

Abschlussbericht

Anschubprojekt: „Gennetzwerke des Phosphormetabolismus von Fischen und fakultativ anaeroben Invertebraten“

Zuwendungsempfänger:	FBN und Universität Rostock
Kooperationspartner:	FBN ¹ und Universität Rostock ²
Vorhabenbezeichnung:	Gennetzwerke des Phosphormetabolismus von Fischen und fakultativ anaeroben Invertebraten
Laufzeit des Vorhabens:	01.10.2022-30.11.2023
Autoren:	T. Goldammer ¹ , M. Verleih ¹ , A. Rebl ¹ , R.M. Brunner ¹ , I. Sokolova ²

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung (ggf. offene Forschungsfragen)	1
2 Einleitung und Ziele des Projektes	1
3 Material und Methoden	3
4 Ergebnisse	5
5 Diskussion	6
6 weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt	6
7 Literaturverzeichnis	7
Danksagung	8
Anhang	8

1. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Für viele in der Aquakultur kultivierte Organismen liegen kaum molekulare Informationen zum P-Haushalt vor. Für die Schonung der P-Ressourcen in der Aquakultur durch Optimierung der Haltungsbedingungen fehlen somit valide Daten. Initiale Analysen im Rahmen einer erfolgreich abgeschlossenen Masterarbeit führten zur Identifizierung putativer Schlüsselmoleküle des P-Metabolismus (Fgf23, Pth1r, Pth2r, Pth3r, Pth4, Stc1, Stc2, Casr, Vdr, Slc34a1, Slc34a2) für die Fischarten Atlantischer Lachs *Salmo salar*, Zander *Sander lucioperca*. Da diese Gene spezifisch für Vertebraten sind, sollten im Rahmen einer zweiten Qualifikationsarbeit Gene für den P-Transport in den Invertebraten Miesmuschel *Mytilus edulis* und Schwarze Tigergarnele *Penaeus monodon* identifiziert werden. Dieses Ziel wurde nicht erreicht, da sich kein Student für die molekularbiologischen Arbeiten am außerhalb Rostocks liegenden FBN fand. Es wurden deshalb die vorhandenen Gene für die Fischarten weiter validiert. Insgesamt konnten für 21 Gene (Zander, 10 Gene; Atlant. Lachs, 11 Gene) funktionsfähige Primersets für funktionale Analysen auf Genexpressionsebene generiert werden. Das Projekt bietet somit eine erste Grundlage für die Analyse des P-Stoffwechsels mit Genexpressionsstudien bei den beiden Aquakulturarten Zander und Atlantischer Lachs. Eine Ausweitung der Suche nach zusätzlichen Genen, die insbesondere am P-Transport beteiligt sind, wird vorgeschlagen. Dies wird künftige vergleichende Vorhersagen über den P-Stoffwechsel zwischen Fischen und Wirbellosen ermöglichen und somit zur besseren Modellierung der P-Verwertung in der Aquakultur von tierischen Organismen beitragen.

2. Einleitung und Ziele des Projektes

Die kontinuierlich steigende Erzeugung von Fischen (ca. 55 Mio t) und Invertebraten (ca. 30 Mio t) in Aquakultur bewirkt eine massive und anhaltende Verlagerung von P-Ressourcen in diese Richtung (Huang et al., 2020). Für viele kultivierte Organismen liegen kaum molekulare Informationen zum P-Haushalt vor. Dies betrifft unter anderem die metabolische Regulation, die Homöostase oder auch die Beeinflussung in typischen Stresssituationen. Für die Schonung der P-Ressourcen in der Aquakultur durch Optimierung der Haltungsbedingungen fehlen somit valide Daten. Mit dem Ansbuchprojekt sollten für ausgewählte Spezies (Atlant. Lachs *Salmo salar*, Zander *Sander lucioperca*, Miesmuschel *Mytilus edulis* und Schwarze Tigergarnele *Penaeus monodon*) im Rahmen einer umfassenden Literatur- und Genomdatenbankanalyse Moleküle (Gene, Proteine) und Signalwege identifiziert werden, welche zur Regulation des P-Haushaltes beitragen. Hierzu erfolgten Analysen mit Hilfe von IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen). Abhängig vom Stand der Genomaufklärung der analysierten Spezies sollten ausgewählte Schlüsselmoleküle in P-Haushalt regulierenden Signalkaskaden für zukünftige funktionale Studien rekrutiert, hinsichtlich ihrer putativen Bedeutung für den P-Metabolismus gewichtet, sequenzanalytisch ausgewertet und teilweise hinsichtlich ihrer Eignung für z.B. Genexpressionsexperimente geprüft werden. Dazu sollten Primer abgeleitet und mit der qRT-PCR evaluiert werden. Zusätzlich sollten die rekrutierten Moleküle hinsichtlich ihrer evolutiven Abstammung und Sequenzhomologie phylogenetisch eingeordnet werden. Im Fokus der Untersuchungen sollten Moleküle stehen, die in den P-Transport involviert und an der Bildung von Polyphosphaten beteiligt sind.

Insgesamt ist eine Vielzahl von Faktoren am Phosphormetabolismus der Vertebraten beteiligt. In der NCBI Datenbank sind ca. 6000 Gene für den Phosphormetabolismus des Menschen hinterlegt und ca.

2500 Gene für den der Teleostei. Die davon für das Projekt ausgewählten Gene bzw. Genfamilien und deren Produkte werden im Folgenden kurz erläutert.

Phosphattransport

SLC34-Transporter-Familie

Zu den wichtigsten Transportern für die Regulation des Pi-Gleichgewichts im Körper zählen die natriumabhängigen Phosphattransporter der SLC34-Familie. Diese Familie hat bei Säugetieren drei Mitglieder, SLC34A1, SLC34A2 und SLC34A3, wovon die ersten beiden auch bei Fischen zu finden sind (Verri & Werner 2019). Aufgrund von zusätzlichen Genomduplizierungsereignissen (engl. Whole Genome Duplication, WGD) in der Evolution kommen die Gene bei den Teleostei insbesondere bei Salmoniden häufiger in duplizierter Form vor (Verri & Werner 2019).

Phosphatregulation

Parathormon Rezeptoren

Die Familie der Parathormone (PTH) ist eine Gruppe strukturell verwandter, sekretierter Peptide, die an der Mineralhomöostase der Knochen und einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen der Wirbeltiere beteiligt sind (Suarez-Bregua et al. 2017a). Diese Peptide vermitteln ihre Wirkung über Membranrezeptoren, die PTH-Rezeptoren (PTHR), welche zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören (Suarez-Bregua et al. 2017).

Mittlerweile weiß man, dass die PTH-Familie bei Fischen eine hohe Komplexität aufweist, die auf WGD Ereignisse in ihrer Evolution zurückzuführen ist (Verri & Werner 2019). Bei den Teleostei sind bisher sechs Gene aus dieser Familie bekannt (PTH1a, PTH1b, PTHLHa, PTHLHb, PTH2, PTH4) (Suarez-Bregua et al. 2017b). Zudem konnten drei PTH-Rezeptoren isoliert werden: PTH1R (PTH1Ra), PTH2R und PTH3R (PTH1Rb) (Rubin & Juppner 1999).

Stanniocalcin

Stanniocalcin (STC) ist ein Polypeptidhormon, das erstmals aus den Stannius-Körperchen (CS) der Teleostei isoliert wurde. Es kommt bei allen Wirbeltieren in zwei Isoformen vor, die von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden, STC1 und STC2 (Schein et al. 2012).

FGF23 und VDR

FGF23, ein sekretorisches Molekül, gehört zur Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs) (Kawai 2016). FGFs sind Proteine mit vielfältigen Funktionen in Entwicklung, Reparatur und Stoffwechsel (Itoh 2010). FGF23 gehört zu den hormonähnlichen FGFs. Diese wurden ausschließlich bei Wirbeltieren identifiziert (Itoh und Konishi 2007). Es spielt eine wichtige Rolle im Phosphat- und Vitamin D- Stoffwechsel, indem es die jeweiligen Konzentrationen im Serum reguliert (Kawai 2016). Es ist bekannt, dass Vitamin D die Expression von FGF23 durch die Aktivierung des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) hochreguliert (Shimada et al. 2004). Aktives Vitamin D bindet an den VDR. Der ligandengebundene VDR bildet ein Heterodimer mit Retinoid-X- Rezeptoren (RXRs) und induziert die Expression von FGF23 im Knochen. Der Vitamin D Rezeptor (VDR) ist ein Mitglied der NR11- Unterfamilie der nuklearen Rezeptoren. Bei den Teleostei wurden zwei verschiedene VDR-Gene identifiziert (Suzuki et al. 2000; Howarth et al. 2008).

Wie oben beschrieben, kann ein effizienter Einsatz von Phosphor in der Aquakultur zu einem nachhaltigeren Umgang mit dieser Ressource beitragen. Eine Studie von Sugiura et al. (2007) hat gezeigt, dass Fische in der Aquakultur lediglich 40 Prozent des Pi aus ihrem Futter aufnehmen. Die

übrigen 60 Prozent gelangen in die umliegenden Gewässer. Diese Zahlen verdeutlichen das Potential der Phosphoreinsparung in der Aquakultur. In dieser Arbeit wurden daher Gene des Phosphormetabolismus zweier Fischarten aus der Aquakultur für zukünftige Genexpressionsstudien identifiziert. Es wurde eine bereits in der Aquakultur etablierte Art, der Atlantische Lachs *Salmo salar*, und eine noch relativ neue, aber an Bedeutung gewinnende Art, der Zander *Sander lucioperca*, untersucht.

Der zur Familie der *Salmonidae* gehörende Atlantische Lachs ist zurzeit der wichtigste Salzwasserfisch in der globalen Aquakultur und macht 32,6 Prozent des erzeugten Fisches aus. 2020 lag die Produktion bei über 2,7 Millionen Tonnen (FAO 2022). Der zur Familie der *Percidae* gehörende Zander ist ein guter Kandidat für die an Bedeutung gewinnende kreislaufbasierte Aquakultur und somit ein Hoffnungsträger für die zukünftige Diversifizierung und den Ausbau der Aquakultur. Derzeit sind die Produktionszahlen noch relativ gering und lagen 2020 bei nur ca. 3000 Tonnen weltweit (FAO 2022).

Die konkreten Projektziele sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Erarbeitung einer Liste von Genen mit potentieller Funktion im P-Metabolismus der Fische;
2. Ableitung spezifischer Primerpaare für die untersuchten Gene;
3. Überprüfung der Primerpaare mittels quantitativer Echtzeit-PCR;
4. Erstellung von Stammbäumen zur Klärung der evolutiven Abstammung der untersuchten Gene.

3. Material und Methoden

Im Projekt kamen übliche aber essentielle genombiologische und molekulare Analysemethoden zum Einsatz. Diese sind hinreichend beschrieben und werden an dieser Stelle deshalb nur aufgelistet wiedergegeben. Weitere Details finden sich in der im Projekt erstellten Masterarbeit (Kölling, 2023).

Auswahl der Gene

Für die Auswahl der Gene wurde zunächst eine Liste mit wichtigen Genen des P-Metabolismus von Vertebraten erstellt. Da tausende Gene daran beteiligt sind, wurde die Auswahl dafür zunächst anhand einer Studie von Just et al. (2018) zur Phosphat- Homöostase beim Hausschwein auf die wichtigsten Gene eingegrenzt. Im Anschluss wurde die Relevanz dieser Gene für den P-Metabolismus der Teleostei überprüft. Als Grundlage diente hier ein Übersichtspaper von Verri und Werner (2019) zum Phosphatgleichgewicht der Teleostei. Es folgte eine Überprüfung in der NCBI Datenbank zur Datenlage der entsprechenden Gene für *S. salar* und *S. lucioperca*. Auf dieser Grundlage wurde eine Liste von Genen erstellt, deren Sequenzen in der Datenbank für beide Arten hinterlegt sind und die eine entscheidende Rolle im P-Metabolismus spielen.

Primerdesign

Primerableitung für die Gene:

Kandidatengene wurden in der NCBI Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) aufgerufen, jeweils längste cDNAs ins FASTA-Format übertragen, Exon-Exon-Grenzen bestimmt, ein Alignment der Sequenzen mit Standardeinstellungen auf der Webseite *genome.jp* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) vorgenommen. Die Exon-Exon-Grenzen wurden anschließend genutzt, um mit dem Programm *PSQ Assay Design* (Biotage AB, Uppsala, Schweden) Primer abzuleiten.

```

NC_050180      CTGATTATGTTTGTGTGCTCCACAGATGGGGTTTGATGGTCCTCTCTCT 7500
XM_036004496 -----ATGGGGTTTGATGGTCCTCTCTCT
                *****

NC_050180      GCACAGGAGCAGATGTACATCCTTTATGAAATCAAACGCAGTGCTACCA 7550
XM_036004496 GCACAGGAGCAGATGTACATCCTTTATGAAATCAAACGCAGTGCTACCA
                *****

NC_050180      GAACCTCTCCAACATTGACCCAGGGTCCACAGGTACAAAACCTGCACAGA 7600
XM_036004496 GAACCTCTCCAACATTGACCCAGGGTCCACAG-----

```

Abb. 2: Ausschnitt des Alignments der cDNA- und der genomischen DNA-Sequenz des Gens *PTH2Ra* von *S. lucioperca*

cDNA Synthese

cDNA wurde aus verschiedenen Geweben der hier untersuchten Fische synthetisiert. Für *S. salar* waren dies Kieme, Leber, Milz, Darm und Kopfniere. Für *S. lucioperca* Niere, Muskel, Kieme, Herz, Milz und Leber. Für die Synthese der cDNA wurde 1 µg der jeweiligen RNA verwendet. Zu jeder Probe wurden 4 µl 5x TransAmp Puffer (Bioline) und 1 µl Reverse Transkriptase gegeben. Die Ansätze wurden gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden sie im Thermocycler (Biometra) vervielfältigt. Die gewählten Einstellungen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Nach der Vervielfältigung im Thermocycler wurde jede Probe mit 80 µl hochreinem Roche-H₂O verdünnt und im Anschluss für die qRT-PCR verwendet.

Quantitative Echtzeit-PCR – qRT-PCR

Die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) erfolgte nach Standardprotokollen (Heid et al. 1996). Sie ermöglicht es, den Verlauf einer PCR in Echtzeit nachzuvollziehen und die entstehenden Nukleotidsequenzen zu quantifizieren. Die Methode beruht auf dem Prinzip einer klassischen PCR. Sie unterscheidet sich dadurch, dass vor Beginn der PCR ein Fluoreszenzfarbstoff zu den Proben gegeben wird, der an die Sequenz bindet. Dieser Farbstoff wird bei der Vervielfältigung wieder mit eingebaut. Durch Fluoreszenzmessungen am Ende jedes Zyklus ist so eine Quantifizierung ohne weitere Analysen und in Echtzeit möglich. Die qRT-PCR erfolgte im Lightcycler® 96 (Roche).

Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen

Es wurden Stammbäume für jedes in dieser Arbeit untersuchte Gen erstellt. Dafür wurden neben den hier untersuchten Fischen, *S. salar* und *S. lucioperca*, Modellspezies verschiedener phylogenetischer Taxa herangezogen, einschließlich terrestrischer Säugetiere (*Mus musculus*), aquatischer Säugetiere (*Monodon monoceros*), Knorpelfische (*Chiloscyllium plagiosum*), Amphibien (*Xenopus tropicalis*), Reptilien (*Zootoca vivipara*) und Vögel (*Gallus gallus*). Zudem wurde für die Gene, die auch bei den *Mytilidae* vorkommen, die kalifornische Muschel *Mytilus californianus* als Vertreter der Wirbellosen herangezogen. Mit Hilfe des Programms *MEGA 11* (Version 11.0.13, *MEGA Software Development Team*) wurden aus den Proteinsequenzen mögliche Stammbäume berechnet.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden anhand einer Literatur- und Genomdatenbankanalyse Gene des P-Metabolismus für den Zander und den Atlantischen Lachs identifiziert. Diese wurden sequenzanalytisch untersucht und auf ihre Eignung für Genexpressionsexperimente geprüft.

Insgesamt wurden 45 wesentliche Gene des P-Metabolismus für weitere Untersuchungen aus einer Gruppe mehrerer 1000 Gene herauskristallisiert über intensive Literatur und Datenbankarbeit. 14 Gene und deren Paraloge konnten im Zander identifiziert werden. 21 Gene und Paraloge konnten im Atlantischen Lachs identifiziert werden. Darauf basierend wurden 26 speziesspezifische qRT-PCR-Primerpaare entwickelt. 11 der qRT-PCR-Primerpaare wurden erfolgreich im Atlantischen Lachs getestet und 10 der qRT-PCR-Primerpaare wurden erfolgreich beim Zander getestet. Für alle betrachteten Gene erfolgte eine phylogenetische Betrachtung und entsprechende Stammbäume wurden erstellt.

Tabelle 1. Validierte Kandidatengene für den Atlantischen Lachs.

Gene symbol	Primer sequence 5'→3' (Sense, Antisense)	PSQ Value [%]	Amplicon length [bp]	GC content [%]
<i>FGF23 like (4)</i>	CCCAATAAGAACAGAAACAAGTGA, GGTTCAGTTCTATGATGTTTCAGCA*	88	110	38,2
<i>FGF23 like (5)</i>	CTATGATGGACAGCAGGAAAGAC*, CGGATTGTTGCTCCACCTGGAA	92	104	48,1
<i>PTH2R like (2)</i>	ACGCACAGGTTTCATCCAGAGG*, TTGTGCCCTGGCTGGGATG	93	135	54,1
<i>PTH3R</i>	CACAGAGGTCAGGCCTATCGT*, TCCTGGCTTCTATGGCTAGACA	91	128	55,5
<i>STC1 (1-3)</i>	AGCCACTTCCCAACAGGTTTT*, CTTGCCCCAGAGATGACCATTC	86	121	55,4
<i>STC</i>	ACAGCCCTCGGATGTGGCTA*, AACTGTTCTTTCACACCCGACG	83	136	52,9
<i>STC2b</i>	CTCTCACTGCAAAACACAGCGG*, TATGACATTTCTGCACAATGCCG	81	145	49,7
<i>STC2</i>	ACAGCTGAGATCCAGCACTGTC*, ACTCCTGTGAGATCAGAGGCC	92	94	53,2
<i>VDR</i>	ACTCCTCAACCACTCACCAGA*, CAGTGAGGACGATGGCTCCAA	86	118	53,4
<i>VDRb (4)</i>	GCTTCAGGCCTCCGGTCCGT*, TAACGACGACGACGGCTCCAA	94	205	57,1
<i>SLC34A2ba</i>	AGTGCCATCATAGAGCTGGATAA*, CTGATCAAAATCTGGTGCAAAACA	88	99	48,5

Tabelle 2. Validierte Kandidatengene für den Zander.

Gene symbol	Primer sequence 5'→3' (Sense, Antisense)	PSQ Value [%]	Amplicon length [bp]	GC content [%]
<i>PTH1R</i>	GGTCATCTTGGGATATTTCCGAC*, CCTTAGAGAACATGGAAAGAGTC	82	151	44,4
<i>PTH2Ra</i>	TCAATCACAAGGACATGCTTACA*, TAATGAGGAAGGGAGACAAGATTT*	93	142	47,9
<i>PTH3R</i>	TCATAATAGTGACTGCACTGATAG*, AAGTGTGAGAGGAACATCCAGG	88	105	45,7
<i>STC1</i>	CTTTTCTGCCAACAGCCCTTCA*, GCTAAATTTGACACTCAGGGTAAA*	88	169	50,3
<i>STC2a</i>	ACTCTCAGGGGAAGTCTTCAT*, CACTCTCTGGAGCTGAAACA	91	130	49,2
<i>CASR</i>	TGTCAGGTTCAATTTCCGAGGTT*, AGCAGTACTCTCCTGCCAATA	90	92	44,6
<i>VDRb</i>	CAAAGGTTTTTTCAGGCGCAGTA*, ACATTGGCATGATGAAAGAGTTCA*	80	149	53
<i>VDRb</i>	CAAAGGTTTTTTCAGGCGCAGTA*, ACATTGGCATGATGAAAGAGTTCA*	80	149	53
<i>SLC34A1b</i>	TCCCTAAAGAGAAAGCAGATAGC*, AAAATGCCTCTCCTCCTCATCC	90	105	46,7
<i>SLC34A2b</i>	TCTGGATTGCTGGACGTTTCAGT*, ACCGAAATGAGTTCCGCAGGG*	93	121	55,4

5. Diskussion

Erstmals erfolgte für die ausgewählten Aquakulturarten eine genomdatenbankbasierte Identifizierung und Evaluierung von Molekülen des P-Metabolismus. Die unikale Bereitstellung molekularer Ausgangsdaten und -materialien dient direkt weiterführenden Projekten im Rahmen des P-Campus, wie zur P-Homöostase oder dem Einfluss von Stress auf den P-Haushalt (in Planung) sowie über Sequenzstrukturanalysen der evolutiven Aufklärung des P-Metabolismus zwischen Invertebraten und Vertebraten. Die Identifizierung von Kandidatengenen für den P-Metabolismus gestaltete sich verhältnismäßig einfach, da für die betrachteten Spezies gut annotierte Genomsequenzen in den Genomdatenbanken vorliegen. Die Referenzsequenz für das Zander-genom wurde im FBN erstellt (Nguinkal et al., 2019) und sämtliche Rohdaten standen und stehen auf den FBN-Servern zur Verfügung. Der Atlantische Lachs besitzt aufgrund einer erst vor etwa 25 Mio Jahren bei Salmoniden stattgefundenen zusätzlichen Gesamtgenomduplikation (Verri & Werner 2019), ein noch zu ca. 20% tetraploides Genom. Dadurch treten neben evolutiv früher entstandenen paralogenen auch zusätzliche ohnologe Genkopien auf, die die Bearbeitung – insbesondere Ableitung genspezifischer Primer – erschwerten und teilweise zunächst unmöglich machten im Rahmen der im Projekt durchgeführten Masterarbeit. Aufgrund dieser Schwierigkeiten erfolgte im Projektverlauf eine Reduktion in der Analyse von vier Spezies auf zwei. Der Fokus des Projektes lag einerseits darauf wesentliche Player im P-Metabolismus zu bearbeiten, damit in funktionalen Studien Änderungen im Stoffwechsel auch messbar gemacht werden können. Andererseits sollten Gene des P-Metabolismus vergleichend auch zwischen Vertebraten und Invertebraten identifiziert werden. Dies gelang zunächst nicht. Eine Ursache dafür ist, dass die abgeleiteten Gene der Fische dem Knochenstoffwechsel zuzuordnen sind. Dies muss in zukünftigen Recherchen für Invertebraten bedacht werden. Zudem sind die Genomsequenzen für die betrachteten Invertebraten (Tigergarnele, Miesmuschel) nur sehr schlecht annotiert in den Datenbanken verfügbar, was aus der Datenrecherche für das Projekt zu den Genomen nicht ersichtlich war. Die Loci der Gene folgen nur teilweise internationalen Gennomenklaturen für Vertebraten, wodurch vergleichende Analysen schwierig sind. Mit ausgewählten Gensequenzen der Vertebraten sind nur selten homologe Abschnitte per BLAST bei den Invertebraten zu finden. Hier muss zunächst eine tiefere Literaturrecherche im Bereich Invertebraten erfolgen, um mit einem direkten und nicht komparativen Ansatz Gene zu identifizieren, die im P-Metabolismus eine Rolle spielen.

Über das Projekt erfolgte eine neue Vernetzung der Meeresbiologie (IfBi) mit der Abteilung Fischgenetik im FBN bzw. der Molekularbiologie und Genetik der Fische (AUF). Für Fische und marine Invertebraten gilt gleichermaßen, dass der natürliche, wie auch der in Aquakultur anthropogen beeinflusste P-Metabolismus weitgehend unbekannt sind. Die synergistische Betrachtung von Genen des P-Metabolismus für bestimmte Spezies dieser taxonomischen Gruppen ermöglichte erste evolutive und phylogenetische Vergleiche und Aufklärung mit anderen Spezies, deren Bearbeitung im P-Campus aus Sicht der Projektbearbeiter erfolgreich erfolgte.

6. weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt

Clara Kölling, 2023. Identifizierung von Genen des Phosphormetabolismus der Fische *Salmo salar* und *Sander lucioperca*, MSc-Arbeit Clara Kölling, 14.03.2023, Universität Rostock, IfBi & FBN Genombiologie. Betreuer: Prof. I. Sokolova, Prof T. Goldammer. (Masterarbeit)

Clara Kölling, Alexander Rebl, Marieke Verleih, Ronald M. Brunner, Inna Sokolova & Tom Goldammer, 2023. Identification of phosphorus metabolism genes of the fish *Salmo salar* and *Sander lucioperca*. Internationales P-Campus Symposium, 9.-10.10.2023, IOW, Warnemünde, Germany. (Poster)

7. Literaturverzeichnis

- FAO (2022) The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* 6 (10): 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Howarth DL, Law SHW, Barnes B, Hall JM, Hinton DD, Moore L, Maglich JM, Moore JT, Kullman SW (2008) Paralogous vitamin D receptors in teleosts: transition of nuclear receptor function. *Endocrinology* 149 (5): 2411–2422. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1256>
- Huang Y, Ciais P, Goll DS, Sardans J, Peñuelas J, Cresto-Aleina F, Zhang H (2020) The shift of phosphorus transfers in global fisheries and aquaculture. *Nat Commun* 11: 355. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14242-7>
- Itoh N (2010) Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 342: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1024-2>
- Itoh N, Konishi M (2007) The zebrafish fgf family. *Zebrafish* 4: 179–186. <https://doi.org/10.1089/zeb.2007.0509>
- Just F, Reyer H, Muráni E, Ponsuksili S, Oster M, Wimmers K (2018) Genetic variants of major genes contributing to phosphate and calcium homeostasis and their association with serum parameters in pigs. *J Appl Genet* 59: 325-333. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0449-2>
- Kawai M (2016) The FGF23/Klotho axis in the regulation of mineral and metabolic homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Invest* 28 (1): 55–67. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0068>
- Kölling C (2023). Identifizierung von Genen des Phosphormetabolismus der Fische *Salmo salar* und *Sander lucioperca*, MSc-Arbeit Clara Kölling, 14.03.2023, Universität Rostock, IfBI & FBN Genombiologie. Betreuer: Prof. I. Sokolova, Prof T. Goldammer. (Masterarbeit)
- Nguinkal JA, Brunner RM, Verleih M, Rebl A, de los Rios-Perez L, Schafer N, Hadlich F, Stueken, M, Wittenburg D, Goldammer T (2019) The First Highly Contiguous Genome Assembly of Pikeperch (*Sander lucioperca*), an Emerging Aquaculture Species in Europe. *Genes* 2019, 10, 708. <https://doi.org/10.3390/genes10090708>
- Rubin DA, Juppner H (1999) Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a Novel Receptor (PTH3R) that is preferentially activated by Mammalian and Fugufish Parathyroid Hormone-related Peptide. *J Biol Chem* 274: 28185–28190. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28185>
- Schein V, Cardoso JCR, Pinto PIS, Anjos L, Silva N, Power DM, Canário AVM (2012) Four stanniocalcin genes in teleost fish: Structure, phylogenetic analysis, tissue distribution and expression during hypercalcemic challenge. *Gen Comp Endocrinol* 175: 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.033>
- Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Segawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113: 561–568. <https://doi.org/10.1172/jci200419081>
- Suarez-Bregua P, Cal L, Canestro C, Rotllant J (2017a) PTH reloaded: a new evolutionary perspective. *Front Physiol* 8: 776. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00776>

Suarez-Bregua P, Saxena A, Bronner ME, Rotllant J (2017b) Targeted Pth4-expressing cell ablation impairs skeletal mineralization in zebrafish. PLoS ONE 12: e0186444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186444>

Sugiura SH, Hardy RW, Roberts RJ (2004) The pathology of phosphorus deficiency in fish - a review. J Fish Dis 27: 255–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00527.x>

Suzuki T, Suzuki N, Srivastava A, Kurokawa T (2000) Identification of cDNAs encoding two subtypes of vitamin D receptor in flounder, *Paralichthys olivaceus*. Biochem Biophys Res Commun 270 (1): 40–45. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2378>

Verri T, Werner A (2019) Type II Na⁺-phosphate Cotransporters and Phosphate Balance in Teleost Fish. Pflügers Arch – Eur J Physiol 471: 193-212. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2239-4>

Danksagung

Wir danken der Lenkungsgruppe des Leibniz-Wissenschaftscampus Phosphorforschung Rostock für die Förderung und das uns entgegengebrachte Vertrauen in den Erfolg des Projektes.