasiten aus dem Stamm der Myxozoa (Grassé, 1970), und ist eine ursprünglich im europäischen Raum beheimatete Parasitose. Man findet eine erhebliche Diskrepanz bei der Resistenzlage zwischen einheimischen (autochthonen) und eingeführten Fischen. So kommt es bei der europäischen Bachforelle (*Salmo trutta fario*) zwar zur Infektion, jedoch zu keiner Erkrankung, weswegen sie als ursprünglicher Wirt für *M. cerebralis* angesehen wird (Hoffman, 1970). Im Gegensatz dazu reagiert die nordamerikanische Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), die vor ca. 150 Jahren aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit und Schnellwüchsigkeit in Europa eingeführt wurde, sehr empfindlich auf den Parasiten (Hofer, 1903; Hoffman und Putz, 1969). Doch auch innerhalb der verschiedenen Regenbogenforellen-Linien gibt es deutliche Unterschiede in der Empfänglichkeit.

Nach Einschleppung der Parasitenerkrankung auf den amerikanischen Kontinent in den 50er Jahren (Hoffman, 1990) folgte eine rasante Ausbreitung in Forellenzuchten und Wildgewässern in bisher 23 Staaten (Hedrick et al., 1998). Neben finanziellen Verlusten sind vor allem die ökologischen Auswirkungen enorm.

Durch Untersuchung der Invasions- und Resistenzmechanismen erhofft man sich Ansatzpunkte für wirksame Bekämpfungsmaßnahmen. Ein interessanter Aspekt hierbei sind insbesondere die Abwehrmechanismen, die eine erhöhte Resistenz bei bestimmten Forellenlinien bedingen, und deren Erforschung zu einem besseren Verständnis der Wirt-Parasit-Interaktionen führen könnte. Da bei den Fischen als einer sehr alten Wirbeltiergruppe das unspezifische Immunsystem eine weitaus größere Rolle spielt als das erworbene, ist es wahrscheinlich, dass solche Resistenzmechanismen vor allem auf nichtspezifischen Abwehrmechanismen basieren.

Bei Säugetieren spielt bei der ersten unspezifischen Abwehr von bestimmten Parasiten das Membranprotein Nramp (natural resistance-associated macrophage protein) eine entscheidende Rolle. Dieses Protein wird vor allem in

phagozytierenden Zellen exprimiert (Cellier et al., 1994; Govoni und Gros, 1998) und kommt in allen bisher untersuchten Organismen einschließlich Pflanzen, Pilzen und Bakterien vor. Sequenz- und Strukturanalysen zeigen ein hoch konserviertes Protein, das offenbar eine überlebenswichtige Rolle in den verschiedensten Organismen spielt. Die genaue Funktion von Nramp bei der unspezifischen Abwehr von Pathogenen wirft jedoch noch immer Fragen auf. Studien haben gezeigt, dass das Protein im Moment der Phagozytose in die Membran des Phagosoms integriert wird und dort während dessen Reifung zum Phagolysosom verbleibt (Gruenheid et al., 1997). Durch die Transportaktivität des Proteins kommt es zu einer Ausschleusung von bivalenten Kationen aus dem Phagolysosom (Jabado et al., 2000), womit offenbar dem phagozytierten Pathogen lebenswichtige Stoffe entzogen werden. Auch wird die Fähigkeit von Makrophagen, gegen eindringende Pathogene zu agieren, auf vielfältige Weise durch Nramp stimuliert (Blackwell et al., 1994; Blackwell, 1996; Radzioch et al., 1995; Skamene, 1994; Lang et al., 1997). Bei der Regenbogenforelle wurden zwei Nramp-Homologe (OmNramp α und OmNramp β) isoliert (Dorschner und Phillips, 1999), die ebenfalls eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem entsprechenden Säugetierprotein aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden OmNramp α und OmNramp β in unterschiedlichen Forellenstämmen durch molekularbiologische Methoden näher charakterisiert und ein möglicher Zusammenhang mit der erhöhten Resistenz einiger Forellenlinien gegen *M. cerebralis* untersucht.

2. Literaturbesprechung

2.1. Die Drehkrankheit der Salmoniden

2.1.1. Taxonomie

Myxobolus cerebralis ist ein mehrzelliger Parasit, der zur Klasse Myxosporea (Bütschli, 1881) und damit zum Tierstamm der Myxozoa (Grassé, 1970) gerechnet wird (*International Comission on Protozoan Nomenclature*, Levine et al., 1980). Hier finden sich ca. 1250 bei Fischen parasitierende Spezies (Lom und Dykova, 2006), darunter auch *Tetracapsuloides bryosalmonae*, der Erreger der Proliferativen Nierenerkrankung der Salmoniden (PKD) sowie *Sphaerospora renicola*, die die Schwimmbblasenentzündung der Karpfen verursacht. Charakteristisch für diese Parasiten ist die Ausbildung von Schalen-, Polkapsel- und Amöboidkeimzellen.

Die Actinosporea stellten ursprünglich ebenfalls eine eigene Klasse innerhalb der Myxozoa dar, wobei die Abgrenzung zu den Myxosporea hauptsächlich durch die Sporenmorphologie erfolgte, welche den Actinosporen, meist durch Ausbildung von Fortsätzen an der Basis, eine Flotation im Wasser erlauben. Eine Unterscheidung der einzelnen Arten ist hier anhand der Morphologie der Schalenzellen wie auch der unterschiedlichen Anzahl der Amöboidkeimzellen möglich.

Aufgrund der Beschreibung eines zweiwirtigen Entwicklungszyklus bei den Myxosporea (Wolf und Markiw, 1984) und der molekularbiologischen Zuordnung einiger Actinosporen zu den Myxosporidien musste eine neue taxonomische Einordnung vorgenommen werden. Nach Kent et al. (1994) steht der Begriff „Actinosporea“ nunmehr als Synonym für die Klasse Myxosporea (Bütschli, 1881), und die ursprünglichen Artenbezeichnungen werden nun als Typbezeichnungen für die verschiedenen Sporenformen verwendet.

Auch die Systematik der Myxozoa wird gegenwärtig neu diskutiert. Schlegel et al. (1996) postulieren (aufgrund der Ergebnisse der phylogenetischen Analyse von ribosomaler RNA) eine Zugehörigkeit zu den Bilateria, und Siddall et al. (1995) schlagen aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit eine Zuordnung zu den Cnidaria vor.

2.1.2. Allgemeines

Myxobolus cerebralis als Erreger der Drehkrankheit wurde erstmals 1903 in einer Regenbogenforellenpopulation in Deutschland von Hofer beschrieben. Durch den zunehmenden Handel mit lebenden und toten Fischen wurde die Parasitose, mit Ausnahme von Südamerika (Hedrick et al., 1998), in mittlerweile fast alle Forellen-produzierenden Länder verschleppt (Halliday, 1976). Bislang konnte *M. cerebralis* bei 18 Salmonidenarten der Gattungen *Oncorhynchus* (Hedrick et al., 1999b), *Salmo*, *Salvelinus* (Blazer et al., 2004) und *Hucho* nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Empfänglichkeit gibt es jedoch deutliche Unterschiede. Einige Fischarten können bei erhöhten Sporedosen durchaus infiziert werden, wobei Krankheitssymptome jedoch stark abgemildert oder gar nicht auftreten (Hoffman et al., 1962; Hedrick et al., 1999a). Die ausgeprägte Resistenz der Bachforelle (*Salmo trutta fario*), die als „Originalwirt“ gilt, wird der lang andauernden Kohabitation mit dem Parasiten im europäischen Ursprungsgebiet und damit einer evolutionären Anpassung zugeschrieben (Andree et al., 1999). Doch zeigen einige nordamerikanische Arten wie der Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*) ebenfalls eine erhöhte Resistenz (Hedrick et al., 1999b), deren Ursprung oder Ursache bis heute nicht erklärt werden konnte. Nach O’Grodnick (1979) erwies sich die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) am empfänglichsten. Da gerade diese Art für die Aquakultur besonders wichtig ist, entstehen durch die Drehkrankheit auch enorme wirtschaftliche Schäden. Die verheerenden ökologischen Auswirkungen und Verluste in den befallenen nordamerikanischen Wildfischpopulationen haben eine Ausweitung der internationalen Forschung bewirkt, um den bereits bestehenden Befall möglichst einzudämmen und eine weitere Ausbreitung zu verhindern.

2.1.3. Entwicklungszyklus und Morphologie

Die Transmission und der Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* wurden nach ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1903 noch einige Jahrzehnte lang kontrovers diskutiert. Markiw und Wolf (1983) und Wolf und Markiw (1984) zeigten, dass (1) Oligochäten der Art *Tubifex tubifex* als Zwischenwirt für den Zyklus von

M. cerebralis vorhanden sein müssen, und dass (2) zwei Sporenstadien ausgebildet werden.

Entwicklung im Oligochäten

Infektiöse Myxosporen von *M. cerebralis*, die sich im Knorpelgewebe des Fisches entwickelt haben, werden entweder nach dem Tod des Wirtes durch Auflösung des umgebenden Gewebes (El-Matbouli et al., 1992) oder eventuell auch schon *pre mortem* durch die Fäzes (Nehring et al., 2002) freigesetzt und von *Tubifex tubifex* zusammen mit der Nahrung aus dem Sediment aufgenommen. Infektionsstudien zeigen, dass es auch bei diesem Avertebratenwirt Unterschiede in der Empfänglichkeit gibt (Kerans et al., 2004). Für die weitere Entwicklung des Parasiten ist also die Aufnahme durch Individuen einer suszeptiblen *T. tubifex*-Linie notwendig, die dann als Endwirt im Entwicklungszyklus dient (El-Matbouli et al., 1992). In dessen Darmtrakt erfolgt die Adhäsion der Sporen durch Ausschleudern ihrer Polfilamente an die Darmwand. Die Schalenzellen öffnen sich entlang der Nahtlinie, und das Sporoplasma dringt interzellulär in das Darmepithel ein. Dort findet dann eine dreiphasige, geschlechtliche Entwicklung mit Schizogonie, Gametogenie und Sporogenie statt:

Phase 1: Schizogonie (5 – 25d p.exp.): Durch vegetative Teilung des zweikernigen Amöboidkeims entstehen ein- oder zweikernige Zellen, die ihrerseits durch mehrmalige Teilungen einkernige Tochterzellen produzieren. Diese wandern interzellulär durch die Darmepidermis und befallen benachbartes Gewebe. Einige von ihnen bilden durch Plasmogamie Zweikernstadien, die ca. ab 25d p.exp. zwischen den Epithelzellen sichtbar sind (El-Matbouli et al., 1992; El-Matbouli, 1996; Hedrick und El-Matbouli, 2002).

Phase 2: Gametogenie (25 - 46d p.exp.): Nach weiteren Teilungen der Zweikernstadien bilden sich Pansporozysten, die aus zwei äußeren umschließenden somatischen Zellen und zwei inneren generativen Zellen (α und β) bestehen. Diese durchlaufen weitere mitotische Teilungen zu insgesamt 16 diploiden Gameten, die dann nach einer meiotischen Teilung zu 16 haploiden Gameten mit jeweils einem Polkörper differenzieren. Dies ist die einzige haploide Phase im gesamten Entwicklungszyklus von *M. cerebralis* (El-Matbouli et al., 1998). Ab 50d p.exp. beginnt die sexuelle Vermehrungsphase des Parasiten, die in einer

Verschmelzung von je einem haploiden α -Gameten mit einem haploiden β -Gameten besteht. Dadurch entstehen acht diploide Zygoten (El-Matbouli und Hoffmann, 1998).

Phase 3: Sporogonie (ab 50d p.exp.): Jede der acht Zygoten bildet durch Teilungen vier Sporoblasten, wobei einer von drei weiteren umhüllt wird. Durch eine weitere Teilung der drei äußeren Zellen besteht die sich entwickelnde Spore nun aus sieben Zellen. Diese differenzieren sich in Polkapsel, Hülle und Sporoplasma, das bis zu 64 Keimzellen enthält.

Nach etwa 90 Tagen werden durch Wanderung des Pansporozysten zur Oberfläche des Darmepithels und durch Ruptur der Pansporozystenwand die fertigen Triactinomyxon-Sporen in das Darmlumen abgegeben. Durch die Darmpassage gelangen sie mit dem Kot ins freie Wasser und erlangen durch osmotische Wasseraufnahme ihre endgültige Form (Hedrick und El-Matbouli, 2002): Die Schalenzellen bilden drei Sporenfortsätze, an die sich der Sporenstiel anschließt. Dieser enthält den Amöboidkeim und die drei Polkapseln mit jeweils einem spiralförmigen Polfilament im Innern (El-Matbouli, 1996).

Beginn und Dauer der Sporenausscheidung ist stark von äußeren Faktoren wie Wassertemperatur und -qualität sowie Alter und Empfänglichkeit der Oligochäten abhängig. Unter Laborbedingungen, bei denen die Würmer konstant bei 12,5°C gehalten werden, beginnt die Ausscheidung 104d p.exp. mit einem Maximum zwischen dem 120. und 170. Tag (Markiw, 1986), wobei sich Wassertemperaturen zwischen 10°C und 15°C als optimal für eine hohe und langanhaltende Sporenproduktion erwiesen haben (El-Matbouli et al., 1999b). Diese kann in infizierten Würmern über ein Jahr lang anhalten, wobei von einem Individuum einige tausend Sporen ins Wasser entlassen werden können (Markiw, 1986).

Entwicklung im Fisch

Die Triactinomyxon-Sporen zeigen keinerlei Eigenbewegung und flottieren mit Hilfe ihrer charakteristischen, ankerförmigen Morphologie frei im Wasser. Ihre Tenazität ist im Vergleich zu den Myxosporen sehr gering. Die Infektiosität der Sporen hält für etwa 60h an, d.h. innerhalb dieser Zeit muss der (zufällige) Kontakt mit dem Fisch erfolgen (Markiw, 1992). Die Infektion erfolgt gezielt an den

sekretorischen Öffnungen der Epidermisschleimzellen, die über den gesamten Fischkörper, Maulhöhle und Kiemen eingeschlossen, verteilt sind. Hier kommt es durch eine vermutlich chemotaktisch gesteuerte Reaktion zum Ausschleudern der Polfilamente (Adhäsion) und zur aktiven Penetration der Haut durch den Amöboidkeim (El-Matbouli et al., 1999a). Es folgen eine präsporogonische und eine sporogonische Entwicklungsphase, deren Dauer unter anderem von der Wassertemperatur abhängig ist. Niedrige Temperaturen scheinen die einzelnen Vorgänge zu verlangsamen (Halliday, 1973b).

Präsporogonische Phase (bis zu 35d p.exp.): Nach ca. 1h beginnen die Zellen des Sporoplasmas in Epidermiszellen einzudringen und sich dort mitotisch zu teilen. Die daraus entstehenden Parasitenstadien dringen unter weiterer Teilung, abwechselnd inter- und intrazellulär, immer tiefer in die Haut ein. Spätestens nach 24h p.exp. sind kaum noch Parasiten in der Epidermis nachweisbar (El-Matbouli et al., 1995). Zwischen 4d und 24d p.exp. sind Parasitenstadien zuerst im peripheren, dann auch im Zentralnervensystem zu finden, von wo aus sie ins Knorpelgewebe wandern (bevorzugt Kopf- und Wirbelsäulenbereich). Hier finden weitere Replikationen zu mehrzelligen Parasitenstadien (Plasmoidien) statt, wobei durch extrazelluläre Verdauung eine Zerstörung von Knorpelmatrix und Chondrozyten einsetzt (Hedrick und El-Matbouli, 2002).

Sporogonische Phase (ab ca. 20d p.exp.): Diese Phase beginnt mit einer Autogamie, bei der sich zwei Zellen vereinigen und eine generative Zelle bilden, die eine sporogonische Zelle umhüllen. Dieses Stadium wird als *Pansporoblast* bezeichnet. Aus der sporogonischen Zelle entstehen nun nach mehreren mitotischen Teilungen zwölf diploide Zellen, die Schalenzellen, Amöboidkeim und Polkapseln für zwei Myxosporen ausbilden (Halliday, 1973b). Abhängig von der Wassertemperatur kann man nach 52 Tagen bis 11 Monaten p.exp. die fertig ausgebildeten, linsenförmigen Myxosporen nahezu überall im Skelett des Fisches nachweisen (Halliday, 1973b). Sie bestehen aus zwei Schalenzellen, die im Bereich des Äquators eine Nahtlinie bilden und zwei Polkapseln sowie den zweikernigen Amöboidkeim umschließen (Lom und Hoffman, 1971). Die Sporen besitzen eine äußerst hohe Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen und können im Sediment 30 Jahre und länger infektiös bleiben (Hoffman und Putz, 1969). Durch den Tod des Fisches und nachfolgende Gewebsautolyse freigesetzt oder

bereits mit der Fäzes ausgeschieden, gelangen freie Myxosporen in die Umwelt.

2.1.4. Pathogenese und Klinik

Das Zielgewebe des Parasiten ist juveniler Knorpel. Das Ausmaß der Symptomatik hängt daher stark vom Alter der Fische zum Zeitpunkt der Infektion ab (Ryce et al., 2004). Zudem nimmt die klinische Ausprägung, insbesondere bei sehr empfänglichen Arten wie der Regenbogenforelle, proportional mit der Infektionsdosis zu. Ältere sowie schwach infizierte Tiere können also als symptomlose Carrier der Parasiten fungieren (Schäperclaus, 1931).

Die Sporogenese konzentriert sich auf das Knorpelgewebe von Kopf und Wirbelsäule und hier im Wesentlichen auf die Bereiche um die Ossifikationszentren (El-Matbouli et al., 1992). Hier ist eine breitflächige Zerstörung des Knorpels zu beobachten, die durch extrazelluläre Verdauung von Knorpelmatrix und Chondrozyten zustande kommt (Bechara et al., 2003; Hedrick und El-Matbouli, 2002). Die genaue Pathogenese ist noch unklar, es wird aber eine Beteiligung von parasitären Proteasen vermutet (Kelley et al., 2003, 2004; Dörfler und El-Matbouli, 2007). Die daraus folgende Störung der Ossifikation führt zu unregelmäßigen Knorpel-Knochen-Wucherungen, die zu den drei Leitsymptomen der Erkrankung führen:

- (1) Deformationen am Stützskelett in Form von verkürzten Kiemendeckeln, missgebildeten Kiefern und verkrümmter Wirbelsäule
- (2) Charakteristische spiralförmige Schwimmbewegungen, ausgelöst durch äußere Reize und wohl bewirkt durch fortwährende Nervenstimuli an den Rückenmarkseinschnürungen (Rose et al., 2000)
- (3) Schwarzfärbung des hinteren Körperdrittels, vermutlich resultierend aus einem Reiz von pigmentmotorischen Neuronen an deformierten Wirbelsäulenbereichen (Schäperclaus, 1990).

Diese unmittelbaren Folgen führen im weiteren Verlauf zu einer Reduktion der Futteraufnahme und damit einhergehender Wachstumsminderung. In Naturge-

wässern werden befallenen Tiere zudem zur leichten Beute für Fressfeinde (Plehn, 1905).

2.1.5. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie

Mikroskopische und immunologische Diagnosemethoden sind erst ab einem relativ späten Zeitpunkt des Infektionsgeschehens anwendbar. Ein Nachweis mittels der PCR (Polymerase-Chain-Reaction) kann dagegen schon ab 2h p.inf. geführt werden und ist aus diesem Grunde in den meisten Fällen als Methode der Wahl anzusehen.

Die Diagnose der Drehkrankheit kann auch erfolgen:

adspекторisch: Ab dem 60. Tag p.inf. kann anhand der oben genannten Symptome eine Verdachtsdiagnose gestellt werden (Wolf und Markiw, 1975), wobei jedoch die folgenden differentialdiagnostischen Aspekte zu beachten sind:

- Abnormes Schwimmverhalten kann auch durch andere Erkrankungen wie Infektiöse Pankreasnekrose (IPN), Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) und Enteritiden hervorgerufen werden (Plehn, 1905).
- Bei Skelettdeformationen ist auch an ernährungsbedingten Ascorbinsäure- oder Tryptophanmangel zu denken (Wolf et al., 1981), ebenso an eine *Flexibacter psychrophila*-Infektion (Margolis et al., 1996).

mikroskopisch: Dies erfolgt durch Ausstrich von nativem Knorpelmaterial bzw. Histologie und Anfärbung nach Giemsa oder mit Hämatoxilin-Eosin. Hier können auch andere Myxoboliden gefunden werden, die oft nur durch Erfahrung oder mittels PCR von *M. cerebralis* zu unterscheiden sind.

immunologisch: Für einen immunologischen Nachweis können die *Indirekte Fluoreszenzantikörpertechnik* (IFAT; Wolf und Markiw, 1975), serologische Methoden (Griffin und Davis, 1978) sowie Immunperoxidase-gekoppelte Antikörper (Hoffmann et al., 1991) verwendet werden.

molekularbiologisch: Für die Detektion von *M. cerebralis*-DNA wurden unterschiedliche Polymerase-Kettenreaktionen entwickelt. Neben einer single-round und nested PCR nach Andree et al. (1998) und einer single-round PCR nach

Baldwin und Myklebust (2002) steht besonders mit der *real-time-PCR* nach Cavender et al (2004) eine äußerst sensitive Nachweismethode zur Verfügung. Kürzlich wurde von El-Matbouli und Soliman (2005) ein Diagnostikverfahren namens LAMP (loop-mediated isothermal amplification) für die Detektion von *M. cerebralis* entwickelt. Mit der isothermalen Amplifikation *M. cerebralis*-spezifischer DNA innerhalb von 1h steht hier eine kostengünstige und zeitsparende Methode zur Verfügung.

Eine wirksame Behandlung bereits infizierter Fische ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Zunächst vielversprechende Ergebnisse in Studien, die die Wirksamkeit von Fumagillin und TNP-470 untersuchten (El-Matbouli und Hoffmann, 1991; Schott, 2002), konnten in weiteren Tests nicht bestätigt werden (Staton et al., 2002). Daher kommt der Prophylaxe bzw. Hygiene eine entscheidende Bedeutung bei der Bekämpfung der Drehkrankheit in Fischzuchten zu. Betonteiche bieten zum Beispiel, im Gegensatz zu Naturteichen, den Oligochäten keine Lebensgrundlage und sind daher geeignet, den Infektionsdruck zu senken. Sie sind zudem leichter zu reinigen und zu desinfizieren. Bei latentem Erregereintrag über das Zulaufwasser kann dieses durch UV-Licht bzw. Filterung dekontaminiert werden (Hedrick et al., 2000; Nehring et al., 2003). Nach Ausbruch der Drehkrankheit empfiehlt Noga (1996) für die Sanierung eines Betriebes eine unschädliche Beseitigung infizierter Fische und gründliche Desinfektions- und Reinigungsmaßnahmen mit Natronlauge, Branntkalk oder Chlorkalk. Der Wiederaufbau des Zuchtstammes sollte anschließend mit pathogenfreier Brut erfolgen.

2.2. Resistenz gegen *Myxobolus cerebralis*

2.2.1. Selektion

Die genannten Therapie- und Prophylaxemaßnahmen sind geeignet, den ökonomischen Schaden durch *M. cerebralis* zu begrenzen und betroffene Betriebe zu sanieren. Sie bedeuten aber einen erheblichen personellen und finanziellen Aufwand und sind zudem in Wildgewässern nicht anwendbar. Eine weitere Möglichkeit, Zucht- sowie Wildbestände langfristig vor Krankheiten zu schützen, stellt die Selektion, Zucht und Einkreuzung resisterter Linien dar. Man unterscheidet zwei Arten der Selektion:

Direkte Selektion: Bei der direkten Selektion werden die Tiere nach verbesserter Überlebensrate selektiert. Hierbei muss ein Einfluss durch andere Pathogene sowie durch Haltungs- und Managementprobleme ausgeschlossen werden.

Indirekte Selektion: Hier werden Faktoren selektiert, die mit der gewünschten Eigenschaft (also Resistenz gegen die Krankheit) korreliert sind. Beispiele für solche Faktoren sind hohe Wachstumsrate, geringe Cortisolausschüttung (beides korreliert mit verminderter Empfänglichkeit gegen Furunkulose (Fevolden et al., 1995; Gjedrem et al., 1991)) oder eine Kombination von Resistenzgenen (engl. „quantitative trait loci“ oder „QTL“).

2.2.2. Einkreuzung

Das Einkreuzen von resistenten Tieren wird auch im Fall der Drehkrankheit als Lösungsansatz für die drastischen ökologischen Auswirkungen in Wildgewässern erachtet. Zu diesem Zweck wurde im Anschluss an einen Vortrag von El-Matbouli (2000) über seine Beobachtungen an resistenten Regenbogenforellen-Linien das Forschungsprogramm „Resistant Trout“ von der US-amerikanischen „Whirling Disease Foundation“ ins Leben gerufen. In diesem Programm werden resistente Regenbogenforellen-Linien auf ihre Eignung für den Besatz amerikanischer Naturgewässer und für die Einkreuzung in dortige Populationen getestet. Dafür müssen neben Infektions- und Symptomprävalenz gegen *M. cerebralis* auch die Krankheitsanfälligkeit gegen weitere Erkrankungen wie VHS und Rotmaulseuche untersucht werden. Des Weiteren sollen die Resistenzmecha-

nismen untersucht werden, um ein breiteres Basiswissen über deren genetische Grundlagen zu erhalten.

2.2.3. Deutsche Regenbogenforellen als Resistenzträger

In empirischen Beobachtungen zeigten sich deutsche Regenbogenforellen-Linien resistenter gegen *M. cerebralis* als amerikanische, was auch durch eine Reihe von Untersuchungen untermauert werden konnte (Küppers, 2003). Bei zwei deutschen Zuchttämmen lag die Infektionsprävalenz signifikant niedriger als bei den amerikanischen. Dies mag an der bereits über 100jährigen Koevolution von Wirt und Parasit in Europa liegen, wohingegen amerikanische Populationen dem Erreger erst seit ca. 50 Jahren ausgesetzt sind. Bei Kreuzungen zwischen empfänglicher (amerikanischer) und resistenter (deutscher) Zuchtlinie und anschließendem Infektionsversuch lag die Empfänglichkeit der Hybriden zwischen denjenigen der Elterntiere, jedoch etwas mehr angenähert der des resistenten Stammes (Meixner, 2004). Allerdings wird der hohe Inzuchtgrad des deutschen Stammes als problematisch für den Besatz amerikanischer Naturgewässer angesehen. Erst seit kurzem wird eine deutsche Wildpopulation aufgrund ihrer hohen Resistenz in die Untersuchungen mit eingeschlossen (El-Matbouli et al., 2006). Diese Population besteht wohl aus Einkreuzungen vieler verschiedener Zuchtlinien und verfügt also über eine ausgeprägte Heterozygotie, die grundsätzlich zu einer höheren Unempfindlichkeit gegenüber Krankheiten beiträgt. Hinsichtlich einer Auswilderung wäre dies als großer Vorteil gegenüber den gezüchteten Linien zu werten.

2.2.4. Wirtsreaktionen auf *Myxobolus cerebralis*

Bevor auf den in dieser Arbeit untersuchten Immunfaktor eingegangen wird, sollen kurz die bisher bekannten und histologisch sichtbaren Immunreaktionen bei einer *M. cerebralis*-Infektion angesprochen und die Unterschiede zwischen resistenten und empfänglichen Tieren dargestellt werden.

Haut: In der Haut werden durch Antigenaufnahme vor allem zelluläre Mechanismen stimuliert (Nakanishi und Ototake, 1997); man findet hier neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Makrophagen (Anderson, 1974; Cooper et

al., 1990). Intrazellulär degenerierende Parasitenstadien in der Haut lassen auf Phagozytose durch die genannten Immunzellen sowie auf phagozytierende Epidermiszellen schließen (El-Matbouli et al., 1995). In resistenten Tieren findet man 4h p.exp. nur halb so viele Parasitenstadien wie bei empfänglichen. Als Ursache hierfür werden Abwehrmechanismen im Schleim und Unterschiede in den Oberflächenmolekülen der Wirtsepidermis diskutiert. Nach 10h p.exp. sind dann im resistenten Stamm mehr, größtenteils degenerierte, Parasitenstadien zu finden als im empfänglichen Stamm. Möglicherweise wird im resistenten Wirt eine große Anzahl der Parasitenstadien so geschädigt, dass sie ihre Wanderung im Gewebe nicht fortsetzen können (Meixner, 2004).

Nervengewebe: Bei der anschließenden Wanderung entlang der peripheren Nerven zum Gehirn und Rückenmark lassen sich bei der Regenbogenforelle keine Immunreaktionen im Gewebe nachweisen (El-Matbouli et al., 1995). Vermutlich kann sich hier der Parasit dem Immunsystem des Wirtes entziehen, so wie dies beispielsweise bei Herpesvirus-Infektionen bekannt ist. Hedrick et al. (1999a) fanden in Bachforellen eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten im Nervengewebe, was wohl als Hinweis auf eine Immunabwehr mit zellulärer Beteiligung interpretiert werden muss.

Knorpel: Im Knorpel bilden sich granulomatöse Entzündungsherde mit Leukozyteninfiltrationen um die Sporenstadien (El-Matbouli et al., 1995; Hedrick et al., 1999a). Bei empfänglichen Regenbogenforellen fanden Hedrick et al. (1999a), im Gegensatz zur Bachforelle, eine Korrelation zwischen Sporenkonzentration und Ausprägung der Knorpelläsionen. Die Regenbogenforelle scheint den Parasiten also trotz umfangreichen Entzündungsreaktionen nicht effektiv immunologisch bekämpfen zu können. In der Bachforelle fanden die Autoren eine generell größere Präsenz von Entzündungszellen in Nerven und Knorpel. Dies könnte die Ursache für eine erfolgreichere Immunabwehr sein.

Das spezifische Immunsystem ist für die Abwehr der Drehkrankheit wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung. Dies liegt zum einen daran, dass bei Fischen dem unspezifischen Immunsystem eine grundsätzlich größere Bedeutung zukommt als beim Säugetier (Ingram, 1980). Zum anderen entwickelt sich die Fähigkeit, spezifische Antikörper zu produzieren, im Fisch erst mit 4 – 8

Wochen (Ellis, 1988), die Infektion mit *M. cerebralis* kann aber schon wesentlich früher erfolgen. Eine passive Immunisierung von jungen Forellen mit *M. cerebralis*-antikörperhaltigem Serum zeigte ebenfalls nur geringe Wirkung (Adkinson et al., 1997). Die oben angesprochenen Befunde und Untersuchungen anderer Myxobolideninfektionen (Muñoz et al., 2000) weisen auf die wichtige Rolle der zellulären Immunreaktion und insbesondere der Aktivität phagozytierender Zellen hin. Diese könnten limitierend für die Wanderung des Parasiten im Fischkörper und Ausprägung der oben beschriebenen Symptomatik sein.

In Säugetieren wird die Phagozytoseaktivität von Makrophagen und polymorphekernigen Zellen durch das Makrophagenprotein Nramp 1 stimuliert. Dessen Funktion zeigte sich bei vielen Infektionen als entscheidend für den weiteren Verlauf der Erkrankung.

2.3. Nramp (natural resistance-associated macrophage protein)

2.3.1. Geschichte (nach Buschman & Skamene, 2001)

In den frühen 70er Jahren wurde zum ersten Mal über einen Genlocus bei Mäusen berichtet, der Resistenz- und Empfänglichkeitsallele umfasst. Er teilt eine Auswahl von Inzucht-Mäuselinien in 2 Gruppen, wobei sich die eine Gruppe als resistent, die andere als empfänglich gegenüber *Salmonella typhimurium* zeigt (Plant & Glynn, 1976). Dieser Locus wurde von den Autoren als *Ity* bezeichnet. Parallel dazu wurde nachgewiesen, dass *Ity* eng gekoppelt an, bzw. identisch mit dem Locus *Lsh* sein musste, der eine ähnliche Kontrolle über Infektionen mit *Leishmania donovani* ausübt (Bradley, 1974).

Gleches gilt auch für den *Bcg*-Locus, der die Empfänglichkeit von Mäusen gegenüber verschiedenen Mykobakterien kontrolliert (Vidal et al., 1993). Alle drei Loci sind auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Mock et al., 1990). 1982 wurde die Annahme eines identischen Genortes der drei Loci bestätigt (Plant et al., 1982; Skamene et al., 1982). Schon damals stellten die Autoren weitergehende Vermutungen an, die in den darauffolgenden Jahren größtenteils bestätigt wurden:

- (1) Ein einziges Gen reguliert die Empfänglichkeit gegen taxonomisch nicht verwandte intrazelluläre Erreger.
- (2) Dieses Gen sorgt im intrazellulären Milieu der Makrophagen durch Beeinflussung bestimmter Wachstumsfaktoren für eine Begrenzung des Wachstums des Pathogens.
- (3) Aufgrund der geringen Anzahl empfänglicher Mäuselinien scheint das suszeptible Allel eine recht junge Mutation zu sein und keine polymorphe Variante.
- (4) Das menschliche Nramp-Homolog ist an der Resistenz gegen die mykobakteriellen Krankheiten wie Lepra und Tuberkulose beteiligt.

Da weder das Protein noch die Funktion des Gens bekannt waren, erforderte die Bestätigung der Ein-Gen-Hypothese eine noch relativ neue Technik, das *Positionsklonieren* (engl. „positional cloning“). Hierbei geht man nicht von einem bekannten Protein aus und isoliert anhand der Aminosäuresequenz das Gen, sondern es muss zuerst der Genort bestimmt werden, um dann anhand von geeigneten, mit dem entsprechenden Phänotyp verknüpften Markern das Gen nach und nach „aufzuspüren“. Gleichzeitig wurde die Funktion dieses Gens erforscht und seine Einflussnahme auf die verschiedensten Makrophagen-Aktivitäten beschrieben (Blackwell et al., 1991). 1993 gelang die Isolierung des muri-
nen Nramp 1 (Vidal et al., 1993), und 1994 (Cellier et al.) wurde erstmals das menschliche Homolog NRAMP 1 beschrieben.

1998 (Skamene et al.) wurde endgültig nachgewiesen, dass die Resistenz gegen drei intrazelluläre Pathogene tatsächlich auf ein einziges Gen auf dem Mäuse-Chromosom 1 zurückzuführen ist. Das suszeptible Mäuseallel zeigt eine einzige, in neuerer Zeit entstandene Mutation (ein Gly zu Asp Austausch in der Transmembran-Domäne Nr. 4), die zu einem kompletten Ausfall des Proteins führt. Außerdem hat man herausgefunden, dass Nramp ein intrazellulär lokalisiertes Makrophagenprotein ist, das als Carrier für bivalente Kationen fungiert (Skamene et al., 1998).

Die Tatsache, dass NRAMP 1 beim Menschen, im Gegensatz zu Mäusen, offensichtlich bei der Resistenz gegen *M. tuberculosis* beteiligt ist (Medina und North, 1996), führte zu einer Vielzahl von Untersuchungen über die Gewebs-

spezifität des Proteins. Govoni et al. (1995, 1999) konnten nachweisen, dass das Mäuseprotein hauptsächlich in Milz und Leber, den Zielorganen von *Mycobacterium bovis*, *lepraeumurium*, *avium*, *typhimurium* und *donovani*, exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird das menschliche NRAMP 1 vor allem in der Lunge, dem Zielorgan des Tuberkuloseerreger *M. tuberculosis*, exprimiert (Cellier et al., 1994, 1997). Es wird daher diskutiert, ob nicht durch den evolutionären Infektionsdruck von *M. tuberculosis* die Lunge wichtigstes Organ für die Exprimierung von NRAMP 1 beim Menschen geworden sein könnte.

Mittlerweile sind Nramp-Homologe in allen weiteren untersuchten Organismen gefunden worden, wie in Ratten (Gunshin et al., 1997), Vögeln (Hu et al., 1995), Fischen (Dorschner und Phillips, 1999), Insekten (Rodrigues et al., 1995), Nematoden (The C. elegans Sequencing Consortium, 1998), Pflanzen (Belouchi et al., 1995), Pilzen (Portnoy et al., 2000) und Bakterien (Makui et al., 2000). Das ubiquitäre Vorkommen und die hohe Sequenz-Konservierung weisen auf eine essentielle Rolle von Nramp in den verschiedensten Organismen hin.

In Säugetieren wurde noch ein weiteres Nramp-Homologes, Nramp 2, isoliert, das im Gegensatz zu Nramp 1 in allen Geweben exprimiert wird. Es weist eine 78%ige Homologie zu Nramp 1 (Gruenheid et al., 1995) auf und wurde als ein Transferrin-unabhängiges Eisenaufnahme-System mit Kationentransporter-Funktion im Säugetierdarm identifiziert (Gunshin et al., 1997). Im Mäusegenom sind bekanntermaßen weitere Nramp-Loci enthalten, jedoch noch nicht isoliert worden (Dosik et al., 1994).

Die heute korrekten Bezeichnungen für die murinen Proteine lauten *Slc11a1* (für Nramp 1) und *Slc11a2* (für Nramp 2). Zur Vereinfachung wird jedoch in dieser Arbeit im Weiteren der bisher gebräuchliche Begriff Nramp verwendet.

2.3.2. Nramp 1 bei Säugetieren

Nramp 1 umfasst eine Gruppe von Membranproteinen, die durch die Evolution hoch konserviert wurden. Die Primärstruktur dieses Phosphoglykoproteins lässt auf 12 Transmembran-Domänen, zwei N-gebundene Glykosylierungsstellen und ein konserviertes Transport-Motiv schließen (Govoni et al., 1995) (Abb. 1).

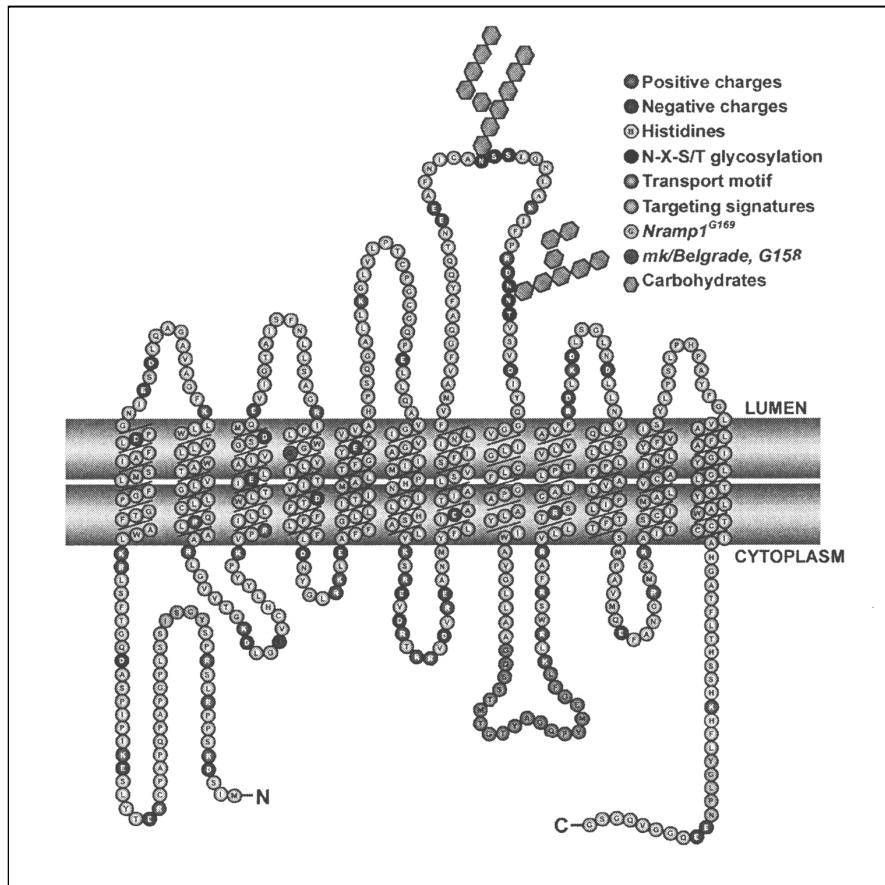


Abbildung 1 Strukturmerkmale von Nramp 1 (abgeleitet von der Primärstruktur). Nach Jabado et al. (2004)

Es ähnelt also in seiner Struktur Ionenkanälen bzw. Transportproteinen. Bei Säugetieren ist die Expression von Nramp 1 auf Makrophagen und polymorphe Zellen beschränkt und wird artspezifisch in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Durch Nramp 1 wird der Befall und die Vermehrung taxonomisch und antigenetisch unterschiedlicher Pathogene kontrolliert, so wie *Leishmania*, *Salmonella*, verschiedene Mykobakterien, *Brucella abortus*, *Pasteurella pneumotropica* und *Candida albicans* (Barthel et al., 2001; Chapes et al., 2001; Blackwell et al., 2001). Im Mäusemodell führt eine einzige Mutation in der Transmembran-Domäne Nr 4 (Gly169→Asp) zu einer Nicht-Exprimierung des Proteins und zu einer hohen Empfänglichkeit gegenüber den genannten Infektionen (Vidal et al., 1996). Diese Mutation konnte in allen daraufhin untersuchten suszeptiblen Mäuselinien nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass sie normalerweise durch natürliche Auslese ausgemerzt wird und sich nur in der

apathogene Umwelt dieser seit vielen Generationen als Versuchstiere gezüchteten Mäusepopulationen weitervererben konnte.

Nramp 1 wird im spät-endosomalen / früh-lysosomalen Kompartiment von Makrophagen exprimiert. Nach Abschluss der Phagozytose wird Nramp 1 in die Phagosomenmembran eingebaut und verbleibt dort während des Reifungsprozesses des Phagosoms zum Phagolysosom (Gruenheid et al., 1997). Hier fungiert Nramp 1 als bivalenter Kationentransporter, wobei Metallionen (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) aus dem Phagosomenlumen in das Cytoplasma ausgeschleust werden (Abbildung 2). Dieser Transport ist pH-abhängig, d.h. je höher die H^+ -Konzentration im Phagosomenlumen und damit die Ausprägung des pH-Gradienten ist, desto effizienter werden die Kationen transportiert (Jabado et al., 2000).

Noch ungeklärt ist jedoch, inwiefern dadurch das intrazelluläre Überleben und Wachstum der phagozytierten Pathogene beeinflusst wird. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass durch die Nramp 1-Aktivität den Pathogenen Metallionen entzogen werden, die sie für Stoffwechselaktivitäten und auch für die Bildung von Schutzenzymen wie Katalase, Peroxidase und Superoxid-Dismutase benötigen. Es zeigte sich, dass dadurch verschiedene Überlebensstrategien von Pathogenen im Phagolysosom (Blockierung der Phagolysosomenreifung, Blockierung der Ansäuerung) durch die Präsenz von Nramp 1 verhindert werden können (Jabado et al., 2004). Wahrscheinlich findet sogar eine Art Konkurrenzkampf um bivalente Kationen zwischen dem bakterieneigenen Nramp-Transport und dem Wirtszell-Nramp-Transport statt (Abbildung 2).

Wie Nramp das Wachstum von extrazellulären Krankheitserregern wie z.B. *Candida albicans* limitieren kann, ist noch ungeklärt. Es ist jedoch erwiesen, dass Nramp außer dem genannten Effekt an der Phagosomenmembran viele weitere Makrophagenaktivitäten stimuliert, wie z.B. die Regulierung von Interleukin- β (IL- β), Stickoxid-Synthase (inducible nitric oxide synthase, iNOS), MHC Klasse II-Molekülen, Tumor-Necrosis-Faktor α (TNF- α), „oxidative burst“ und Antigenpräsentation (Blackwell et al., 1991, 1994; Blackwell 1996, Radzioch et al. 1995, Skamene 1994, Lang et al. 1997). Die Stimulation erfolgt durch Interferon- γ (IFN- γ) und Lipopolysaccharide (LPS) (Barton et al., 1995; Barrera et

al., 1997) und könnte der Grund für eine Kontrolle nicht nur intrazellulärer, sondern auch extrazellulärer Krankheitserreger durch Nramp sein.

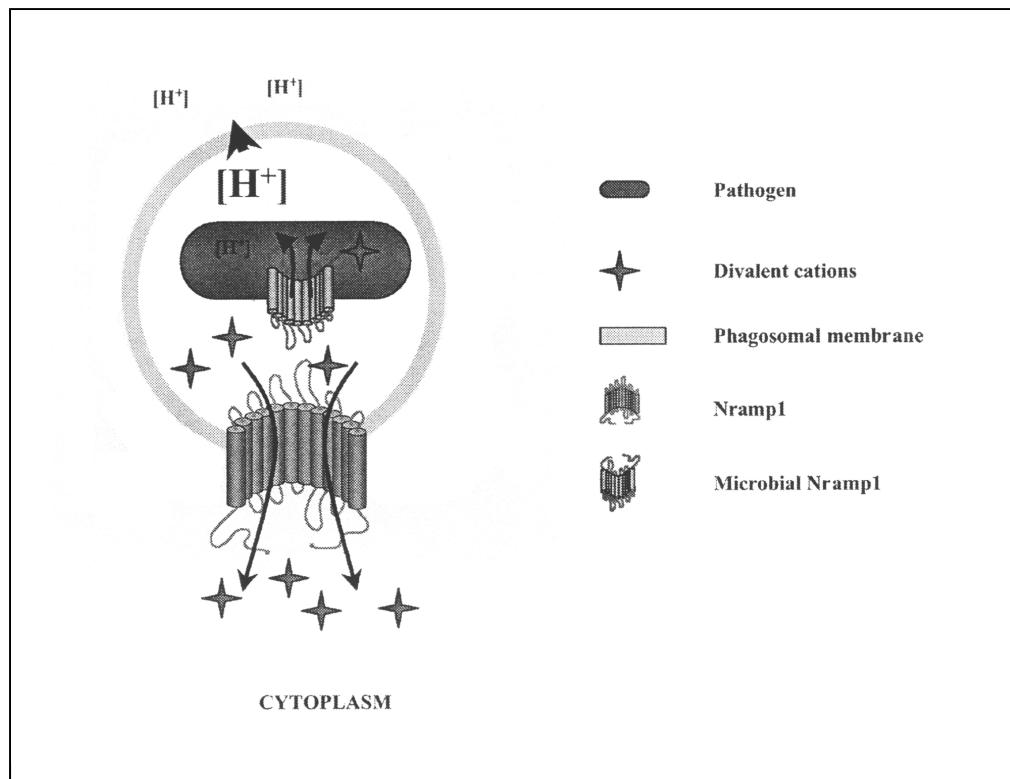


Abbildung 2 Modell für die Wirkungsweise von Nramp an der Phagosomenmembran des Phagozyten. Bivalente Metallionen werden aus dem Phagosom hinaus in das Cytoplasma transportiert. Für den dafür notwendigen pH-Gradienten könnte z.B. eine $H^+/ATPase$ sorgen. Das bakterielle Nramp-Homolog konkurriert in diesem Modell mit dem Wirtszell-Nramp um das gleiche Substrat (bivalente Kationen wie z.B. Mn^{2+} oder Fe^{2+}). Jabado et al. (2001)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar der antimikrobielle Effekt von Nramp im Säugetier zweifelsfrei erwiesen, die genauen Mechanismen dieser Wirkung jedoch noch größtenteils unbekannt sind. Insbesondere stellt sich die Frage, wie durch das Ausschleusen von bivalenten Metallionen aus dem Phagosomenlumen das intrazelluläre Wachstum einiger Pathogene unterbunden werden kann, und welche Mechanismen andere Pathogene entwickelt haben, um dieser körpereigenen Abwehr zu entgehen.

2.3.3. Nramp bei Fischen

Nramp-Homologe wurden auch in Teleosteern isoliert. Offenbar besitzen einige Spezies nur ein Homolog, so wie der Karpfen *Cyprinus carpio* (Saeij et al., 1999), der Wels *Ictalurus punctatus* (Chen et al., 2001), der Zebrabärbling *Danio rerio* (Donovan et al., 2002) und der Streifenbarsch *Morone saxatilis* (Burge et al., 2004a). Dagegen konnten in der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* (Dorschner und Phillips, 1999) und im Japanischen Kugelfisch *Takifugu rubripes* (Sibthorpe, 2002) zwei Nramp-Gene isoliert werden. Im Allgemeinen ähneln die Teleosteer-Homologen hinsichtlich Sequenz und gewebsspezifischer Expression eher Nramp 2 als Nramp 1. Dies ist eventuell ein Hinweis darauf, dass Nramp 2 ein älterer Vertreter der Nramp-Proteinfamilie ist.

Infektionsversuche *in vivo* und *in vitro* zeigten nach Exposition mit Krankheitserregern oder mit Lipopolysacchariden einen Anstieg der Expression in den Zielgeweben. Dies zeigt, dass Nramp auch hier bei bestimmten Infektionsabläufen eine Rolle spielt. So konnten Chen et al. (2004) nach Infektion von Meerbrassen (*Pagrus major*) mit *Vibrio anguillarum* eine erhöhte Expression von Nramp in Leber und Milz nachweisen. Da gerade in diesen Geweben eine exzessive Vermehrung dieses Erregers mit umfangreichen pathologischen Veränderungen einhergeht, gehen die Autoren von einer bakterieninduzierten Nramp-Expression aus. Ebenso beobachteten Burge et al. (2004a, 2004b) *in vitro* und *in vivo* eine hochregulierte Expression von MsNramp (dem Nramp-Homologen des Streifenbarsches *Morone saxatilis*) in peritonealen Exsudat-Zellen als Reaktion auf eine Exposition mit LPS und mit *Mycobacterium marinum*. Es ist also anzunehmen, dass Nramp bei Fischen, ähnlich wie bei Säugetieren, ebenfalls an der Abwehr bestimmter Pathogene beteiligt ist. Welche Pathogene das sind, ob hier die gleichen Mechanismen wie beim Säugetier zugrunde liegen, und ob es auch bei Fischen zu suszeptiblen Mutationen kommen kann, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Bei der Regenbogenforelle wurden, wie bereits erwähnt, zwei verschiedene Nramp-Homologe isoliert (Dorschner & Phillips, 1999). Der Vergleich der Nukleotidsequenzen zeigt eine 91%ige Übereinstimmung, weist aber zu viele Unter-

schiede auf, um sie als zwei Allele ein und desselben Locus zu interpretieren. Im Mittel sind die Regenbogenforellen-Proteine zu 69% identisch und zu 84% ähnlich den Säugetier-Homologen, zeigen aber auch hier eine größere Ähnlichkeit mit Nramp 2. Während OmNramp α vor allem in Pronephros und Ovar exprimiert wird, findet sich OmNramp β in allen daraufhin untersuchten Geweben (Pronephros, Milz, Leber, Herz, Muskel, Gehirn, Ovar). Die beiden Proteine zeigen also eine ähnlich gewebsspezifische Expression wie Nramp 1 und 2. Ange- sichts der hohen Expression von OmNramp α und β in den Ovarien vermuten Dasmahapatra et al. (2000) eine Beteiligung der Proteine beim Eisenstoffwechsel während der Follikulogenese und Eireifung.

2.4. Versuchsrelevante Einflüsse auf das Immunsystem bei Fischen

2.4.1. Alter

Die hämatopoetischen und immunkompetenten Organe des Fisches sind Thymus, Kopfniere und Milz. Thymus und Kopfniere fungieren hierbei als primäre lymphoide Organe. Die Milz wird als sekundäres lymphatisches Organ von T- und B-Lymphozyten besiedelt und übernimmt in diesem Sinne auch die Rolle der Lymphknoten der Säugetiere (Amlacher, 1992; Ellis, 1988). Die Reifung der lymphoiden Organe wird anhand der Anzahl der gebildeten Lymphozyten beurteilt. Diese Zellen erscheinen bei der Regenbogenforelle im Thymus ca. 3 – 5 Tage nach dem Schlupf, in der Niere nach 5 – 6 Tagen, und in der Milz nach 21 Tagen (Angaben für 14°C Wassertemperatur). Ihre funktionelle Reife ist im Thymus 5 Tage, in der Niere erst 14 Tage nach dem Schlupf nachweisbar. Das Wachstum der lymphoiden Organe ist während der ersten zwei Monate überproportional zu dem des restlichen Körpers und erreicht sein Maximum bei einem Körpergewicht von 0,5 g. Danach geht das relative Gewicht kontinuierlich zurück. Dies scheint eher abhängig von der Wachstumsrate als vom Alter der Fischbrut zu sein (Ellis, 1988).

Eine Phagozytose ist 4 Tage nach dem Schlupf nur durch Makrophagen in den Kiemen und im Bindegewebe von Haut und Darm möglich. Im Alter von 18 Tagen sind ebenfalls Makrophagen in den Kiemen, in der Niere und in geringem

Maße in der Milz und im Epikard zur Phagozytose fähig. In den folgenden Wochen verringert sich die Anzahl der Makrophagen in den Kiemen, und die Phagozytoseaktivität erfolgt mehr und mehr in Niere, Milz und im Epicard (Tatner et al., 1985).

Ein immunologische Gedächtnis und die Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern gegen T-abhängige Antigene werden erst im Alter von 8 – 10 Wochen fertig ausgebildet (Ellis, 1988).

2.4.2. Stress

Stress kann aufgrund exogener Faktoren wie suboptimaler Haltung, häufigem Handling oder Krankheitserregern entstehen, aber auch durch endogene Faktoren wie z.B. bei der Laichanbildung. Chronischer Stress bewirkt eine erhöhte Glucocorticoidausschüttung durch die Nebennierenrinde, was wiederum Einfluss auf die Expression verschiedener Immunfaktoren hat. Vor allem bei parasitären Infektionen kann bei fortgeschrittener Pathogenese häufig eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber weiteren Krankheitserregern beobachtet werden. In drehkranken Forellen weisen Verschiebungen von Blutparametern (u.a. eine erniedrigte Gesamtleukozytenzahl) auf eine erhöhte Glucocorticoidproduktion hin (Densmore et al., 1999). Holland et al. (2003) wiesen eine *in vitro*-Hemmung der LPS-induzierter Expression von IL-1 β , IL-8, TNF- α 1 und COX-2 durch Cortisol in Regenbogenforellen-Leukozyten nach. Die Autoren sehen darin einen Grund für die höhere Infektionsanfälligkeit von an PKD erkrankten Fischen.

3. Zielsetzung

Nramp hat möglicherweise einen bedeutenden Einfluss auf den Ablauf einer *Myxobolus cerebralis*-Infektion. Deshalb sollte versucht werden, die Expression von OmNramp α und β in resistenten Forellenlinien zu verschiedenen Zeitpunkten während des Infektionsverlaufes zu messen, mit derjenigen nicht-resistenter (empfänglicher) Linien zu vergleichen und so zu klären, ob (1) *M. cerebralis* überhaupt eine Expression von Nramp induziert und ob (2) diese bei den resistenten Forellen gegenüber den empfänglichen Tieren zu einem bestimmten Zeitpunkt des Infektionsverlaufes erhöht ist.

Des Weiteren sollten Polymorphismen in der Basenpaarsequenz von OmNramp α in unterschiedlich resistenten Regenbogenforellenstämmen definiert und auf mögliche Auswirkungen auf die Proteinfunktion hin untersucht werden.

Von den Ergebnissen erhofften wir uns Aufschluss über die Gene, die an der immunologischen Abwehr von *M. cerebralis* beteiligt sind und möglicherweise die Resistenz bestimmter Forellenlinien bedingen. Diesbezügliche Kenntnisse könnten beispielsweise die zukünftige Entwicklung genetischer Marker für Auswahl und Zucht resisterter Linien wesentlich erleichtern und außerdem einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Wirt-Parasit-Wechselwirkungen liefern.

4. Material und Methoden

4.1. Versuchsübersicht

Verschiedene suszeptible und nicht-suszeptible Forellenlinien wurden mit *Myxobolus cerebralis* infiziert, die Expressionshöhe von Nramp zu jeweils gleichen Zeitpunkten des Infektionsverlaufes mittels effizienz-korrigierter, quantitativer real-time-PCR gemessen und die Stämme sowohl untereinander als auch mit nicht-infizierten Kontrollgruppen-Tieren verglichen.

Dazu wurden zunächst *M. cerebralis*-Sporen aus dem Knorpelgewebe drehkranker Forellen entnommen und damit *Tubifex*-Kulturen (*Tubifex tubifex*) infiziert. Nachdem diese begonnen hatten, ausreichende Mengen an Triactinomyxon-Sporen zu bilden, wurden von jeder Fisch-Versuchslinie jeweils 20 Tiere des gleichen Alters für eine Stunde einer jeweils gleichen Anzahl von Sporen ausgesetzt. Nach dieser Exposition kamen die einzelnen Gruppen in belüftete Zulaufbecken, aus denen nach jeweils 3 Stunden, 14 Tagen und 40 Tagen von je 5 Tieren identische Gewebeproben (Haut, Muskel, Wirbelsäulen- und Kopfknorpel, Niere) für die Expressionsuntersuchung entnommen wurden.

Für diese wurde aus jeder Gewebeprobe die Gesamt-RNA extrahiert, die entsprechende cDNA synthetisiert und der Infektionserfolg mit einer *M. cerebralis*-spezifischen PCR verifiziert.

Zunächst mussten für OmNramp α und β spezifische Primer entwickelt und für die real-time-PCR optimiert werden. Dazu wurde das PCR-Amplifikat einkloniert und die daraus gewonnenen Plasmide extrahiert, enzymatisch geschnitten und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Aus dieser konnte dann über eine Standardkurve die Effizienz der real-time-PCR-Reaktion ermittelt werden. Die gemessenen Expressionshöhen von OmNramp α und β jeder Probe wurden gegen β -Actin normalisiert und die Standardabweichungen und Signifikanzen errechnet.

Für die Isolierung und Sequenzierung von OmNramp α wurde aus jeweils einem Fisch unterschiedlich resisterter Regenbogenforellenlinien die Niere entnommen und daraus die Gesamt-RNA extrahiert. Für die Amplifizierung der ORF (open reading frame) von OmNramp α wurden spezifische Primer synthetisiert und das Amplifikat in kompetente *E. coli*-Bakterien einkloniert. Nach Ex-

traktion der Plasmide konnte das Insert mit vektor- und genspezifischen Primern sequenziert, die Polymorphismen der unterschiedlichen Stämme definiert und hinsichtlich ihrer möglichen Auswirkung auf die Funktion des Proteins untersucht werden.

4.2. Material

4.2.1. Versuchstiere

Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*): Für die Expressionsversuche wurden zwei Regenbogenforellen-Stämme verwendet: Die hoch empfängliche amerikanische Zuchlinie TL (als Eier im Augenpunktstadium direkt aus den U.S.A. bezogen) und der äußerst resistente deutsche Wildstamm WT. Jungtiere des Letzteren wurden einer Population in einem Naturgewässer im Schwarzwald entnommen, in der Klinik für Fische und Reptilien der LMU München bis zur Laichreife gehältert und dann abgestreift. Die Hälterung selbst erfolgte in durchströmten (0,8L/min) und belüfteten 100L-Tonnen bei einer Temperatur von $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Gefüttert wurde mit handelsüblichem Fertigfutter.

Für die Isolierung und Sequenzierung des OmNramp α wurden Tiere des resistenten Regenbogenforellenstammes (HO) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Linie, die seit etwa 150 Jahren in Deutschland gezüchtet wird und, wohl aufgrund der langen Kontaktzeit mit dem Parasiten, eine erhöhte Resistenz gegenüber *M. cerebralis* zeigt. Die Eier dieses Stammes wurden im Augenpunktstadium aus einer Fischzucht bezogen.

Bachforellen (*Salmo trutta fario*): Die Eier dieser Spezies wurden ebenfalls im Augenpunktstadium aus einer Fischzucht bei München bezogen. Die Brut wurde bis zum Alter von 54 Tagen unter SPF (Specific pathogenic free)-Bedingungen in Brutrinnen in der Klinik für Fische und Reptilien aufgezogen, im Durchfluss mit Münchener Leitungswasser bei $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ gehältert und mit handelsüblichem Fertigfutter aufgezogen (eine Aufstellung des verwendeten Fischmaterials findet sich in Tabelle 1). Nach den Expositionsversuchen wurden

die Fische in belüftete 50L-Becken umgesetzt, wo sie bei ca. 15°C und einem Durchfluss von 1 – 1,5L/min für ca. 6 Wochen bis zum Abschluss der Probenahmen verblieben.

Forellenlinie	Schlupfdatum	Mittleres Gewicht (in g)	Tagesgradalter (in T°)*	TAM-Dosis pro Fisch
WF (Wildforelle)	18.05.2006	0,58	810	5000
TL (am. Zuchtlinie)	31.05.2006	0,60	810	5000
BF (Bachforelle)	18.12.2005	0,55	810	5000
HO (dt. Zuchtlinie)	15.01.2006	-	-	-

* Lebensalter x Wassertemperatur (im Monatsmittel berechnet)

Tabelle 1 Übersicht über Fischmaterial und Expositionsversuch

4.2.2. Tubifex und Triactinomyxon-Sporen

Der Lebenszyklus von *Myxobolus cerebralis* wird in unserem Labor unter kontrollierten Bedingungen vollständig nachvollzogen. Dazu werden *Tubifex*-Kulturen in Plastikboxen von 9L Wasservolumen in einem Brutschrank bei 14°C auf einem 3cm hohen Sand- und Schlammgrund gehältert. Das Wasser wird über Kieselgurausströmer mit Luftsauerstoff angereichert und zweimal in der Woche gewechselt.

Die Oligochäten werden 1-2 mal mit extrahierten *Myxobolus*-Sporen infiziert und beginnen ca. 3 - 4 Monate später mit der Produktion der Triactinomyxon-sporen. Diese werden mit Filtergaze (Porengröße 20µm) aus dem überständigen Wasser abfiltriert und damit anschließend die Regenbogenforellen-Brütlinge aus SPF-Beständen infiziert, aus deren Knorpelgewebe (Kopf und Wirbelsäule) dann später die *Myxobolus*-Sporen gewonnen werden. Dazu wird das Knorpelgewebe manuell entfleischt, mit einem kleinen, küchenüblichen Mixer ca. 10min homogenisiert und durch Gaze filtriert, um grobes Restgewebe zu entfernen. Unter dem Mikroskop wird der Sporentiter des filtrierten Homogenats

bestimmt und dann eine Homogenatmenge mit ca. 1 Million Sporen in jedes *Tubifex*-Becken gegeben. Um eine optimale Infektion zu gewährleisten, wird jedes dieser Becken nach der Sporenzugabe nur vorsichtig auf zwei Drittel seines Volumens mit Wasser aufgefüllt und in den ersten beiden Wochen nur der Verdunstungsverlust ersetzt. Erst nach dieser Zeit wird das Wasser erstmals gewechselt.

4.2.3. verwendete Geräte

Gerät	Hersteller bzw. Lieferant
Thermocycler (Mastercycler Gradient)	Eppendorf, Hamburg
Real time Gerät (MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System)	BioRad, München
Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417R)	BioRad, München
Elektrophoresekammer (Sub-Cell® GT) mit Spannungsgerät (Power Pac 300)	BioRad, München
Gel-Dokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Mikrowelle (MW 7801G)	MTC Medion, Mülheim/Ruhr
UV/Vis-Spektrophotometer (BioPhotometer)	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer (Ikamag® Reo)	Bachofer, Reutlingen
pH-Meter (MultiLab P5)	WTW GmbH, Weilheim
temperaturgeregeltes Wasserbad	Memmert, Schwabach
Schüttler	Heidolph, Schwabach
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Sterilbänke (HeraSafe HS12)	Heraeus Kulzer, Hanau
Autoklav (Varioklav® Dampfsterilisator)	H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Tabelle 2 Geräte zur Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen

4.2.4. verwendete Kits

Kit	Hersteller bzw. Lieferant
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
pGEM®-T Vector System I	Promega, Madison, WI, U.S.A.
FastPlasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Miniprep®-Kit	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Kits

4.3. Methoden

4.3.1. Expositionsversuch

Die Fischbrütlinge wurden im Alter von 810 T° Tagen infiziert (Tabelle 1). Obwohl für die Probenentnahme nur 15 Fische je Stamm erforderlich waren, wurden jeweils 20 Brütlinge infiziert, um eventuelle Verluste zu kompensieren. Zur Gewinnung der Triactinomyxon-Sporen für den Expositionsversuch wurde das überstehende Wasser eines *Tubifex*-Beckens wie in 4.2.2 beschrieben durch Filtergaze filtriert und die Sporen in ca. 100mL konzentriert. Nach der Titerbestimmung in einer 50µL-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde diese Sporensuspension in Portionen von jeweils ca. 1×10^5 Sporen aufgeteilt und in 1L-Becken vorsichtig mit Wasser aufgefüllt. In jedes Becken kamen je 20 Forellenbrütlinge eines jeden Stammes (ergab eine Expositions-dosis von ca. 5000 Sporen pro Fisch) und wurden für eine halbe Stunde darin belassen. Wegen der hohen mechanischen Störanfälligkeit des Infektionsvor-gangs wurde erst nach einer halben Stunde mit der Belüftung und Frischwas-serzufuhr begonnen und die Fische nach Ablauf einer weiteren halben Stunde bis zum Versuchsende in die vorbereiteten 50L- Becken gesetzt. Bei den Kon-

trollgruppen wurden in derselben Weise vorgegangen, jedoch enthielt deren Wasser keine Sporen.

4.3.2. Probennahme

Die Probennahmen erfolgten jeweils 3 Stunden, 14 Tage und 40 Tage nach der Sporen-Exposition. Zu diesen Zeitpunkten wurden jeweils 5 Fische einer jeden Gruppe, homogen in Größe und Gewicht, mit einer Überdosis MS 222[®] (5g/L) getötet und folgendermaßen präpariert: Auf Höhe des hinteren Augenrandes wurde ein Vertikalschnitt durch das Cranium bis auf Höhe des Seitenlinienorgans, ein zweiter Schnitt entlang der Seitenlinie bis auf die Höhe des Afters geführt und dabei alle inneren Organe (außer der Niere) und die Bauchlappen entfernt. Vor der Afterflosse wurde dann das so gewonnene Probenmaterial vom restlichen Gewebe abgetrennt (Abbildung 3).

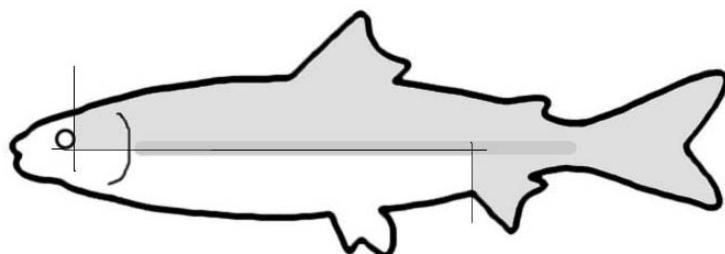


Abbildung 3 Schema zur Probennahme für die quantitative Expressionsanalyse. Die dünnen Linien bezeichnen die Schnitte durch den Fischkörper. Die grau schraffierten Gewebe wurden für die RNA-Extraktion verwendet.

Die so präparierten Proben wurden in 10mL-Plastikröhren mit dem zehnfachen Volumen RNAlater[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Für die Isolierung und Sequenzierung von OmNramp α wurden von je einem nichtinfizierten Fisch der Stämme HO, TL und WT die Niere entnommen und ebenfalls für die RNA-Extraktion aufbewahrt.

4.3.3. RNA-Extraktion

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Gewebeproben mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert, 30mg des Materials mit dem *RNEasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers weiterverarbeitet und zur Vermeidung einer DNA-Kontamination mit DNase I (Qiagen, Hilden) behandelt. Die aufgereinigte RNA wurde in 40µL RNase-freiem Wasser eluiert, Menge sowie Reinheit spektrophotometrisch bei 260 bzw. 280nm gemessen (4.3.4) und anschließend mit 1,5µL RNase-Inhibitor versetzt, um eine Lysis durch RNAsen zu verhindern. Die Aufbewahrung erfolgte in Aliquots von 1µg bei -80 °C.

4.3.4. Spektrophotometrie

Die RNA- und cDNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der optischen Dichte der verdünnten Probe ($OD_{260\text{nm}}$) und einem jeweils für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Eine Aussage über die Reinheit der Probe erhält man aus dem Verhältnis $OD_{260\text{nm}} / OD_{280\text{nm}}$.

4.3.5. cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde das *iScriptTM cDNA Synthesis Kit* der Firma Bio-Rad (München) benutzt. Dabei wurde jeweils 1µg Gesamt-RNA in einem Endvolumen von 20µL mit Hilfe einer reversen Transkriptase in first strand-cDNA gemäß den Anweisungen des Herstellers umgeschrieben. Die daraus resultierende einsträngige cDNA wurde in Mengen von 1µL aliquotiert, mit 9µL ddH₂O auf ein Volumen von 10µL aufgefüllt, und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die cDNA-Synthese zur Sequenzierung von OmNramp α wurde aufgrund der Länge der zu amplifizierenden Sequenz die *Avian Reverse Transcriptase (eAMVTM RT, Sigma)* gewählt.

Der erste Ansatz (insgesamt 10 μ L) bestand aus:

- 2 μ L dNTP-Mix (Gemisch aus jeweils 10mmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1 μ L Oligo-dT-Primer (Gemisch mit insgesamt 37,5 μ mol)
- 2 μ g Gesamt-RNA
- X μ L ddH₂O

Zwischenvolumen: 10 μ L

Dieser erste Reaktionsansatz wurde für 10min bei 70 °C inkubiert.

Dann wurden hinzugefügt:

- 1 μ L eAMVTM RT
- 2 μ L Puffer für eAMVTM RT (Sigma)
- 7 μ L ddH₂O

Endvolumen: 20 μ L

Es folgte eine weitere 50minütige Inkubation bei 50 °C, nach der die so synthetisierte cDNA sofort in die PCR überführt wurde.

4.3.6. Oligonukleotide und Optimierung

Die Parameter der PCRs wurden so optimiert, dass bei maximaler Spezifität eine möglichst hohe Effizienz der Amplifikation bzw. Signalbildung erreicht wurde.

Der erste Schritt dieser Strategie bestand in der Wahl geeigneter Primerpaare, wobei folgende Kriterien berücksichtigt wurden:

- Länge: 17-28 Basen
- GC-Gehalt: 40-60%
- G oder C am 3'-Ende
- nicht mehr als 3 C- bzw. G-Basen am 3'-Ende
- Möglichst eng beieinander liegende Annealingtemperaturen (T_a)
- Amplikonlänge: nicht mehr als 250bp
- keine selbst- oder paarweise komplementären Sequenzen

Die Primer zur Amplifikation von cDNA zum Transkriptnachweis sollten außerdem in verschiedenen Exonen des betreffenden Gens lokalisiert sein, damit ein fälschlicherweise direkt aus genomischer DNA amplifiziertes Fragment anhand seiner größeren Länge identifiziert werden kann. Für deren Design wurde das Programm *Oligo 5.0* (National Biosciences, Plymouth) zu Hilfe genommen.

Der nächste Schritt bestand in der Optimierung der Mg^{2+} -Konzentration, in dem Effizienz und Spezifität der Produktbildung des gewählten Primerpaars unter verschiedenen Magnesiumionen-Konzentrationen miteinander verglichen wurden. Schließlich wurde im letzten Schritt die Idealtemperatur für die Hybridisierung der Primer ermittelt.

In den Proben aus der Bachforelle wurden mit den Regenbogenforellen-spezifischen OmNramp („*Oncorhynchus mykiss* Nramp“) α - und OmNramp β -Primern ebenfalls zwei Nramp-Homologe detektiert. Der Einfachheit halber werden diese Bachforellen-Homologen im Folgenden in die Bezeichnungen „OmNramp α “ und „OmNramp β “ mit eingeschlossen.

Zur Amplifizierung von forellenspezifischem β -Actin wurden die Primer nach einem Vorschlag von Sigh et al. (2004) verwendet (Tabelle 4), die Detektion von *M. cerebralis*-Nukleinsäuren in den infizierten Proben wurde anhand der *single-round-PCR* nach Andree et al. (1998) durchgeführt (Tabelle 6). Zur Amplifizierung der kompletten ORF von OmNramp α wurde ein Primerpaar gewählt, das diese Zielsequenz umschloss.

In den nachfolgenden Tabellen 4, 5 und 6 sind alle Zielsequenzen mit darauf verwendeten Primern wie auch die gewählten PCR-Programme für Thermo- und real-time-Cycler aufgeführt. Die Primer selbst wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert. Die Genbank-Einträge bezeichnen die Zugriffsnummern auf die Datenbankeinträge (accession number) der Sequenzen in der Gen-Datenbank *Nucleotide* des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/):

Zielsequenz	Länge	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Genbank
Real time PCR:				
β-Actin	260bp	Bact – F Bact – R	ATGGAAGGTGAAATGCC TGCCAGATCTTCTCCATG	AF157514
OmNramp α	230bp	OmNramp α F OmNramp α R	TTCTTCTCACCCGCTCCATCG CACAGACCACCAGGATGACCA	AF048760
OmNramp β	244bp	OmNramp β F OmNramp β R	GACTTGCTAATGGACTGGTG TTGTTGCTTACCTGTTGCC	AF048761
Detektion von M. cerebralis:				
18S rDNA	415bp	Tr5-17 Tr3-17	GCCCTATTAACCTAGTTGGTAGTATAGAAC U96492 GGCACACTACTCCAACACTGAATTG	
Sequenzierung von OmNramp α:				
OmNramp α (ORF)	1851	Compl_nrampa F Compl_nrampa R	CTAATGAAGACAGCGCGGGGA ATGAGGATGGGCACTTACGA	AF048760
Insert im pGEM®-T- Vektor		GATC-pUC/M13F GATC-pUC/M13R	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC TCACACAGGAAACAGCTATGAC	
OmNramp α (691-1348)		Nrampa_691F Nrampa_1348R	TGAGTATGTGATGGTACGTC GTTGAGGAAGTCGTTCATGC	AF048760

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Ziel-Gen	Denature	Anneal	Elongate	Extension	Cycle-Anzahl
β-Actin	95 °C/3min	-	-	-	1
	94 °C/45s	-	-	-	35
	-	58 °C/45s	-	-	
	-	-	72 °C/45s	-	
OmNramp α	95 °C/3min	-	-	-	1
	95 °C/30s	-	-	-	40
	-	68,5 °C/20s	-	-	
	-	-	72 °C/20s	-	
OmNramp β	95 °C/3min	-	-	-	1
	95 °C/30s	-	-	-	40
	-	64,6 °C/20s	-	-	
	-	-	72 °C/20s	-	

Tabelle 5 Übersicht über die Programme für die real time PCR

Ziel-Gen	Denature	Anneal	Elongate	Extension	Cycle-Anzahl
18S rDNA of					
M. cerebralis	95 °C/5min	-	-	-	1
	95 °C/1min	-	-	-	35
	-	65 °C/2.5min	-	-	
	-	-	72 °C/1.5min	-	
	-	-	-	72 °C/10min	1
OmNramp α					
(ORF)	94 °C/5min	-	-	-	1
	95 °C/1min	-	-	-	30
	-	55 °C/1min	-	-	
	-	-	72 °C/2min	-	
	-	-	-	72 °C/10min	1

Tabelle 6 Übersicht über die Programme für den Thermocycler

4.4. Quantitative real-time-PCR

4.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist ein von Mullis et al. (1986) beschriebenes Verfahren zur Vermehrung ausgewählter DNS-Stücke in einem Nukleinsäuregemisch. Sollen mit diesem Verfahren bestimmte RNA-Sequenzen vermehrt werden, so müssen diese erst mithilfe einer reversen Transkriptase in die entsprechende cDNS umgeschrieben werden.

Bei erhöhter Temperatur (ca. 95°C) trennen sich die beiden komplementären Einzelstränge voneinander, die DNS denaturiert („schmilzt“). Bei wieder erniedrigter Temperatur (ca. 55°C) können sich jetzt die zugefügten Primer komplementär an die Einzelstränge binden (Hybridisierung). Bei jetzt wieder (auf 72°C) erhöhter Temperatur beginnt die (hitzestabile) DNS-Polymerase, weitere komplementäre Nukleotide an das jeweilige 3'-Ende der gebundenen Primer anzubauen, wodurch diese verlängert werden und je eine komplementäre Kopie der DNS-Sequenz bilden. Jede Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelt die Anzahl der kopierten DNS-Moleküle, sodass man z.B. bei 20fachem Durchlauf dieses Zyklus von einem DNS-Molekül etwa eine Million Kopien erhält. Weil man diese beispielsweise durch Gelelektrophorese von weiteren vorhandenen DNS-Molekülen abtrennen, sichtbar machen und auch mengenmäßig bestimmen kann, lässt sich die PCR in vielfacher Weise nutzen, z.B. zur Erkennung charakteristischer Sequenzen im Genom von Bakterien und Viren oder, wie in der vorliegenden Arbeit, zum Nachweis von Genaktivitäten.

4.4.2. Real time-PCR

Bei dieser abgewandelten Form der PCR wird nicht das Endprodukt, sondern die Entstehung des Produktes analysiert. Dies geschieht durch den Einsatz eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR Green I), der sich an doppelsträngige DNA bindet und dann bei Anregung mit Licht von etwa 520nm Wellenlänge grün fluoresziert. Dieses Fluoreszenzsignal verstärkt sich mit jedem Verdoppelungszyklus und korreliert daher direkt mit der Menge des amplifizier-

ten Produktes. Die Lichtemission selbst ist allerdings unspezifisch, das heißt, sie erlaubt keine Differenzierung zwischen unterschiedlichen PCR-Produkten. Allerdings kann nach Abschluss der Amplifizierung eine *Schmelzkurvenanalyse* durchgeführt werden: Bei kontrollierter Temperaturerhöhung trennen sich die Doppelstränge der Fragmente, abhängig von der Länge, in Einzelstränge auf, sie „schmelzen“, wobei der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt wird. Eine Analyse der allmählichen Fluoreszenzabnahme erlaubt es dann, zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten bzw. Primerdimeren zu differenzieren.

4.4.3. Standardkurven und Effizienz

Nur die mittlere exponentielle und damit quantifizierbare Phase der PCR ist mess- und auswertbar. Verglichen werden die Fluoreszenzen der Proben anhand des *Threshold Cycles* (Ct-Wert oder CP = Crossing Point), der am Anfang der exponentiellen Phase der PCR steht und den Wert beschreibt, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßern die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA.

Zur Korrektur der Quantifizierung ist die Berechnung der Effizienz einer PCR-Reaktion notwendig, was am einfachsten über die Erstellung einer Standardkurve möglich ist. Dabei steht die eingesetzte DNA-Menge in linearer, umgekehrt proportionaler Beziehung zum CP. Mit der Formel $E=10^{[-1/\text{Steigung}]}$ lässt sich aus der Steigung der Kurve die Effizienz berechnen.

Erstellung der Standardkurven

Herstellung von Plasmid-DNA

Methodik: Um eine ausreichende Amplifikatmenge für die Erstellung einer real-time-PCR-Standardkurve zu erhalten, wurden die PCR-Produkte über einen rekombinanten Vektor in kompetente Bakterien einkloniert. Die Kultivierung erfolgte auf Agarplatten, die Ampicillin, das noch farblose X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid) und den Expressionsinduktor für das lac-Ope-

ron IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) enthielten. Der verwendete Vektor trägt das lacZ-Gen und ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Aufgrund des Ampicillin-Zusatzes in den Nährböden können deshalb nur Bakterien mit ursprünglichem oder neu-rekombiniertem Plasmid auf den Platten wachsen.

Das lacZ-Gen des Vektors bewirkt eine Wiederherstellung der enzymatischen Funktion von β -Galaktosidase, welches das farblose X-Gal in ein blaues Produkt umwandelt. Blaue Kolonien signalisieren somit die Aufnahme des ursprünglichen, nicht-ligierten Vektors. Erfolgt jedoch eine Rekombination des Plasmids mit dem Amplifikat, so wird das lacZ-Gen zerstört und damit funktionsunfähig – die Kolonien erscheinen weiß.

Vorbereitung der Nährböden und –medien: Zum Ausstreichen und Differenzieren der transformierten Bakterien wurden LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agarplatten verwendet. Für die Herstellung eines 200mL-Ansatzes zum Gießen der Platten wurden 8g LB-Agar-Pulver (Genaxxon, Biberach) in 150mL dH₂O eingerührt und mit verd. NaOH-Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Dann wurden die restlichen 50mL dH₂O dazugegeben und das Gemisch in einem Schnellkochtopf autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C und Zugabe von Ampicillin wurde soviel Agar in die Petrischalen gegossen, dass der Boden mit einer 3 - 4mm hohen Schicht bedeckt war. Auf diese (abgekühlten) LB/Amp-Platten wurde dann verdünnte IPTG-Lösung gegeben und sofort mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels gleichmäßig verteilt. Ebenso wurde mit mit X-Gal-Lösung verfahren. Die fertigen Platten wurden mit dem Deckel nach unten getrocknet und bis zum Ausplattieren der Zellen bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Für das Nährmedium wurden 2,5g LB-Medium-Pulver (Genaxxon, Biberach) abgewogen und in 50mL dH₂O eingerührt. Der Ansatz wurde mit verd. NaOH-Lösung auf pH 7,5 eingestellt, mit dH₂O auf 100mL aufgefüllt, autoklaviert und ebenfalls im Kühlschrank aufbewahrt.

Aufreinigung der PCR-Produkte: Die PCR mit cDNA aus Regenbogenforellen-Nieren wurde mit den OmNramp α - und OmNramp β -Primern durchgeführt. Die jeweils 50 μ L Reaktionsgemisch setzten sich folgendermaßen zusammen:

-
- 46 μ L 1.1x *ReddyMix PCR Master Mix* (Abgene, Hamburg) mit folgenden Einzelkomponenten: 75mmol Tris-HCl (pH 8,8), 20mmol (NH₄)₂SO₄, 1,5 mmol MgCl₂, 0,01% (v/v) *Tween20*, jeweils 0,2mmol von dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1,25U *Taq DNA Polymerase* und roter Farbstoff für die Elektrophorese
 - 2 μ L template cDNA
 - 2 μ L Forward- und Reverse-Primer (Verdünnung: 50pmol/ μ L)

Das PCR-Produkt wurde mit dem *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und danach sofort auf Eis gestellt.

Klonieren: Die Amplifikate wurden direkt in den *pGEM[®]-T-Vektor* mittels des *pGEM[®]-T Vector Systems* (Promega, Madison, WI, U.S.A.) ligiert. Dazu wurden 3 μ L der beiden aufgereinigten PCR-Produkte mit Ligationspuffer, T4 DNA-Ligase und *pGEM[®]-T-Vektor* gemischt und für 1h auf Eis inkubiert. 50 μ L *Escherichia coli JM109 High Efficiency Competent Cells* wurden entsprechend den Herstelleranweisungen mit dem Ligase-Reaktionsgemisch transformiert und unter Zugabe von LB-Nährmedium 1,5h auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Danach wurden jeweils 100 μ L der transformierten Kulturen mit einem sterilen Drigalski-Spatel auf je einer der vorbereiteten LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Selektion von transformierten Klonen: Zunächst wurden sterile Gläserchen mit je 10mL des autoklaviertem LB-Nährmediums beschickt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden dann von jeder Platte 3 weiße Kolonien abgenommen, mitsamt der Pipettenspitze einzeln in die Röhrchen gegeben und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Extraktion der Plasmide: Nach spektrophotometrischer Kontrolle des Bakterientiters (Messung bei OD₆₀₀) wurden die Plasmide mit dem *FastPlasmid Mini Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers aus 1,5mL Bakteriensuspension extrahiert und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Kontrolle, Schneiden und Aufreinigen der Inserts: Zur Kontrolle der Identität der Inserts (in den Plasmiden) wurden diese für eine PCR vorbereitet. Hierfür mussten zunächst die noch ringförmigen Vektor-DNS-Moleküle mit einer passenden Restriktionsendonuclease außerhalb der Inserts geschnitten (linearisiert) und dann aufgereinigt werden:

Ein entsprechender 10µL-Enzymansatz war zusammengesetzt aus:

- 1µL Puffer (BioLabs, New England, U.S.A.),
- 1µg (= 2,13µL) Plasmid,
- 0,15µL *Sca I* (BioLabs, New England, U.S.A.) und
- 6,72µL ddH₂O

Dieser Ansatz wurde für 2h bei 37°C und nachfolgend bei 80 °C 20min inkubiert. Die jetzt geschnittene, in linearer Form vorliegende DNA wurde anschließend mit dem *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt und die Konzentration spektrophotometrisch gemessen.

Verdünnungsreihe

Vom Gen für β-Actin, welches als Referenzgen zur Normalisierung der Proben herangezogen wurde, waren in 1µL cDNA genügend Kopien enthalten, um damit eine fünfstufige, logarithmische Verdünnungsreihe erstellen zu können. Die Konzentration der cDNA an den anderen beiden Genen (für OmNramp α und OmNramp β) reichten jedoch für eine solche Verdünnungsreihe nicht aus. Deshalb mussten von diesen, wie oben beschrieben, erst Amplifikate kloniert werden.

Für die Verdünnungsreihen selbst wurde jeweils von 0,1µg Plasmid- bzw. cDNA in 100µL ddH₂O ausgegangen ($c = 0,01\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) und daraus in aufeinanderfolgenden 1:10 (=1+9)-Verdünnungsschritten Reihen mit logarithmisch abnehmenden Konzentrationen von 10^{-3} bzw. 10^{-4} bis $10^{-9}\ \mu\text{g}/10\mu\text{L}$ erstellt.

Wichtigste Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus der real-time-PCR sind jeweils gleiche Konzentrationen von Primern, dNTPs und Enzymen in den einzelnen Reaktionsansätzen. Da es hier selbst bei sorgfältigstem

Pipettieren sehr leicht zu Ungenauigkeiten kommt, wurde für jede PCR ein *MasterMix* aus handelsüblichem Premix (*iQ™ SYBR Green Supermix*, BioRad, München) und Primern hergestellt, der dann auf 0,5µL-Tubes verteilt und darin mit der verdünnten DNA vermischt wurde. Für die Erstellung der Standardkurven wurde von jeder Verdünnungsstufe ein Triplikat in 96-well-Platten pipettiert.

Die 25µL-Reaktionsansätze enthielten jeweils:

- 12,5µL *iQ™ SYBR Green Supermix*,
- 1,25µL von jeweils Forward und Reverse Primer (auf 20pmol/µL verdünnt)
- 10µL der verdünnten DNA.

Ein Ansatz mit reinem ddH₂O an Stelle verdünnter DNA diente jeweils als Negativkontrolle.

In dieser Weise wurde für alle drei Zielgene (für OmNramp α, OmNramp β und β-Actin) verfahren; Die jeweiligen PCR-Programme sind Tab. 4 zu entnehmen. Visualisiert wurde der Verlauf der real-time-PCR mit *iCycler iQ Real Time Detection System Software* (BioRad, München).

4.4.4. Detektion der Genexpression

Die quantitative Expression von OmNramp α, OmNramp β und β-Actin, das später zur Normalisierung der beiden Zielgene diente, wurde mittels real time-PCR detektiert. Die Reaktionsansätze für die Genexpressionsanalyse der aufbereiteten Proben wurden, wie bereits oben beschrieben, hergestellt. Allerdings wurde hier für jede Probe statt drei (Triplikat) nur zwei (Duplikat) Ansätze pipettiert. Als Kontrolle für den korrekten Ablauf der Reaktion dienten jeweils zwei Standardverdünnungen.

4.4.5. Effizienz-korrigierte, relative Quantifizierung

Die Menge eines Zielgenes lässt sich in der real time PCR absolut oder relativ quantifizieren. Bei der absoluten Quantifizierung wird aus einer Verdünnungsreihe, bestehend aus exakt bekannten Zielgen-Kopieanzahlen, eine Kalibrierkurve erstellt. Damit können die absoluten Startkopienzahlen oder –konzentra-

tionen bestimmt werden. Nachteilig bei dieser Methode sind der zeitliche und apparative Aufwand und die hohen Anforderungen an die Standardisierung der einzelnen Arbeitsschritte. Die relative Quantifizierung ist im Gegensatz dazu einfach durchzuführen und liefert – bei richtiger Vorgehensweise – sehr genaue Ergebnisse. Hierbei wird die Zielgen-Expression auf ein oder mehrere weitere, sog. „Housekeeping Gene (HKG)“ bezogen. Da die Gesamtanalyse auf dem Signal des HKG basiert, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt bei der real-time-Analyse. Sie hängt unter anderem von der Art des Experiments und dem zu untersuchenden Material ab. Die Expression sollte möglichst unabhängig von äußeren Einflüssen (Temperatur, Pathogene, Medikamentengabe) als auch von Alter oder Zellzyklus sein. Als HKG wurde in dieser Studie β -Actin gewählt.

Der Vorteil der beschriebenen relativen Quantifizierung liegt darin, dass schwer standardisierbare Effekte (Gewebseffekte, Qualität der RNA, Effizienz der reversen Transkription) Zielgen und HKG in gleicher Weise betreffen und somit kompensiert werden. Noch genauer wird die Analyse, wenn man die Effizienzen der einzelnen PCRs in die Normalisierung mit einrechnet.

Die Normalisierung gegen β -Actin und die Einrechnung der Effizienz basieren auf den Berechnungen von Vandesompele et al. (2002). Die jeweilige Standardabweichung wurde mit Hilfe der entsprechenden Funktion des Microsoft Office-Programms Excel[®], signifikante Abweichungen der infizierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit Hilfe eines Mann-Whitney *U*-Tests ($P < 0,05$) ermittelt.

4.5. Isolierung und Sequenzierung von OmNramp α

Die ORF von OmNramp α wurde mittels spezifischer Primer isoliert und direkt aus dem PCR-Produkt über den *pGEM-T-Vektor* in kompetente *E. coli*-Bakterien einkloniert (siehe oben). Die Plasmid-DNA wurde mit dem *Miniprep[®]*-Kit (Eppendorf, Hamburg) extrahiert und deren Konzentration spek-

trophotometrisch bei 260nm gemessen. Von jedem PCR-Produkt wurden drei Klone folgendermaßen (von GATC Biotech AG, Konstanz) sequenziert: Für die Sequenzierung der 3'- und 5'-Enden wurden vektorspezifische Primer verwendet und die Sequenzen der Mittelstücke mit zwei weiteren genspezifischen Primern ermittelt (Tabelle 4). Für einen direkten Vergleich wurden die einzelnen sequenzierten Fragmente wieder zusammengesetzt und miteinander sowie mit der publizierten OmNramp α -Sequenz aus der Gendatenbank verglichen (Acc. No. AF048760).

5. Ergebnisse

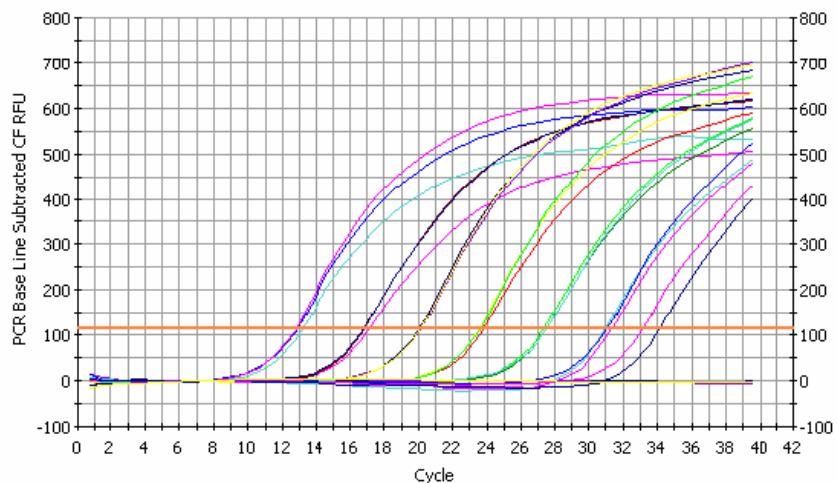
5.1. Verifizierung der Infektion der Forellenbrütlinge

Bei der Visualisierung der PCR-Produkte der cDNA-Proben wurde in jeder Probe ein 415bp-Produkt detektiert.

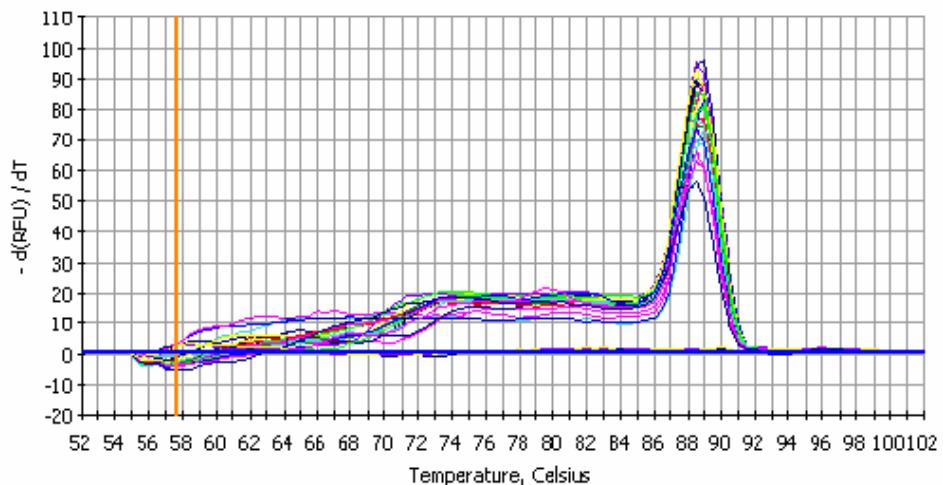
5.2. Effizienz und Spezifität der *real-time-PCR*

Die Effektivität der Reaktionen wurde aus den Steigungen der entsprechenden Standardkurven ermittelt. Für die Negativkontrollen wurde ddH₂O an Stelle eines cDNA-Templates eingesetzt und damit in keinem Fall ein Signal erhalten. Die Spezifität wurde anhand einer Schmelzkurve ermittelt (Abbildungen 4, 5, 6).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3



B. Melt Curve Graph for SYBR-490



C. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3

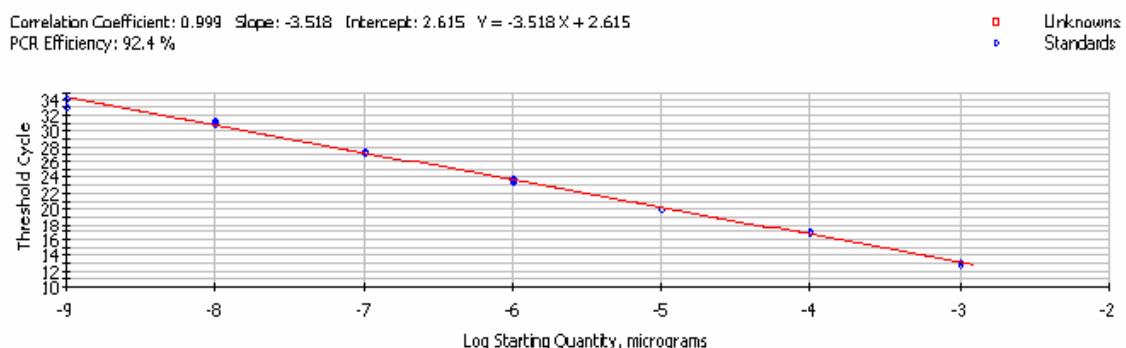
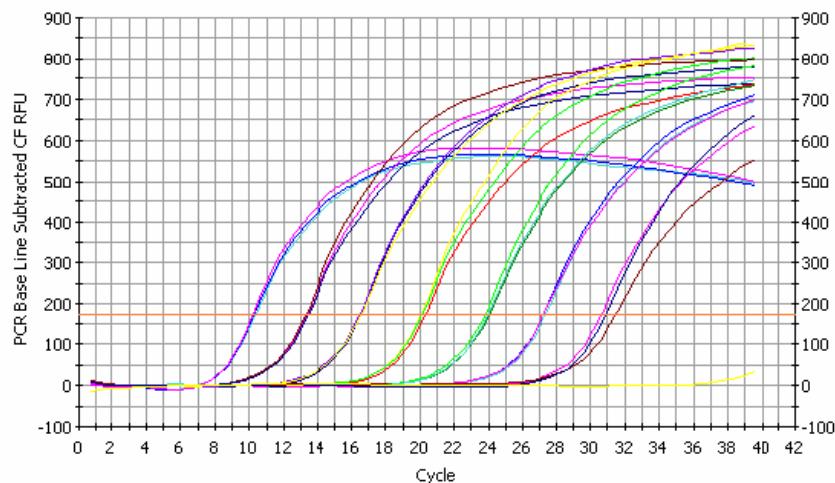
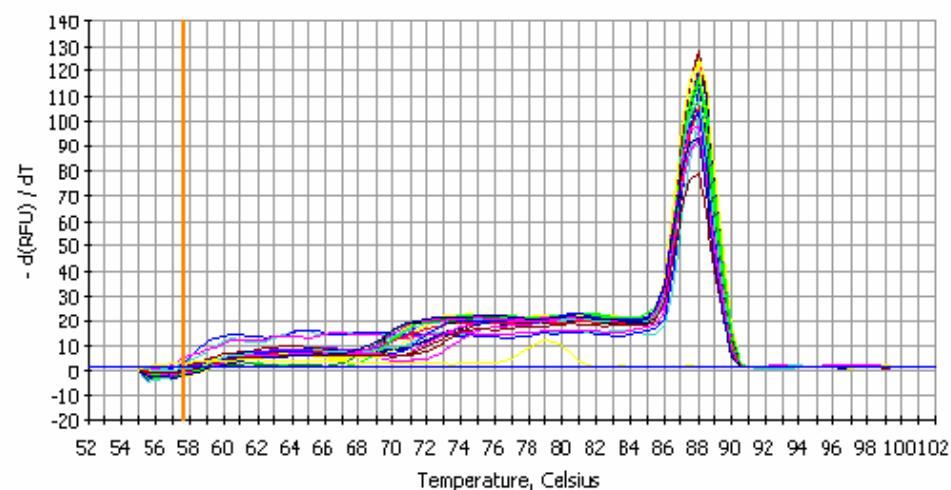


Abbildung 4 OmNramp a: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-\frac{d(RFU)}{dT}$; x-Achse: Temperatur (°C)). C. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: log der Startmenge (μ g)).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3



B. Melt Curve Graph for SYBR-490



C. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3

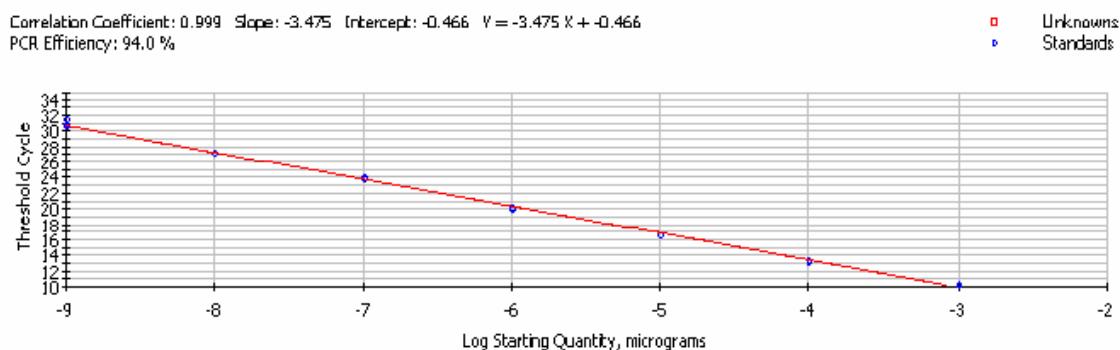
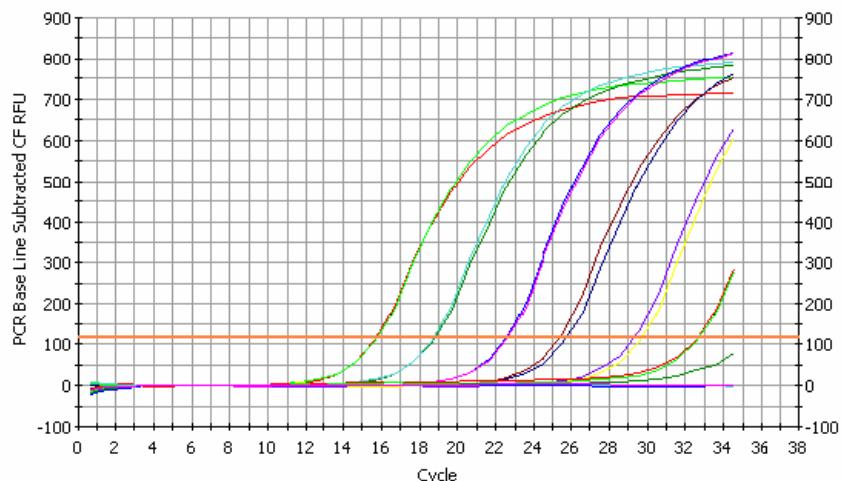
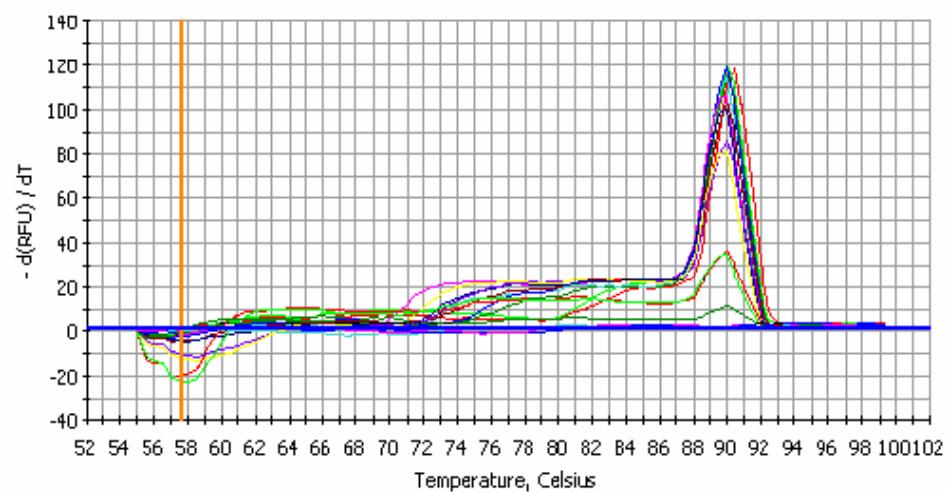


Abbildung 5 OmNramp 3: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-\frac{d(RFU)}{dT}$; x-Achse: Temperatur (°C)). C. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: log der Startmenge (μg)).

A. PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490 Step 3



B. Melt Curve Graph for SYBR-490



C. Standard Curve Graph for SYBR-490 Step 3

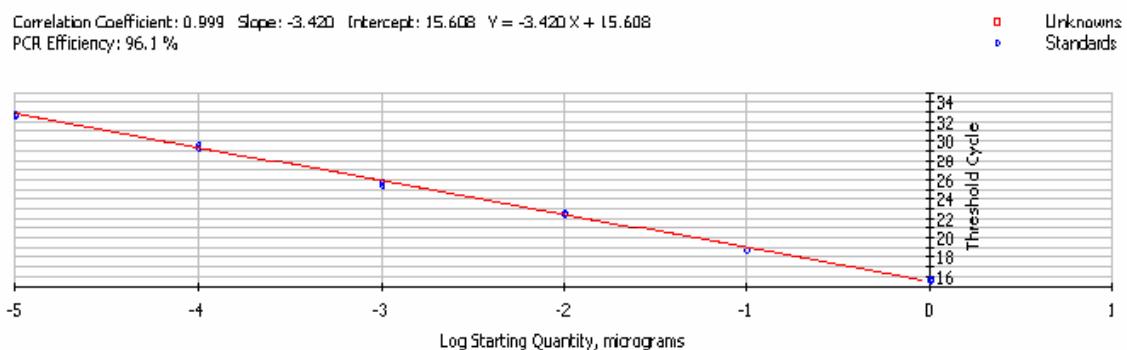


Abbildung 6 β -Actin: A. Zweifach lineare basislinienkorrigierte Abbildung der Amplifikationsreaktionen der Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve (y-Achse: relative Fluoreszenzeinheiten; x-Achse: Zyklen). B. Schmelzkurvenprofil (y-Achse: $-d(RFU)/dT$; x-Achse: Temperatur (°C)). C. Standardkurve (y-Achse: Schwellenwertzyklus; x-Achse: log der Startmenge (μg)).

5.3. Genexpression

Die Evaluierung der real time-PCR-Ergebnisse zeigte eine variierende Grundexpression der beiden Gene für OmNramp α und OmNramp β in allen nicht-infizierten Gewebeproben. Nach 3h waren keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Gruppen zu erkennen. Nach 14h zeigt die infizierte TL-Gruppe eine signifikante Erniedrigung der OmNramp α -Expression, verglichen mit der Kontrollgruppe. Dieser Trend ist auch noch nach 40d zu erkennen, jedoch ist er hier nicht mehr signifikant. Bei der Darstellung der Expression von OmNramp β ergibt sich während der ersten beiden Zeitpunkte (3h und 14d) ein sehr homogenes Bild der infizierten und nicht-infizierten Gruppen. Nach 40d allerdings zeigt wiederum die infizierte TL-Gruppe eine signifikante Expressionerniedrigung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Genexpressionen in den Gruppen BT und WT (Abbildungen 7, 8) weisen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Gruppen auf.

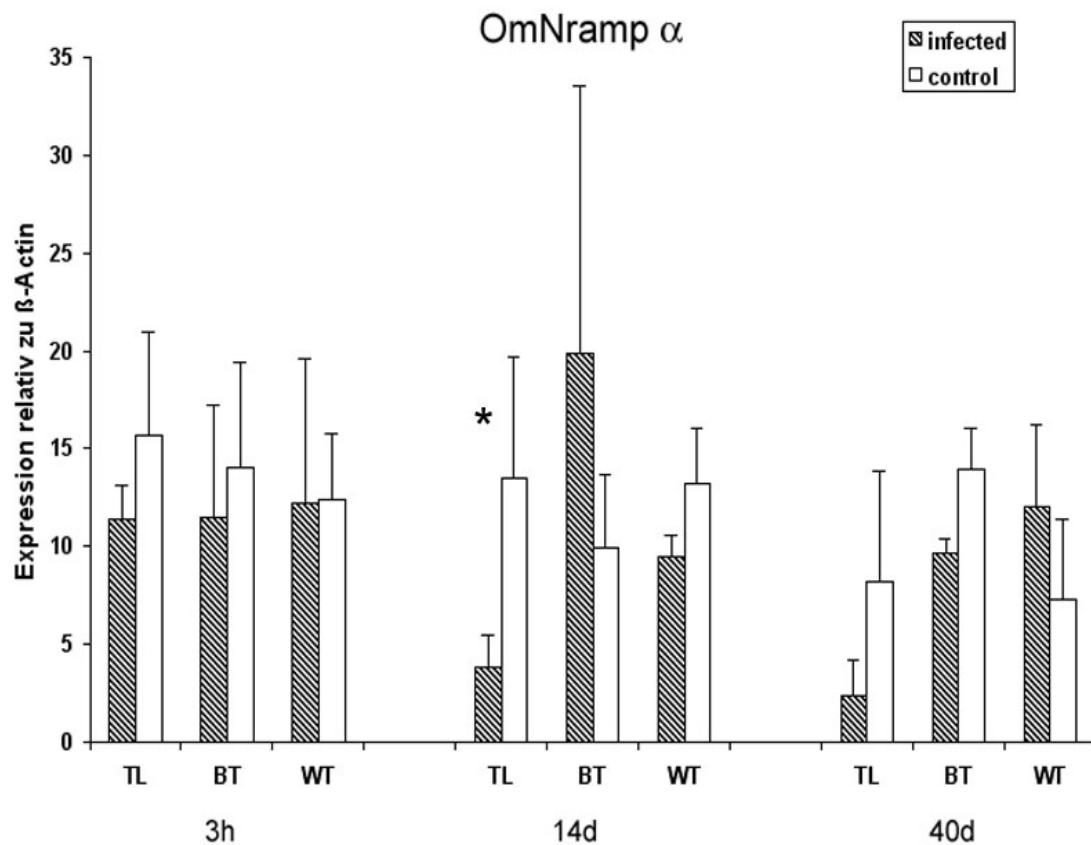


Abbildung 7 Relative Genexpression von OmNramp α in der real time PCR von infizierten und nicht-infizierten Fischen der Linien TL, BT und WT. Die Gewebeproben enthielten Haut, Muskel, Wirbelsäulen- und Kopfknorpel und Niere. Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (+SD; n=5 außer WT-Linie 14d: n=4; WT-Linie 40d: n=3) und die Standardabweichung. Expressionsunterschiede zwischen infizierter und nicht-infizierter Gruppe wurde mit einem Mann-Whitney U-Test berechnet. Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

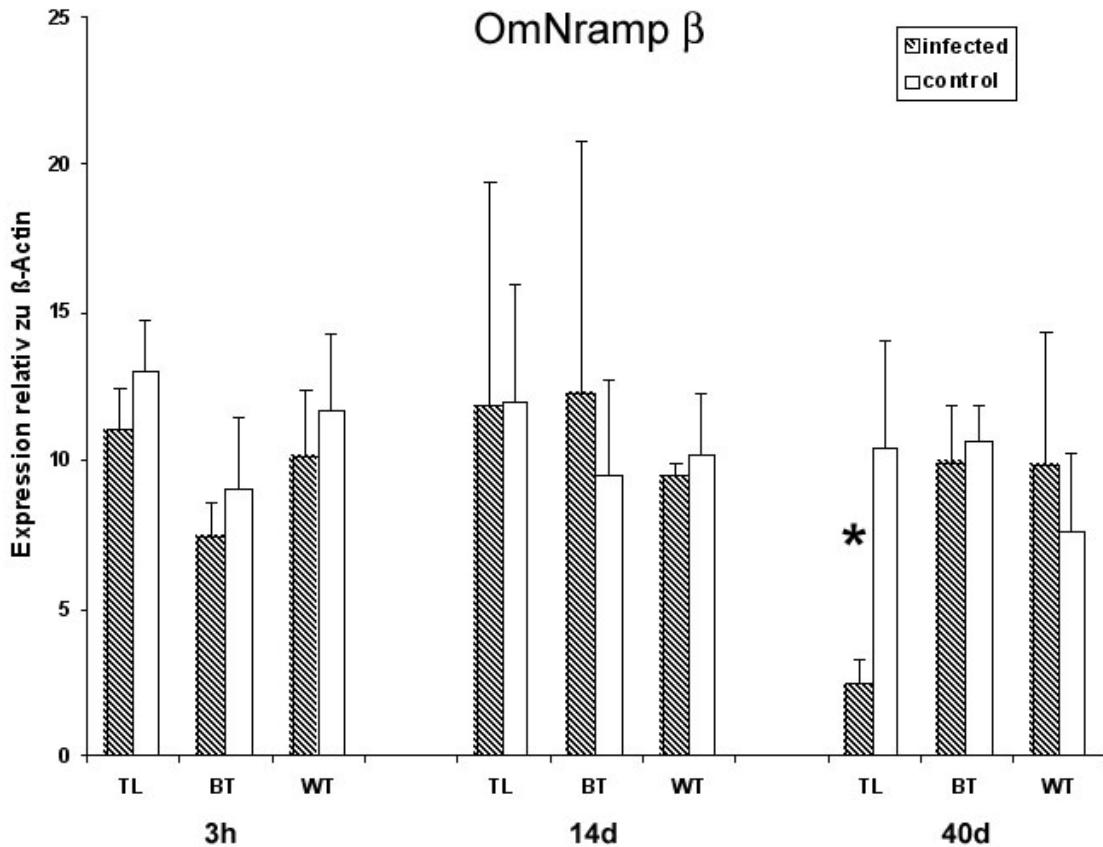


Abbildung 8 Relative Genexpression von OmNramp β in der real time PCR von infizierten und nicht-infizierten Fischen der Linien TL, BT und WT. Die Gewebeproben enthielten Haut, Muskel, Wirbelsäulen- und Kopfknorpel und Niere. Die Werte repräsentieren die mittlere relative Expression (+SD; n=5 außer WT-Linie 14d: n=4; WT-Linie 40d: n=3) und die Standardabweichung. Expressionsunterschiede zwischen infizierter und nicht-infizierter Gruppe wurde mit einem Mann-Whitney U-Test berechnet. Signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

5.4. Sequenzierung von OmNramp α in drei Regenbogenforellen-Linien

Mit den spezifischen Primern für Nramp α wurde ein 1852bp-cDNA-Fragment amplifiziert. Nach dem Einklonieren und Sequenzieren des Inserts mit weiteren gen- bzw. vektorspezifischen Primern wurden die einzelnen sequenzierten Fragmente wieder zusammengesetzt und miteinander sowie mit der von Dorschner und Phillips (1999) publizierten Sequenz (Acc. No. AF048760) verglichen (Tabelle 7). Die Nummerierung der Basenpaare erfolgte anhand der GenBank-Sequenz. Dabei wurden die folgenden variablen Positionen detektiert: An Position 712 ist ein C im HO- und WT-Stamm durch ein G in der GenBank-

Sequenz und im TL-Stamm ersetzt. Weitere Unterschiede finden sich an Positionen 1711 und 1822; hier wechseln sich A und G ab, wobei dies auch in verschiedenen Klonen ein und desselben Tieres zu beobachten ist, also keine Stamm-spezifische Mutation darstellt. In einem Klon eines Tieres des TL-Stamms findet sich eine Deletion, die einen 154bp-Abschnitt von Position 1442 bis 1595 betrifft und die 11. und zum Teil die 12. Transmembran-Domäne mit einschließt.

	GenBank (Acc. No. AF048760)	HO	TL	WT
GenBank (Acc. No. AF048760)	1.000	0.996	0.912	0.995
HO	---	1.000	0.913	0.997
TL	---	---	1.000	0.913
WT	---	---	---	1.000

Tabelle 7 Grad der Übereinstimmung der OmNramp α -Sequenzen untereinander

6. Publikation

Vol. 76: 223–230, 2007	DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org	Published July 16
------------------------	--	-------------------

Sequence analysis of OmNramp α and quantitative expression of Nramp homologues in different trout strains after infection with *Myxobolus cerebralis*

Ute Rucker, Mansour El-Matbouli*

Institute of Zoology, Fish Biology and Fish Diseases, University of Munich, Kaulbachstr. 37, 80539 Munich, Germany

ABSTRACT: Salmonid whirling disease caused by the metazoan parasite *Myxobolus cerebralis* is an ongoing problem in wild and farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* populations. Rainbow trout from different strains vary in susceptibility to the parasite. Identification of underlying mechanisms could be a starting point for improved control of the disease. We conducted infection trials using 2 rainbow trout strains and brown trout *Salmo trutta fario*, a species not susceptible to the parasite, to investigate host immune response and resistance mechanisms. We compared expression levels of 2 natural resistance-associated macrophage proteins (Nramp α and β) after infection with *M. cerebralis*. Total RNA was extracted from skin, muscle, kidney, head and spinal column, and gene expression was quantified by real-time PCR. Significant decreases in expression of both genes were observed at different time points in the infected susceptible rainbow trout compared to the non-infected group. Furthermore, the OmNramp α (*O. mykiss* natural resistance-associated macrophage protein α) sequences in 2 resistant and 1 non-resistant rainbow trout strain were analysed and compared for sequence aberrations.

KEY WORDS: Whirling disease · *Myxobolus cerebralis* · Nramp · Gene expression · Real-time PCR

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Whirling disease in salmonids, caused by the myxzoan parasite *Myxobolus cerebralis*, can presently be found in most countries that produce trout in aquaculture (Hedrick et al. 1998), and it has been responsible for severe ecological and economic damage to natural and farmed populations of salmonids. Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* has a much higher susceptibility to the disease than the original host brown trout *Salmo trutta fario*, which had a historic association with *M. cerebralis* in its original European range (Andree et al. 1999, Hedrick et al. 1999a). The fish-infective spore stage of the parasite, the triactinomyxon (TAM), attaches to the host gills and epidermis. After penetration of the epidermis, the parasite develops intracellularly and migrates through the subcutis and peripheral nervous tissue to the central nervous system, and then to nearby cartilage tissue (El-Matbouli et al. 1999, Hedrick & El-Matbouli 2002). Subsequently, parasite

development leads to destruction of the cartilage and gives rise to typical clinical signs: deformation of the head and spine, whirling swimming behaviour and a black tail (Schäperclaus 1990, Rose et al. 2000).

The immune and resistance mechanisms in the fish host against *Myxobolus cerebralis* are only poorly understood. Mucosal factors potentially affect TAM attachment, and the presence of eosinophilic granular leucocytes in root ganglia of infected brown trout strongly suggests a cellular protective response (Hedrick et al. 1999b). However, mechanisms for the differences in susceptibility between rainbow trout strains remain unknown.

In mammals, the ability of macrophages to kill phagocytosed pathogens is enhanced by the membrane protein Nramp 1. Bradley et al. (1974) observed expression of a single, dominant, autosomal gene *Bcg/Lsh/ty* on mouse chromosome 1 that could control growth of taxonomically and antigenically unrelated intracellular parasites including *Salmonella typhim-*

*Corresponding author. Email: el-matbouli@lmu.de

© Inter-Research 2007 · www.int-res.com

urium, *Leishmania donovani* and *Mycobacterium bovis*. Vidal et al. (1993) isolated the gene and called it Nramp 1. Members of the Nramp family have since been isolated from humans (Kishi 1994), rats (Gunshin et al. 1997), birds (Hu et al. 1995), fish (Dorschner & Phillips 1999), insects (Rodrigues et al. 1995), nematodes (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998), plants (Belouchi et al. 1995), yeast (Portnoy et al. 2000) and bacteria (Makui et al. 2000). The widespread occurrence of the gene suggests that Nramp protein functions may be essential for the survival of cells and organisms.

Structural analysis showed that vertebrate homologues share a 12 transmembrane domain topology, glycosylation, extensive phosphorylation, and a highly conserved binding protein-dependent transport system inner membrane component signature (Govoni et al. 1995). In mammals, Nramp 1 is preferentially expressed in phagocytic cells such as macrophages and polymorphonuclear leucocytes (Cellier et al. 1994, Govoni & Gros 1998). A second mammalian gene Nramp 2 has been identified and, in contrast to Nramp 1, it is expressed at low levels in all tissues. Its protein has been identified as a pH-dependent divalent cation transporter and represents the major transferrin-independent iron uptake system of the mammalian intestine (Gunshin et al. 1997). Nramp genes code for integral membrane proteins that share 63% identical residues and an overall homology of 78%. They share very similar secondary structure, including identical hydrophathy profiles and predicted membrane organization, with a minimum of 10 and most probably 12 transmembrane domains, a cluster of predicted N-linked glycosylation sites, and a consensus transport motif (Gruenheid et al. 1995).

Nramp 1 codes for an integral membrane protein which is localized to the late endocytic compartments of resting macrophages. Upon phagocytosis, Nramp 1 is recruited to the membrane of the phagosome and remains associated with this structure during its maturation to phagolysosome (Gruenheid et al. 1997). Gene knockout experiments in mice revealed that Nramp 1 plays an important role in the early stages of parasite-macrophage interactions (Govoni et al. 1996). Although the mechanism by which Nramp 1 confers innate resistance to intracellular pathogens remains unknown, there are several theories that attempt to explain its exact function. Jabado et al. (2000) used Nramp 1-expressing (+/+) and Nramp 1-deficient (-/-) macrophages to show that phagosomes from Nramp 1^{+/+} macrophages extrude Mn²⁺ faster than their Nramp 1^{-/-} counterparts. This difference is no longer visible when the acidification of the phagosomal lumen is dissipated, suggesting that Mn²⁺ transport of Nramp 1 is pH-dependent. The authors conclude that

Nramp 1, like Nramp 2, is a divalent cation transporter that may also transport other divalent cations like Fe²⁺ or Zn²⁺ out of the phagosomal lumen. These cations are presumed to be essential to metabolic activity of intracellular parasites. As Nramp homologues have also been identified in many bacterial species, it is possible that both macrophage and microbial homologues compete for metals in the microenvironment of the phagosome (Jabado et al. 2000).

There is also a wide range of other effects of Nramp 1 on macrophage activity, including regulation of interleukin-β (IL-β), inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS), major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), NO release, L-arginine flux, oxidative burst, and antigen presentation (Blackwell et al. 1994, Skamene 1994, Radzioch et al. 1995, Blackwell 1996, Lang et al. 1997).

The high degree of sequence and gene structure similarity within the Nramp family across species suggests that the protein cannot tolerate significant alteration in primary structure (Cellier et al. 1994, Blackwell et al. 1995, Govoni et al. 1995, Dorschner & Phillips 1999). This was demonstrated by sequencing Nramp 1 cDNA clones in 27 inbred mouse strains; a single non-conservative Gly to Asp substitution in the murine Nramp 1 at position 169 causes susceptibility to *Mycobacteria*, *Salmonella* and *Leishmania* (Malo et al. 1994). This sequence aberrance appears in the 4th transmembrane domain and may influence the integration of the protein into the phagosomal membrane (Malo et al. 1994). In humans, a linkage of polymorphisms in NRAMP 1 to susceptibility to tuberculosis is suspected (Hsu et al. 2006), but evidence is still weak. A polymorphism in the 3' untranslated region of cattle Nramp 1 has an effect on expression of the gene and is also linked to *Brucella abortus* susceptibility (Barthel et al. 2001).

In rainbow trout, 2 Nramp proteins called OmNramp α and OmNramp β (*Oncorhynchus mykiss* Nramp α and β) have been isolated. Detailed analysis showed that the evolutionary conservation of Nramp proteins extends to teleost fish, with a 69% identity to mammalian Nramp 1 homologues and a 78% identity with Nramp 2 proteins (Dorschner & Phillips 1999).

The current study was designed to investigate Nramp as a candidate gene for resistance of rainbow and brown trout to *Myxobolus cerebralis*. The expression of Nramp in non-infected and infected fish was estimated quantitatively. The second aim was to define polymorphisms in the rainbow trout Nramp homologue OmNramp α in rainbow trout strains with differing resistance and susceptibility to *M. cerebralis*. Although the OmNramp α sequence resembles that of the mammal Nramp 2, the trout version is preferentially expressed in the kidney and juvenile ovary, and with

this tissue specific expression it shares an important characteristic of the mammal Nramp 1. For this reason we regard it as a candidate gene for resistance to disease.

MATERIALS AND METHODS

Primer design. For expression analysis, PCR primers were designed using the published rainbow trout OmNramp α and OmNramp β sequences (Table 1). Positions of splice junctions were determined in order to facilitate positioning primers in a way that they overran at least one splice junction, to make sure they only amplified cDNA and not genomic DNA. The primers were analyzed for potential secondary structure and dimerization potential using Oligo software (Molecular Biology Insights) and were commercially synthesized (MWG Biotech). Primers were diluted to 20 pMol μ l $^{-1}$ with ddH₂O (double-distilled water) and used without further purification. In brown trout, Nramp α and β homologues were detected with the specific primers OmNramp α F/R and OmNramp β F/R. For this reason, the terms Nramp α and Nramp β refer here to the target genes of both species (*Oncorhynchus mykiss* and *Salmo trutta*). Sequences and PCR conditions for rainbow trout β -actin primers were from Sigh et al. (2004). PCR detection of *Myxobolus cerebralis* was conducted according to Andree et al. (1998) (Tables 1 & 2).

For sequence analysis of OmNramp α , 3 primer pairs were constructed. Compl $_{\alpha}$ F and Compl $_{\alpha}$ R enclosed the whole open reading frame and were used for

isolation of the gene. The primers pUCM_13 F and pUCM_13 R were specific for the cloning vector and were used for sequencing the 5' and 3' ends of the inserts. 691 F and 1348 R were again specific for OmNramp α and were used for sequencing the inner part of the inserts.

Fish and rearing conditions. For real-time quantification, 2 rainbow trout strains and 1 brown trout strain were used in this study, i.e. a hatchery rainbow trout strain named TL from the USA that was highly susceptibility to *Myxobolus cerebralis*, a self-reproducing wild strain of rainbow trout from Germany (WT) which was resistant to the parasite, and brown trout *Salmo trutta fario* (BT) which is regarded as the highly resistant original host of *M. cerebralis*. For sequence analysis, one more German hatchery strain (HO) which has a high level of resistance was used. Specific-pathogen-free (SPF) fish were obtained as eggs and were hatched and reared in our wet laboratory at 15°C. For the entire experiment, fish were fed commercial trout feed at 1% body weight d $^{-1}$.

Parasites. The complete life cycle of *Myxobolus cerebralis* has been established in our laboratory. For exposure of the fish, fresh triactinomyxon spores were maintained by filtering (filter gauze, 20 μ m pore size) the water in tanks containing infected *Tubifex tubifex* worms.

Infection procedure. For infection experiments, 54 d old (810 degree-days post hatching) fish were used. From each strain, 15 fish were exposed to 75000 freshly filtered triactinomyxon spores (5000 spores fish $^{-1}$) for 1 h in 1 l tanks without water flow. This is an

Table 1. Primers used for expression analysis

Gene target	Size of amplicon (bp)	Designation	Sequence (5'-3')	GenBank accession no.
Primers used for real-time PCR				
β -actin	260	Bact - F	ATGGAAGGTGAAATGCC	AF157514
		Bact - R	TGCCAGATCTTCTCCATG	
Nramp α	230	OmNramp α F	TTCTTCTCACCGCTCCATCG	AF048760
		OmNramp α R	CACAGACCACAGGATGACCA	
Nramp β	244	OmNramp β F	GACTTGCTAATGGACTGGTG	AF048761
		OmNramp β R	TTGTTGCTTACCCCTGTTGCC	
Primers used for the detection of <i>Myxobolus cerebralis</i>				
18S rDNA of <i>M. cerebralis</i>	415	Tr5-17	GCCCTATTAACTAGTTGGTAGTATAGAAGC	U96492
		Tr3-17	GGCACACTACTCCAAACACTGAATTG	
Primers used for OmNramp α sequencing				
OmNramp α	1852	Compl $_{\alpha}$ F	CTAATGAAGACAGCGCGGGA	AF048760
		Compl $_{\alpha}$ R	ATGAGGATGGGCACCTACGA	
		691 F	CGCCAGGGTTTCCACGTACGAC	
		1348 R	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	
Insert in pGEM $^{\circ}$ -T vector		pUCM_13 F	CGCCAGGGTTTCCACGTACGAC	
		PUCM_13 R	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	

Table 2. Cycle parameters for the polymerase chain reactions

Target cDNA	Denaturation	Annealing	Elongation	Extension	No. of cycles
Real-time PCR					
β-actin	95°C for 3 min 94°C for 45 s	– 58°C for 45 s	– 72°C for 45 s	–	1 35
Nramp α	95°C for 3 min 95°C for 30 s	– 68.5°C for 20 s	– 72°C for 20 s	–	1 40
Nramp β	95°C for 3 min 95°C for 30 s	– 64.6°C for 20 s	– 72°C for 20 s	–	1 40
Conventional PCR					
18S rDNA of <i>Myxobolus cerebralis</i>	95°C for 5 min 95°C for 1 min –	– 65°C for 2.5 min –	– 72°C for 1.5 min –	– 72°C for 10 min	1 35 1

infection dose comparable to natural infection, where the spore concentrations are lower but the fish are exposed to the TAM spores over a longer period.

After 30 min, water and oxygen (air) flow were supplied to the tanks. After 1 h, the fish were transferred to 50 l tanks with water flow at 15°C. Another 15 fish from each strain were treated in the same way, without exposure to triactinomyxon spores, and served as controls.

Tissue sampling and RNA isolation. At 3 h, 14 d and 40 d after exposure, 5 fish from each exposed and control group were sampled for expression analysis and detection of *Myxobolus cerebralis* infection. For tissue sampling, 2 incisions were made; one was cut vertically through the head cartilage behind the eye, followed by a horizontal incision along the lateral line to the anus. By doing this, we separated the upper half of the body of each fish containing head and spinal column cartilage, skin, muscle, dorsal, anal and tail fin and kidney. These tissue samples were stored at -80°C in RNAlater® (Sigma-Aldrich). For purification, the tissue samples were immersed in liquid nitrogen and ground with a mortar and pestle. Thirty mg of the tissue powder was used for extraction of total RNA with RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The RNA samples were DNase-treated using DNase I (Qiagen). The purity and quantity of the resulting RNA was determined spectrophotometrically by measuring the optical density at 260/280 nm. From total RNA, 1 µg was reverse transcribed using the iSCRIPT® Kit (Bio-Rad). The resulting cDNA was divided in aliquots of 1 µl, replenished to a final amount of 10 µl, and stored at -20°C prior to qualitative and quantitative PCR analysis.

Verification of the infection. Samples from all exposed fish were measured for infection with *Myxobolus cerebralis* using the single-round PCR of Andree et al. (1998) (Tables 1 & 2) using the cDNA produced.

Amplification products were separated through 1.5% agarose Tris-acetate EDTA (TAE) gels containing 10 µl ml⁻¹ ethidium bromide and photographed under UV illumination. cDNA from TAM spores served as positive control. A reaction mix with ddH₂O instead of cDNA was used as a negative control.

Standard DNA plasmids construction. To obtain standard DNA for generating a standard curve for each target gene (β-actin, Nramp α, Nramp β), cDNA was amplified by PCR with the specific primer pairs (Table 1). PCR was carried out in a final reaction volume of 50 µl containing 46 µl 1.1× ReddyMix PCR Master Mix (Abgene) comprising 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) Tween20, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1.25 U Taq DNA polymerase, red dye for electrophoresis and 4 µl of template cDNA with forward and reverse primers. PCR products were checked by agarose gel electrophoresis and directly ligated into the plasmid vector pGEM®-T (Promega). *Escherichia coli* JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega) were then transformed with the ligation reaction according to the instructions of the manufacturer. Positive clones were checked for correct-sized inserts by PCR. Plasmid DNA was subsequently isolated following propagation of selected colonies using a GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). The inserts were released by a digest with Sca I (BioLabs) and purified using MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen).

Quantification of cDNA by real-time PCR. The amplification of cDNA was measured by quantitative real-time PCR using an iCycler instrument (Bio-Rad). Fluorescence was detected by labelling the probes with SYBR Green I fluorophore. To generate a standard curve, a serial dilution of the released inserts was prepared by pipetting a 10-fold dilution series from 10² to 10⁹. Real-time PCR was performed in 96-well PCR plates in a final volume of 25 µl containing

10 μ l of attenuated inserts or diluted cDNA sample, 12.5 μ l iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad), and 1.25 μ l of each primer. PCR conditions for each primer pair can be seen on Table 2. Melting curves were obtained by performing a denaturation at 95°C, followed by rehybridisation at 55°C and by progressive denaturation, raising the temperature to 95°C at a transition rate of 0.5°C s⁻¹ with continuous fluorescence measurement. Rainbow trout β -actin primers were used to normalize the starting quantity of cDNA using the calculation method of Vandesompele et al. (2002). Reaction mixes with ddH₂O instead of diluted cDNA served as negative control. The significance in expression levels in infected fish was tested against the expression levels of uninfected controls using a Mann-Whitney *U*-test.

Sequence analysis. cDNA was taken from the kidney of fish from the strains HO, TL, and WT. A 1852 bp fragment from nucleotide positions 20 to 1871 enclosing the whole open reading frame was amplified by PCR using the primers Compl_α F and R. The PCR was carried out using 2 \times ReddyMix PCR Master Mix (Abgene) on an Eppendorf Thermal cycler with a cycling profile comprised of an initial denaturing step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 50 s, 56°C for 50 s and 72°C for 1.5 min, and a final extension at 72°C for 7 min. The PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels and detected by ethidium bromide. One PCR product from each strain was purified using the PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol, cloned into pGEM-T vector (Promega), and plasmids of 3 clones from each PCR product were purified using the Miniprep kit (Eppendorf). The 2 plasmid-specific primers pUCM_13 F and pUCM_13 R were used for the sequencing of the 5' and 3' ends of the inserts. The 2 additional gene-specific primers 961 R and 1348 F served for sequencing of the inner part. All the sequencing procedures were conducted by GATC Biotech.

Sequence variabilities and similarities between the sequences were determined according to Corpet (1988) and Hall (1999) using the MULTALIN and BIOEDIT 5.0.9 software (Table 3). The OmNramp α

Table 3. Similarities of the OmNramp α sequences. HO: German hatchery strain of brown trout with elevated resistance to *Myxobolus cerebralis*; TL: hatchery rainbow trout strain highly susceptible to *M. cerebralis*; WT: rainbow trout resistant to *M. cerebralis*

	HO	TL	WT
GenBank (acc. no. AF048760)	0.996	0.912	0.995
HO	1.000	0.913	0.997
TL	–	1.000	0.913

sequence from GenBank was included in the analysis. Position numbers refer to this sequence.

RESULTS

Verification of *Myxobolus cerebralis* infection. As clinical signs are not apparent until 3 mo after an infection with *M. cerebralis*, the fish appeared healthy throughout the whole study. A 415 bp band was present in *M. cerebralis* assay PCR in all samples of exposed fish, confirming successful infection.

Real-time PCR results. Evaluation of real-time PCR results showed a variable constitutive expression of both genes in all tissue samples (Fig. 1). In general, there was no significant difference in gene induction between infected and control groups at 3 h. A significant depression in gene expression relative to uninfected controls was seen in the TL strain for Nramp α at 14 d and for Nramp β at 40 d. At no time was there a significant increase of target gene expression in any infected group compared to the non-infected controls.

Sequence analysis. On bp position 712, a C in the HO and WT strains is replaced by a G in the GenBank sequence and TL strain. Other variable positions are at 1711 and 1822, where the bases A and G alternate throughout the strains. An interesting finding was a deletion in one clone of the strain TL, which enfolds 154 bp and extends from position 1442 to 1595. To calculate the similarity of the sequences of the strains and the GenBank sequence among each other, the clones have been recomposed to full length genes (Table 3).

DISCUSSION

Little is known about how interactions between the fish host and *Myxobolus cerebralis* lead to an increased resistance to the parasite infection, and how immune responses differ between resistant and susceptible individuals. The long association of brown trout with *M. cerebralis* is believed to be the reason for its enhanced resistance. This could be also the case for the wild rainbow trout strain used in this study, as these fish may represent a remnant population of the earliest rainbow trout introduced to Germany. However, some native American species such as coho salmon also show a strong resistance to the parasite (Hedrick et al. 1999b). This indicates an accidentally or selectively developed innate immunity that plays a proportionally greater role in resistance in fish than in homeothermic vertebrates (Jones 2001). While mucosal factors are likely to affect successful infection by triactinomyxon spores, recent studies also show the involvement (in blood and tissue) of the innate immune system (authors' unpubl. data).

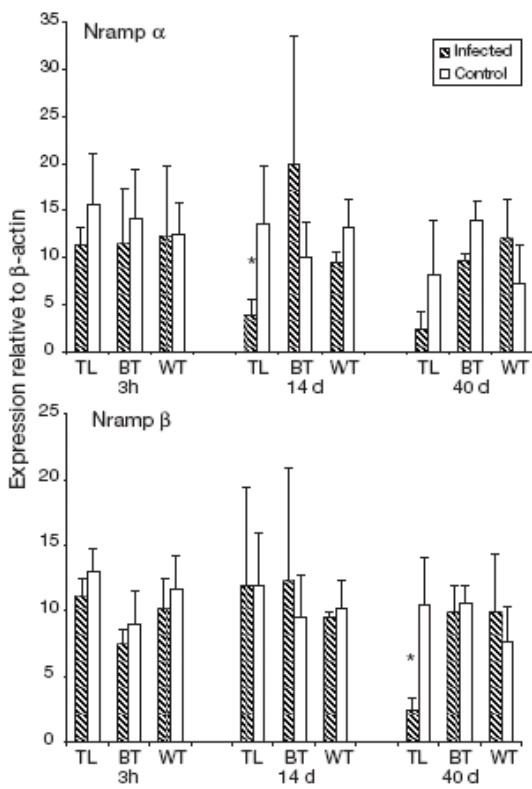


Fig. 1. *Oncorhynchus mykiss* (TL and WT strain) and *Salmo trutta fario* (BT). Real-time PCR amplification of target gene expression in tissue samples containing skin, muscle, head and spinal column bone and kidney. The expression of the specific genes is relative to β -actin expression levels. Bars represent mean (\pm SD) expression level of 5 individual samples (infected and uninfected) except the WT strain at 14 d (4 samples for infected and uninfected group each) and WT strain at 40 d (3 samples for infected and uninfected group each). *Significantly depressed expression (Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$); TL: hatchery rainbow trout strain highly susceptible to *Myxobolus cerebralis*; BT: brown trout highly resistant to parasite; WT: rainbow trout resistant to parasite

Nramp has been identified as an important part of the innate immune system that broadly stimulates macrophage activity and enhances macrophages' ability to kill phagocytised pathogens. This study was designed to investigate the role of Nramp in the increased resistance of a wild rainbow trout strain and brown trout to infection by *Myxobolus cerebralis*. We observed reduced expression of the 2 genes in the susceptible TL strain at 14 d (Nramp α) and 40 d (Nramp β) post exposure. A similar expression pattern of Nramp 1 was recently reported by Sadeyen et al. (2004) in susceptible chickens after infection with *Sal-*

monella. This finding may indicate a possible negative feedback mechanism involving Nramp (Baker et al. 2000). Similar reduced expression of genes following pathogen exposure has been observed in rainbow trout by other authors; however, the cause of the reduced expression is unknown (Grayson et al. 2002, Sigh et al. 2004, Overturf & LaPatras 2006).

In several parasitic diseases, advanced pathology leads to a suppression of innate immune responses and enhances susceptibility to other diseases. This is mediated by the subsequent release of immune suppressive glucocorticoids (Elenkov & Chrousos 1999). Holland et al. (2003) found that LPS-induced gene expression of several innate immune factors including COX-2, TNF- α 1, IL-1 β 1, IL-1 β 2 and IL-8 is suppressed *in vitro* by cortisol. Investigations on glucocorticoid-mediated suppression of Nramp are not available, but as Nramp is involved in the regulation of some of the immune factors mentioned above, a coherence is possible.

The absence of any up-regulation of the 2 genes in infected fish suggests these genes are not influenced by *Myxobolus cerebralis* infection. We also investigated the possibility that a sequence aberration in an Nramp gene, expressed at normal level, is responsible for an enhanced susceptibility to the disease in fish possessing the aberrant sequence; studies on mammals have shown clear correlations between mutations and susceptibility to parasites (Malo et al. 1994). However, none of the sequence variabilities that have been detected here were specific to one strain; they were all found to be individual variations. The deletion that was found in one TL clone affects the whole 11th transmembrane domain and a part of the 12th transmembrane domain, and probably has a wide influence on the functionality of the protein. The other clones of the same fish did not have this deletion. We postulate that this deletion occurs in the other strains too, but has not been observed due to the limited number of clones that have been sequenced. Further studies are necessary to clarify the impact and/or function of this variability.

Acknowledgements. This work was supported by the Whirling Disease Foundation and the US Fish and Wildlife Service. We also thank E. Eszterbauer and H. Soliman for their assistance with the molecular work.

LITERATURE CITED

- Andree KB, MacConnell E, Hedrick RP (1998) A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 34:145–154
- Andree KB, El-Matbouli M, Hoffmann RW, Hedrick RP (1999) Comparison of 18S and ITS-1 rDNA sequences of selected geographic isolates of *Myxobolus cerebralis*. Int J Parasitol 29:771–775

- Baker ST, Barton TE, Biggs TE (2000) A negative auto-regulatory link between Nramp 1 function and expression. *J Leukoc Biol* 67:501–507
- Barthel R, Feng J, Piedrahita JA, McMurray DN, Templeton JW, Adams LG (2001) Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infect Immunol* 69(5): 3110–3119
- Belouchi A, Cellier M, Kwan T, Saini HS, Leroux G, Gros P (1995) The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. *Plant Mol Biol* 29(6):1181–1196
- Blackwell JM (1996) Structure and function of the natural-resistance associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Mol Med Today* 2:205–211
- Blackwell JM, Barton CH, White JK, Roach TI and 6 others (1994) Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the Lsh/Ity/Bcg gene story continues. *Immunol Lett* 43(1–2):99–107
- Blackwell JM, Barton CH, White JK, Searle S, Baker AM, Williams H, Shaw MA (1995) Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol Med* 1(2):194–205
- Bradley DJ (1974) Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature* 250:353–354
- C. elegans Sequencing Consortium (1995) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396):2012–2018
- Cellier M, Govoni G, Vidal S, Kwan T and 6 others (1994) Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 180(5):1741–1752
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* 16(22):10881–10890
- Dorschner MO, Phillips RB (1999) Comparative analysis of two Nramp loci from rainbow trout. *DNA Cell Biol* 18(7):573–583
- Elenkov IJ, Chrousos GP (1999) Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 9:359–368
- El-Matbouli M, Hoffmann RW, Schoel H, McDowell TS, Hedrick RP (1999) Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 35:1–12
- Govoni G, Gros P (1998) Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* 47(7): 277–284
- Govoni G, Vidal S, Cellier M, Lepage P, Malo D, Gros P (1995) Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp 1 gene in macrophages. *Genomics* 27(1):9–19
- Govoni G, Vidal S, Gauthier S, Skamene E, Malo D, Gros P (1996) The Bcg/Ity/Lsh locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp 1 Gly169 allele. *Infect Immunol* 64(8):2923–2929
- Grayson TH, Cooper LF, Wrathmell AB, Roper J, Evenden AJ, Gilpin ML (2002) Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. *Immunology* 106:273–283
- Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P (1995) Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* 25(2):514–525
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 85(4):717–730
- Gunshin H, MacKenzie B, Berger UV, Gunshin Y and 5 others (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482–488
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hedrick RP, El-Matbouli M (2002) Recent advances with taxonomy, life cycle, and development of *Myxobolus cerebralis* in the fish and oligochaete hosts. *Am Fish Soc Symp* 29:45–53
- Hedrick RP, El-Matbouli M, Adkinson MA, McConnell E (1998) Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunol Rev* 166:365–376
- Hedrick RP, McDowell TS, Gay M, Marty GD, Georgiadis MP, McConnell E (1999a) Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. *Dis Aquat Org* 37:173–183
- Hedrick RP, McDowell TS, Mukatira K, Georgiadis MP, McConnell E (1999b) Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *J Aquat Anim Health* 11:330–339
- Holland JW, Gould CRW, Jones CS, Noble LR, Secombes CJ (2003) The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD). *Parasitology* 126:95–102
- Hsu YH, Chen CW, Sun HS, Jou R, Lee JJ, Su IJ (2006) Association of NRAMP 1 gene polymorphism with susceptibility to tuberculosis in Taiwanese aborigines. *J Formos Med Assoc* 105(5):363–369
- Hu J, Bumstead N, Burke D, Ponce de Leon FA, Skamene E, Gros P, Malo D (1995) Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken. *Mamm Genome* 6(11):809–815
- Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *Exp Med* 192(9): 1237–1248
- Jones SRM (2001) The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Dev Comp Immunol* 25(8–9):841–852
- Kishi F (1994) Isolation and characterization of human Nramp cDNA. *Biochem Biophys Res Comm* 204:1074–1080
- Lang T, Prina E, Sibthorpe D, Blackwell J (1997) Nramp1 transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect Immunol* 65:380–386
- Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* 35(5):1065–1078
- Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J and 6 others (1994) Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 23(1):51–61
- Overturf K, LaPatra S (2006) Quantitative expression of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus. *J Fish Dis* 29:215–224

- Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* 20(21):7893–7902
- Radzioch D, Kramnik I, Skamene E (1995) Molecular mechanisms of natural resistance to mycobacterial infections. *Circ Shock* 44:115–120
- Rodrigues V, Cheah PY, Ray K, Chia W (1995) Malvolio, the *Drosophila* homologue of mouse NRAMP-1 (Bcg), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *EMBO J* 14(13): 3007–3020
- Rose JD, Marrs GS, Lewis C, Schisler G (2000) Whirling disease behaviour and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. *J Aquat Anim Health* 12: 107–118
- Sadeyen JR, Trotter J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barlow PA, Bumstead N, Lalmanach AC (2004) *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microb Infect* 6:1278–1286
- Schäperclaus W (1990) *Fischkrankheiten*, 5th edn. Akademie-Verlag, Berlin
- Sigh J, Lindenstrom T, Buchmann K (2004) Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol* 17(1):75–86
- Skamene E (1994) The Bcg gene story. *Immunobiology* 191: 451–460
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 18:3–7
- Vidal S, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate gene for Bcg. *Cell* 73:469–475

*Editorial responsibility: Dieter Steinhausen,
Hannover, Germany*

*Submitted: February 2, 2007; Accepted: May 24, 2007
Proofs received from author(s): July 10, 2007*

7. Diskussion

Das folgende Kapitel fasst die Diskussionen des vorangegangen Kapitels 6 zusammen und greift insbesonders Aspekte auf, die in der vorstehenden Publikation wenig oder gar nicht berücksichtigt werden konnten.

7.1. Relative Quantifizierung der Expression von OmNramp α und β

Die Wirtsreaktion auf eindringende Pathogene ist ein kompliziertes Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren des Immunsystems, und wird daher meist auch von mehreren Genen reguliert (engl.: multigenic trait). Mit Hilfe von Mikrosatelliten und sogenannten *linkage maps* versucht man, die Genloci, auf denen sich die involvierten Gene befinden, zu lokalisieren und spezifische Marker für ihre An- bzw. Abwesenheit zu entwickeln. Besonders in der Aquakultur spielt diese Methode eine große Rolle für die Selektion und Zucht krankheitsresistenter Stämme. Die Kenntnis derjenigen Gene, die bei Prozessen der Immunabwehr eine Schlüsselrolle spielen bzw. für Resistenzen verantwortlich sind, ist daher nicht nur für das Verständnis grundlegender immunologischer Abläufe von Interesse, sondern könnte auch eine wertvolle Hilfe bei der Entwicklung entsprechende Zuchtprogramme sein.

Zwei Gene für Nramp-Homologe, OmNramp α und OmNramp β , wurden hinsichtlich ihrer Gewebsexpression während einer Infektion mit *Myxobolus cerebralis* untersucht. Zum einen sollte so geklärt werden, ob sich eventuell bereits aus dem Expressionsprofil eine Beteiligung der Nramp-Homologen bei der Immunreaktion gegen *M. cerebralis* ableiten lässt, zum anderen, ob sich die Expression bei unterschiedlich resistenten Forellenstämmen dahingehend unterscheidet, dass man daraus auf einen Zusammenhang zwischen Expressionshöhe und Ausprägung der Resistenz schließen könnte.

Einen wichtigen Arbeitsschritt stellte die Infektion der Forellenbrütlinge dar. Bereits während der Sporenexposition war bei allen Gruppen das charakteristische Zucken zu beobachten. Dies ist (nach El-Matbouli et al., 1999a) als Ab-

wehrverhalten auf die Injektion der Polfilamente in die Epidermis und das Eindringen der Amöboidkeimzellen in die Poren der Schleimzellen zu werten. Diese Beobachtung weist also bereits auf das Vorhandensein infektionstüchtiger Triactinomyxonsporen hin. Aufgrund der frühen Entnahme-Zeitpunkte und der Dauer des Versuchs war eine Bewertung der Infektion anhand klinischer Symptome nicht möglich. Daher diente der molekularbiologische Nachweis parasitenspezifischer DNA im Fischkörper als Verifizierung der Infektion. Anhand der durchweg positiven Ergebnisse der mit den spezifischen Primern nach Andree et al. (1998) durchgeführten PCR-Untersuchung wurde die Infektion aller Fische als erfolgreich bewertet.

Da gerade in den ersten Lebenswochen die Entwicklung der immunkompetenten Organe und damit die Ausprägung eines funktionierenden Immunsystems stattfindet (siehe 2.4.1), wurde die Übereinstimmung des Alters der Versuchstiere zum Infektionszeitpunkt für wichtiger erachtet als die Infektion aller Gruppen mit derselben Sporengeneration. Um dabei mögliche Fehlerquellen zu minimieren, wurden die Sporen sorgfältig ausgezählt und jede Gruppe mit exakt derselben Sporenanzahl infiziert (siehe 4.3.1).

Durchaus kritisch für die quantitative Genexpressionsanalyse war die Probenentnahme: Die Entnahmezeitpunkte (3h, 14d, 40d) sollten alle Gewebestadien (Haut, Muskel, periphere Nerven, zentrales Nervensystem, Knorpel) des Parasiten umfassen. Als Ausgangsmaterial diente daher von jedem Fisch eine Probe, die all diese Gewebe enthielt. Die Art und Weise der Probenentnahme war entscheidend für die spätere Auswertung der Ergebnisse, da für die Normalisierung gegen β -Actin Menge und Art der enthaltenen Gewebe absolut vergleichbar sein mussten. Aus diesem Grund wurden immer nur Fische desselben Gewichts und derselben Größe in den einzelnen Gruppen zusammengefasst.

Allgemein ist eine recht große Streuung der Einzelergebnisse festzustellen, durch die eventuell einige Effekte, ausgelöst durch die Infektion, verdeckt wurden. Da die Tiere jedoch mit einer hohen Sporenanzahl (5000 TAMs/Fisch) infiziert wurden, kann man von einer deutlichen Immunreaktion ausgehen. Es besteht jedoch zu keinem Entnahmezeitpunkt eine signifikante Erhöhung der Expression in den infizierten Gruppen gegenüber der in den Kontrollgruppen.

Weder OmNramp α noch OmNramp β werden also bei einer Infektion mit *M. cerebralis* zu irgendeinem Zeitpunkt der Infektion hochreguliert. Dieser Befund legt die Annahme nahe, dass diese beiden Gene nicht an der Immunabwehr gegen *M. cerebralis* von Seiten des Wirtes beteiligt sind. Ein interessanter Aspekt ist jedoch die Herunterregulierung der Genexpression im empfänglichen Stamm TL im späteren Verlauf der Infektion. In mehreren Studien zeigten Nramp wie auch andere immunregulatorische Gene nach Pathogenexposition ein ähnliches Expressionsmuster (Sadeyen et al., 2004; Sigh et al., 2004; Grayson et al., 2002; Overturf et al., 2006; Holland et al., 2003). Bei der Proliferativen Nierenerkrankung der Salmoniden (PKD), verursacht durch *Tetra-capsula bryosalmonae*, ist nachgewiesen, dass eine fortgeschrittene Erkrankung zu einem erhöhten Cortisolspiegel im Blut führt. Dieses hat wiederum eine Hemmung verschiedener Immunfaktoren und somit eine durch den Parasiten ausgelöste Immunsuppression zur Folge (Holland et al., 2003). Ob und inwieweit die in der vorliegenden Studie beobachtete Erniedrigung der Expression von OmNramp α und β mit vermehrter Glucocorticoidausschüttung zusammenhängt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7.2. Sequenzierung von OmNramp α in drei Regenbogenforellenlinien

Die Bedeutung von Nramp 1 für die Abwehr verschiedener Infektionskrankheiten konnte zum einen in Knockout-Versuchen an Mäusen bewiesen werden, zum anderen zeigten die Sequenzanalysen von Malo et al. (1994) einen direkten Zusammenhang zwischen der Funktionstüchtigkeit des Nramp-Proteins und der Resistenz gegen bestimmte Erreger. Vor allem Inzucht-Mäuselinien zeigen eine in erhöhter Häufigkeit vorkommende Mutation an einer Transmembran-Domäne von Nramp 1, welche offenbar zu einer erheblichen Einschränkung der Funktion des Proteins führt.

Auch bei Fischen ist in Inzuchtpopulationen, wie sie auch bei einigen der hier untersuchten Regenbogenforellen-Linien vorliegen, im Allgemeinen mit einer erhöhten Homozygotie zu rechnen. Nachteilige Mutationen werden durch die

pathogenarme (künstliche) Aufzucht nicht ausgemerzt und können so zu einer vermehrten Krankheitsanfälligkeit führen.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, Nramp α auf cDNA-Ebene in zwei Zuchtpopulationen und einer Wildpopulation von Regenbogenforellen zu sequenzieren, um Ort, Art und Anzahl der Polymorphismen zu definieren und miteinander vergleichen zu können.

Von den beiden bisher bekannten Nramp-Homologen der Regenbogenforelle (Nramp α und Nramp β) wurde für die Sequenzierung Nramp α gewählt. Auch wenn dieses Gen hinsichtlich der Sequenz mehr dem Säugetier-Homologen Nramp 2 ähnelt (Dorschner und Phillips, 1999), zeigen sich hinsichtlich der Gewebsspezifität der Expression größere Gemeinsamkeiten mit Nramp 1. Aus diesem Grunde vermuteten wir auch eine ähnliche Rolle von Nramp α in der Immunabwehr der Forelle.

Es fanden sich einige, jeweils eine Base betreffende variable Positionen, die sich auch innerhalb ein und desselben Tieres in den verschiedenen Klonen voneinander unterschieden (siehe 5.4). Da sich diese Positionen jedoch ausnahmslos außerhalb der funktionalen Einheiten (u.a. den Transportdomänen) des Gens befinden, ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass sie eine entscheidende Rolle für die Expression und Funktion von Nramp α spielen.

Wesentlich interessanter erscheint hier die Deletion, die im amerikanischen Zuchstamm TL in einem Klon gefunden wurde. Da diese Aberration in keinem weiteren Klon festgestellt werden konnte, ist auch an einen technischen Fehler im Sequenziervorgang zu denken. Die flankierenden Basenpaare liegen jedoch innerhalb eines sequenzierten Abschnitts; ein Abbruch des Lesevorgangs bzw. ein „Überspringen“ des Abschnitts, beispielsweise aufgrund einer loop-Struktur, ist also auszuschließen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass diese Sequenz für ein weiteres Nramp-Protein codiert, das in anderen Forellentypen ebenfalls vorkommt, jedoch in dieser Studie aufgrund der begrenzten Anzahl an Klonen nur einmal isoliert wurde. Dagegen spricht, dass der Rest der Sequenz fast zu 100% mit den Sequenzen der anderen Klonen übereinstimmt. Läge hier tatsächlich ein anderes Protein vor, wäre mit einer größerer Diversität zu rechnen (zum Vergleich: Die Sequenzhomologie von Nramp 1 zu Nramp 2

beträgt 78% (Gruenheid et al., 1995), die von Nramp α zu Nramp β jedoch 91% (Dorschner und Phillips, 1999)).

Aufgrund der Länge sowie der Position dieser Deletion, die zwei Transmembran-Domänen ganz bzw. teilweise betrifft, ist mit einer wesentlichen Beeinflussung der späteren Struktur und Funktion des Proteins zu rechnen. Um zu klären, ob diese Aberration tatsächlich regelmäßig in dieser Zuchtpopulation vorkommt und inwieweit dadurch immunologische Vorgänge beeinflusst werden könnten, sind weiterführende Untersuchungen notwendig,

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Nramp-Homologe in der Regenbogen- bzw. Bachforelle hinsichtlich ihrer Rolle bei der Abwehr von *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden, untersucht. Nramp stellt beim Säugetier eine wichtige Komponente des unspezifischen Immunsystems dar, indem es die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen beeinflusst und auf vielfältige Art und Weise die Immunabwehr stimuliert. Bei einigen Pathogenen ist es sogar allein entscheidend für den Verlauf der Infektion. Um den Einfluss von Nramp auf eine Infektion von Forellen mit *Myxobolus cerebralis* zu untersuchen, wurden eine empfängliche amerikanische Regenbogenforellen-Zuchlinie (TL), eine weniger empfängliche deutsche Wildpopulation (WT), sowie (gegen *M. cerebralis* weitgehend resistente) Bachforellen (BT) dem Erreger in einem Expositionsversuch ausgesetzt und danach zu verschiedenen Zeitpunkten zur Gewinnung von Gewebe getötet. Nach der Extraktion der Gesamt-RNA und Umschreibung in die cDNA wurde mit spezifischen Primern die Höhe der Expression von Nramp α und β mittels der real-time-PCR bestimmt und gegen β -Actin normalisiert. Dabei wurde zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Anstieg der Nramp-Homologen in einer der Gruppen beobachtet. Bei zwei Entnahmzeitpunkten wurde ein Absinken des Expressionslevels im Stamm TL gemessen.

Zur Untersuchung von Aberrationen in der Sequenz von Nramp α als mögliche Resistenzursache wurde eine weitere Regenbogenforellen-Linie miteinbezogen (ein deutscher Zuchstamm, der sich in verschiedenen Studien als relativ unempfindlich gegenüber *M. cerebralis* gezeigt hat). Mit spezifischen Primern wurde Nramp α aus der Niere isoliert und sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen ergab nur einige wenige variable Positionen, die stets nur ein Basenpaar betrafen und sich außerhalb der funktionalen Einheiten des Gens befanden. Eine über 154 Basenpaare reichende Deletion in einem Klon eines Fisches des TL-Stammes konnte in keinem weiteren Klon desselben oder eines anderen Tieres festgestellt werden. Inwiefern diese Aberration die Expression und Funktionalität des Gens auf Proteinebene beeinflusst, und ob sie eventuell auch in

anderen Regenbogenforellen-Linien vorkommt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

9. Summary

In the current work, two Nramp homologs in rainbow trout and brown trout were studied regarding its impact on an infection with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of the Whirling Disease of Salmonids. Nramp is an important component of the nonspecific immune system in mammals, as it improves the ability of macrophages to kill pathogens and stimulates the immune response in numerous ways. It even is responsible for the course of infection of some pathogens. To study the impact of Nramp on the infection of trout with *M. cerebralis*, an infection trial was conducted with a susceptible American rainbow trout strain (TL), a less susceptible german wild rainbow trout population (WT), and the resistant brown trout (BT). Afterwards the specimen were killed at several timepoints for tissue sampling. After extraction of total RNA and synthesis of cDNA, the expression of Nramp α and β was measured by real time PCR with specific primers and normalized against β -actin. No significant elevation of expression was measured at any timepoint. A depression in gene expression was detected at two timepoints in the TL strain.

To study aberrations in the sequence of Nramp α as a possible reason for enhanced or declined resistance, a further rainbow trout strain was included: a German hatchery strain also showing enhanced resistance to *M. cerebralis* in different studies. Using specific primers, Nramp α was isolated and sequenced from cDNA of kidney. Comparison of the sequences of the different strains revealed several variable positions of one bp each which were located outside of the functional elements of the gene. A deletion reaching over 154bp was found in one clone of the TL strain, but couldn't be found in another clone of the same or another fish. It has to be clarified in a further study if this aberration has an impact on expression and functionality of the protein, and if this occurs in other rainbow trout strains, too.

10. Literaturverzeichnis

Adkinson MA, Levine RP, Hedrick RP (1997) Investigations into the immune response of rainbow trout to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Proceedings of the Whirling Disease Symposium; Expanding the database: 1996 research progress reports. Logan, Utah, March 6-8

Amlacher E (1992) Taschenbuch der Fischkrankheiten. Grundlagen der Fischpathologie. 6. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart:61-100

Anderson DP (1974) Fish immunology. Diseases of Fishes (Hrsg. Snieszko, Axelrod), Vol. 4, T.F.H. Publications Incorporation, Neptune City

Andree KB, MacConnell E, Hedrick RP (1998) A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ 34(2):145-54

Baldwin TJ & Myklebust KA (2002) Validation of a single round polymerase chain reaction assay for identification of *Myxobolus cerebralis* myxospores. Dis Aquat Organ 49(3):185-90

Barrera LF, Kramnik I, Skamene E, Radzioch D (1997) Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN- γ and infection with BCG. Immunology 82:457-464

Barthel R, Feng J, Piedrahita JA, McMurray DN, Templeton JW, Adams LG (2001) Stable transfection of the bovine NRAMP 1 gene into murine RAW264.7 cells: Effect on *Brucella abortus* survival. Infect Immun 69(5):3110-3119

Barton CH, Whitehead SH, Blackwell JM (1995) Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. Mol Med 1:267-279

Bechara IJ, Youssef NN, Roberts DW (2003) Histologic study of head cartilage degeneration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with the parasite *Myxobolus cerebralis*. J Submicrosc Cytol Pathol. 35(2):111-116

Belouchi A, Cellier M, Kwan T, Saini HS, Leroux G, Gros P (1995) The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. Plant Mol Biol 29(6):1181-1196

Blackwell JM (1996) Structure and function of the natural-resistance associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. Mol Med Today 2:205–211

Blackwell JM, Barton CH, White JK, Roach TI, Shaw MA, Whitehead SH, Mock BA, Searle S, Williams H, Baker AM (1994) Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the Lsh/Ity/Bcg gene story continues. *Immunol Lett* 43(1-2):99-107

Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M (2001) SLC11A1 (formerly NRAMP 1) and disease resistance. *Cell Microbiol* 3(12):773-784

Blackwell JM, Roach TI, Atkinson SE, Ajioka JW, Barton CH, Shaw MA (1991) Genetic regulation of macrophage priming/activation: The Lsh gene story [Review]. *Immunol Lett* 30:241-248

Blazer VS, Densmore CL, Schill WB, Cartwright DD, Page SJ (2004) Comparative susceptibility of Atlantic salmon, lake trout and rainbow trout to *Myxobolus cerebralis* in controlled laboratory exposures. *Dis Aquat Organ* 58(1):27-34

Bradley D (1974) Genetic control of resistance to leishmania donovani. *Nature* 250:353-354

Burge EJ, Gauthier DT, Ottinger CA, Van Veld PA (2004a) *Mycobacterium*-Inducible Nramp in Striped Bass (*Morone saxatilis*). *Infection and Immunity*, Mar.:1626-1636

Burge EJ, Gauthier DT, Van Veld PA (2004b) In vitro response of the stripes bass natural resistance-associated macrophage protein, Nramp, to LPS and *Mycobacterium marinum* exposure. *Comp Biochem Physiol Pt. C* 138:391-400

Buschman E & Skamene E (2001) From Bcg/Lsh/Ity to Nramp 1: Three decades of search and research. *Drug Metab Dispos* 29(4 Pt. 2):471-473

C. elegans Sequencing Consortium (1995) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396):2012-2018

Cavender WP, Wood JS, Powell MS, Overturf K, Cain KD (2004) Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) to identify *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* 60(5):679-91

Cellier M, Govoni G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P (1994) Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 180(5):1741-1752

Cellier M, Shustik C, Dalton W, Rich E, Hu J, Malo D, Schurr E, Gros P (1997) Expression of the human NRAMP 1 gene in professional primary phagocytes: Studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. *J Leukocyte Biol* 61:96-105

Chapes SK, Mosier DA, Wright AD, Hart ML (2001) MHCII, Tlr4 and Nramp 1 genes control host pulmonary resistance against the opportunistic bacterium *Pasteurella pneumotropica*. *J Leukoc Biol* 69(3):381-386

Chen H, Waldbieser GC, Rice CD, Elibol B, Wolters WR, Hanson LA (2002) Isolation and characterization of channel catfish natural resistance associated macrophage protein gene. *Dev Comp Immunol* 26:517-531

Chen SL, Xu MY, Ji XS, Yu GC (2004) Cloning and characterisation of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*). *Fish Shellfish Immunol* 17:305-313

Cooper EL, Grewal IS, Magor BG (1990) Comparative Immunology of the Integument. In: Skin Immune System (Hrsg. Bos):9-24

Dasmahapatra AK, Wimpee BAB, Budsberg KJ, Dorschner MO, Phillips RB, Hutz RJ (2000) Lack of effect of beta-naphthoflavone on induction of Nramp genes in adult rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Mar Environ Res* 50:147-151

Densmore C, Blazer VS, Waldrop TB, Schill WB (1999) Physiological and morphological parameters of juvenile rainbow trout infected with *Myxobolus cerebralis*. 5th Annual Whirling Disease Symposium, February 18-20:27-29

Donovan A, Brownlie A, Dorschner MO, Zhou Y, Pratt SJ, Paw BH, Phillips RB, Thisse C, Thisse B, Zon LI (2002) The zebrafish mutant gene chardonnay (cdy) encodes divalent metal transporter 1 (DMT 1). *Blood* 100:4655-4659

Dörfler C & El-Matbouli M (2007) Isolation of a subtilisin-like serine protease gene (MyxSubtSP) from spores of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *Dis Aquat Organ* 18;73(3):245-251

Dorschner MO, Phillips RB (1999) Comparative Analysis of Two Nramp Loci from Rainbow Trout. *DNA and Cell Biology* 18(7):573-583

Dosik JK, Barton CH, Holiday DL, Krall MM, Blackwell JM, Mock BA (1994) A Nramp-related sequence maps to mouse chromosome 17. *Mamm Genome* 5:458-460

Ellis AE (1988) Ontogeny of the immune system in teleost fish. In: Fish Vaccination, Academic Press, London:21-31

El-Matbouli M & Hoffmann RW (1989) Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. Developing bisporogeny via tubificid worms. *Parasitol Res* 75:461-464

El-Matbouli M & Hoffmann RW (1991) Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by Fumagillin. *Dis Aquat Organ* 10:109-113

El-Matbouli M & Hoffmann RW (1998) Light and electron microscopic study on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* to the actinosporean stage triactinomyxon. *J Parasitol* 84:195-202

El-Matbouli M & Soliman H (2005) Development of a rapid assay for the diagnosis of *Myxobolus cerebralis* in fish and oligochaetes using loop-mediated isothermal amplification. *J Fish Dis* 38(9):549-557

El-Matbouli M (1988) Untersuchungen zum Entwicklungszyklus von *Myxobolus cerebralis* und *Myxobolus cotti* – Übertragung sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde. Dissertationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

El-Matbouli M (1996) Biologie und Entwicklung von *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903 (Myxozoa). Habilitationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

El-Matbouli M, Fischer-Scherl T, Hoffmann RW (1992) Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some *Myxosporea* spp. Important for fresh water fish – a review. *Annual Review of Fish Diseases* 2:367-402

El-Matbouli M, Hoffmann RW, Mandok C (1995) Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cartilage. *J Fish Biol* 46:919-935

El-Matbouli M, Hoffmann RW, Schoel H, McDowell TS, Hedrick RP (1999a) Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 35:1-12

El-Matbouli M, Holstein TW, Hoffmann RW (1998) Determination of the nuclear DNA concentration in cells of *Myxobolus cerebralis* and triactinomyxon spores, the causative agent of whirling disease. *Parasitol Res* 84:694-699

El-Matbouli M, McDowell TS, Antonio DB, Andree KB, Hedrick RP (1999b) Effect of water temperature on the development, release and survival of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* to the actinosporean stage triactinomyxon. *Intern. Journal of Parasitology* 28:195-217

El-Matbouli M, Oucible A, Severin V, Meyer U, Grabner D, Hedrick R (2006) Data on the mechanisms associated with the resistance of Hofer and wild rainbow trout strains to whirling disease. Oral presentation on the 12th Annual Whirling Disease Symposium in Denver, Colorado, February 9th to 10th

- Fevolden S, Refstie T, Roed KH (1992) Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. *Aquaculture* 104:19-29
- Gjedrem T, Salte R, Gjen HM (1991) Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture* 97:1-6
- Govoni G, Canonne-Hergaux F, Pfeifer CG, Marcus SL, Mills SD, Hackam DJ, Grinstein S, Malo D, Finlay BB, Gros P (1999) Functional expression of Nramp 1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun* 67:2225-2232
- Govoni G, Gros P (1998) Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* 47(7):277-84
- Govoni G, Vidal S, Cellier M, Lepage P, Malo D, Gros P (1995) Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp 1 gene in macrophages. *Genomics* 27:9-19
- Griffin B & Davis E (1978) *Myxosoma cerebralis*: Detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can* 35:1186-1190
- Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P (1995) Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* 25:514-525
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 17; 185(4):717-30
- Gunshin H, MacKenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488
- Halliday MM (1973b) Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids II. The development and pathology of *Myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different temperatures. *Nordic Veterinary Medicine* 25:349-358
- Halliday MM (1976) The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids. *J Fish Biol* 9:339-357
- Hedrick RP, El-Matbouli M (2002) Recent advances with taxonomy, life cycle, and development of *Myxobolus cerebralis* in the fish and oligochaete hosts. *American Fisheries Society Symposium* 29:45-53
- Hedrick RP, El-Matbouli M, Atkinson MA, McConnell E (1998) Whirling Disease. Re-emergence among wild trout. *Immunol Rev* 166:365-376

Hedrick RP, McDowell TS, Gay M, Marty GD, Georgiadis MP, MacConnell E (1999a) Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. *Dis Aquat Organ* 37(3):173-183

Hedrick RP, McDowell TS, Marty GD, Mukkatira K, Antonio DB, Andree KB, Bukhari Z, Clancy T (2000) Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies. *Dis Aquat Organ* 42(1):53-59

Hedrick RP, McDowell TS, Mukkatira K, Georgiadis MP, MacConnell E (1999b) Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *J of Aquat Anim Health* 11:330-339

Hofer B (1903) Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. *Allgemeine Fischereizeitung* 28:7-8

Hoffman GL (1970) Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). *Transactions of the American Fisheries Society* 103:541-550

Hoffman GL (1990) *Myxobolus cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease. *J Aquat Anim Health* 2:30-37

Hoffman GL Putz RE (1969) Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. *The Progressive Fish Culturist* 31: 35-37

Hoffman GL, Dunbar CE, Bradford A (1962) Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. U.S Department of the Interior, Special Scientific Report Fisheries 427:15pp

Hoffmann RW, El-Matbouli M, Fischer-Scherl T (1991) Myxozoa als Parasiten des Zentralnervensystems bei Fischen. *Tierärztliche Praxis* 19:324-330

Hoffmann RW, El-Matbouli M, Hoffmann-Fezer G (1991) Nachweis von Antikörpern gegen *Myxobolus cerebralis* bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). In: *Verhandlungsband, Tagung der Fachgruppe Fischkrankheiten der DVG*, 14.-16. Nov. 1990:135-139

Holland JW, Gould CRW, Jones CS, Noble LR, Secombes CJ (2003) The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD). *Parasitology* 126:95-102

Hu J, Bumstead N, Burke D, Ponce de Leon FA, Skamene E, Gros P, Malo D (1995) Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken. *Mamm Genome* 6(11):809-815

Ingram GA (1980) Substances involved in the natural resistance of fish infection- a review. *Journal of Fish Biology* 16:23-60

Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *Exp Med* 192(9):1237-1248

Jabado N, Lam-Yuk-Tseung S, Forbes JR, Gros P (2004) Mouse Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (Nramp1): A key player in host innate immunity against infections. In: *The Nramp Family*, edited by Mathieu Cellier and Philippe Gros, Eurekah.com and Kluwer Academic

Kelley GO, Adkison MA, Leutenegger CM, Hedrick RP (2003) *Myxobolus cerebralis*: identification of a cathepsin Z-like protease gene (MyxCP-1) expressed during parasite development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Exp Parasitol* 105(3-4):201-210

Kelley GO, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Adkison MA, Baxa DV, Hedrick RP (2004) Identification of a serine protease gene expressed by *Myxobolus cerebralis* during development in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* 59(3):235-248

Küppers M (2003): Untersuchungen verschiedener Regenbogenforellenstämme auf *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit der Salmoniden. Dissertationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lang T, Prina E, Sibthorpe D, Blackwell J (1997) Nramp1 transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect Immun* 65:380-386

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 27(1):37-58

Lom J & Dykova I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol (Praha)* 53(1):1-36

Lom J & Hoffman GL (1971) Morphology of the spores of *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903) and *M. cartilaginis* (Hoffman, Putz and Dunbar, 1965). *J Parasitol* 57(6):1302-1308

Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* 35(5):1065-78

Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Cellier M, Schurr E, Fuks A, Bumstead N, Morgan K, Gros P (1994) Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 23(1):51-61

Margolis ML, Kent ML, Bustos P (1996) Diseases of salmonids resembling myxo-sporean whirling disease, and the absence of *Myxosoma cerebralis*, in South America. *Dis Aquat Organ* 6:33-37

Markiw ME & Wolf K (1983) *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa, Myxosporea), etiologic agent of salmonid whirling disease, requires tubificid worms (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *J Protozool* 30:561-564

Markiw ME (1986) Salmonid Whirling Disease: dynamics of experimental production of the infective stage – the triactinomyxon spore. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43:521-526

Markiw ME (1992) Experimentally induced whirling disease II. Determination of longevity of the infective triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* by vital staining. *J Aquat Anim Health* 4:44-47

Mattes M (2004) Untersuchungen zur Empfänglichkeit zweier Regenbogenforellen-Stämme gegenüber *Tetracapsuloides bryosalmonae*, *Yersinia ruckeri* und dem Viralen Hämmorrhagischen Septikämie-Virus. Dissertationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Medina E & North RJ (1996) Evidence inconsistent with a role for the BCG gene (Nramp 1) in resistance of mice to infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 183:1045-1051

Meixner MJ (2004) Untersuchung der Resistenzmechanismen eines Regenbogenforellen-Stamms gegenüber *Myxobolus cerebralis*, dem Erreger der Drehkrankheit. Dissertationsschrift aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mock B, Krall M, Blackwell J, O'Brien A, Schurr E, Gros P, Skamene E, Potter M (1990) A genetic map of mouse chromosome 1 near the Lsh-Ity-Bcg disease resistance locus. *Genomics* 7:57-64

Muñoz P, Álvarez-Pellitero P, Sitjá-Bobadilla A (2000) Modulation of the in vitro activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Fish Shellfish Immunol* 10: 567-581

Nakamura H, Kikuchi S, Shimozawa A (1992) Active involvement of the skin in eliminating nonself materials in the teleost, *Oryzias latipes*. *Dev Comp Immunol* 16:9

- Nakanishi T, Ototake M (1997) Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Developmental Biological Standards* 90:59-68
- Nehring RB, Thompson KG, Taurman K, Atkinson W (2003) Efficacy of passive sand filtration in reducing exposure of salmonids to the actinospore of *Myxobolus cerebralis*. *Dis Aquat Organ* 57(1-2):77-83
- Nehring RB, Thompson KG, Taurman K, Shuler DL (2002) Laboratory studies indicating that living brown trout *Salmo trutta* expel viable *Myxobolus cerebralis* (Myxosporea). *American Fisheries Society Symposium* 29:125-134
- Noga EJ (1996) Whirling Disease (Black tail). In: Duncan LL, Steube M, Wilson BJ (eds.), *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, Mosby-Year Book, INC:183-185
- O'Grodnick JJ (1979) Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) in the United States. *Trans Am Fish Soc* 108:187-190
- Peleteiro MC, Richards RH (1990) Phagozytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 13:225-232
- Plant J, Glynn AA (1976) Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Infect Dis* 133(1):72-78
- Plant JE, Blackwell JM, O'Brien AD, Bradley DJ, Glynn AA (1982) Are the Lsh and Ity disease resistance genes at one locus on mouse chromosome 1? *Nature* 297:510-511
- Plehn M (1905) Über die Drehkrankheit der Salmoniden *Lentospora cerebralis* (Hofer). *Arch Protistenkd* 5:145-166
- Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol Cell Biol* 20(21):7893-7902
- Radzioch D, Kramnik I, Skamene E (1995) Molecular mechanisms of natural resistance to mycobacterial infections. *Circ Shock* 44:115-120
- Rodrigues V, Cheah PY, Ray K, Chia W (1995) Malvolio, the *Drosophila* homologue of mouse NRAMP-1 (Bcg), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *EMBO J* 14(13):3007-3020
- Rose JD, Marrs GS, Lewis C, Schisler G (2000) Whirling disease behaviour and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. *J Aquat Anim Health* 12:107-118

Ryce EK, Zale AV, MacConnell E (2004) Effects of fish age and parasite dose on the development of whirling disease in rainbow trout.
Dis Aquat Organ 59(3):225-233

Saeij JPJ, Wiegertjes GF, Stet RJM (1999) Identification and characterisation of a fish natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) cDNA.
Immunogenetics 50:60-66

Schäperclaus W (1931) Die Drehkrankheit in der Forellenzucht und ihre Bekämpfung. Zeitschrift für Fischerei 29:521-567

Schäperclaus W (1990) Fischkrankheiten. 5. Auflage, Akademie-Verlag, Berlin

Schlegel M, Lom J, Stechmann A, Bernhard D, Leipe D, Dykova I, Sogin ML (1996) Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa related to the bilateria. Arch Protistenkd 147:1-9

Schott A (2002) Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit von Fumagillin und TNP-470 im Rahmen der Bekämpfung der Drehkrankheit bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Dissertation aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Sibthorpe D (2002) Molecular evolution of the solute carrier family 11 (SLC11) protein in the pufferfish, *Fugu rubripes*. Ph.D. thesis. University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Siddall ME, Martin DS, Bridge D, Desser SS, Cone DK (1995) The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria.
J Parasitol 81(6):961-7

Sigh J, Lindenstrøm T, Buchmann K (2004) Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. Fish Shellfish Immunol 17(1):75-86

Skamene E (1994) The Bcg gene story. Immunobiology 191:451–460

Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PAL, St. Charles C, Taylor BA (1982) Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens.
Nature 297:506-510

Skamene E, Schurr E, Gros P (1998) Infection genomics: Nramp 1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections.
Annu Rev Med 49:275-287

Staton L, Erdahl D, El-Matbouli M (2002) Efficacy of Fumagillin and TNP-470 to prevent experimentally induced whirling disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. American Fisheries Society Symposium 29:239-247

Tatner MF, Manning MJ (1985) The ontogenetic development of the reticuloendothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fish Dis 8:35-41

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 18:3-7

Vidal SM, Malo D, Vogan K (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. Cell 73(3):469-485

Vidal SM, Pinner E, Lepage P, Gauthier S, Gros P (1996) Natural resistance to intracellular infections: Nramp 1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp 1 D169) mouse strains. J Immunol 157(8):3559-3568

Wolf K & Markiw ME (1975) Serological identification by indirect fluorescent antibody test. Fish Health 4:8

Wolf K & Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science 255:1449-1452

Wolf K, Markiw ME, Cruz JM, Galhano MH, Eiras J, Herman RL (1981) Non-myxosporidian blacktail of salmonids. J Fish Dis 4:355-357

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner ganzen Familie und meinem Andy ... **für alles!**

Herrn Prof. Dr. Mansour El-Matbouli danke ich für die Überlassung des Themas und für seine engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Göbel danke ich für seine fachlichen Ratschläge.

Bei Dr. Hatem Soliman und Dr. Edit Eszterbauer bedanke ich mich besonders herzlich für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Problemen bzw. Fragestellungen.

Ein herzliches Dankeschön an alle übrigen Mitglieder der Arbeitsgruppe - Christoph Dörfler, Daniel Grabner, Simone Keller, Hamed Coulibaly, Nina Seel, Dennis Kallert, Vanessa Severin, Amine Oucible und M'hamed Oumouna – dafür, dass ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt, für die freundschaftliche Zusammenarbeit, und für die schöne Zeit mit Euch!

Andre Hohenegger danke ich für seine engagierte Hilfe bei der Beschaffung und Hälterung der Versuchsfische.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an die Mitarbeiter der Fachabteilung Fischgesundheit des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V. für die fortwährende Unterstützung und das interessante, lehrreiche und schöne Praktikum, durch das ich „auf den Fisch gekommen“ bin!

Curriculum vitae

Name: Ute Rucker, geb. Meyer

Geburtsdatum: 07.01.1980

Geburtsort: Augsburg

Eltern Dr. Hartmut Meyer und
Ursula Maria Meyer-Reisner

Staatsangeh.: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulausbildung: 1986-1990 Grundschule in Augsburg
1990-1999 Rudolf-Diesel-Gymnasium Augsburg,
neusprachlicher Zweig
1999 Abitur am Rudolf-Diesel-Gymnasium Augsburg

Studium: 1999-2005 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maxi-
milians-Universität München
Feb. 2005 Staatsexamen

Approbation: März 2005

seit April 2005: Doktorandin am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und
Fischkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität
München

seit April 2007: Tierärztin beim Chemischen und
Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, Außenstelle
Heidelberg, Abteilung Fischgesundheitsdienst