

**Das Globingen-Repertoire
von Amphibien und Teleostiern:
Molekulare Evolution und Analysen zur
Genexpression**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Christine Fuchs
geboren in Ludwigshafen/Rhein

Mainz, 2007

Dekan:

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.2007

1.	Einleitung	1
1.1.	Generelle Merkmale der Globine	2
1.2.	Myoglobin	3
1.3.	Hämoglobin	4
1.4.	Neuroglobin	5
1.5.	Cytoglobin	8
1.6.	Die Evolution der Globine	10
1.7.	Genomprojekte und die Vertebraten-Evolution	11
1.8.	Zielsetzung der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Versuchstiere	19
2.2.	Molekularbiologische Methoden zur Analyse von RNA	19
2.2.1.	Isolierung von RNA	19
2.2.2.	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA	19
2.2.3.	Standard-Gelelektrophorese von RNA	20
2.2.4.	Reverse Transkription von mRNA	20
2.3.	Molekularbiologische Methoden zur Analyse von DNA	20
2.3.1.	Isolierung und Quantifizierung von DNA	20
2.3.2.	Standard-Gelelektrophorese von DNA	21
2.3.3.	Fällung von DNA	21
2.3.4.	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Oligonukleotid-Design	21
2.3.5.	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	22
2.3.6.	PCR-Aufreinigung	22
2.3.7.	Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	22
2.3.8.	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	23
2.3.9.	Standard-Protokoll für die Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.3.10.	Transformierung und Selektion von Bakterienzellen	24
2.3.11.	Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.3.12.	Hydrolyse von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	24
2.4.	Real-Time RT-PCR	24
2.4.1.	Versuchsvorbereitungen	24
2.4.2.	Design der Oligonukleotide	26
2.4.3.	Durchführung der Real-Time RT-PCR	26
2.4.4.	Auswertung der Real-Time RT-PCR	27
2.5.	mRNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	27
2.5.1.	Herstellung digoxygenierter Sonden durch <i>in vitro</i> -Transkription	27
2.5.2.	Analyse der Markierungseffizienz	27
2.5.3.	Durchführung der Hybridisierung in Schnittpräparaten	28
2.5.4.	Whole Mount mRNA <i>in situ</i> -Hybridisierung (WMISH)	29

2.6. Methoden zur Expression rekombinanter Proteine	31
2.6.1. Generierung eines Expressionskonstrukts.....	31
2.6.2. Vortests zur Expression rekombinanter Proteine	32
2.6.2.1. Optimierung der IPTG- bzw. δ -Aminolävulinisäure-Konzentration.....	32
2.6.2.2. Optimierung der Expressionsdauer	33
2.6.2.3. Bestimmung des am besten exprimierenden Bakterienklones.....	33
2.6.2.4. Ermittlung der Aufreinigungsmethode.....	34
2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.6.4. Coomassie-Färbung.....	35
2.6.5. Silbernitrat-Färbung	35
2.6.6. Rekombinante Expression und Aufreinigung von Proteinen	36
2.6.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	36
2.6.8. Spektralanalyse rekombinant exprimierter Globine	37
2.6.9. Protein-Nachweis auf Membranen: Western Blot.....	37
2.6.9.1. Elektrotransfer.....	37
2.6.9.2. Immuno-Detektion des rekombinanten Proteins	37
2.7. In silico-Analysen	38
2.7.1. Datenbanken und Programme.....	38
2.7.2. In silico-Transkriptionsanalysen und Untersuchungen syntäner Genom-Bereiche ..	39
2.7.3. Erstellung von Stammbäumen.....	39
2.8. Puffer und Lösungen	40
3. Ergebnisse	44
3.1. Analyse des Globingen-Repertoirs von <i>Xenopus tropicalis</i>	44
3.1.1. Die phylogenetische Einordnung der <i>Xenopus</i> -Globine.....	44
3.1.2. Die genomische Organisation ausgewählter Globine in <i>Xenopus</i>	46
3.1.3. In silico-Analyse syntäner Globingen-Regionen in Vertebraten	47
3.1.4. In silico-Analyse von GlobinY und Hämoglobin in <i>Xenopus tropicalis</i>	50
3.1.5. Die Hämoglobin-Transkription in der Entwicklung von <i>Xenopus</i>	54
3.1.6. Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von <i>Ngb</i> , <i>Cygb</i> , <i>GbX</i> und <i>GbY</i>	
in <i>Xenopus</i>	56
3.1.7. Differentielle mRNA-Transkription von <i>Ngb</i> , <i>Cygb</i> , <i>GbX</i> und <i>GbY</i> in	
adulten Krallenfröschen	60
3.1.8. Nachweis der mRNA-Transkription ausgewählter Globingene in der Entwicklung	
von <i>Xenopus laevis</i>	63
3.1.8.1. mRNA-Transkriptionsnachweis via RT-PCR.....	63
3.1.8.2. Quantifizierung der Transkription von <i>Ngb</i> , <i>Cygb</i> , <i>GbX</i> und <i>GbY</i> in der	
Entwicklung des afrikanischen Krallenfrosches	66
3.1.9. mRNA-Transkriptionsnachweis durch Whole Mount <i>in situ</i> -Hybridisierungen.....	71

3.1.10.	Rekombinante Protein-Expression von <i>Xenopus tropicalis</i> Ngb, Cygb, GbX und GbY	75
3.1.11.	Spektralanalyse der rekombinant exprimierten Proteine von <i>Xenopus tropicalis</i> ...	79
3.2.	Analyse von Cygb und Ngb in Teleostiern	81
3.2.1.	Duplizierte Cygb-Gene in Teleostiern	81
3.2.2.	Analyse der Gen-Organisation von <i>Cygb-1</i> und <i>-2</i> in Kugelfisken	81
3.2.3.	Phylogenetische Einordnung und molekulare Evolution der paralogen Cytoglobine	84
3.2.4.	Amplifikation und Quantifizierung der Transkription duplizierter Cygb-Gene.....	
	in Teleostiern	87
3.2.4.1.	Amplifikation und Analyse der Cytoglobin-Duplikate	87
3.2.4.2.	Quantifizierung der Transkription von <i>Cygb-1</i> und <i>-2</i> in Teleostier-Geweben	90
3.2.5.	Zelluläre mRNA-Lokalisation von Ngb, <i>Cygb-1</i> und <i>Cygb-2</i> in <i>Danio rerio</i>	92
3.2.5.1.	Zellulärer Nachweis der <i>Ngb</i> -mRNA in <i>Danio rerio</i>	92
3.2.5.2.	Zellulärer Nachweis der <i>Cygb-1</i> und <i>-2</i> -mRNA in <i>Danio rerio</i>	94
3.2.6.	Rekombinante Expression von <i>Danio rerio</i> <i>Cygb-1</i>	95
3.2.6.1.	Herstellung eines Expressions-Konstrukts.....	95
3.2.6.2.	Rekombinante Expression von <i>Danio rerio</i> <i>Cygb-1</i>	95
3.2.6.3.	Spektralanalyse des <i>Cygb-1</i> -Proteins von <i>Danio rerio</i>	97
4.	Diskussion	98
4.1.	Das „phylogenomische Profil“ von Globinen in Vertebraten.....	98
4.1.1.	Neuroglobin in Fischen und Fröschen.....	98
4.1.1.1.	Neuroglobin: konservierter genomischer Kontext seit 420 Millionen Jahren ..	98
4.1.1.2.	Neuroglobin im Sequenzvergleich: ein äußerst stark konserviertes Globin ...	100
4.1.1.3.	Neuroglobin: in Tetrapoden hexakoordiniert.....	102
4.1.1.4.	Neuroglobin wird auch in Amphibien und Teleostiern vorwiegend	
	neuronal transkribiert	104
4.1.2.	Das Neuroglobin-verwandte GlobinX ist auf Amphibien und Teleostier	
	beschränkt	109
4.1.2.1.	Phylogenetische Analysen geben Hinweise auf zwei Globin-Familien	
	im Tierreich.....	109
4.1.2.2.	Der Verlust von GlobinX in Amnioten ist wahrscheinlich auf	
	genomische Rearrangements zurückzuführen.....	111
4.1.2.3.	Zwei GlobinX-Gene in <i>Xenopus tropicalis</i> ?	111
4.1.2.4.	GlobinX: in Amphibien und Teleostiern ubiquitär exprimiert	113
4.1.3.	Fische verfügen über zwei paraloge Cytoglobin-Kopien.....	115
4.1.3.1.	Phylogenetische Analysen bestätigen die Monophylie der Cytoglobine	115
4.1.3.2.	Die Cytoglobin-Duplikate der Teleostier resultieren aus einer	
	Genomduplikation.....	116

4.1.3.3.	Die paralogen Teleostier-Cytoglobine geben noch heute Hinweise auf ihren gemeinsamen Ursprung	118
4.1.3.4.	Die differenten Expressionsmuster von Cygb-1 und Cygb-2 sind mit dem Modell der Subfunktionalisierung kompatibel.....	120
4.1.4.	Das single-copy-Cytoglobin der Frösche ist konserviert.....	122
4.1.4.1.	Cytoglobin ist in fibroblastenähnlichen Zellen und neuronalen Strukturen von <i>Xenopus</i> nachzuweisen	123
4.1.5.	<i>Xenopus</i> besitzt kein Myoglobin.....	125
4.1.6.	GlobinY und die Hämoglobine in <i>Xenopus</i> : Hinweise auf einen gemeinsamen Ursprung.....	127
4.1.6.1.	GlobinY: ein <i>Xenopus</i> -spezifisches Globin mit geringer Konservierung.....	128
4.1.6.2.	Die Hämoglobine von <i>Xenopus</i> sind in einem Cluster angeordnet	129
4.1.6.3.	Die Transkriptionsanalyse der <i>Xenopus</i> -Hämoglobine gibt Hinweise auf ihre Evolution	130
4.1.6.4.	Die Hämoglobin-Transkriptionsanalyse zeigt deutliche Unterschiede während der <i>Xenopus</i> -Entwicklung.....	131
4.2.	Funktionsanalyse und Ausblick	133
4.2.1.	Neuroglobin besitzt eine Funktion in neuronalen Geweben mit hohem Metabolismus	133
4.2.2.	GlobinX: eine Funktion in aquatischen Lebewesen	135
4.2.3.	Cytoglobin in Amphibien und Fischen: Hinweise auf unterschiedliche Funktionen des Globins	136
4.2.4.	GlobinY: eine Funktion im Sauerstoffmetabolismus von Amphibien?.....	138
5.	Zusammenfassung	140
6.	Literaturverzeichnis	142
7.	Anhang	155
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	155
7.2.	Abkürzungscodes der Aminosäuren	156
7.3.	Genetischer Standardcode der DNA.....	157
7.4.	IUPAC-Code für degenerierte Nukleotide	157
7.5.	Eingesetzte Oligonukleotide.....	158
7.6.	Protein-Standardmarker	163
7.7.	Speziesnamen und Accession-Nummern	163
7.8.	Alignments.....	165
7.8.1.	Zu Abbildung 7	165
7.8.2.	Zu Abbildung 12	167
7.8.3.	Zu Abbildung 26A	169
7.8.4.	Zu Abbildung 26B1 & B2.....	171
7.8.5.	AS-Alignment von Neuroglobin.....	173

7.8.6.	AS-Alignment von Cytoglobin	173
7.8.7.	AS-Alignment von GlobinX	174
7.8.8.	AS-Alignment von GlobinY und Cytoglobin.....	174
7.8.9.	Zu 3.2.6.1: <i>Danio rerio</i> Cygb-1	175
7.9.	EST-Einträge ausgewählter Globine in <i>Xenopus</i>	176
7.10.	Materialien zur quantitativen Real-Time RT-PCR in <i>Xenopus</i>	177
7.10.1.	Quantifizierung der Gesamt-RNAs von <i>Xenopus laevis</i>	177
7.10.2.	Eingesetzte Oligonukleotide	177
7.10.3.	R ² -Werte, Steigung und PCR-Effizienz der Real-Time PCR von <i>Xenopus</i>	177
7.10.4.	Real-Time PCR-Ergebnisse für Ngb, Cygb, GbX und GbY von <i>Xenopus</i>	178
7.11.	Materialien zur Whole Mount <i>in situ</i>-Hybridisierung in <i>Xenopus</i>	180
7.11.1.	Oligonukleotide zur Generierung der Sonden und deren Länge	180
7.11.2.	„Dot-Blot“-Analyse der in die WMHIS eingesetzten Sonden.	180
7.11.3.	Sondenmenge in der WMHIS	181
7.12.	Alignments zur rekombinanten Globin-Expression in <i>Xenopus</i>.....	181
7.13.	Klonierungsstrategie zur rekombinanten Expression von Globinen.....	183
7.14.	Eingesetzte Vektoren	184
7.15.	Entwicklungsstadien von <i>Xenopus laevis</i>	186
7.16.	Identitäten/Similaritäten der Teleostier-Cytoglobine	190
7.17.	Materialien zur Real-Time RT-PCR von Cygb in Teleostiern	191
7.18.	Übersicht über das Gehirn von <i>Danio rerio</i> in einer lateralen Aufsicht	192
7.19.	Liste der in dieser Arbeit aufgeführten Gene.....	192
8.	Publikationen	200

1. Einleitung

»Dieser Kelch ist der Neue Bund in meinem Blut, das für Euch vergossen wird.«

(Bibel, Markus 14, 12-26)

»Blut ist ein ganz besonderer Saft.«

(Goethe, 1808: Faust. Der Tragödie erster Teil)

»Mein Blut soll dein Blut und dein Blut soll mein Blut sein! Ich werde das deinige und du wirst das meinige trinken. Intschu tschuna, der größte Häuptling der Apachen, der mein Vater und Erzeuger ist, wird es mir erlauben!« Intschu tschuna reichte uns seine Hände und sagte in einem von Herzen kommenden Tone: »Ich erlaube es. Ihr werdet nicht nur Brüder, sondern ein einziger Mann und Krieger mit zwei Körpern sein. Howgh! «

(Karl May, 1893: Winnetou)

Bereits in der Antike wurde „Blut“ mit „Lebenskraft“ gleichgesetzt und in der Bibel wie der heutigen Literatur nimmt das Blut eine herausragende und oft mystische Stellung ein. Dies erscheint vor der Beobachtung, dass mit dem Verlust einer größeren Blutmenge bei Mensch und Tier der Tod eintritt, nur zu logisch: Blut ist lebensnotwendig. Rein wissenschaftlich betrachtet ist Blut eine Suspension aus zellulären Bestandteilen und Plasma, das mit Unterstützung des Herz-Kreislaufsystems in der Lage ist, die Funktionalität der restlichen Körpergewebe über mannigfaltige Transport- und Verknüpfungsfunktionen sicherzustellen (Welsch, 2006).

Neben anderen Eigenschaften beruht die Lebensnotwendigkeit des Blutes auf seiner Fähigkeit, gasförmige Liganden zu transportieren: Luftsauerstoff wird an Hämoglobin gebunden, welches als eisenhaltiges Metalloprotein in den Erythrozyten die rote Farbe des Blutes bedingt (Dickerson und Geis, 1983). Sowohl in den Zellen der quergestreiften Skelettmuskel als auch des Herzmuskels wird der Sauerstoff dann auf Myoglobin, ein weiteres Metalloprotein übertragen und von diesem innerhalb der Zelle zu den Mitochondrien transportiert, wo er bei Bedarf freigesetzt und metabolisiert wird (Wittenberg und Wittenberg, 2003). Das im Stoffwechsel entstehende, in größeren Mengen toxisch wirkende Kohlendioxid wird wiederum an Hämoglobin gebunden, über das Blut zur Lunge transportiert und dort über die Atmung freigesetzt. Neben ihrer bekanntesten Funktion als Transporter gasförmiger Liganden zur Aufrechterhaltung des oxidativen Stoffwechsels wurden in den letzten Jahren auch weitere Funktionen der Globine beschrieben (Gardner et al., 1998; Sowa et al., 1998; Minning et al., 1999; Flögel et al., 2001). Beispielsweise wurde für Myoglobin eine enzymatische Funktion als detoxifizierende NO-Dioxygenase nachgewiesen, die NO zu Nitrat metabolisiert und somit eine Schädigung der Zellkompartimente durch dieses Radikal verhindert (Brunori et al., 1999; Flögel et al., 2001; Wittenberg und Wittenberg, 2003; Gardner, 2005; Göde-

cke, 2006). NO wird enzymatisch durch NO-Synthasen gebildet und spielt als gasförmiger Transmitter eine zentrale Rolle in grundlegenden Prozessen wie beispielsweise der Kontrolle des Blutdruckes, der Stärke der Herzkontraktion und der Neubildung von Blutgefäßen (Gödecke, 2006). Aufgrund seiner Eigenschaft als Radikal kann es jedoch Zellkompartimente schädigen, weshalb es schnellstmöglich gebunden und unschädlich gemacht wird (Brunori et al., 1999). Diese enzymatische Wirkung unter Zuhilfenahme von Sauerstoff wird als eine ursprüngliche Funktion der Globine von Bakterien, Nematoden und Hefen gesehen (Moens et al., 1996; Gardner et al., 1998; Liu et al., 2000; Vinogradov et al., 2006).

Neben diesen neuen Funktionen altbekannter Globine wurden in den letzten Jahren weitere, bisher unbekannte Globine entdeckt. So erweiterten das im Jahr 2000 erstmals beschriebene Neuroglobin (Burmester et al., 2000) und das 2002 entdeckte Cytoglobin (Burmester et al., 2002) die Superfamilie der Globine in Vertebraten.

1.1. Generelle Merkmale der Globine

Hämoglobin, Myoglobin, Neuroglobin und Cytoglobin repräsentieren Proteine, die sich nach der heute bekannten Phylogenie wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entwickelten, das bereits in einem letzten gemeinsamen Vorfahren vor etwa 1,8 Milliarden Jahren existierte (Hardison, 1996; Freitas et al., 2004). Als generelles Merkmal weisen die Globine die Fähigkeit der Ligandenbindung mittels eines Eisenions auf. Dieses Prinzip ist phylogenetisch sehr alt und in solch unterschiedlichen Proteinen wie dem Leghämoglobin der Pflanzen (Kundu und Hargrove, 2003) aber auch dem bereits angesprochenen Hämoglobin der Vertebraten verwirklicht.

Seit rund 40 Jahren sind die Globine ein intensiv erforschtes Beispiel zur Analyse der Proteinstruktur: Am Myoglobin des Pottwals *Physeter catodon* führte John Kendrew 1959 erstmals eine Röntgenstrukturanalyse an einem Protein durch und konnte dessen Struktur aufklären (Kendrew, 1959). Basierend darauf erforschte Max Perutz die Struktur des Hämoglobins (Perutz, 1964a, b). Beide Forscher erhielten für diese Arbeiten den Nobelpreis für Chemie.

Gemein ist den Globinen ihre kleine, globuläre Form aus etwa 140-150 Aminosäuren. Diese formieren sich in acht rechtsgängigen α -Helices (A-H) zu einer charakteristischen „drei-über-drei-Sandwichstruktur“ (Abbildung 1A), wodurch im Inneren des Proteins hauptsächlich unpolare, hydrophobe Aminosäuren zu liegen kommen (Kendrew, 1963; Perutz, 1964b; Dickerson und Geis, 1983; Bolognesi et al., 1997). Die Ausnahme bilden die als „distales“ Histidin an der helikalen Position E7 (der siebten Aminosäure der E-Helix) und als „proximales“ Histidin an Position F8 bezeichneten Aminosäuren. Der hydrophile Rest des proximalen Histidins vermittelt den Kontakt zu der prosthetischen Häm-Gruppe. In dieser liegt zentral in einem Porphyrinring aus vier Pyrrolgruppen ein zweiwertig positiv geladenes Eisen-Ion als Metallokomponente eingebettet (Abbildung 1B).

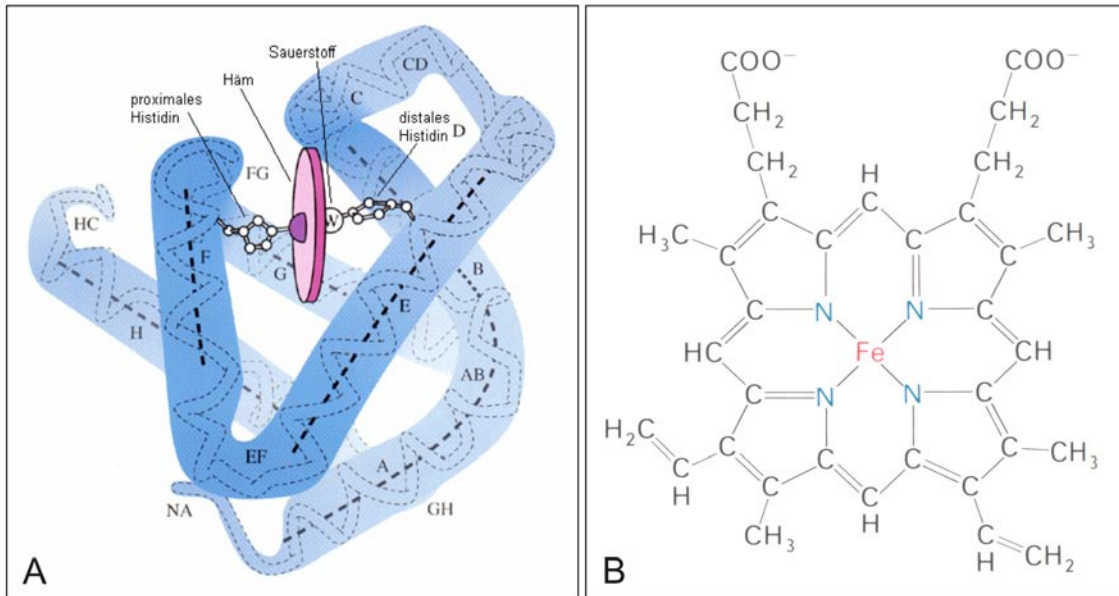


Abbildung 1:

Die dreidimensionale Struktur des Myoglobins (A) und die Hämgruppe der Globine (B).

Das monomere Myoglobin setzt sich aus acht rechtsgängigen α -Helices (A-H) und der violett gekennzeichneten Häm-Gruppe zusammen. Die Lage des proximalen und distalen Histidins in dem pentakoordinierten Molekül ist angegeben, „W“ repräsentiert die Ligandenbindungsstelle (nach <http://chemlearn.chem.indiana.edu/bcce/default.htm>). Die Hämgruppe besteht aus einem Protoporphyrinring mit einem zentralen Fe(II)-Ion (Stryer, 1997).

Bei Häm- und Myoglobin ist die sechste Bindungsstelle des Fe²⁺-Ions ungebunden und kann direkt von einem gasförmigen Liganden besetzt werden (Abbildung 1B): diese Bindungseigenschaft des Eisen-Ions wird als „Pentakoordination“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu konnte für Neuroglobin und Cytooglobin eine so genannte „hexakoordinierte“ Bindung gezeigt werden, in der die sechste Bindungsstelle des Fe²⁺-Ions im Deoxyzustand von dem distalen Histidin E7 belegt ist (Dewilde et al., 2001; Pesce et al., 2003; Vallone et al., 2004a) und zur Bindung eines externen Liganden erst gelöst werden muss. Die Hexakoordination war bereits aus Pflanzen, Bakterien und Invertebraten bekannt, mit Neuroglobin wurde sie erstmals auch in Vertebraten nachgewiesen (Kundu et al., 2003). Ob die Hexakoordination des Eisens in Vertebraten lediglich ein Relikt der Evolution darstellt oder eine tatsächliche Funktion besitzt, ist umstritten. Eine denkbare Funktion stellt beispielsweise die Vermittlung einer temperaturunabhängigen Ligandenbindung (Kiger et al., 2004) dar, die besonders für poikilotherme Tiere von Bedeutung sein könnte (Hankeln et al., 2005).

1.2. Myoglobin

Das humane Myoglobin besteht aus 153 Aminosäuren, die das monomere Protein von ca. 17 kDa bilden. Myoglobin findet sich hauptsächlich im Skelett- und Herzmuskel, wo es als temporärer Sauerstoffspeicher dient, der die O₂-Versorgung der Mitochondrien aufrecht erhält (Wittenberg und Wittenberg, 1989) und die intrazelluläre Diffusion des Sauerstoffes erleichtert (Wittenberg

und Wittenberg, 2003). Durch die Bindung bzw. Freisetzung von O₂ ist es zudem in der Lage, Schwankungen der Sauerstoffkonzentration im Muskelgewebe kurzfristig auszugleichen (Ordway und Garry, 2004). Zudem wurde für Myoglobin eine enzymatische Funktion als NO-Dioxygenase nachgewiesen, die NO zu Nitrat oxidiert (Brunori et al., 1999; Flögel et al., 2001; Wittenberg und Wittenberg, 2003; Gardner, 2005; Gödecke, 2006). Mit einem Halbsättigungswert von P₅₀=1 Torr (Dickerson und Geis, 1983) liegt die Affinität dieses Globins für Sauerstoff deutlich höher als die von Hämoglobin (P₅₀=26 Torr, (McCarthy, 1943)), wodurch die O₂-Aufnahme aus dem Blut in die Muskelzellen begünstigt wird. Bei sinkendem pH-Wert, der beispielsweise aus einer steigenden Lactat-Konzentration unter anaeroben Bedingungen in einem stark beanspruchten Muskel resultieren kann, verringert sich die Affinität von Myoglobin zu Sauerstoff, so dass dieser leichter freigesetzt wird (Giardina et al., 1996). Weiterhin dient Myoglobin als Radikalfänger reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) im quergestreiften Skelettmuskel (Flögel et al., 2001). In diesen sehr mitochondrienreichen Muskeln entstehen im Zuge der Energiegewinnung durch Zellatmung permanent freie Radikale. Auch hypoxische bzw. hyperoxische Zustände führen vermehrt zu deren Entstehung. Die Radikale eignen sich durch die Reduktion von Proteinen, Lipiden oder DNA die ihnen fehlenden Elektronen an und bewirken dabei massive intrazelluläre Schädigungen. Myoglobin konnte bisher im Herz- und Skelettmuskel nahezu aller Vertebraten nachgewiesen werden. Die Ausnahme bilden einige antarktische Eisfische, die Myoglobin ausschließlich in geringen Spuren im Herzmuskel aufweisen (Sidell et al., 1997; Moylan und Sidell, 2000) und die Krallenfrösche, in denen das Protein bisher überhaupt nicht detektiert wurde (Baylor und Pape, 1988). Eine mögliche Erklärung für das tolerierte Fehlen des als so wichtig erachteten Myoglobins lieferte die Generierung einer Myoglobin-knock out-Maus (Garry et al., 1998), die kompensatorische Mechanismen wie beispielsweise eine höhere Kapillarendichte erkennen ließ und somit den Myoglobin-Mangel eventuell ausgleichen konnte (Gödecke et al., 1999).

1.3. Hämoglobin

Die Untereinheiten des heterotetrameren Hämoglobins der Vertebraten ähneln in ihrer Grundstruktur dem monomeren Myoglobin. Jede Untereinheit des menschlichen adulten Hämoglobins besteht aus 141 bzw. 146 Aminosäuren und bedingt so die molekulare Masse des Proteins von etwa 64 kDa. Im Verlauf der Entwicklung vom Embryo zum Adultus werden in Mammaliern mehrere verschiedene Untereinheiten gebildet, deren Sauerstoffbindekapazität deutlich variiert (Dickerson und Geis, 1983). Durch diese Variation der Zusammensetzung differenter Untereinheiten kann sich der Organismus optimal an die unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen während seiner Entwicklung anpassen (Dickerson und Geis, 1983). Auch Hämoglobin konnte bisher in nahezu allen Vertebraten nachgewiesen werden, lediglich einige antarktische Eisfisch-Spezies sind durch die komplette Deletion des β -Hämoglobin-Gens und einen partiellen Verlust des α -Hämoglobin-Gens nicht länger in der Lage, diese Proteine zu exprimieren (Ruud, 1954; Zhao et al., 1998; di

Prisco et al., 2002; Pisano et al., 2003). Die Affinität zu O₂ ist im nativen humanen Hämoglobin mit P₅₀=26 Torr deutlich geringer als die des Myoglobins. Die Bindung wie auch die Abgabe von Sauerstoff erfolgt im allosterischen Hämoglobin kooperativ. Zusätzlich ist die O₂-Affinität von pH-Wert und CO₂-Konzentration im Blut abhängig: dieses als Bohr-Effekt bekannte Phänomen begünstigt eine Abgabe von Sauerstoff bei sinkendem pH-Wert, der insbesondere in beanspruchten Muskelzellen bei anaerober Energiegewinnung durch die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat bei steigenden CO₂-Konzentrationen hervorgerufen wird.

1.4. Neuroglobin

Die Identifikation von Neuroglobin (Ngb) gelang im Jahr 2000 ursprünglich *in silico* in der EST-Datenbank des menschlichen Genoms (Burmester et al., 2000). Bisher konnte dieses Globin in zahlreichen Mammaliern wie Maus, Ratte, Hund, Schwein und Rind experimentell nachgewiesen werden. Auch das Haushuhn als Vertreter der Vögel und Teleostier verfügen über eine Kopie des Gens (Burmester et al., 2000; Awenius et al., 2001; Reuss et al., 2002; Gillemans et al., 2003; Kugelstadt et al., 2004). Im Vergleich zu den Aminosäuresequenzen von Myoglobin (Mb) und Hämoglobin (Hb) zeigt Neuroglobin lediglich eine Identität von 20-25% (Burmester et al., 2000). Der Vergleich des humanen Neuroglobins mit dem orthologen Protein der Maus zeigt hingegen nur einen Unterschied von 6% (Burmester et al., 2004) und belegt die hohe Konservierung dieses Globins während der Säugerevolution. Die Aminosäuresubstitution beträgt mit $0,4 \times 10^{-9}$ lediglich ein Drittel der für Hämoglobin berechneten Rate und zeigt, dass das Neuroglobin-Gen einer starken reinigenden Selektion unterliegt (Burmester und Hankeln, 2004; Wystub et al., 2004; Roesner et al., 2005).

Strukturell ähnelt das monomere Neuroglobin dem Myoglobin. Die charakteristischen, an der Häm- und Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren (Pesce et al., 2003) sind in den Neuroglobin-Proteinen aller bisher analysierten Spezies erhalten. Das Protein der Mammalier besteht aus 151-160 Aminosäuren und bildet aus acht α -Helices die für Globine charakteristische drei-über-drei-Struktur aus (Burmester et al., 2000; Pesce et al., 2003). Insertionen und Deletionen beschränken sich auf das N- bzw. C-terminale Ende des Globins (Burmester et al., 2004). Neben diesen Ähnlichkeiten zu Myoglobin zeigt Neuroglobin aber auch strukturelle Besonderheiten auf: in der kristallinen Struktur des Proteins konnte die Existenz relativ großer, intramolekularer Hohlräume nachgewiesen werden (Pesce et al., 2003), die möglicherweise die molekulinterne Diffusion von gasförmigen Liganden und deren Speicherung beeinflussen könnten (Vallone et al., 2004a) und in dieser Form weder in Myo- noch Hämoglobin vorkommen. Zudem zeigt das Deoxy-Neuroglobin der Mammalier – im Gegensatz zu Myo- und Hämoglobin – eine Hexakoordination des Eisen-Ions (Abbildung 2). Diese Konformation konnte zwar bereits für Globine von Pflanzen, Bakterien und Invertebraten gezeigt werden (Kundu et al., 2003), war jedoch bei Vertebraten unbekannt. Die Bindung des proximalen und distalen Histidins an das zentrale Eisenion des Deoxy-Neuroglobins

führt zu einer biphasischen Kinetik der Ligandenbindung: die Verdrängung des distalen Histidins E7 als internen Liganden stellt dabei den limitierenden Faktor dar. Die nachfolgende Bindung eines externen gasförmigen Liganden erfolgt hingegen aufgrund der hohen Affinität des Eisenions schnell (Dewilde et al., 2001; Pesce et al., 2002; Kundu et al., 2003; Pesce et al., 2005). Für Neuroglobin konnte die reversible Bindung von Sauerstoff experimentell gezeigt werden (Burmester et al., 2000; Trent et al., 2001). Die Affinität des humanen Neuroglobins gleicht mit $P_{50}=1$ Torr der des Myoglobins (Dewilde et al., 2001) und ist nahezu unabhängig von der Temperatur (Kiger et al., 2004; Hankeln et al., 2005), nicht jedoch vom pH-Wert (Fago et al., 2004a). Neben O_2 können auch CO bzw. NO an Neuroglobin binden (Kriegl et al., 2002; Brunori et al., 2005). Die Bindung eines gasförmigen Liganden führt jeweils zu einer internen Konformationsänderung des Häms und bedingt eine Änderung der Proteinstruktur (Pesce et al., 2003; Vallone et al., 2004b). Dies modifiziert molekulintern die Affinität von Neuroglobin zu dem gasförmigen Liganden (Pesce et al., 2003; Vallone et al., 2004b) und könnte als eine Art „Feinregulation“ dienen.

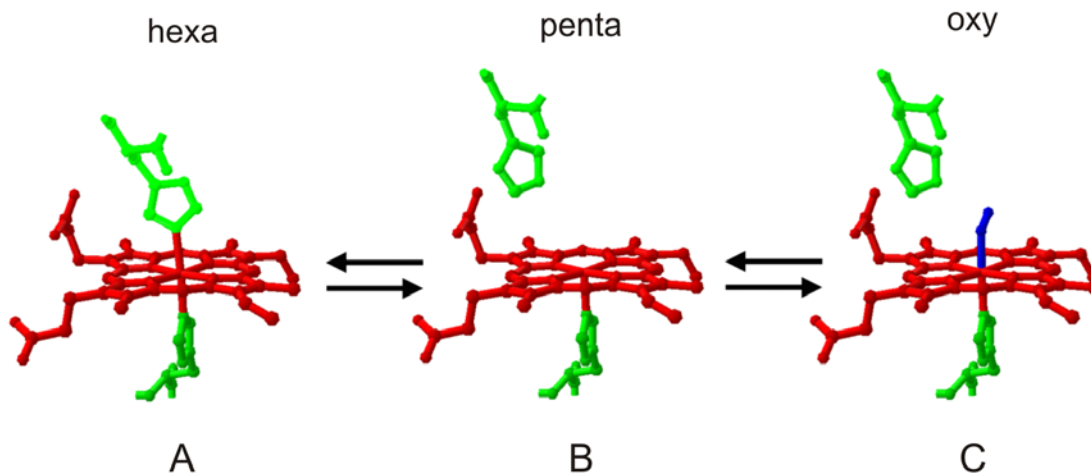


Abbildung 2:

Koordination des Häms in hexa- und pentakoordinierten Globinen.

(A) stellt das vom distalen (oben) bzw. proximalen (unten) Histidin fixierte hexakoordinierte Häm im deoxygenierten Neuro- bzw. Cytoglobin dar; (B) zeigt das pentakoordinierte Häm im deoxy-Myoglobin und (C) repräsentiert ein oxygeniertes Globin. Die Häm-Gruppe ist rot dargestellt, die Histidine grün und der (Sauerstoff-)Ligand blau (nach Hankeln et al., 2005).

Das rekombinant exprimierte Maus-Neuroglobin liegt als Monomer vor (Dewilde et al., 2001). Für das humane Neuroglobin konnte *in vitro* die Bildung molekulinterner Disulfidbrücken gezeigt werden, die unter reduzierenden Bedingungen in der Zelle gespalten werden können und die O_2 -Affinität von Neuroglobin um den Faktor 10 verringern (Hamdane et al., 2003). Die damit verbundene, leichtere Freisetzung von Sauerstoff könnte eventuell zur Minderung hypoxischer Zustände im Zellinneren beitragen. Da die zur Ausbildung von Disulfidbrücken notwendigen Aminosäuren jedoch bereits innerhalb der Mammalier-Neuroglobine nicht durchgehend konserviert sind, erscheint diese Hypothese spekulativ.

Bei Maus und Ratte konnte die Expression von Neuroglobin vorwiegend im Cytoplasma von Neuronen des Zentralen und Peripheren Nervensystems gezeigt werden; ein weiterer prominenter

Expressionsort ist die Retina (Burmester et al., 2000; Sun et al., 2001; Mammen et al., 2002; Reuss et al., 2002; Zhang et al., 2002; Geuens et al., 2003; Schmidt et al., 2003; Wystub et al., 2003; Laufs et al., 2004; Hankeln et al., 2005). Andere Mammalier wie die Klappmützenrobbe *Cystophora cristata* und die Blindmaus *Spalax ehrenbergi* hingegen exprimieren Neuroglobin auch in Gliazellen (Mitz, Gerlach, Reuss, Hankeln und Burmester, unveröffentlicht). In Maus und Ratte wurde Neuroglobin per Immunfluoreszenz in unterschiedlichen Verteilungen beobachtet: die Beobachtungen reichten von einem positiven Nachweis in nahezu jedem Neuron mit allerdings unterschiedlichen Expressionsstärken in verschiedenen Gehirnregionen (Reuss et al., 2002; Wystub et al., 2003) bis hin zu einem ausschließlich fokalen Nachweis des Proteins (Mammen et al., 2002; Geuens et al., 2003). Generell sind jedoch hohe Konzentrationen von Neuroglobin mit besonders stoffwechselaktiven Geweben korreliert. Dies gilt in besonderem Maß für die Retina, die als ein besonders stark energieverbrauchendes Gewebe bekannt ist (Anderson, 1968). Außerhalb des Gehirns und der Retina konnte Neuroglobin in endokrinen Geweben wie der Nebenniere, der Adenohypophyse, dem Hoden und den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse von Mammaliern detektiert werden (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002; Geuens et al., 2003).

Das Vorkommen von Neuroglobin in allen Vertebraten lässt auf eine wichtige, konservierte Funktion dieses Proteins schließen. Seit seiner Entdeckung wurden daher zahlreiche mögliche Funktionen diskutiert (Burmester und Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005; Brunori und Vallone, 2007). Die Überlegung, dass Neuroglobin – ähnlich wie Myoglobin – eine Funktion als Sauerstoffspeicher besitzen oder aber die Diffusion von O₂ zu den Mitochondrien hin erleichtern könnte (Burmester et al., 2000), erscheint angesichts der eher geringen Gesamtkonzentration von 1 µM im Gehirn als unwahrscheinlich (Burmester et al., 2000). In den Neuronen der Retina von Mammaliern konnte mit 100 µM hingegen eine deutlich höhere Konzentration nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2003), die den Bereich der Konzentration von Myoglobin mit 100 bis 400 µM erreicht (Wittenberg und Wittenberg, 1989) und damit eine O₂-versorgende Funktion von Neuroglobin in der Retina durchaus ermöglichen würde. Da Neuroglobin im Gehirn jedoch zum Teil fokal exprimiert wird, ist auch hier von einer wesentlich höheren Konzentration in einzelnen Neuronen auszugehen. Die Funktion als zumindest kurzfristiger Sauerstoffspeicher oder -Transporter ist daher für Neuroglobin denkbar. Problematisch für eine solche Funktion sind jedoch die Befunde einer schnellen Autooxidation des enzymatisch aktiven Neuroglobins (Fe²⁺) hin zu einem inaktiven Met-Neuroglobin (Fe³⁺) (Dewilde et al., 2001). Hier fehlt bislang die Beschreibung einer passenden Reduktaseaktivität für Neuroglobin. Eine mögliche Funktion von Neuroglobin als O₂-Sensor scheint hinsichtlich der internen Konformationsänderung des Proteins unter hypoxischen Bedingungen denkbar: die Mobilität innerhalb des Proteins könnte der Zelle auf einem bisher unbekanntem Weg den Sauerstoffmangel signalisieren (Vallone et al., 2004b; Brunori et al., 2005). Weiterhin wird für Neuroglobin eine entgiftende Rolle für reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies angedacht (Herold et al., 2004). In geringen Mengen besitzen diese eine wichtige Rolle als sekundäre Botenstoffe, in höheren Konzentrationen, wie sie beispielsweise bei Reperfusionen nach Ischämien auf-

treten, bewirken sie jedoch oxidativen Stress in der Zelle. Sie werden daher von endogenen Faktoren streng kontrolliert (Freitas et al., 2002). Myoglobin wird eine Schutzfunktion vor reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies zugeordnet (Flögel et al., 2004) und Neuroglobin könnte eine analoge Funktion besitzen. Da bereits kurzfristige Schwankungen der Sauerstoffkonzentration massive Schädigungen von Neuronen in betroffenen Hirnarealen bewirken, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen zur Veränderung der Neuroglobin-Expression unter Hypoxie und Ischämie in Mammaliern durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass Neuroglobin in den Gehirnen von Nagern, die als adulte Tiere kaum hypoxischen Zuständen ausgesetzt sind, nicht signifikant erhöht exprimiert wird (Mammen et al., 2002; Hundahl et al., 2005; Li et al., 2006). Dahingegen zeigen die Gehirne von Spezies wie dem Zebraquarienfisch *Danio rerio* (Roesner et al., 2006) und der Schildkröte *Trachemys scripta* (Milton et al., 2006), deren Habitate beispielsweise aufgrund von Temperaturschwankungen häufig sich ändernden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind, eine deutlich gesteigerte mRNA-Transkription von Neuroglobin. Eine generell gesteigerte Neuroglobin-Expression konnte in hypoxietoleranten Spezies wie dem Goldfisch *Carassius auratus* (Roesner, 2007) und der Blindmaus *Spalax ehrenbergi* (Avivi et al., unveröffentlicht, vgl. auch Burmester et al., 2007) nachgewiesen werden

Neuroglobin weist damit in den bisher schwerpunktmäßig untersuchten Mammaliern gemeinsame Charakteristika auf, eine exakte physiologische Funktion kann dem Globin jedoch noch nicht zugeordnet werden. In dieser Arbeit soll die Untersuchung dieses Globins auf Amphibien und Teleostier ausgedehnt werden, um konservierte und wichtige Merkmale von Neuroglobin in Vertebraten zu erkennen.

1.5. Cytoglobin

Im Jahr 2002 konnte der Superfamilie der Globine ein weiteres Mitglied hinzugefügt werden: es wurde von drei Forschergruppen gleichzeitig beschrieben und letztlich ob seiner zunächst ubiquitär erscheinenden Expression als „Cytoglobin“ benannt (Kawada et al., 2001; Burmester et al., 2002; Trent und Hargrove, 2002). Ursprünglich wurde auch dieses Globin *in silico* identifiziert und nach und nach in verschiedenen Säugern, aber auch im Huhn nachgewiesen (Burmester et al., 2002; Kugelstadt et al., 2004). Im Vergleich mit den Aminosäuresequenzen von Myoglobin zeigt Cytoglobin eine Identität von 30% und phylogenetische Analysen belegen eine Verwandtschaft beider Globine (Burmester et al., 2002). Ein Aminosäurevergleich der Mammalier-Cytoglobine ergibt eine für Globine sehr geringe Substitutionsrate von lediglich $0,3 \times 10^{-9}$ Austauschen pro Position und Jahr. Damit evolviert Cytoglobin noch etwas langsamer als die Mammalier-Neuroglobine und unterliegt offensichtlich in Säugern einer stark reinigenden Selektion (Burmester et al., 2002; Wystub et al., 2004).

Cytoglobin ähnelt strukturell ebenfalls weitgehend dem Myoglobin, die charakteristischen, an der Häm- und Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren sind in allen bisher analysierten Spezies erhalten. Cytoglobin besteht je nach Spezies aus 174 bis 190 Aminosäuren und besitzt N- bzw. C-terminale Verlängerungen. Das Protein zeigt die für Globine charakteristische α -helikale drei-über-drei-Faltung (de Sanctis et al., 2004). Im humanen Cytoglobin konnte ein relativ großer, unpolarer Hohlraum unweit des Häms nachgewiesen werden, der durch einen Tunnel mit der Oberfläche des globulären Proteins verbunden ist. Eventuell stellen Hohlraum und Tunnel den Diffusionsweg eines externen Liganden dar (de Sanctis et al., 2004). Auch für Cytoglobin werden die Bindungseigenschaften eines externen Liganden durch Hexakoordination bestimmt: im deoxygenierten Zustand ist das distale Histidin an die Häm-Gruppe gebunden, die Ligandenbindung erfolgt analog zu Neuroglobin in einer biphasischen Reaktion (Pesce et al., 2002). Cytoglobin bindet Sauerstoff reversibel, die O_2 -Auffinität des humanen Cytoglobins entspricht mit $P_{50}=1$ Torr der des Neuro- und Myoglobins (Trent und Hargrove, 2002). Biochemische und kristallographische Analysen legen nahe, dass das humane Cytoglobin in seiner vollen Länge *in vitro* als Homodimer vorliegt (Hamdane et al., 2003; de Sanctis et al., 2004). Durch eine mögliche intramolekulare Disulfidbrückenbildung an den helikalen Positionen B2 und E9 verringert sich die Sauerstoffaffinität von Cytoglobin um etwa die Hälfte (Hamdane et al., 2003). Die physiologische Relevanz dieses Befundes ist jedoch wie schon bei Neuroglobin umstritten.

Die Expression von Cytoglobin ist nicht, wie zunächst angenommen, vollkommen ubiquitär. Vielmehr wird Cytoglobin hochspezifisch im Cytoplasma von Fibroblasten bzw. fibroblasten-ähnlichen Zelltypen verschiedener viszeraler Organe wie Leber, Lunge, Herz, Muskel, Darm, Niere und der Bauchspeicheldrüse nachgewiesen (Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004). Außerdem kann das Protein in Osteoblasten und Chondroblasten, nicht jedoch in bereits reifen – und sich nicht mehr teilenden – Osteozyten und Chondrozyten detektiert werden (Schmidt et al., 2004). Cytoglobin zeigt damit eine bevorzugte Expression in Zellen, die aktiv an der Bildung der Extrazellulären Matrix beteiligt sind. Neben diesen Expressionsorten wird Cytoglobin cytoplasmatisch und nukleär in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems gebildet (Hankeln et al., 2004; Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2005; Wystub, 2007).

Aufgrund der unterschiedlichen zellulären und intrazellulären Lokalisation kann über die mögliche Funktion von Cytoglobin bisher nur spekuliert werden: Es ist eher unwahrscheinlich, dass es zellspezifisch Sauerstoff für den allgemeinen oxidativen Metabolismus bereit stellt. Eine Beteiligung an der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffverbindungen hingegen ist eher denkbar, doch unbewiesen (Fordel et al., 2007). Versuche zeigen, dass eine Überexpression von Cytoglobin die Synthese von Kollagen steigert (Nakatani et al., 2004). Vor der Beobachtung einer überwiegenden Expression im Cytoplasma fibroblastenähnlicher Zellen führt dies zu der Hypothese, dass Cytoglobin primär in die Kollagen-Synthese bzw. -Reifung involviert sein könnte (Hankeln et al., 2005). Die Hydroxylierung von Kollagen als einem der wesentlichen Proteine der extrazellulären Matrix verbraucht molekularen Sauerstoff, der von Prolyl-Hydroxylasen bereitgestellt wird. Cytoglobin

könnte daher beispielsweise diesen Enzymen Sauerstoff zur Verfügung stellen, wobei der direkte Weg aufgrund der geringeren Sauerstoffaffinität der Hydroxylasen (Hirsilä et al., 2003) eher unwahrscheinlich ist. Alternativ wird daher vermutet, dass Cytoglobin auf einem bisher unbekanntem Signalweg in die Kollagensynthese involviert sein könnte (Hankeln et al., 2005).

Die Daten zur Regulation von *Cygb* unter hypoxischen Bedingungen weisen auf eine gewebespezifische Reaktion hin: während Li et al. (2006) eine unveränderte Cytoglobin-Expression im Gehirn von Maus und Ratte als Reaktion auf Sauerstoffmangel beobachteten, konnten Schmidt et al. (2004) und Fordel et al. (2007) eine deutliche Zunahme der Cytoglobin-mRNA im Hirn und verschiedenen Geweben wie Leber, Herz, Muskel und Auge beider Nager nachweisen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Regulation von Cytoglobin unter Hypoxie steht derzeit noch aus.

Auch für Cytoglobin wurde der überwiegende Teil der bisher bekannten Ergebnisse in Mammaliern erbracht. Die Charakteristika dieses Globins sollen daher durch Analysen in Amphibien und Teleostern überprüft und in ihre mögliche Gültigkeit für Vertebraten gezeigt werden.

1.6. Die Evolution der Globine

Die zunehmende Verfügbarkeit genomischer Daten und deren Auswertung durch Computer führte neben der Entdeckung von Neuroglobin und Cytoglobin im humanen Genom (Burmester et al., 2000; Burmester et al., 2002) zur Detektion weiterer Globine: im Haushuhn *Gallus gallus* wurde ein als „Globin E“ (für „eye“) bezeichnetes Protein mit einer präferentiellen Expression im Auge gefunden (Kugelstadt et al., 2004). Fische weisen zudem ein zu Neuroglobin entfernt verwandtes, als „GlobinX“ bezeichnetes Gen mit einem breit gefächerten Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben auf (Roesner et al., 2005), dessen Funktion und Evolution weitgehend ungeklärt ist.

Die Verfügbarkeit der Daten ist auf die konsequente Sequenzierung der Genome verschiedenster Organismen zurückzuführen. Wie das Auffinden von Neuroglobin und Cytoglobin gezeigt hat, ist die Entdeckung weiterer Globine daher möglich, und führt durch die Erweiterung der Superfamilie zu tieferen Einsichten in Evolution und Funktion der Globine. Die gegenwärtig vorliegenden phylogenetischen Untersuchungen belegen, dass der Ursprung der Globine weit in der Vergangenheit liegt (Abbildung 3). Vor mehr als 1,8 Milliarden Jahren existierte demnach ein ursprüngliches Vorläufer-Globin (Hardison, 1998), von welchem sich vor etwa 800 Millionen Jahren Neuroglobin und GlobinX trennten (Burmester et al., 2000; Roesner et al., 2005). Hinweise darauf gibt ein Nerven-Globin in Anneliden, das phylogenetisch und funktionell ein Homolog des Neuroglobins zu sein scheint. Demnach haben diese in Nerven exprimierten Globine bereits vor der Aufspaltung der Protostomier und Deuterostomier vor etwa 600-700 Millionen Jahren existiert (Bromham et al., 1998; Burmester et al., 2000). GlobinX wurde bisher ausschließlich in Fischen, jedoch keinem

Tetrapoden nachgewiesen. Myo- und Hämoglobin entwickelten sich durch schrittweise Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläufergen vor ca. 600 Millionen Jahren (Goodman et al., 1988). Cytoglobin, das phylogenetisch in die Nähe des Myoglobins eingeordnet wird, hat sich zusammen mit diesem wahrscheinlich aus einem gemeinsamen zellulären Globin in Folge einer Genduplikation vor 450 Millionen Jahren entwickelt, nachdem sich die Agnathen von den Gnathostomata trennten, jedoch bevor die kiefermündigen Vertebraten divergierten (Burmester et al., 2002). Die Aufspaltung der Vertebraten-Hämoglobine wird auf etwa 450 Millionen Jahren datiert (Goodman et al., 1987; Hardison, 1998), dabei entstanden die Vorläufer der heutigen α - bzw. β -Globine. Durch weitere Diversifikationen und infolge inäqualen Crossing-overs entstanden weitere Duplikate, die heute die Mitglieder der α - und β - Subfamilien der Hämoglobine repräsentieren (Fitch et al., 1991; Metzberg et al., 1991).

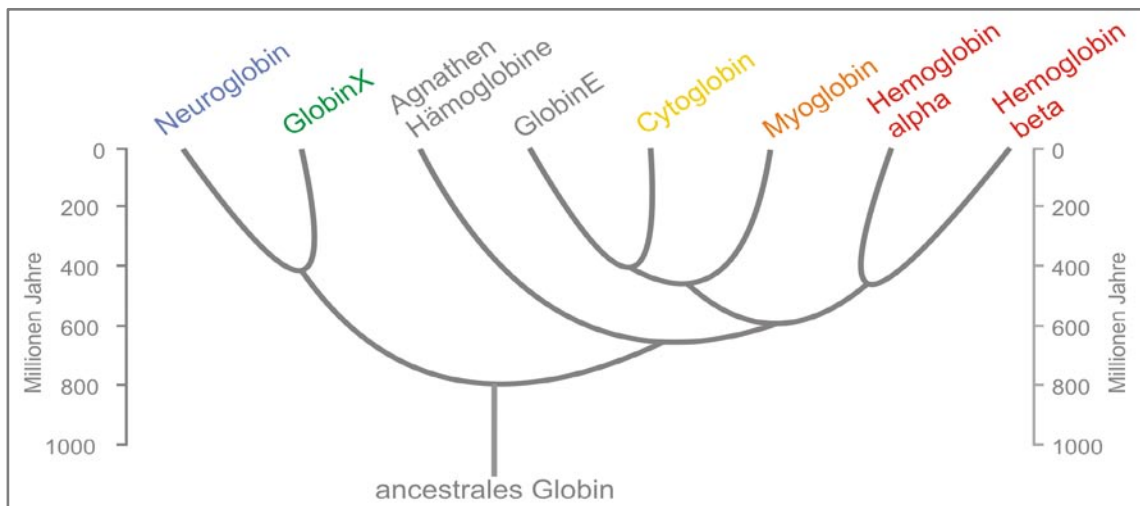


Abbildung 3:
Die Globingene der Vertebraten in ihrem phylogenetischen Zusammenhang.
 (nach Burmester et al., 2004, verändert)

1.7. Genomprojekte und die Vertebraten-Evolution

Die Entdeckung mehrerer neuer Globine hat das Profil der Globinfamilie während der Evolution bereits erweitert, zeigt jedoch einen deutlichen Schwerpunkt auf Mammaliern. Dies resultiert aus der in den letzten Jahren rasant angestiegenen Zahl von Sequenzierprojekten diverser Organismen, wobei die Genome von Mammalier wie Mensch und Maus mit als erste analysiert wurden. Aufgrund der technischen Bedingungen werden nun zunehmend auch die Genome von Modellorganismen sequenziert, durch deren Analyse man einen umfassenden Einblick in die Genome von Vertebraten zu gewinnen hofft. Neben Amphibien umfassen diese Sequenzierprojekte auch die Genome verschiedener Teleostier, die mit mehr als 27000 Arten einen wesentlichen Ast des Vertebratenstammbaums bilden (Nelson, 2006). Besonders zu nennen sind die in dieser Arbeit näher untersuchten Spezies *Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes*, *Danio rerio* und *Oryzias latipes*.

Mit der Veröffentlichung des Genoms von *Tetraodon nigroviridis* (de Procé, 1822) im Jahr 2002 wurde nach dem humanen Genom das zweite Vertebratengenom vollständig sequenziert (Jaillon et al., 2004). In einer 1968 durchgeführten cytometrischen Analyse wurde das Genom des Grünen Kugelfisches (Abbildung 4A) als sehr klein identifiziert (Hinegardner, 1968) und bedingte so die Auswahl dieses Teleostiers für ein Sequenzierprojekt. In dem 350 Mb umfassenden Genom wurden insgesamt 28000 Gene auf 21 Chromosomen annotiert (http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_C/organisme_C.html). Bei einer vergleichbaren Genzahl beträgt die Größe des *Tetraodon*-Genoms nur ein Achtel der Größe des humanen Genoms und repräsentiert damit das kleinste heute bekannte Vertebratengenom. Die Kompaktierung ist auf eine Reduktion der Intronlänge auf durchschnittlich 60-100 Nukleotide bei einer gleich bleibenden Länge der Exons zurückzuführen (Jaillon et al., 2004). Auch die Länge intergenischer Sequenzen ist deutlich vermindert, und es finden sich weniger repetitive Sequenzen. Während 45% des menschlichen Genoms aus transposablen Elementen bestehen, betragen diese bei *Tetraodon* nur 3,8% und sind auf die heterochromatischen Regionen beschränkt (Dasilva et al., 2002). Trotz ihres eher seltenen Vorkommens weisen die transposablen Elemente mit 75 verschiedenen Typen eine erstaunliche Diversität im Genom des Grünen Kugelfisches auf (Roest Crolius et al., 2000; Dasilva et al., 2002). Vergleichende Analysen des *Tetraodon*- und des humanen Genoms führten zur Identifikation von über 900 neuen, bisher nicht identifizierten humanen Genen (Roest Crolius et al., 2002; Jaillon et al., 2004) und unterstreichen die Notwendigkeit und den Nutzen einer komparativen Genomik. Zudem konnte ein hypothetisches ancestrales Vertebraten-Genom mit 12 Chromosomen skizziert werden (Jaillon et al., 2004).

Im Zuge der komparativen Betrachtung von Genomen wurde das Genom des nahe verwandten Japanischen Kugelfisches *Takifugu rubripes* (Temminck und Schlegel, 1843) entschlüsselt (Brenner et al., 1993; Aparicio et al., 2002) und resultierte in einer Genomgröße von 365 Mb. Das haploide Genom umfasst etwa 27000 identifizierte Gene auf 22 Chromosomen (<http://genome.igi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>). Komparative Analysen zeigen, dass das Genom von *Takifugu* aus den gleichen Gründen so kompakt ist wie das von *Tetraodon*: reduzierte Intronlängen bei gleich bleibender Exonlänge, Reduktion intergenischer Bereiche und ein nur geringes Vorkommen repetitiver Sequenzen (Aparicio et al., 2002). Diese Gemeinsamkeiten unterstreichen die nahe Verwandtschaft beider Spezies (Abbildung 4A, B), deren letzter gemeinsamer Vorfahre vermutlich vor etwa 30 Millionen Jahren lebte (Crnogorac-Jurcevic et al., 1997; Benton und Donoghue, 2007).

Der auch unter seinem japanischen Namen „Medaka“ bekannte *Oryzias latipes* (Temminck und Schlegel, 1843) wurde bereits in der Edo-Periode (1603-1867) aufgrund seiner prächtigen Färbungen als Zierfisch gehalten (Abbildung 4C) und diente als einer der ersten Teleostier zur Aufklärung genetischer Fragestellungen: 1916 erschien eine erste Publikation über die Entstehung der verschiedenen Körperfärbungen (Toyama, 1916), 1921 folgte eine grundlegende Arbeit über die Y-chromosomale Vererbung (Aida, 1921). Cytometrische Analysen bestimmten einen (diploiden)

DNA-Gehalt von 1,7 bzw. 2,2 pg/Zelle (Hinegardner und Rosen, 1972; Uwa und Iwata, 1981; Lamatsch et al., 2000). Dieses relativ kleine Teleostiergenom und seine phylogenetisch intermediäre Stellung zwischen Kugelfisch und Zebraabärbling prädestinierten *Oryzias* für ein Sequenzierprojekt (http://mbase.bioweb.ne.jp/~dclust/medaka_top.html). Der Karyotyp des haploiden Genoms beinhaltet 24 Chromosomen (Naruse et al., 2000) mit etwa 20100 identifizierten Genen in dem 700 Mb umfassenden Genom (Kasahara et al., 2007). Phylogenetische Analysen ordnen einen letzten gemeinsamen Vorfahren von Medaka und den Kugelfischen vor schätzungsweise 60-80 Millionen Jahren ein (Shima et al., 2003), während jener von Medaka und *Danio* vor etwa 100-150 Millionen Jahren lebte (Wittbrodt et al., 2002; Naruse et al., 2004a; Naruse et al., 2004b; Benton und Donoghue, 2007).

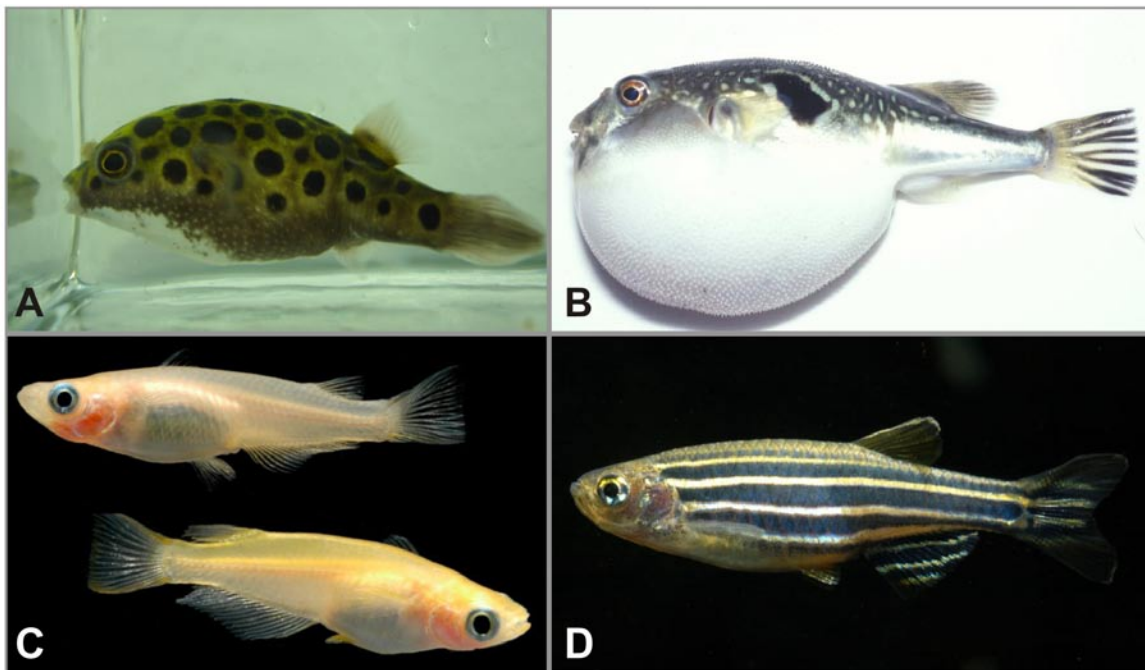


Abbildung 4:

***Tetraodon nigroviridis* (A), *Takifugu rubripes* (B), *Oryzias latipes* (C) und *Danio rerio* (D).**

Der Grüne Kugelfisch *Tetraodon nigroviridis* (A) ist weniger als 10 cm lang, lebt in den Flüssen und brackischen Küstengewässern Südostasiens und wird in die Familie der Tetraodontidae in der Ordnung der Tetraodontiformes eingeordnet (Bild: Ch. Fuchs). Derselben Familie und Ordnung gehört der nahe Verwandte Japanische Kugelfisch *Takifugu rubripes* (B) an, der, bis zu 80 cm groß werdend, in den Gewässern des Nordpazifik anzutreffen ist und über ein neurotoxisches Gift verfügt (Bild: <http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/>). *Oryzias latipes* ((C), Adrianichthyidae/Beloniformes) wird nur 3-4 cm lang und lebt in den überschwemmten Reisfeldern Japans, Koreas und Ostchinas. Seine Generationszeit beträgt 6-8 Wochen und er legt täglich 20-40 befruchtete, transparente Eier (Wittbrodt et al., 2002), an welchen grundlegende Entdeckungen zur Geschlechtsbildung sowie der Entwicklungsgenetik und -biologie gemacht wurden ((Ishikawa, 2000), Bild: <http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp>). *Danio rerio* (D), Cyprinidae/Cypriniformes) lebt im Süßwasser und erreicht eine Länge von 6-10 cm. Seine Generationszeit von 8-10 Wochen und die Fähigkeit eines Weibchens, wöchentlich bis zu 200 transparenter Eier legen, die sich innerhalb von 2-3 Tagen zu freischwimmenden Larven entwickeln, prädestinierten den Zebraabärbling unter anderem als Modell für entwicklungsbiologische Fragestellungen ((Mullins et al., 1994; Grapin-Botton und Melton, 2000; Crosier et al., 2002; Easter und Malicki, 2002; Hinchliffe, 2002; Furutani-Seiki et al., 2004), Bild: <http://fishbase.org>).

Der Zebraärbling *Danio rerio* (Hamilton, 1822) wird seit Beginn seines Sequenzierprojekts im Jahr 2001 in zunehmendem Maße für genetische Fragestellungen herangezogen. Da sein Genom mit schätzungsweise $1,7 \times 10^9$ bp mehr als doppelt so groß wie das von *Oryzias* und mehr als vier Mal so groß wie das der Kugelfische ist, sind die Analysen meist vergleichender Natur. Bisher wurden etwas mehr als $1,6 \times 10^9$ bp sequenziert (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html, Version Zv6). Der Karyotyp umfasst 25 Chromosomen ((Daga et al., 1996); <http://www.sanger.ac.uk/>). Unter Einbeziehung der bisher analysierten Genomdaten von *Danio* wurde wiederum das putative ancestrales Genom eines letzten gemeinsamen Teleostier-Vorfahren rekonstruiert, welches auch nach dieser Berechnung aus 12 Chromosomen bestanden haben soll (Jaillon et al., 2004; Woods et al., 2005).

Neben den durch mehrere Spezies in Genomprojekten vertretenen Mammaliern und Teleostiern sind die Kenntnisse über die Klasse der Amphibien bislang äußerst limitiert. Das am längsten im Labor etablierte Amphibium ist der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), der aufgrund der Möglichkeit einer gezielten Stimulation der Reproduktion durch Choriongonadotropin bis in die 1960er Jahre als „lebender Schwangerschaftstest“ diente. *Xenopus* (Abbildung 5A) bietet zudem den Vorteil der extrakorporalen Entwicklung der zahlreichen, anfänglich vollkommen transparenten Nachkommen, welche leicht manipuliert werden können. Die Genomgröße von *Xenopus laevis* wurde durch cytometrische Untersuchungen auf 3×10^9 bp berechnet (Baldari und Amaldi, 1976) und rangiert damit in der gleichen Größenordnung wie die des Menschen. Mit einem Karyotyp von 36 Chromosomen (Graf und Kobel, 1991) weist der afrikanische Krallenfrosch jedoch eine Allotetraploidie auf. Gene sind dadurch mehrmals im Genom vorhanden (Hughes und Hughes, 1993) und erschweren ein mögliches Genomprojekt.

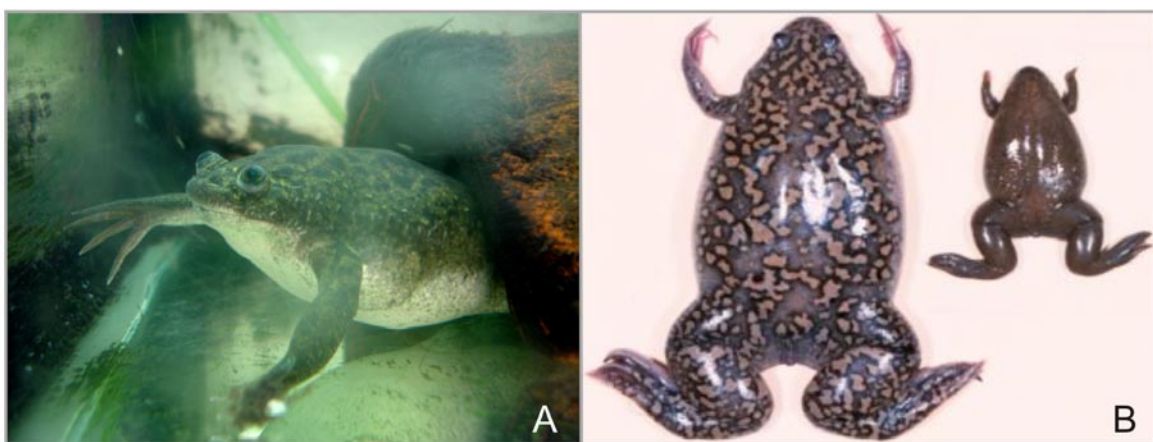


Abbildung 5:
Xenopus laevis (A) und der Größenvergleich (B) von *Xenopus laevis* (links) und *Xenopus tropicalis* (rechts).

(A) von Ch. Fuchs, (B) nach http://www.umr8080.u-psud.fr/buttons/Images/xenopus_both.jpg.

Dies veranlasste die Suche nach einem nahen Verwandten mit diploidem Genom, der in Form des tropischen Krallenfrosches *Xenopus tropicalis* (Gray, 1864) gefunden wurde (Hirsch et al., 2002; Klein et al., 2002). Beide *Xenopus*-Spezies sind so nahe verwandt, dass lebensfähige Hybride gezüchtet werden konnten (Burki und Fischberg, 1985). Der letzte gemeinsame Vorfahre beider Spezies lebte vor schätzungsweise 30 Millionen Jahren (Bisbee et al., 1977). Das Genom von *Xenopus tropicalis* umfasst ungefähr 1,7 Mb mit etwa 28000 detektierten Genen auf 20 Chromosomen (<http://www.jgi.doe.gov/>). Neben den schon bei *Xenopus laevis* aufgezeigten Vorzügen als Modellorganismus bietet *Xenopus tropicalis* den weiteren Vorteil von kleineren Individuen (Abbildung 5B) mit einer verkürzten Juvenilphase und früheren Fertilität (Tinsley und Kobel, 1996). Die Embryonen entwickeln sich innerhalb eines Tages zu frei schwimmenden Larven, nach 8 Wochen beginnt die Metamorphose und die Generationszeit beträgt 4 Monate.

Die gezielte Suche nach Globinen in Fischen und Amphibien sollte durch die Abdeckung eines wesentlichen Teiles des Vertebraten-Stammbaumes zu neuen Einblicken in die Evolution dieser Genfamilie führen. Zum einen unterlagen alle Vertebraten im Laufe der Evolution deutlichen Sauerstoffschwankungen der Atmosphäre, zum anderen erfordern aquatische Habitate besondere Anpassungen: vor etwa 3,5 Milliarden Jahren begannen Prokaryoten erstmals mit der Produktion von Sauerstoff, der sich in der vor etwa 2 Milliarden Jahren entstehenden Erdatmosphäre zu akkumulieren begann (Jenkins, 1991). Sein Gehalt unterlag dabei deutlichen Schwankungen: nach einer maximalen Konzentration von etwa 35% vor 300 Millionen Jahren (Berner, 1999) nahm die Konzentration vor 150 bis 200 Millionen Jahren auf etwa 10% ab. Die heutige Konzentration von 21% Luftsauerstoff besteht erst seit etwa 10 Millionen Jahren (Falkowski et al., 2005). In Wasser jedoch löst sich selbst unter optimalen Bedingungen lediglich $\frac{1}{30}$ des in der Luft vorhandenen Sauerstoffes, wobei dessen Aufnahmegeschwindigkeit aus der Luft durch die Diffusion in das flüssige Medium hinein entsprechend der Stokes-Einstein-Gleichung deutlich verlangsamt ist (Einstein, 1905). Entscheidender Parameter ist dabei neben der Temperatur auch der Salzgehalt des Wassers: je niedriger die Temperatur und je höher der Salzgehalt ist, desto mehr Sauerstoff kann sich in dem Wasser lösen. Es ist also anzunehmen, dass insbesondere aquatile Lebewesen während ihrer Evolution Anpassungen zum Schutz vor den schwankenden Sauerstoffkonzentrationen ihrer Umgebung entwickelt haben, die auch die Globine betreffen könnten.

Eine Besonderheit stellt dabei der afrikanische Krallenfrosch dar: anders als die ausschließlich im Wasser lebenden Fische lebt er vorwiegend aquatil und kann, falls es beispielsweise zur Austrocknung seines Lebensraumes kommt, kürzere Strecken auf dem Land überwinden. *Xenopus laevis* deckt seinen Sauerstoffbedarf nur zu 40% aus dem Wasser, während er 60% aus regelmäßig an der Wasseroberfläche aufgenommenen Luft gewinnt (Storch und Welsch, 1996). Dieses Verhalten ist als Anpassung an die regelmäßig von Austrocknung betroffenen Habitate südlich der Sahara zu sehen, welche den ursprünglichen Lebensraum des afrikanischen Krallenfrosches darstellen.

Der folgende Vertebraten-Stammbaum (Abbildung 6) ordnet die beschriebenen Modellorganismen in ihre vermutlichen verwandtschaftlichen Beziehungen ein und gibt die Zeit ihrer wahrscheinlichen Divergenzen von einem letzten gemeinsamen Vorfahren wieder (Benton, 1990; Kumar und Hedges, 1998; Benton und Donoghue, 2007).

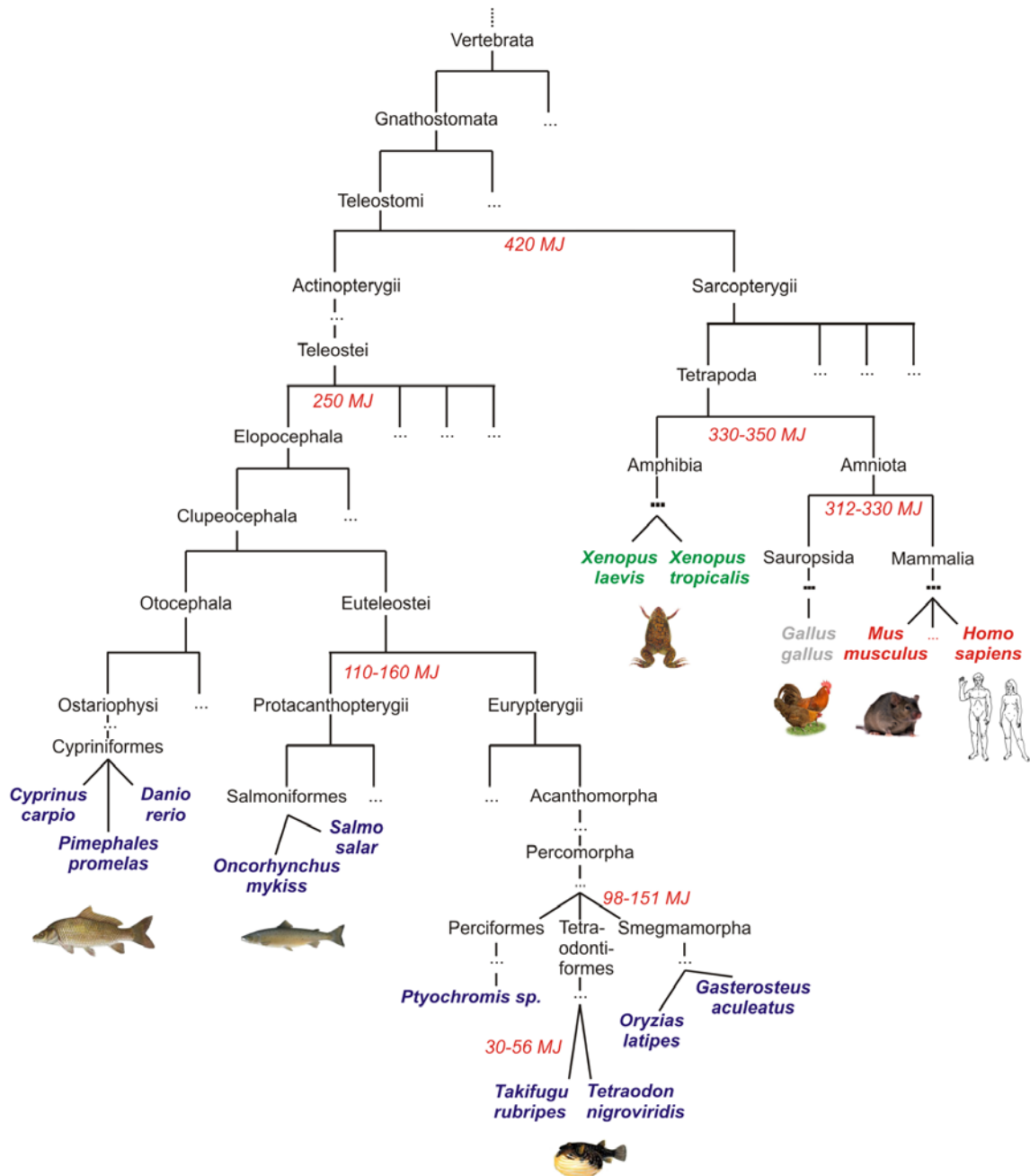


Abbildung 6:

Schematische Ansicht der Vertebraten-Evolution.

Hervorgehoben sind die in dieser Arbeit betrachteten Teleostier (blau), Amphibien (grün), Vögel (grau) und Mammalier (rot); die wahrscheinlichen Divergenzzeiten sind in Millionen Jahren (MJ) angegeben.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

In einem ersten Teil dieser Arbeit sollte das Globin-Repertoire von ***Xenopus* als amphibischem Modellorganismus** detailliert untersucht werden. Die Analyse sollte *in silico* in den durch ein Genomprojekt verfügbaren Daten von *Xenopus tropicalis* und praktisch mittels molekularbiologischer Methoden an *Xenopus tropicalis* und – aufgrund der leichteren Verfügbarkeit – an *Xenopus laevis* durchgeführt werden.

Die *in silico* durchgeführte Analyse des kompletten Genoms von *Xenopus tropicalis* sollte Aufschluss über die Gesamtheit der in diesem diploiden Organismus vorhandenen Globingene geben. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf die Analyse von Neuroglobin und Cytoglobin in Amphibien hinsichtlich ihrer Konservierung über die Mammalier hinaus gelegt werden. Außerdem war die Frage zu klären, ob *Xenopus* über ein Myoglobin verfügt oder nicht: bisher wurde zwar davon ausgegangen, dass in *Xenopus* kein Myoglobin-Protein existiert (Baylor und Pape, 1988), ein biochemischer oder molekulargenetischer Nachweis der Nicht-Existenz war jedoch nicht erbracht worden. Die Hämoglobine von *Xenopus tropicalis* sollten detailliert analysiert und damit erstmals ein kompletter Überblick über diese Globin-Subfamilie erlangt werden. Die bisher bekannten Analysen waren vorwiegend in *Xenopus laevis* durchgeführt worden und aufgrund des allotetraploiden Genoms unvollständig (Jeffreys et al., 1980; Hosbach et al., 1982; Knöchel et al., 1985). Nach einer Einordnung der Hämoglobine in einen phylogenetischen Kontext sollte, basierend auf den vorhandenen EST-Daten, eine *in silico* durchgeführte Transkriptionsanalyse Aufschluss über die Zeitpunkte der mRNA-Transkription der einzelnen Gene in der Entwicklung von *Xenopus* geben. Eventuell neu gefundene Globingene sollten hinsichtlich ihrer Phylogenie und Sequenzkonservierung charakterisiert werden. Ihre genomische Organisation in Bezug zu umgebenden Genen sollte Hinweise auf Ihre Entstehungsgeschichte liefern.

Experimentell sollte das in *Xenopus* detektierte Neuroglobin und Cytoglobin wie auch neu gefundene Globine kloniert, sequenziert und ihre gewebespezifische mRNA-Expression durch qualitative und quantitative RT-PCR-Versuche in *Xenopus laevis* wie *Xenopus tropicalis* vergleichend betrachtet werden. Dabei sollte insbesondere ein Expressionsprofil für Globine während der Entwicklung eines Vertebraten erstellt werden, wofür die Embryonen von *Xenopus laevis* mit ihrer extrakorporalen Entwicklung prädestiniert sind. Zwar sind Daten über die differentielle Expression der Hb-Gene in Mammalierembryonen bekannt (Boussios et al., 1982; Peschle et al., 1985; Chada et al., 1986; Holland und Gooley, 1997; Silver und Palis, 1997; Holland et al., 1998), für Neuroglobin und Cytoglobin hingegen existierten lediglich partielle Analysen aus der Maus (Witan, 2003). Die zelluläre Lokalisation der Globin-mRNAs sollte durch Whole Mount *in situ*-Hybridisierungen analysiert werden. Abschließend sollten die Globine rekombinant exprimiert werden und erste biochemische Untersuchungen Aufschluss über die Koordination des Eisenions in den Proteinen geben. Die rekombinant exprimierten Proteine sollten zudem als Grundlage für zukünftige Analysen hinsichtlich der Ligandenbindungsfunktion dienen.

In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten Neuroglobin und Cytoglobin in verschiedenen **Teleostiern** analysiert werden. Während die Amphibien mit ihrer Lebensweise eine Art „Zwischenstadium“ zwischen Land- und Wasserleben darstellen, sind die Fische ausschließlich auf aquatische Habitate festgelegt. Diese differente Lebensweise sollte in den Organismen zu unterschiedlichen Anpassungen an die gegebenen Sauerstoffbedingungen und damit möglicherweise an die O₂-versorgenden Moleküle, die Globine, geführt haben. Die Konservierung von Neuroglobin sollte hinsichtlich des Zellexpressionsmusters im Gehirn von Teleostiern am Modell des Zebrafischlings *Danio rerio* näher analysiert werden. Unterschiede wie Gemeinsamkeiten hinsichtlich der bisher schwerpunktmäßig in Mammaliern untersuchten Lokalisation sollten herausgestellt werden. Für Cytoglobin konnte ich bereits in meiner Diplomarbeit die Existenz zweier paraloger Gene in ausgewählten Teleostiern nachweisen (Fuchs, 2002). Ihr Vorhandensein sollte unter Ausnutzung der *in silico* vorhandenen Datensätze in weiteren Teleostier-Spezies nachgewiesen und so generalisiert werden. Der Vergleich der Cytoglobin-Duplikate in ihrem genomischen Kontext mit dem singulären Cygb-Gen des Menschen sollte Rückschlüsse auf die Entstehung und Evolution der paralogen Cytoglobin-Kopien erlauben.

Experimentell sollten die Cygb-Paraloga verschiedener Teleostier amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Ihre mRNA-Transkription sollte in verschiedenen Geweben von *Danio rerio* und *Tetraodon nigroviridis* qualitativ und quantitativ vergleichend betrachtet werden, um Rückschlüsse auf eine gleichartige oder unterschiedliche Funktion der Paralogen zu erhalten. Die zelluläre mRNA-Lokalisation von Cygb-1, -2 und Ngb sollte in ausgewählten Geweben von *Danio rerio* durch *in situ*-Hybridisierungsversuche analysiert werden. Die rekombinante Expression von Cygb-1 von *Danio rerio* und erste biochemische Untersuchungen sollten schließlich Aufschluss über die Funktionalität dieses Proteins geben.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die in dieser Arbeit eingesetzten Teleostier *Danio rerio* und *Tetraodon nigroviridis* stammten von einem lokalen Tierhändler und wurden im Institut für Zoologie, Universität Mainz bei 26°C in Süßwasseraquarien gehalten, die Reiskärpflinge *Oryzias latipes* wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Scharl (Julius Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die afrikanischen Krallenfrösche *Xenopus laevis* wurden im Institut für Zoologie gezüchtet und unter Standardbedingungen in Süßwasseraquarien gehalten, die tropischen Krallenfrösche *Xenopus tropicalis* stammen von Herrn Prof. Dr. W. Knöchel (Universität Ulm, Deutschland). Alle Tiere wurden zu Versuchsbeginn in kaltem Wasser in Ihrer Aktivität eingeschränkt und durch das Durchtrennen der Wirbelsäule getötet. Die gewünschten Organe wurden unmittelbar entnommen und in flüssigem Stickstoff bzw. bei -80°C gelagert.

2.2. Molekularbiologische Methoden zur Analyse von RNA

2.2.1. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus tierischen Geweben wurde zu Beginn der Arbeit mit Guanidin-Isothiocyanat (Roth, Karlsruhe) nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987) durchgeführt. Die zerkleinerten Gewebe wurden in einem Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffer aufgenommen und die RNA durch mehrere Extraktionen mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) bei saurem pH-Wert aufgereinigt, gefällt und in Wasser gelöst. Hinsichtlich einer besseren Reproduzierbarkeit erfolgte im Lauf der Arbeit die Umstellung auf das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) bzw. das „SV Total RNA Isolation System“ (Promega, Mannheim) als standardisierte Systeme. Beide basieren auf dem Prinzip der reversiblen Bindung von Nukleinsäuren an eine immobilisierte Siliziumdioxid-Membran unter hohen Konzentrationen chaotroper Salze. Unerwünschte DNA wurde mittels eines DNase-Verdaues eliminiert und die RNA nach mehreren Waschschritten unter schwach ionenhaltigen Bedingungen mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Konzentration und Reinheit der eluierten RNA wurden photometrisch mittels eines BioPhotometers (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bzw. des Spektralphotometers NanoDrop ND-1000 (Pqlab, Er-

langen) bestimmt. Die Konzentration wurde aus der Extinktion E_{260} nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt, die Reinheit aus dem Quotient $E_{260/280}$, der bei reiner RNA Werte zwischen 1,8-2,0 aufweisen sollte.

2.2.3. Standard-Gelelektrophorese von RNA

Um die Qualität der extrahierten RNA visuell begutachten zu können, wurde diese in 1,2%igen vertikalen Agarose-Gelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Herstellung der Gelmatrix erfolgte durch das Aufkochen der Agarose in 33,5 ml 1x TBE-Puffer (vgl. 2.8.) und der Zugabe von 5 ml 1x MOPS-Puffer sowie 7,5 ml 37%igem Formaldehyd. Nach dem Befüllen der horizontalen Gekassetten (GENTERphorese, Genterprise, Mainz) polymerisierte die Agarose etwa 45 min. Die Proben wurden durch das Mischen von 1 Volumen RNA (0,5-1 μg RNA) mit 1 μl EtBr [5 mg/ml] und 3 Volumen Ladepuffer hergestellt und vor dem Auftragen auf das Gel für 15 min bei 55°C denaturiert. Den auf Eis abgekühlten Proben wurde unmittelbar vor dem Auftragen 0,1 Volumen einer RNA-Färbelösung zugegeben. Diese enthielt die nicht mit Nukleinsäuren interkalierenden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylenxyanol FF, welche als externe Farbmarker die Laufweite der Proben in der Agarose-Matrix anzeigen. Die Proben wurden komplett auf das Gel aufgetragen, die Auftrennung erfolgte bei 150V für 30-45 min. Die RNA wurde auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einem „Image Documentations-System CSI“ (Cybertech) dokumentiert.

2.2.4. Reverse Transkription von mRNA

0,5-1 μg Gesamt-RNA wurden mit SuperScript™ II Reverser Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Karlsruhe) und 10 pM eines Oligo(dT)₁₅-Oligonukleotides nach Angaben des Herstellers für die cDNA-Erststrang-Synthese eingesetzt.

2.3. Molekularbiologische Methoden zur Analyse von DNA

2.3.1. Isolierung und Quantifizierung von DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe des DNeasy-Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert. Das System basiert auf der reversiblen Bindung der Nukleinsäuren unter stark salzhaltigen Bedingungen an eine Siliziumdioxid-Membran, ihrer Aufreinigung und Elution unter schwach ionenhaltigen Bedingungen. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der präparierten DNA erfolgte photometrisch. Die Konzentration wurde durch die Extinktion E_{260} ermittelt, der Quotient $E_{260/280}$ ließ Rückschlüsse auf

mögliche Verunreinigungen zu und sollte bei reiner DNA 1,8 betragen. Zusätzlich wurde die Qualität der extrahierten Proben durch die Auftrennung in einem Agarose-Gel visualisiert.

2.3.2. Standard-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden in 1,0-1,6%igen, vertikalen Agarose-Matrizes aufgetrennt. Die Agarose wurde mit einem entsprechenden Volumen 1x TBE aufgekocht und in Gelkassetten gefüllt. Nach dem vollständigen Polymerisieren der Agarose wurden die Probentaschen mit den DNA-Proben, welche mit jeweils 0,2 Volumen DNA-Ladepuffer (#R0611, Fermentas, St. Leon-Roth) vermischt worden waren, beladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100-150 V. Die Laufweite der Proben konnte mittels der dem Ladepuffer zugesetzten Farbstoffe Bromphenolblau und Xylenxyanol FF optisch überprüft werden. Die Lauffronten dieser nicht mit der DNA interkalierenden Farbstoffe entsprachen laut Angaben des Herstellers in einem 1%igen Agarosegel etwa 300 bp (Bromphenolblau) bzw. 4000 bp (Xylenxyanol FF). Nach der Elektrophorese wurde die DNA durch die Färbung des Gels in einer EtBr-Lösung sichtbar gemacht, die Auswertung erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 302 nm mit dem „Image Documentations-System CSI“ (Cybertech).

2.3.3. Fällung von DNA

DNA-Präparationen wurden von Salzen, Enzymen und anderen, nachfolgende Reaktionen negativ beeinflussenden Stoffen gereinigt, indem der DNA-Lösung $\frac{1}{10}$ Volumen 10x Dialysepuffer und 3 Volumen eiskaltes Ethanol abs. zugesetzt wurden. Nach dem Präzipitieren der DNA für mindestens 45 min bei 4°C und 14000 U/min wurde der Überstand abgenommen und verbleibende Salzreste durch einen Waschschrift mit 3 Volumen 70%igem Ethanol bei 4°C und 14000 U/min für 15 min entfernt. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 10-15 µl HPLC-H₂O (Roth, Karlsruhe) gelöst.

2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Oligonukleotid-Design

Die auf der Idee von K.B. Mullis beruhende und von Saiki weiterentwickelte Methode der PCR wurde standardmäßig in einem Volumen von 50 µl durchgeführt (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Als Matrize dienten je 100 ng DNA, die Oligonukleotide wurden in Endkonzentrationen von je 10 pM eingesetzt. Außerdem enthielten die Reaktionen standardmäßig je 0,2 mM dNTP's und 5 Units „Taq DNA Polymerase“ (D1806, Sigma-Aldrich). Nach einer dreiminütigen initialen Denaturierungsphase bei 94°C durchliefen die Proben 35 Amplifikationszyklen in einem „Primus 96 advanced Thermocycler“ (Peqlab, Erlangen), die je eine Denaturierungsphase (30 s, 94°C), eine Oligonukleotidbindungsphase (30 s, 55°C-64°C) und eine Synthesephase (30-60 s,

72°C) umfassten. Nach einer finalen Elongation von 7 min bei 72°C wurden standardmäßig 10 µl der PCR-Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.3.2.).

Die Oligonukleotide wurden entsprechend der bekannten Regeln entworfen und mit der Software „IDT SciTools Oligo Analyzer 3.0“ (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) auf Sekundärstrukturen und mögliche falsche Bindungsstellen im Bereich des zu amplifizierenden Gens überprüft. Außerdem wurden sie mittels des „Search for short, nearly exact matches“-Werkzeugs des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit den *in silico* verfügbaren Datenbanken verglichen. Damit wurde die potentielle Bindung in anderen, bereits bekannten Bereichen der Genome überprüft und Oligonukleotide ausgewählt, welche bevorzugt das gesuchte Gen charakterisierten. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von den Firmen Qiagen GmbH (Hilden), Biomers.net GmbH (Ulm) und Operon Biotechnologies GmbH (Köln) durchgeführt. Eine Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide findet sich in Anhang 7.5.

2.3.5. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Mit Hilfe der „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE) können unvollständige kodierende Bereiche eines Gens in mehreren Schritten amplifiziert und ihre Sequenz ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde das „3´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends-Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) zur Amplifikation von 3'-Enden nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.3.6. PCR-Aufreinigung

Sofern die im Anschluß an eine PCR-Reaktion durchgeführte Gelelektrophorese ein einzelnes, spezifisches PCR-Produkt erkennen ließ, wurde dieses mit dem „E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit“ (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers von Salzen, dNTPs und Enzymen befreit. Die Qualität der Aufreinigungsreaktion wurde gelelektrophoretisch überprüft, die Konzentration photometrisch ermittelt.

2.3.7. Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Waren nach der gelelektrophoretischen Auftrennung eines PCR-Probenaliquots mehrere Fragmente sichtbar, wurde der gesamte verbleibende Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt, das Fragment der gewünschten Größe ausgeschnitten und die DNA mittels des „R.Z.N.A. Gel Extraction Kits“ (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose-Matrix wiedergewonnen. Die Elution erfolgte in 50 µl HPLC-H₂O (Roth, Karlsruhe), das abweichend von den Herstellerangaben zweimal auf die Matrix pipettiert wurde. Dies verbesserte das Lösen der DNA von der

Siliziumdioxid-Membran und erhöhte die Konzentration der Probe. Die Konzentration der eluierten DNA-Fragmente wurde photometrisch bestimmt, die Qualität gelelektrophoretisch überprüft.

2.3.8. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese nach Sanger (Sanger et al., 1977) und wurde mehrfach modifiziert (Prober et al., 1987; Carothers et al., 1989; Lee et al., 1992). Als Matrize für die Reaktion dienten einerseits PCR-Fragmente („direkte Sequenzierung“), andererseits wurden in Vektoren eingebrachte DNA-Fragmente eingesetzt. Für Sequenzierungen von PCR-Fragmenten wurden 100 ng aufgereinigte DNA und 10 pM eines genspezifischen Oligonukleotides eingesetzt, während für die Sequenzierung von in Vektoren ligierte Fragmente 350-500 ng der aufgereinigten Plasmid-DNA und ein im Vektor bindendes Oligonukleotid verwendet wurden. Außerdem wurden der standardmäßig in 10 µl ablaufenden Reaktion 2 µl eines 5x Sequenzierungspuffers und 1 µl des Big Dye 3.1-Kit (beides Genterprise, Mainz) zugesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte gemäß dem Prinzip des „Cycle sequencing“ in einem Primus 96 advanced Thermocycler“ (Peqlab, Erlangen) nach einem Zwei-Schritt-Protokoll (15 s 96°C, 4 min 55°C, 33 Zyklen).

Die Proben wurden mit 1 µl 0,22 molarem SDS vermischt und denaturiert (5 min 98°C, 10 min 25°C), um mögliche Sekundärstrukturen zu eliminieren und die DNA einzelsträngig zu halten. Die anschließende Reinigung der Sequenzieransätze wurde, ebenso wie die Analyse der Proben, mittels des Kapillarsequenzierers 3730 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Weiterstadt) von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt. Die Daten der Sequenzierungsreaktionen wurden mit der Software „Chromas 1.45“ (<http://www.technelysium.com.au/>) visualisiert und bearbeitet.

2.3.9. Standard-Protokoll für die Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen wurden standardmäßig ungerichtet in das pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Mannheim) kloniert. Dazu wurden abweichend von den Herstellerangaben in einem 10 µl-Ansatz 12,5 ng Vektor-DNA eingesetzt. Außerdem wurde 1 U einer T4-DNA-Ligase mit dem entsprechenden Puffer der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) verwendet. Die Ligation erfolgte bei 4°C bzw. 16°C über Nacht oder bei RT für 1 h. Die Ansätze wurden gefällt (vgl. 2.3.3.) und in 10 µl HPLC-H₂O (Roth, Karlsruhe) aufgenommen.

2.3.10. Transformierung und Selektion von Bakterienzellen

50 µl elektrokompetente *E. coli* DH10B™-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit 3 µl Vektor-DNA gemischt, in einer Elektroporations-Küvette (Peqlab, Erlangen) mit Hilfe des „Easyject Prima“ Elektroporationsgerätes (Peqlab, Erlangen) bei 2500 V und einer Impulsdauer von 5 ms transformiert und umgehend in 1 ml LB-Medium resuspendiert.

Die Selektion auf *E. coli*-Zellen, welche den Vektor mit dem in die multiple Klonierungsschnittstelle ligierten Integrat aufgenommen haben, erfolgte über eine Ampicillin-Resistenz und Blau-Weiss-Selektion, die von den in den pGEM®-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) integrierten, für β-Lactamase codierenden und einem partiellen LacZ-Gen vermittelt werden.

50 µl und 100 µl der Bakterienlösung wurden auf Agar-Platten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausgestrichen und ü.N. bei 37°C bebrütet. Weiße Klone, welche das Plasmid mit dem Integrat in der multiplen Klonierungsschnittstelle enthalten sollten, wurden selektiv in 3-5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) überbracht und ü.N. auf einem Schüttler bei 37°C vermehrt.

2.3.11. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde mit dem „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ (Peqlab, Erlangen) bzw. dem „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Herstellerangaben isoliert. Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt.

2.3.12. Hydrolyse von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Zugabe der entsprechenden Restriktionsendonuklease und ihres Puffers zur DNA, die Reaktion wurde bei der optimalen Temperatur des Enzyms für 30-60 min durchgeführt. Anschließend wurde ein Aliquot des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.4. Real-Time RT-PCR

2.4.1. Versuchsvorbereitungen

Die Methode der quantitativen Real-Time RT-PCR wurde 1996 erstmals als modifizierter Typ der RT-PCR beschrieben (Heid et al., 1996) und ermöglicht eine quantitative Analyse der Transkription eines Gens. Im Unterschied zur RT-PCR kann die Quantifizierung in der Real-Time RT-PCR auf der Analyse von DNA, cDNA oder RNA basieren. Je stärker ein Gen in einer zu analysierenden Probe transkribiert wird und je mehr Matrizenmoleküle demzufolge zu Beginn der PCR vorhanden sind,

desto früher entstehen während der Amplifikation nachweisbare Produktmengen. Deren Detektion erfolgt in der Real-Time RT-PCR indirekt durch die Markierung der Amplifikate mit interagierenden, fluoreszierenden Reportermolekülen. Die Fluoreszenz steigt mit jedem PCR-Zyklus proportional an und kann daher in „real time“ während der Entstehung der Amplifikate gemessen werden.

In dieser Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff „SYBR® Green“ verwendet, der sich an die kleine Furche der DNA anlagert und ausschließlich im gebundenen Zustand fluoresziert. Allerdings können durch diesen Farbstoff auch andere, unspezifische PCR-Produkte markiert und detektiert werden. Dieser Nachteil wurde durch das Überprüfen der in der PCR-Reaktion entstandenen Produkte in einer Schmelzpunktanalyse analysiert: innerhalb der so genannten „Dissoziationskurve“ wird bei nur einem PCR-Amplifikat auch nur ein Maximum erwartet. Primer-Dimere oder unspezifische Produkte weisen notwendigerweise andere Schmelzpunkte auf, die in der Dissoziationskurve als zusätzliche lokale Maxima beobachtet werden können.

Die Berechnung der Ausgangskopiezahl in den eingesetzten Proben basiert auf der Erstellung einer Standardkurve. Diese beruht auf Verdünnungen von Plasmiden mit dem jeweils zu analysierenden Gen als Integrat. Die Konzentration y [ng/μl] der Plasmide wurde photometrisch bestimmt und die Ausgangskopiezahl der Plasmide folgendermaßen berechnet:

$$(\text{Länge Vektor} + \text{Integrat}) \times \frac{660 \text{ g}}{\text{mol}} = 6,022 \times 10^{23} \text{ Kopien}/\text{mol}$$

$$(\text{Länge Vektor} + \text{Integrat}) \times 660 \text{ g} = 6,022 \times 10^{23} \text{ Kopien}$$

$$\text{mit } (\text{Länge Vektor} + \text{Integrat}) \times 660 \text{ g} = x \times g, g = 10^9 \text{ ng}$$

$$\text{Daraus folgt} \quad x \times g = 6,022 \times 10^{23} \text{ Kopien}$$

$$x \times 10^9 \text{ ng} = 6,022 \times 10^{23} \text{ Kopien}$$

$$1 \text{ ng} = 6,022 \times 10^{23} / x \times 10^9 \text{ Kopien}$$

Die Plasmidkonzentration y [ng/μl] wurde wie beschrieben ermittelt und je 2 μl Plasmid in die Verdünnungsreihe eingesetzt. Daraus ergibt sich eine Ausgangskopiezahl von

$$2 \mu\text{l} \times y \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times \frac{6,022 \times 10^{23}}{x \times 10^9} \text{ Kopien} = z \frac{\text{Kopien}}{2 \mu\text{l}}$$

Im Mittel betrug die Kopienanzahl nach einer Plasmidpräparation 10^{10} - 10^{11} Kopien/μl. Von diesen wurden fünf serielle 1:10-Verdünnungen hergestellt; die Verdünnungen 10^7 - 10^3 dienten in der jeweiligen Real-Time RT-PCR als Standard. Der ct-Wert („cycle of threshold“) bezeichnet den Schnittpunkt des Schwellenwertes der Fluoreszenzdetektion mit dem der Fluoreszenzkurve. Die ct-Werte der Plasmid-Standardverdünnungen wurden gegen den Logarithmus der berechneten Kopienzahlen aufgetragen und ergaben eine Eichgerade, deren Steigung bei einer 100%igen PCR-Effizienz -3,33 betragen sollte.

Als Matritze dienten in dieser Arbeit cDNAs, die durch Reverse Transkription gleicher Mengen verschiedener Gesamt-RNAs generiert worden waren (vgl. 2.2.4). Die PCR-Reaktion wurde mit den Reagenzien des „Power SYBR[®] Green PCR Master Mix“ durchgeführt, Reaktion und Detektion erfolgten im „ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System-Thermocycler“ (beides Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software des Systems ausgewertet und mit „Microsoft Excel“ visualisiert.

2.4.2. Design der Oligonukleotide

Genomische Verunreinigungen der Real-Time RT-PCR wurden durch das Design der Oligonukleotide verhindert: mindestens ein Primer wurde so gewählt, dass er übergreifend in zwei verschiedenen Exons bindet. Dies ermöglicht ausschließlich die Reaktion des Oligonukleotides mit intronlosen cDNA-Matritzen. Zudem wurde die Effizienz der PCR-Reaktion durch die Begrenzung des entstehenden Amplifikates auf 130-170 Nukleotide optimiert. Die Bildung möglicher Primerdimere wurde mit Hilfe des Programmes „IDT SciTools Oligo Analyzer 3.0“ (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) überprüft, der ermittelte „ ΔG “-Wert zwischen zwei Oligonukleotiden einer PCR sollte nicht mehr als -5 kcal/mol betragen.

2.4.3. Durchführung der Real-Time RT-PCR

Von allen Proben wurde auf eine identische Menge Gesamt-RNA eine Reverse Transkription (vgl. 2.2.4.) durchgeführt. Um Pipettiergenauigkeiten zu vermindern, wurden von jeder Probe je 3 Ansätze („Triplikate“) und von jedem Standard je 2 Proben („Duplikate“) angesetzt. Als Negativkontrolle dienten Proben ohne Matrizen-cDNA.

Für einen 25 μ l-Ansatz wurden 11,0 μ l HPLC-H₂O (Roth, Karlsruhe) vorgelegt und mit 12,5 μ l des „Power SYBR[®] Green PCR Master Mix“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) sowie 1 μ l cDNA vermischt. Die Oligonukleotide wurden in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt und alle Pipettierschritte unter Ausschluss direkter Lichteinstrahlung durchgeführt.

Entsprechend der Probenanzahl wurde ein Master-Mix ohne cDNA angesetzt, um Pipettiergenauigkeiten zu vermindern. Der Master-Mix wurde aufgeteilt, mit den entsprechenden cDNAs bzw. Standardverdünnungen gemischt und 23,5 μ l davon in drei (Triplikate) bzw. zwei (Duplikate) „wells“ einer „96-Well Optical Reaction Plate“ pipettiert. Unmittelbar vor der Durchführung der Real-Time RT-PCR wurde die versiegelte Platte kurz zentrifugiert, in den „ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System Thermocycler“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingelegt und folgendes Standardprotokoll durchgeführt: nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 10 min erfolgte die Amplifikation für 40 Zyklen. Diese setzte sich aus der Denaturierung bei 95°C für 15 s, der Primer-Anlagerung bei 60°C für 30 s und der Elongation und Detektion bei 72°C für 30 s zusammen. Die Detektion erfolgte bei der relativ hohen Temperatur von 72°C, wodurch eventuell

vorhandene Primer-Dimere aufgetrennt und damit der Detektion entzogen wurden. Die anschließende Dissoziationskurve der Amplifikate wurde zwischen 60°C und 95°C durchgeführt.

2.4.4. Auswertung der Real-Time RT-PCR

Die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR wurden anhand der für jedes Gen erstellten Eichgerade folgendermaßen ausgewertet: anhand der Eichgeraden berechnete die Software den Korrelationskoeffizienten R^2 und die Steigung. Mit Hilfe der Formel $E = \left(10^{-1/\text{Steigung}} \right) - 1 \times 100$ (nach Rasmussen, 2001) konnte die Effizienz der PCR berechnet werden, die Ausgangskopienzahl wurde mit Hilfe der unter 2.4.1. angegebenen Formel bestimmt. Die Mittelwerte der Triplikate und deren Standardabweichung wurden berechnet; die höchste Kopienzahl eines Gens wurde als Bezugspunkt gleich 100% gesetzt, die anderen Werte entsprechend relativiert und graphisch dargestellt.

2.5. mRNA-*in situ*-Hybridisierung

2.5.1. Herstellung digoxygenerter Sonden durch *in vitro*-Transkription

Die mRNA-Detektion setzt den Einsatz genspezifischer, markierter Sonden voraus, die mit der mRNA in Schnittpräparaten bzw. Embryonen spezifisch hybridisieren. Mittels einer unlöslichen Farbreaktion kann der Ort der mRNA-Transkription lokalisiert werden.

Die Sonden wurden in einer PCR-Reaktion unter Standardbedingungen mit spezifischen Oligonukleotiden (Anhang 7.5.) amplifiziert, wobei jeweils ein Primer an seinem 5'-Ende mit einer Erkennungssequenz für die T7-RNA-Polymerase versehen war. Damit wurde eine „antisense“-Sonde, welche mit der mRNA der Gewebeschnitte hybridisieren sollte und eine „sense“-Sonde, welche identisch zu der Gewebe-mRNA ist und theoretisch nicht hybridisieren kann, generiert. Die amplifizierten DNA-Moleküle wurden aufgereinigt (2.3.6.), 1 µg mittels des „Dig RNA Labeling Kits (SP6/T7)“ (Roche Diagnostics, Mannheim) in RNA umgeschrieben und mit Digoxigenin (Dig) markiert. Die Konzentration der Sonden wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000-Spektralphotometers (PepqLab, Erlangen) ermittelt und die Markierungseffizienz bestimmt.

2.5.2. Analyse der Markierungseffizienz

Die Effizienz der Dig-Markierung von Sonden, die optisch gegeneinander quantifiziert werden sollten, wurde durch die so genannte „Dot-Blot-Methode“ ermittelt. Dabei wurden in zuvor gekennzeichnete Areale einer PVDF-Trägermatrix (Roti®-PVDF, Porenweite 45 µm, Roth, Karlsruhe) 1 µl-Tropfen serieller Verdünnungen der markierten Soden aufgetragen. Als Vergleich dienten

entsprechende Verdünnungen einer im System enthaltenen, vom Hersteller Dig-markierten Sonde. Die Proben wurden nach fünfminütigen Trocknen bei RT mit einem „UV Stratalinker® 2400“ (Stratagene, Amsterdam) zwei Mal bei 1200 μJ auf der Membran fixiert. Die Membran wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und folgende Reaktion unter leichtem Schütten durchgeführt: die Trägermatrix wurde 5 min in Puffer 1 gewaschen, 15 min in Puffer 2 äquilibriert und für 30-45 min mit 1:1000 in Puffer 2 verdünnten „alkalische Phosphatase-konjugierten Anti-Digoxigenin Fab-Fragmenten“ (Roche Diagnostics, Mannheim) inkubiert. Nach der Antikörperreaktion wurde die Membran zwei Mal für 10 min in Puffer 1 gewaschen und in Puffer 3 äquilibriert (vgl. 2.8.). Die Detektion der Signale erfolgte durch 1:50 in Puffer 3 verdünnter „NBT/BCIP stock solution“ (Roche Diagnostics, Mannheim) lichtgeschützt für 15-45 min. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Spülen der Membran in entionisiertem H_2O abgebrochen, solange die Farbsignale noch deutliche Unterschiede aufwiesen und nicht in die Sättigungs-Phase übergegangen waren. Durch den Vergleich der Signalintensität konnten Rückschlüsse auf die Effizienz der Sondenmarkierung gezogen und die Sonden in einem vergleichbaren Maß eingesetzt werden.

2.5.3. Durchführung der Hybridisierung in Schnittpräparaten

Mit Hilfe eines Kryostaten (MEV, Slee Technik GmbH, Mainz) wurden 10 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und nach 1 h Fixierung bei Raumluft bei -80°C gelagert. Die Gewebefixierung erfolgte nach mindestens einstündigem Temperieren der luftdicht verschlossenen Präparate bei RT für 15 min in 4% Paraformaldehyd. Anschließend wurden die Präparate durch zwei fünfminütige Waschschrte in PTW und einen Äquilibrierungsschritt in 1x PBS auf die Hybridisierung vorbereitet (vgl. 2.8.). Dafür wurde eine zuvor ermittelte (vgl. 2.5.2.), adäquate Menge Dig-markierter Sonde mit Hybridisierungslösung auf 200 μl aufgefüllt und je 50 μl auf ein Präparat aufgetragen. Die Objektträger wurden mit einem sterilen Deckglas abgedeckt in einer feuchten Kammer bei 42°C ü.N. hybridisiert. Durch vorsichtiges Abschütteln wurde die Abdeckung entfernt und überschüssige Sonde bei RT 3 Mal 5 min in 2x SSC abgewaschen. Nicht spezifisch gebundene Sondenmoleküle wurden in einem anschließenden stringenteren Waschschrte von 20 min in 0,1x SSC bei 60°C entfernt. Dieser Schritt wurde durch eine 15-minütige RNaseA/T1-Reaktion komplettiert, in der alle verbleibenden, nicht perfekt hybridisierten Sondenbereiche und freie, ungebundene Sondenmoleküle abgebaut wurden. Anschließend wurden die Präparate drei Mal 5 min in 2x SSC gewaschen, 5 min in 1x PBT äquilibriert und 15 min in Puffer 2 inkubiert. Die Antikörperreaktion erfolgte durch das Aufbringen von etwa 50 μl „anti-Dig-alkalische Phosphatase-Konjugates (Roche Diagnostics, Mannheim) pro Schnitt (8 μl Konjugat in 792 μl Puffer 2) und der Inkubation für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Präparate zwei Mal 5 min in PBT gewaschen und 5 min in Puffer 3 äquilibriert.

Die Substratreaktion erfolgte durch das Aufbringen von 100 µl NBT-BCIP-Lösung (NBT-BCIP-Konzentrat 1:500 in Puffer 3 verdünnt), die Reaktion selbst fand im Dunkeln statt und wurde nach kurzer Sichtkontrolle mit 1x PBS abgestoppt. Die Präparate wurden mit 1x PBS/Glycerin (1:1) beschichtet, mit sterilen Deckgläsern eingedeckt und versiegelt.

Die optische Auswertung erfolgte auf einem „DM RA“ Mikroskop mit einer „DC200“ Digitalkamera und der zugehörigen Software („DC Viewer“, alles Leica, Wetzlar) bzw. auf einem „Axiostar Plus“ Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen), einer „Powershot G5“ Digitalkamera und der Software „RemoteCapture 2.7“ (beides Canon, Krefeld).

2.5.4. Whole Mount mRNA *in situ*-Hybridisierung (WMISH)

Embryonen von *Xenopus laevis* wurden mit der nach (Harland, 1991) modifizierten Methode der „Whole Mount mRNA *in situ*-Hybridisierung“ (WMISH) *in toto* hybridisiert und die mRNA-Transkription der untersuchten Gene lokalisiert. Limitierender Faktor dieser Methode ist die Anzahl der zu durchdringenden Zellschichten, da bei zunehmender Größe die Durchdringung der Gewebe mit Fixierungsmitteln und Hybridisierungslösung nicht mehr ausreichend gegeben ist. In dieser Arbeit wurde die Hybridisierung an *Xenopus laevis*-Embryonen bis zu Entwicklungsstadium 37 nach Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop und Faber, 1975) durchgeführt (vgl. Anhang 7.15).

Die Gallerthülle der Embryonen wurde durch eine 5-15 min andauernde Inkubation in einer 2%igen L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat-Lösung in 0,1x MMR (pH=7,8) unter Sichtkontrolle entfernt (Binokular-Mikroskop RZT-SF, Novex). Die dann sehr fragilen Embryonen wurden vorsichtig in 0,1x MMR und vollentionisiertem H₂O gewaschen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Fixierung der Embryonen erfolgte in 1 ml 1x MEMFA für 1-2 Stunden bei RT. Das Fixativ wurde bis auf 500 µl entfernt, das gleiche Volumen Methanol abs. hinzupipettiert und die Embryonen für 2-3 min darin inkubiert. Schließlich wurde die gesamte Lösung entfernt und durch Methanol abs. ersetzt. Derart fixiert wurden die Embryonen bei -20°C bis zur weiteren Versuchsdurchführung gelagert.

Die Prähybridisierung der fixierten Embryonen wurde mit der Rehydrierung in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25% Methanol in PBSw) für je 5 min bei RT und einem anschließenden Waschschrift von drei Mal 5 min in PBSw eingeleitet. Der folgende, maximal 25 min bei RT andauernde Proteinase K-Verdau wurde durch kurzes Spülen und zweimaliges fünfminütiges Waschen der Embryonen in PBSw gestoppt (vgl. 2.8). Eine anschließende Refixierung in 4% Paraformaldehyd für 20 min bei RT stabilisierte die fragilen Embryonen ein zweites Mal. Das Paraformaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min in PBSw entfernt. Die Embryonen wurden nach einem dreimal 5 min andauerndem Zwischenschritt in PBSw/Hybridisierungslösung (1:1) in 100% Hybridisierungslösung überführt. Endogene alkalische Phosphatasen wurden durch die Inkubation der Embryonen für 1 h bei 65°C im Wasserbad reduziert und so die Hintergrundfärbung minimiert.

Die Prähybridisierung erfolgte bei 55°C in einem Wasserbad für 2-2,5 h. Die Sonden wurden entsprechend der ermittelten Markierungseffizienz eingesetzt: 100 ng der am stärksten markierten Sonde dienten als Richtwert, die Volumina der schwächer markierten Sonden wurden entsprechend berechnet und mit je 3 Volumen Hybridisierungslösung versetzt. Unmittelbar vor ihrer Verwendung wurden die Sonden 5 min bei 95°C denaturiert und 100 µl zu den Embryonen pipettiert. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte ü.N. bei 55°C.

Die Hybridisierung wurde durch das Waschen der Embryonen in Hybridisierungslösung für 5 min bei RT beendet und die Antikörperreaktion durch einen Wechsel des Puffersystems über einen Zwischenschritt aus Hybridisierungslösung/(2x SSC/0,1% CHAPS) (1:1) zu 2x SSC/0,1% CHAPS (1:1) eingeleitet. In dieser Lösung wurden die Embryonen nach einem Waschschrift von 5 min zwei Mal 15 min inkubiert. Die Konzentration von SSC wurde reduziert und die Embryonen nach kurzen Waschen zwei Mal 15 min in der Lösung aus 0,2x SSC/0,1%CHAPS inkubiert, bevor sie nach einen Zwischenschritt in TBS/(0,2x SSC/0,1% CHAPS) (1:1) in TBS überführt wurden. Unspezifische Bindungen des Antikörpers wurden durch eine einstündige Inkubation in Antikörperpuffer bei RT blockiert, die Antikörperreaktion („Anti-DIG-Fab-Fragment“, Roche Diagnostics, Mannheim, 1:5000 in Antikörperpuffer verdünnt) erfolgte ü.N. bei 4°C.

Die Antikörperreaktion wurde durch dreimaliges kurzes Spülen der Embryonen in TBS reduziert und durch ein drei Mal 10 min andauerndes Spülen unter leichtem Schütteln gestoppt. Während einer 15 min dauernden Inkubation in AP-Puffer wurden die Embryonen vorsichtig in plane Reaktionschälchen (Nunc, Wiesbaden) überbracht. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von NBT/BCIP (Roche, Mannheim, 1:50 in AP-Puffer verdünnt) ausgelöst und erfolgte unter Lichtausschluss bei regelmäßiger Sichtkontrolle mittels eines Binokular-Mikroskopes (Novex) bis zu einer deutlichen Farbreaktion.

Die Farbreaktion wurde durch kurzes Spülen und anschließendes Waschen in Stopp-Puffer beendet, die Embryonen nach einer aufsteigenden Methanolreihe (33%, 66%, 100%, je 10 min) und fünfmaligem Spülen in PBSw in 4% Paraformaldehyd refixiert. Nach einem erneuten fünfmaligen Spülen in PBSw und einer erneuten Dehydrierung in einer aufsteigenden Methanolreihe wurde die Pigmentierung der Embryonen durch die Inkubation für mindestens 5 min in Benzylalkohol/Benzylbenzoat (2:1) entfernt. Die Lagerung der Präparate erfolgte in Benzylalkohol/Benzylbenzoat (2:1) bei 4°C. Die durchsichtigen Embryonen wurden umgehend mit einer Digitalkamera (Canon Powershot G5) und der zugehörigen Software („Canon Zoom Browser EX“, beides Canon, Krefeld) dokumentiert.

2.6. Methoden zur Expression rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine beruht auf der gerichteten Klonierung eines zuvor amplifizierten cDNA-Abschnittes in einen Expressionsvektor, der unter der Kontrolle eines von außen induzierbaren Promotors steht. Der Vektor wird in entsprechende Bakterienzellen eingebracht, der Promotor induziert und das rekombinante Protein synthetisiert. Die selektive Reinigung des rekombinant exprimierten Proteins beruht in dieser Arbeit auf der Bindung eines N-terminal an das Protein angefügten „His-Tags“ an eine spezielle Nickel-Nitrilotriessigsäure- (Ni-NTA-) Agarose (Qiagen, Hilden).

2.6.1. Generierung eines Expressionskonstrukts

Der zur Expression gewählte Vektor pET15b (Merck Biosciences, Schwalbach, vgl. Anhang 7.14) wurde mit den Enzymen NdeI und BamHI bzw. XhoI (Fermentas, St. Leon-Roth) hydrolysiert. Als Ausgangsmaterial für jeden präparativen Vektor-Verdau wurden mindestens 4 mg des ungeschnittenen Vektors eingesetzt. Eine Doppelreaktion mit NdeI und BamHI wurde grundsätzlich mit dem weniger reaktiven Enzym NdeI begonnen. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde gelelektrophoretisch überprüft und der Ansatz gefällt. Die Vollständigkeit der zweiten Hydrolyse-Reaktion mit BamHI konnte gelelektrophoretisch nicht überprüft werden, da eine optische Auftrennung durch das zu nahe Zusammenliegen der Schnittstellen nicht gegeben war. Die Religation des Vektors wurde durch die Entfernung der Phosphatgruppen am 5'- und 3'- Ende mit einer „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“-Inkubation (CIAP, Fermentas, St. Leon-Roth) verhindert. Der Ansatz wurde gefällt, in einer adäquaten Menge HPLC-H₂O (Roth, Karlsruhe) aufgenommen und die Konzentration mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (PepqLab, Erlangen) bestimmt.

Das in den Vektor zu inserierende DNA-Fragment wurde per PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden in einer ersten PCR amplifiziert und 1/50 dieses Ansatzes in einer zweiten PCR mit Oligonukleotiden, welchen ein überhängendes Ende mit Schnittstellen für spezifische Restriktionsendonucleasen angefügt wurde, vervielfältigt (2.3.2.). Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (2.3.6.) und in das pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Mannheim) ligiert (2.3.9.). Nach der Transformation in *E. coli* DH10B[™]-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe), der Selektion, Vermehrung und Plasmidisolierung wurde ein Probenaliquot sequenziert, um mögliche Nukleotidaustausche aufzudecken. Durch das Anfügen der spezifischen Schnittstellen an das Integrat konnte dieses aus dem pGEM[®]-T Easy Vektor herausgeschnitten, aufgereinigt und gerichtet in einer 20 µl-Reaktion in den Vektor pET15b ligiert werden. Dabei wurden im Allgemeinen etwa 100 ng Vektor eingesetzt, die Menge des einzusetzenden Inserts wurde mit Hilfe der nachfolgend angegebenen Formel berechnet, wobei das molare Verhältnis von Integrat zu Vektor zwischen 5 und 20 betrug:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insrt}}{\text{kb Vektor}} \times \text{moleres Verhältnis} \frac{\text{Integrat}}{\text{Vektor}} = \text{ng Integrat.}$$

Das Plasmid wurde nach der Fällung in elektrokompente *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Expressionszellen (Merck Biosciences, Schwalbach) eingebracht und auf ampicillinhaltigen Agar-Platten selektiert. Einzelne Klone wurden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht selektiv vermehrt und die Plasmide mit Hilfe des „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ (Peqlab, Erlangen) bzw. des „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Angaben der Hersteller isoliert (2.3.11.). 5 µl der Plasmidpräparation wurden zeitgleich mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BglII (Fermentas, St. Leon-Roth) hydrolysiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der Banden ließ Rückschlüsse auf das enthaltene Integrat zu.

2.6.2. Vortests zur Expression rekombinanter Proteine

Vor dem Hauptversuch wurden die optimalen Versuchsbedingungen für jedes rekombinant zu exprimierende Protein ermittelt. Dazu wurden aus einer ü.N. vorgezogenen Bakterienkultur 400 µl in 3,6 ml LB-Medium mit Ampicillin (150 µg/ml) überbracht und auf einem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀=0,6 - 0,7 vermehrt. Aus jedem Reaktionsgefäß wurden 250 µl als Negativ-Kontrolle entnommen, die restliche Kultur diente dem Austesten der optimalen Versuchsbedingungen.

2.6.2.1. Optimierung der IPTG- bzw. δ-Aminolävulinsäure-Konzentration

IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) wird zur gezielten Induktion der Überexpression des rekombinanten Proteins benötigt, während δ-Aminolävulinsäure eine Vorstufe des Häms darstellt. Die Wahl der von *E. coli* abgeleiteten BL21(DE3)pLysS-Zellen bietet eine effiziente doppelte Kontrolle der Proteinexpression (Sambrook und Russel, 2001): der Bakterienstamm trägt das Genom des lysogenen Phagen λDE3 in sich und verfügt damit über eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors. Die Induktion dieses Promotors, der seinerseits die Expression der T7-RNA-Polymerase initiiert, erfolgt erst in Anwesenheit des Lactose-Analogons IPTG. Die Expression ohne IPTG wird verhindert, indem das für den Repressor des *lacUV5*-Promotors kodierende, chromosomale *lacI*-Gen unter nicht-induzierten Bedingungen exprimiert und die Transkription der T7-RNA-Polymerase unterdrückt wird. Die geringfügige, basale Transkription der T7-Polymerase wird durch einen zweiten Kontrollmechanismus unterdrückt: die Expressionszellen enthalten ein zweites, für T7-Lysozym kodierendes Plasmid (pLYS). Dieses fortwährend gering exprimierte Enzym ist der natürliche Inhibitor der T7-RNA-Polymerase und verhindert durch eine andauernde Hemmung eine vorzeitige Überexpression des rekombinanten Gens. Durch die Zugabe von IPTG wird die T7-RNA-Polymerase überexprimiert und ist dann in einer so hohen Konzentration vorhanden, dass die Lysozym-Hemmung nicht mehr ins

Gewicht fällt: die T7-RNA-Polymerase lagert sich an den im pET-Vektor befindenden T7-Promotor an, unter dessen Kontrolle wiederum die kodierende Sequenz des rekombinant zu exprimierenden Proteins steht.

δ -Aminolävulinsäure als Vorstufe des Häms wird in *E.coli*-Zellen über mehrere Zwischenstufen verstoffwechselt: mit Hilfe der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase wird das Substrat im Cytoplasma der Zellen zu Porphobilinogen umgesetzt. Dieses reagiert mit Hilfe der Enzyme Uroporphyrinogen-I-Synthase und Uroporphyrinogen-III-Cosynthase zu Uroporphyrinogen III, das wiederum mit der Uroporphyrinogen-Decarboxylase zu Coprotoporphyrinogen III umgesetzt und in die Mitochondrien eingeschleust wird. Dieses wird über die Zwischenstufen Protoporphyrinogen IX und Protoporphyrin IX zu Häm oxidiert.

Die optimalen Konzentrationen von IPTG bzw. δ -Aminolävulinsäure wurden ermittelt, indem den vorbereiteten Bakterienkulturen zum einen IPTG in einer Endkonzentration von 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 und 1,5 mM bei einer gleich bleibenden δ -Aminolävulinsäure-Konzentration von 1 mM beigefügt wurde. Zum anderen wurde der IPTG-Spiegel bei 1 mM konstant gehalten, während die δ -Aminolävulinsäure-Endkonzentration zwischen 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 mM variiert wurde. Das rekombinante Protein wurde bei 24°C für 3 h auf einem Schüttler bei 200 U/min exprimiert, anschließend wurden 250 μ l der Bakteriensuspension abgenommen und die OD₆₀₀ bestimmt.

Alle im Lauf der Versuche genommenen Proben wurden pro einer OD₆₀₀=0,6 in je 100 μ l 1x PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 2x Lämmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert, umgehend auf Eis gekühlt und ein Aliquot auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (vgl. 2.6.3.).

2.6.2.2. Optimierung der Expressionsdauer

Eine Expression über 1, 2, 3, 4 und 20 h unter den optimierten IPTG- und δ -Aminolävulinsäure-Konzentration brachte Aufschluss über die optimale Dauer der Reaktion. Da sich im Verlauf der Arbeit herausstellte, dass die rekombinant exprimierten Globine bei langen Expressionszeiten zum Abbau bzw. Einbau in Einschluss-Körperchen neigen, war dieser Test besonders wichtig. Von jeder Probe wurde am Ende der Expression ein 250 μ l Aliquot abgenommen, die optische Dichte ermittelt und mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.6.3.).

2.6.2.3. Bestimmung des am besten exprimierenden Bakterienklones

Unter den optimierten Bedingungen wurde der für die rekombinante Expression am besten geeignete Bakterienklon ermittelt, indem verschiedene Klone mittels eines sterilen Zahnstochers in Vorkulturen selektiv vermehrt wurden. Von diesen Vorkulturen wurden je 400 μ l in die eigentlichen

Testansätze eingesetzt. Auch hier wurden am Ende der Expression Proben genommen, die optische Dichte ermittelt und Aliquots mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt.

2.6.2.4. Ermittlung der Aufreinigungsmethode

Die Analyse der optimalen Aufreinigungsmethode des rekombinant exprimierten Proteins orientierte sich an dem Protokoll Nummer 6 „Determination of target protein solubility“ des „QIAexpressio-nist“ (Qiagen, Hilden). Abweichend wurde die Expression unter den zuvor optimierten IPTG- und δ -Aminolävulinsäure-Konzentrationen durchgeführt und kein Kanamycin eingesetzt. Die Expression erfolgte bei 24°C und 200 U/min. Vor der Induktion und am Ende des Versuches wurden je 250 μ l der Bakteriensuspension aliquotiert. Während der Lyse der Bakterienzellen und der Aufreinigung des Proteins wurden nach jedem Schritt jeweils 20 μ l Probe entnommen und 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer verdünnt. Befand sich das rekombinant exprimierte Protein nach der SDS-PAGE in der Probe des Überstandes, konnte das Protein nativ aufgereinigt werden, war es dagegen in der Probe des resuspendierten Präzipitates sichtbar, musste die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Im Falle der in dieser Arbeit rekombinant exprimierten Globine wurde generell eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen gewählt, da nur so das Häm als prosthetische Gruppe der Globine erhalten werden konnte.

Alle im Lauf der Versuche genommenen 250 μ l-Proben wurden pro einer $OD_{600}=0,6$ in je 100 μ l 1x PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 2x Lämmli-Puffer versetzt. Die von Bakterien-Präzipitaten genommenen Proben wurde in 180 μ l 1x Lämmli-Puffer homogenisiert. Alle Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert, umgehend auf Eis abgekühlt und ein Aliquot per SDS-PAGE aufgetrennt.

2.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts. Die in einer Gelelektrophorese problematische, verschiedenartige Ladung der Aminosäuren wird durch die Inkubation der Proteine mit SDS nivelliert: das stark negativ geladene SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine bindet und hinterlässt in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen. Durch interne Disulfidbrücken gebildete Sekundärstrukturen der Proteine werden durch das im Lämmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert (vgl. 2.8.). Theoretisch sollte daher die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel nur von ihrem relativen Molekulargewicht bestimmt sein.

Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird ein so genanntes „Sammelgel“ über das „Trenngel“ gegossen. Die Matrix des Sammelgels besitzt aufgrund der geringeren Acrylamid-Konzentration weitere Poren und durch den zugesetzten Puffer einen geringeren pH-Wert als das

Trenngel. Die Proteine wandern in dem Sammelgel schnell und ohne Auftrennung als scharfe, fokussierte Bande in einem Gebiet hoher Feldstärke. Mit dem Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel mit geringerer Porengröße und höherem pH-Wert verringert sich die Geschwindigkeit der Proteine drastisch und die Auftrennung erfolgt gemäß ihrem Molekulargewicht.

Standardmäßig wurden 1 mm dicke, 4%ige Sammelgele in Kombination mit 12%igen Trenngelen gegossen. Darauf aufgetragen wurden je 20 µl der zuvor 5 min bei 95°C denaturierten und auf Eis gelagerten Proben. Eine Probenflasche jeden Gels wurde mit 5µl eines Größenstandards beladen (PageRuler™ Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth, Anhang 7.6). Die Auftrennung erfolgte in einem „Mini-Protean II“-Elektrophoresesystem (Biorad Laboratories, München) in 1x Elektrophoresepuffer bei 100 V. Sobald die durch das Bromphenolblau des Lämmli-Puffers gekennzeichnete Lauffront der Proteine deutlich in das Trenngel eingedrungen war, wurde die Spannung auf 150-200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde mit der Ankunft der Lauffront am unteren Ende des Gels beendet, die Kassette geöffnet und das Trenngel zur Visualisierung der Proteinbanden gefärbt.

2.6.4. Coomassie-Färbung

Das Trenngel wurde direkt nach der elektrophoretischen Auftrennung für mindestens 30 min in der Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert (vgl. 2.8.). Das dunkelblau gefärbte Gel wurde kurz in H₂O gewaschen und in kontinuierlich gewechseltem Entfärber unter leichtem Schwenken differenziert. Die Gele wurden umgehend mittels eines Scanners dokumentiert.

2.6.5. Silbernitrat-Färbung

Während mit der Coomassie-Färbung 0,5-2 µg Protein pro Bande detektiert werden können, ist die Silbernitrat-Färbung mit einer Detektionsgrenze von etwa 1 ng Protein pro Bande deutlich sensitiver. Damit eignet sich diese Färbung besonders gut zur Überprüfung der Reinheit rekombinant exprimierter Proteine.

Das Trenngel wurde nach der SDS-PAGE 15 min in 50%igem Alkohol fixiert, kurz mit H₂O gespült und für 15 min in die Silber-Färbelösung überführt. Diese enthält Silbernitrat, welches sich an die Proteine anlagert und nach einem kurzen Waschschrift in Wasser in der Stopp-Lösung reduziert wird. Das elementare Silber fällt schwarz-braun aus und visualisiert die Proteinbanden. Die Dokumentation erfolgte umgehend mittels eines Scanners.

2.6.6. Rekombinante Expression und Aufreinigung von Proteinen

Die rekombinante Protein-Expression wurde parallel in 4 x 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (150 µg/ml) unter den optimierten Bedingungen bei 24°C und 200 U/min durchgeführt. Die Expression wurde durch Präzipitation der Bakterienzellen bei 4000 g für 20 min gestoppt und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einer adäquaten Menge nativen Lyse-Puffers aufgenommen und bei -20°C gelagert. In zwei sich anschließende Auftau- und Gefrierzyklen wurden die Bakterienzellen aufgebrochen. Der Zellaufschluss wurde durch fünfzehn 30 s Sonifizierungsschritte vervollständigt, wobei die Suspension nach jeder Ultraschallbehandlung für 30 s auf Eis gelagert wurde. Die Zelltrümmer wurden bei 10000 g und 4°C für 30 min pelletiert, der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Nach jedem Schritt wurden Aliquots von 6 µl entnommen, mit 180 µl 1x Lämmli-Puffer vermischt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte über die Bindung des dem Protein N-terminal angefügten 6xHis-Tags an eine immobilisierte Nickel-Nitrilotriessigsäure- (Ni-NTA-) Agarose (Qiagen, Hilden). Nach mehreren Waschschritten wurde das aufgereinigte Protein in einer Verdrängungsreaktion mit zunehmender Imidazol-Konzentration von der Agarose eluiert.

Die Aufreinigung wurde gemäß des Protokolls Nummer 12 des „QIAexpressionist“ (Qiagen, Hilden) unter nativen Bedingungen durchgeführt, wobei die Mengen des eingesetzten Protein-Extrakts und der Ni-NTA-Agarose verdoppelt und direkt in der Elutionssäule (Disposable 5 ml polypropylene columns, Pierce/Perbio, Rockford, Illinois, USA) zur Reaktion gebracht wurden. Die Elution wurde fünf Mal durchgeführt, wobei nach jedem Schritt 6 µl Probe abgenommen, mit 180 µl 1x Lämmli-Puffer vermischt und mittels eines SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Protein-Konzentration der Elutionen wurde mit der Bradford-Methode bestimmt.

2.6.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen mittels der Bradford-Methode (Bradford, 1976) beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomassie brilliant blau G250“ an kationische Seitenketten der Proteine im sauren Milieu, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Anhand einer zuvor angefertigten Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen kann die Proben-Konzentration bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden 980 µl Bradfordreagenz (Roti[®]-Quant, Roth, Karlsruhe) mit maximal 20 µl Proteinlösung versetzt und nach 10 min die optische Dichte bei 595 nm mit einem BioPhotometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bestimmt. Durch den Vergleich mit der Eichgerade wurde die Konzentration der Proteinlösung ermittelt.

2.6.8. Spektralanalyse rekombinant exprimierter Globine

Ein Vergleich der Globin-Spektren im oxygenierten und reduzierten Zustand gibt Auskunft über die Koordination des Eisen-Ions im Häm. Nach der Protein-Aufreinigung liegt das Eisen-Ion gewöhnlich oxygeniert vor und kann durch das stark reduzierend wirkende Agens Na-Dithionit unter Erhalt der Wertigkeit des Eisen-Ions deoxygeniert werden.

Für diesen Versuch wurden 10 µl des rekombinant exprimierten Proteins aliquotiert, mit wenigen Körnchen Na-Dithionit versetzt und das UV-Vis-Spektrum der Probe mit Hilfe des NanoDrop®-Spektralphotometers ND-1000 (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Die Spektren wurden mit „Microsoft Excel“ in einem Bereich von 400-700 nm grafisch dargestellt.

2.6.9. Protein-Nachweis auf Membranen: Western Blot

Die Methode des Western-Blots beruht auf dem Elektrotransfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes Feld auf eine Trägermembran. Die Lage der gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine bleibt dabei erhalten. Die Zugänglichkeit der Proteine auf der Trägermatrix ermöglicht die anschließende selektive Detektion mittels Antikörper.

2.6.9.1. Elektrotransfer

Der Proteintransfer erfolgte im „Tank-Blot“-Verfahren in der „Mini Trans Blot Cell“ (Biorad Laboratories, München) nach Angaben des Herstellers bei einer Spannung von 150 V für 1,5 h von dem in einer SDS-PAGE (vgl. 2.6.3) angefertigten Trenngel auf eine PVDF-Membran (Roti®-PVDF, Porendurchmesser 0,45 µm, Roth, Karlsruhe). Als Größenstandard in der SDS-PAGE diente die „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Roth, vgl. Anhang 7.6).

2.6.9.2. Immuno-Detektion des rekombinanten Proteins

Das per Western-Blot auf eine PVDF-Membran immobilisierte, mit einem „His-Tag“ versehene, rekombinant exprimierte Protein wurde mittels der Affinität von Ni-NTA-Agarose zu His-Markierungen an Proteinen detektiert. Die in diesem Versuch eingesetzte „Ni-NTA-AP Conjugate stock solution“ (Qiagen, Hilden) besteht aus einer mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Ni-NTA-Agarose. Die Phosphatase dephosphoryliert BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylhydrogenphosphat-P-Toluidin), das entstehende Produkt reagiert in einer Redoxreaktion mit Nitroblautetrazolium (NBT) zu einem unlöslichen, blau-violetten Farbstoffkomplex.

Die Trägermatrix wurde nach zwei 10-minütigen Waschschrinen in TBS-Puffer für 1 h in TBS-Puffer mit 3% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich, Taufkirchen) unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei 10-minütigen Waschschrinen in TBS-Puffer wurde die Membran für 1 h in TBS-Puffer mit einem Promille „Ni-NTA-AP Conjugate stock solution“ (Qiagen, Hilden) inkubiert. Die Membran wurde 3 Mal 10 min in TBS-Puffer mit 0,05% Tween20 gewaschen und die Farbreaktion mit NBT/BCIP durchgeführt. Diese wurde mit Wasser abgestoppt, sobald das blau-violette Signal deutlich sichtbar war. Nachdem die Membran an der Luft getrocknet war, wurde das Ergebnis umgehend mittels eines Scanners dokumentiert.

2.7. *In silico*-Analysen

2.7.1. Datenbanken und Programme

Zum Auswerten der von der Firma Genterprise erstellten Sequenzdaten wurde das frei verfügbare Programm „Chromas 1.55“ (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) verwendet. Literaturrecherchen wurden in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ NCBI durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Von dieser Seite wurde auch das Werkzeug „Spidey“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>) zum Vergleich genomischer mit mRNA-Sequenzen genutzt.

Blast-Suchen und Genom-Analysen wurden für Mensch, Maus, Huhn, andere Säuger und *Danio rerio* in der NCBI-Datenbank durchgeführt, außerdem wurden für speziesspezifische Analysen folgenden Datenbanken genutzt: *Tetraodon nigroviridis* (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetranew/>), *Takifugu rubripes* (<http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html>), *Oryzias latipes* (<http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka/>), *Xenopus tropicalis* (<http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.home.html>).

Alignments wurden mit den Programmen „AlignX“ (Vector NTI Suite 9.0) und GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>) erstellt und bearbeitet. Stammbäume wurden mit den Programmen „MrBayes 3.0 beta 4“ (Huelsenbeck und Ronquist, 2001) und Mega3.1 (Kumar et al., 2004) berechnet, die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm Treeview (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). Die molekulare Masse von Proteinen wurde mit Hilfe des „EditSeq“-Werkzeuges von DNASTar (Lasergene) berechnet.

2.7.2. *In silico*-Transkriptionsanalysen und Untersuchungen syntäner Genom-Bereiche

In silico durchgeführte mRNA-Transkriptionsanalysen basierten auf Blastn-Suchen (Altschul et al., 1990) der jeweiligen Sequenz in der entsprechenden speziesspezifischen EST-Datenbank. Von den Resultaten wurden ausschließlich jene mit einem E-Wert von 0,0 bei einer gleichzeitigen Identität von minimal 98% berücksichtigt. Der E-Wert gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit dieses Ergebnis per Zufall innerhalb der Datenbank erzielt worden wäre: ein E-Wert von 0,0 bedeutet, dass dieses Resultat spezifisch für die gesuchte Sequenz ist. Durch die Beschränkung der maximalen Identität wurde der nahen Verwandtschaft - beispielsweise der Hämoglobin-Gene - Rechnung getragen und ausgeschlossen, dass ein anderes als das gesuchte Gen berücksichtigt wurde.

Die Vergleiche syntäner Regionen in den Genomen verschiedener Spezies wurden in den speziesspezifischen Datenbanken durchgeführt und die Annotation der Gene bezüglich ihrer Größe, Orientierung und Reihenfolge übernommen. Generell wurden die Protein-Sequenzen aller Gene in einer Blastp-Analyse mit dem menschlichen Genom verglichen. Das humane wurde als erstes Vertebraten-Genom vollständig sequenziert und die Genauigkeit der Analysen ist ob der verfügbaren Datenmenge relativ hoch (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=9558). Zudem bemüht sich die genutzte „Gene“-Datenbank, Redundanzen zu vermeiden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>). Alle von dem offiziell festgelegten Gen-Namen abweichenden Bezeichnungen sind in dieser Datenbank als „Alias“ aufgeführt, wodurch Orthologien zwischen Genen aufgedeckt werden konnten. Die Gen-Bezeichnungen der untersuchten Spezies wurden in dieser Arbeit auf die des Menschen zurückgeführt und die im humanen Genom übliche Schreibweise übernommen.

2.7.3. Erstellung von Stammbäumen

Zur Erstellung von Stammbäumen wurden Aminosäure-Alignments der entsprechenden Gene *in silico* erstellt (Vector NTI Suite 9.0, AlignX) und bearbeitet (GeneDoc, <http://www.psc.edu/bio-med/genedoc/>).

Für die Erstellung von Stammbäumen nach der Bayes-Methode wurde das Alignment mittels des frei verfügbaren Programms „SeqVerter“, (<http://www.genestudio.com/index.htm>) in das erforderliche Nexus-Format konvertiert und in das Programm „MrBayes 3.0 beta 4“ (Huelsenbeck und Ronquist, 2001) eingefügt. Das Programm wurde mit dem PAM-Modell der Aminosäure-Evolution (Dayhoff und Orcutt, 1979) gestartet, Bäume über einen theoretischen Zeitraum von 500000 bzw. 600000 Generationen (Teleostier bzw. *Xenopus*) berechnet und jede zehnte Generation berücksichtigt. Von den resultierenden 50000 bzw. 60000 Bäumen wurden die Daten der letzten 25000 bzw. 35000 in die Berechnung des finalen Stammbaumes einbezogen (burn-in=25000).

Vergleichend wurden auf Distanz-Matrices basierende Stammbäume mit dem Programm MEGA3.1

berechnet (Kumar et al., 2004). Das Aminosäure-Alignment wurde auf das entsprechende Format konvertiert und ein auf der PAM-Matrix (Dayhoff) beziehungsweise der JTT-Matrix (Jones Taylor Thornton) der Aminosäure-Evolution basierender phylogenetischer neighbor joining-Stammbaum berechnet. Die Sequenzen wurden paarweise verglichen und die Zuverlässigkeit des entstehenden Baumes mittels der „Bootstrap“-Analyse mit 1000 Wiederholungen bewertet. Die in die Alignments zur Erstellung der Stammbäume eingeflossenen Sequenzen mit Ihren Accession-Nummern finden sich in Anhang 7.7.

2.8. Puffer und Lösungen

Agar-Platten	15 g Agar-Agar ad 1 l LB-Medium, autoklavieren 100 µg/ml Amicillin 0,2 mM IPTG 0,05% (w/v) X-Gal
Antikörperpuffer	2,25 ml Ziegenserum (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min) 12,75 ml TBSx, Lagerung bei -20°C
AP-Puffer	100 mM Tris 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ , lösen in DEPC-H ₂ O pH auf 9,5 mit NaOH oder HCl
Arbeitslösung (RNA)	12,5 ml Guanidin-Isothiocyanat- Stammlösung 87,5 µl β-Mercaptoethanol
Coomassie-Färber	0,1% Coomassie Brilliant Blue R 250 10% Essigsäure 50% Ethanol, ad 1000 ml VE-H ₂ O
Coomassie-Entfärber	7,5% Essigsäure 25% Ethanol ad 1000 ml VE-H ₂ O
DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC ad 1l VE-H ₂ O ü.N. bei 37°C, autoklavieren
Dialysepuffer (10x)	0,25 M Tris 3 M NaCl 0,1 M Na ₂ -EDTA ad 1 l VE-H ₂ O, pH 7,6
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	30 g Tris 144 g Glycin, lösen in 1,8 ml VE-H ₂ O Zugabe von 100 ml 10% SDS ad 2 l VE-H ₂ O
Elektrophoresepuffer (1x E-Puffer)	36 mM Tris 30 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O 10 mM EDTA
Elutions-Puffe	50 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH auf 8.0 mit NaOH oder HCl einstellen
Entwickler (Silberfärbung)	250 mg Zitronensäure ad 250 ml VE-H ₂ O

Material und Methoden

	0,8 ml 37% Formaldehyd, mischen
EtBr-Färbelösung	5 µg EtBr/1 ml 1x E-Puffer
Färbelösung RNA	50% Glycerin 1 mM EDTA, pH 8,0 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylenyanol FF ad 10 ml A. bidest.
Guanidin-Isothiocyanat-Stammlösung	73,3 ml DEPC-H ₂ O 4,4 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0 6,6 ml 10% N-Laurylsarkosin 62,5 g Guanidinisothiocyanat lösen bei 60-65°C
Hybridisierungslösung (ISH)	50% Formamid (deionisiert) 2x SSC
Hybridisierungslösung (WMISH)	0,5 g "Blocking Reagent" (Roche) 25 ml Formamid deionisiert 12,5 ml 20x SSC erhitzen auf 65°C bis zur vollständigen Lösung 9,75 ml DEPC-H ₂ O 500 µl Hefe-tRNA (100 mg/ml) 100 µl Heparin (50 mg/ml) 250 µl Tween 20 (20%) 500 µl CHAPS (10%) 1250 µl EDTA (0,2 M) Lagerung bei -20°C
Ladepuffer RNA	500 µl Formamid (deionisiert) 100 µl 10x MOPS 150 µl Formaldehyd (filtriert)
Lämmli-Puffer (2x)	5 ml Glycerin 1,25 ml 2,5% Bromphenolblau 2,5 ml β-Mercaptoethanol 6,25 ml Sammelgelpuffer
LB-Medium	10 ml 10% SDS 10 g Tryptophan 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl, ad 1000 ml VE-H ₂ O, autoklavieren
Lysis-Puffer (nativ)	50 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O 300 mM NaCl 10 mM Imidazol, pH auf 8.0 mit NaOH oder HCl einstellen
MEMFA salts (10x)	1 M MOPS 20 mM EGTA 10 mM MgSO ₄ , einstellen mit NaOH auf pH 7,4; sterilfiltrieren, lagern bei 4°C
MEMFA (1x)	10 ml MEMFA salts (10x) 10 ml 37% Formaldehyd ad 100 ml VE-H ₂ O
MMR (1x)	100 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 2 mM HEPES 0,1 mM EDTA einstellen mit NaOH auf pH 7,8
MOPS (10x)	0,2 M 3-(N-Morpholin)-Propan-Sulfonsäure 0,05 M Natriumacetat

Material und Methoden

	0,01 M Na ₂ EDTA, pH 7,0 ad 1000 ml DEPC-H ₂ O autoklavierten, lichtgeschützt aufbewahren
PBS (1x, ISH)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,15mM KH ₂ PO ₄ 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
PBS (10x, Proteine)	70 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 30 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O 1,3 M NaCl
PBS (1x, WMISH)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ P ₄ , lösen in DEPC-H ₂ O und mit NaOH auf pH 7,4-7,6 einstellen
PBSw	0,1% Tween 20 1x PBS
PBT (1x)	2 mg BSA/1 ml PTW
PFA (4%)	2 g Paraformaldehyd 50 ml 1x PBS, erhitzen auf 60°C bis PFA vollständig gelöst ist; Lagerung bei - 20°C
Proteinase K (1mg/ml)	0,001 g Proteinase K 1 ml PBSw, lösen und bei -20°C lagern
PTW	0,1% Tween 20 in 1x PBS
Puffer 1	100 mM Tris 150 mM NaCl, in DEPC-H ₂ O lösen mit HCl auf pH 7,5
Puffer 2	1% (w/v) "Blocking Reagent" in Puffer 1
Puffer 3	100 mM Tris 100 mM NaCl, in DEPC-H ₂ O lösen mit HCl oder NaOH auf pH 9,5
RNA-Färbelösung	50% Glycerin, 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol FF
RNA-Ladepuffer	500 µl Formamid (deionisiert) 100 µl 10x MOPS 150 µl Formaldehyd
RNase-Mix	25 µg/ml RNase A 25 U/ml RNase T1 in 2x SSC
Sammelgelpuffer	3 g Tris, lösen in 40 ml VE-H ₂ O, mit HCl auf pH 6,8 einstellen 500 µl 10% SDS, ad 50 ml VE-H ₂ O
SDS (10%)	50 g SDS/ Natriumlaurylsulfat ad 500 ml VE-H ₂ O
Silber-Färbelösung Lösung A:	0,8 g AgNO ₃ , lösen in 4 ml VE-H ₂ O
Lösung B:	2,1 ml 1N NaOH 1,6 ml NH ₃ Lösung A langsam in Lösung B geben ad 100 ml VE-H ₂ O
Silber-Stopp-Lösung	10% Essigsäure 50% Methanol

Material und Methoden

SSC (2x, ISH)	0,3 M NaCl 0,03 M Natriumcitrat
SSC (20x, WMISH)	3 M NaCl 300 mM Tri-Na-Citrat-dihydrat, lösen und einstellen mit HCl oder NaOH auf pH 7,0
2x SSC/0,1% CHAPS	10 ml 20x SSC 0,1 g CHAPS ad 100 ml DEPC-H ₂ O, Lagerung bei 4°C
0,2x SSC / 0,1% CHAPS	10 ml 2x SSC 0,1 g CHAPS ad 100 ml DEPC-H ₂ O, Lagerung bei 4°C
Staining solution(Western)	10 ml Buffer A 200 µl NBT/BCIP Stock Solution direkt vor Gebrauch ansetzen
Stopp-Puffer (WMISH)	100 mM Tris 1 mM EDTA, in DEPC-H ₂ O lösen, einstellen auf pH 7,4
Tank blotting buffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 20% Methanol, ohne Einstellen bei pH 8,3
TBE (1x)	90 mM Borsäure 90 mM Tris 1,25 mM EDTA
TBS (1x, WMISH)	100 mM Tris 150 mM NaCl, lösen in DEPC-H ₂ O einstellen mit HCl auf pH 7,4
TBSw (Western)	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM NaCl
TBSx (WMISH)	0,1% Triton X-100, 1x TBS
Trenngelpuffer	18,15 g Tris, lösen in 80 ml VE-H ₂ O, mit HCl auf pH 8,8 einstellen 1 ml 10% SDS ad 100 ml VE-H ₂ O
Wasch-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O 300 mM NaCl 20 mM Imidazol, pH auf 8,0 einstellen

3. Ergebnisse

3.1. Analyse des Globingen-Repertoires von *Xenopus tropicalis*

Durch Blast-Suchen in dem als komplett sequenziert geltenden Genom des tropischen Krallenfrosches *Xenopus tropicalis* (<http://genome.jgi-psf.org/Xentr4/Xentr4.info.html#status>) konnten neben larvalen und adulten Hämoglobinen (Hb) die Gene für Neuroglobin (Ngb) und Cytoglobin (Cygb) detektiert werden. Außerdem gelang der Nachweis des bis dahin nur in Fischen bekannten GlobinX (GbX) sowie eines weiteren, bisher unbekanntes Globins. Dieses wurde entsprechend der Terminologie und seiner bisher unbekanntes Funktion als GlobinY (GbY) bezeichnet.

Die phylogenetische Beziehung, genomische Organisation und chromosomale Umgebung von Ngb, Cygb, GbX und GbY des tropischen Krallenfrosches wurde *in silico* analysiert. Die Expression der Hb-Gene wurde zudem durch ein *in silico* erstelltes EST-Profil in verschiedenen Entwicklungsstadien dargestellt. Bei den Analysen wurden, soweit aufgrund der geringeren Verfügbarkeit möglich, die *in silico*-Daten der entsprechenden Gene des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* vergleichend hinzugezogen.

Ngb, Cygb, GbX und GbY wurden mittels PCR in *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Expression der Gene wurde sowohl mittels qualitativer RT-PCR als auch per quantitativer Real-Time PCR in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben adulter afrikanischer Krallenfrösche analysiert und in verschiedenen Entwicklungsstadien durch Whole Mount *in situ*-Hybridisierungen zellulär lokalisiert. Zudem wurden Ngb, Cygb, GbX und GbY rekombinant exprimiert und erste Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Globine durchgeführt.

3.1.1. Die phylogenetische Einordnung der *Xenopus*-Globine

Die Aminosäuresequenzen von Ngb, Cygb, GbX, GbY sowie der adulten α - und β -Hbs von *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis* wurden mit anderen, ausgewählten Globinsequenzen von Vertebraten in ein Alignment eingefügt (Anhang 7.7 und 7.8.1). Dieses bildete die Grundlage für die Berechnung phylogenetischer Stammbäume nach der Bayes'schen Methode bzw. mittels des „neighbor-joining“-Algorithmus (Saitou und Nei, 1987). Beide Vorgehensweisen führten zu weitgehend identischen Ergebnissen, Abbildung 7 gibt den Stammbaum nach Bayes wieder.

Die Ngb-Proteine der Frösche bilden eine distinkte Gruppe mit den Neuroglobinen der Mammalier, des Haushuhnes und verschiedener Teleostier mit posterioren Wahrscheinlichkeiten von 0.96 (Frösche-Mammalier) bzw. 1.00 (Frösche-Huhn/Teleostier). Das GbX-Protein des afrikanischen Krallenfrosches bildet eine deutlich abgegrenzte Gruppe mit den entsprechenden Genen der Te-

leostier mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 0.96. Der GbX-Ast des Stammbaumes zeigt eine eindeutige, wenn auch entfernte phylogenetische Verwandtschaft zu Ngb mit einem Bayes-Unterstützungswert von 1.00, was eine Evolution beider Gene aus einem gemeinsamen Vorläufer heraus nahe legt.

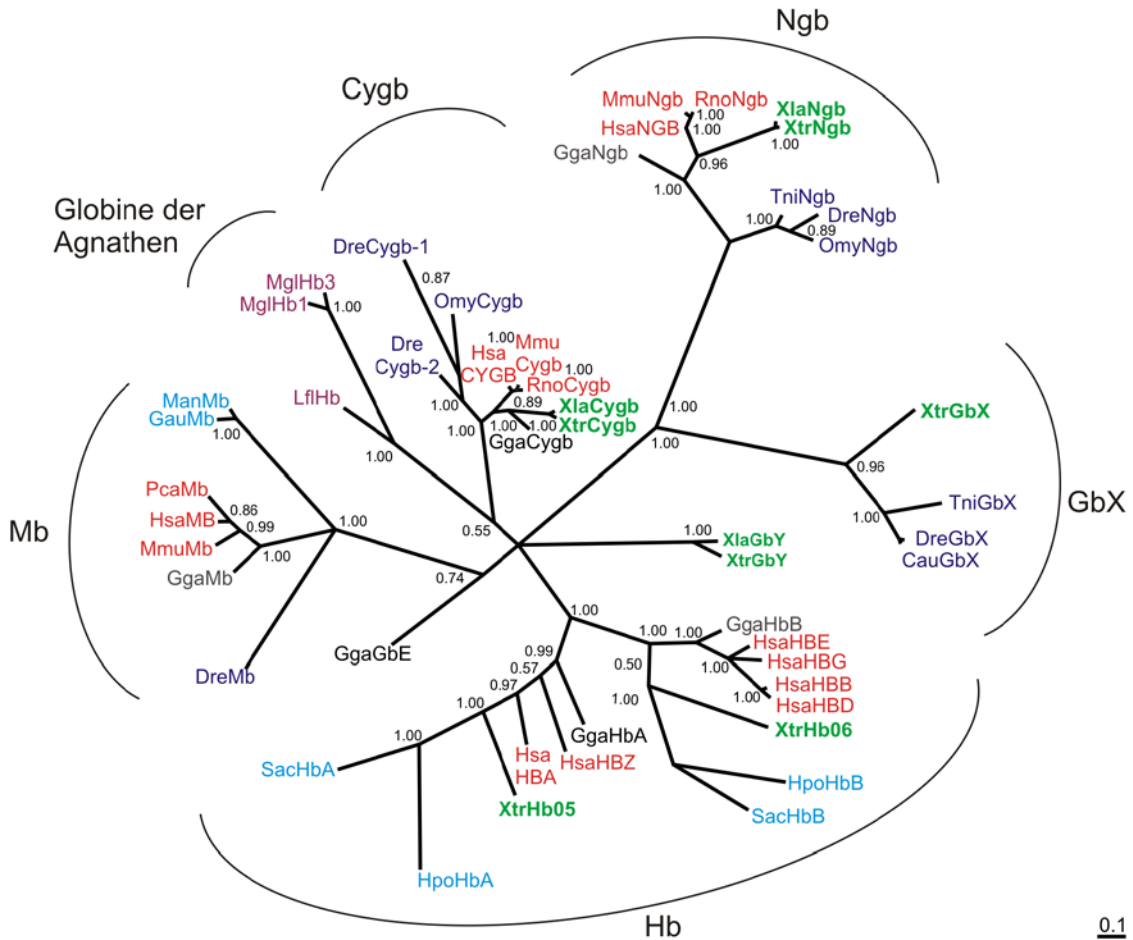


Abbildung 7:

Phylogenetische Beziehung der Globine von *Xenopus* relativ zu jenen anderer Vertebraten.

Der Stammbaum basiert auf der Methode nach Bayes und dem PAM-Modell der Aminosäure-Evolution. Der Größenstandard repräsentiert 0.1 PAM-Distanzen, die Zahlen an den Astverzweigungen des Baumes geben die posterioren Wahrscheinlichkeiten für diese Verzweigung wieder. Die Globine von *Xenopus* sind grün hervorgehoben, die der Mammalier (rot), Actinopterygii (dunkelblau), Sarcopterygii (hellblau), Agnathen (violett) und des Haushuhnes (schwarz) sind entsprechend gekennzeichnet. Das dem Stammbaum zugrunde liegende Alignment findet sich zusammen mit den Abkürzungen in Anhang 7.7 bzw. 7.8.1.

Auch die *Xenopus*-Cygb's bilden mit posterioren Wahrscheinlichkeiten von 0,89 bzw. 1.00 mit den Cygb-Proteinen der Mammalier bzw. Teleostiern und dem Haushuhn einen distinkten Ast im Stammbaum der Globine. Die Globine der Agnathen scheinen mit den Cytoglobinen einen gemeinsamen Ursprung zu haben, doch ist der Bayes-Unterstützungswert von 0.55 sehr niedrig. Das neu entdeckte GbY-Protein der Frösche bildet eine eigenständige Gruppe mit einem frühen Abzweig an der Basis des Globin-Stammbaumes. Die Myoglobine (Mb) bilden eine eigene phylogenetische Gruppe, die mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit von 1.00 statistisch sehr gut unterstützt wird. Ein Mb-Protein konnte bisher weder in *Xenopus tropicalis* noch in *Xenopus laevis* identifiziert wer-

den. Das ausschließlich im Auge des Haushuhnes *Gallus gallus* nachgewiesene Globin E scheint einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung mit den Myoglobinen zu haben, doch ist die statistische Unterstützung mit 0.74 eher niedrig. Die Hämoglobine bilden in diesem Stammbaum der Globine einen separaten Ast, wobei die α - und β -Hbs der Vertebraten deutliche Subgruppierungen zeigten.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den dargestellten Stammbaum (Abbildung 7) lediglich die Daten der adulten α - bzw. β -Hbs (Hb 05 bzw. 06) von *Xenopus tropicalis* eingeflossen, nicht jedoch die der larvalen Hb-Gene. Die detaillierte Phylogenie der Hämoglobine ist separat in Abbildung 12 wiedergegeben.

3.1.2. Die genomische Organisation ausgewählter Globine in *Xenopus*

Durch Blast-Suchen wurden *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* von *Xenopus tropicalis* in der Genom-Datenbank des DOE Joint Genome Institutes nachgewiesen. Die genomischen Daten wurden mit Hilfe des Programms „Spidey“ mit den verfügbaren EST-Daten der einzelnen Gene verglichen, die Ergebnisse sind in Abbildung 8 visualisiert.

Die kodierende Sequenz vom Start- bis zum Stopp-Kodon umfasst für *Ngb* 495 Nukleotide, für *Cygb* 540 bp, für *GbX* 603 Nukleotide und für *GbY* 471 bp. *Ngb* ist auf Scaffold_416 notiert und besteht aus vier kodierenden Exons sowie drei Introns, *Cygb* und *GbY* (Scaffold_733) aus je drei Exons und zwei Introns und *GbX* (Scaffold_37) weist eine Organisation von fünf Exons und vier Introns auf. In der genomischen Datenbank ist das erste kodierende Exon des *Cygb*-Gens auf Scaffold_6831 notiert, während die Exons 2 und 3 auf Scaffold_178 liegen (Stand Juni 2007). Aufgrund der perfekten Übereinstimmung der Daten mit der als Suchsequenz dienenden CDS des Gens aus EST-Daten muss dies als eine fehlerhafte Notierung seitens der Datenbank angesehen werden. Dieser Fehler führt dazu, dass die tatsächliche Länge des ersten Introns von *Cygb* nicht analysiert werden kann.

Die Introns B12.2 (in der 12. Aminosäure der B-Helix des Proteins zwischen Nukleotid 2 und 3 gelegen) und G7.0 sind in allen vier Genen erhalten. Bei *Ngb* wird außerdem ein weiteres Intron an der Position E11.0 gefunden, *GbX* zeigt zwei zusätzliche Introns an den Positionen E10.2 und H10.0. Das Intron an Position E10.2 von *GbX* weist damit im Vergleich mit dem *Ngb*-spezifischen Intron 11.0. eine um nur ein Nukleotid veränderte Position auf. Eine vergleichende Analyse war in *Xenopus laevis* aufgrund der bislang fehlenden genomischen Daten nicht möglich.

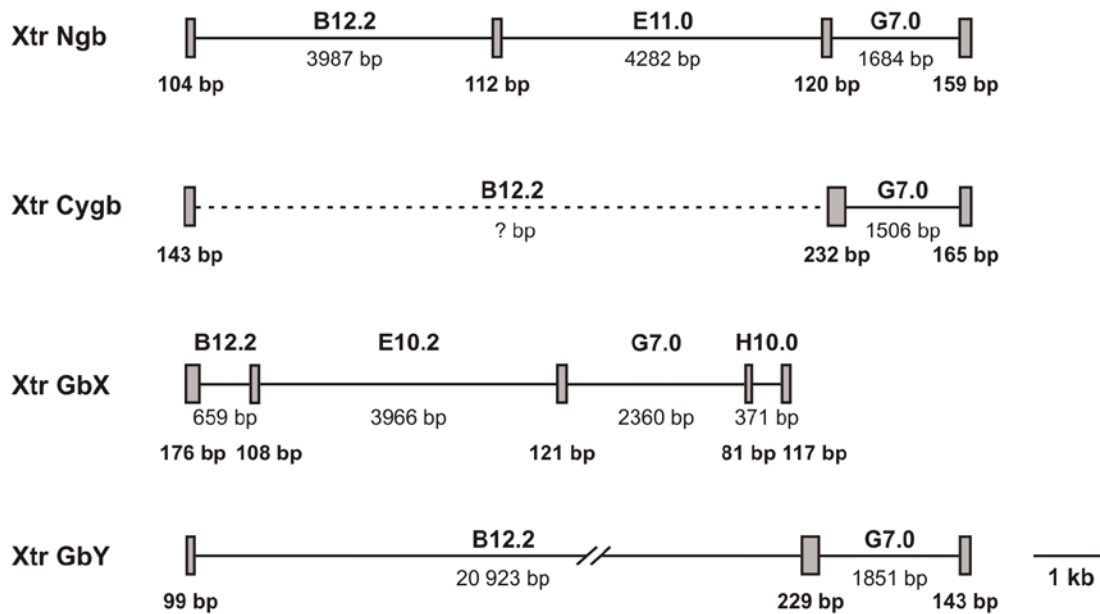


Abbildung 8:

Genomische Organisation von Ngb, Cygb, GbX und GbY in *Xenopus tropicalis*.

Maßstabsgetreu symbolisieren die Rechtecke die Exons, die horizontale Linien die Introns. Die helikale Lage der Introns ist oberhalb, die Länge von Exons bzw. Introns in Basenpaaren (bp) unterhalb angegeben. Eine gestrichelte Linie symbolisiert die unbekannte Länge dieses Introns, während eine unterbrochene solide horizontale Linie andeutet, dass dieses Intron verkürzt dargestellt ist.

3.1.3. *In silico*-Analyse syntäner Globingen-Regionen in Vertebraten

Basierend auf den *in silico* verfügbaren Daten wurden die genomischen Umgebungen von Ngb, Cygb und GbX des tropischen Krallenfrosches mit denen des Menschen, des Haushuhnes und des Grünen wie Japanischen Pufferfisches verglichen (vgl. 2.7.2.). Die Umgebung wurde maßstabsgerecht dargestellt und die 5'-3'-Orientierung der Gene beachtet (Abbildung 9). Alle Gene des Frosches, des Huhnes und des Kugelfisches wurden mit Blastp-Analysen in der nicht-redundanten NCBI-Datenbank gegen das menschliche Genom verglichen, um Orthologien aufzudecken (vgl. Anhang 7.19.). Die Bezeichnung der Gene erfolgte grundsätzlich entsprechend der des Menschen. In den wenigen Fällen, in welchen kein orthologes menschliches Gen detektiert werden konnte, wurden die Protein- bzw. Gen-Identitätsnummern der speziesspezifischen Datenbanken übernommen.

Bezogen auf die genomischen Daten von *Xenopus tropicalis* wurden mehr als 3,8 Megabasen des Ngb-flankierenden Bereiches *in silico* analysiert (Abbildung 9A). In *Xenopus tropicalis* wird Ngb provisorisch auf Scaffold_416 annotiert, bei *Homo sapiens* liegt es auf Chromosom 14, bei *Gallus gallus* auf Chromosom 5 und bei *Tetraodon nigroviridis* auf Chromosom 10. Auffällig ist die sehr hohe syntäne Konservierung der das Ngb umgebenden Gene in Frosch, Mensch und Huhn, deren Abfolge und Orientierung zueinander seit einer angenommenen Trennung der Spezies vor 360 Millionen Jahren erhalten ist (Kumar und Hedges, 1998). Lediglich in einem kleinen, die drei Gene AHSA1, C14orf133 und C14orf148 (vgl. Anhang 7.19) umfassenden Bereich kommt es im tropi-

schen Krallenfrosch zu einer Inversion, die sich weder in den Genomen des Menschen noch des Huhnes findet. Zwei im Mensch- und Huhn-Genom konservierte Gene (TMED8 und C14orf174) können im Frosch-Genom bislang nicht nachgewiesen werden (Stand Juni 2007). Die Ausdehnung der syntänen Konservierung im Kugelfisch-Genom ist weitaus geringer: nur drei bzw. vier Gene rund um Ngb von *Tetraodon* bzw. *Takifugu* zeigen eine Homologie zu den Genregionen von Frosch, Mensch und Huhn. Die zusätzliche Analyse des Genoms von *Danio rerio* bringt keine weiteren Erkenntnisse: Ngb ist im Zebrafisch auf Chromosom 17 in der direkten Nachbarschaft von TMEM63C eingeordnet (<http://www.ensembl.org/index.html>), weitere Orthologien können aufgrund der noch nicht finalen Ordnung des Genoms nicht nachvollzogen werden.

Beim Vergleich der beiden Kugelfisch-Genome fallen jedoch weitere, in diesem Genombereich auf die Fische beschränkte Gene auf, die in Richtung und Abfolge konserviert sind. Diese Homologie stützt die Annahme, dass die beiden Kugelfisch-Genome trotz der geringen Übereinstimmung zu den Genomen der Sarcopterygii in diesem Bereich korrekt annotiert sind.

Rund um Cygb findet sich eine sehr starke Konservierung der Gene in Frosch, Mensch und Huhn (Abbildung 9B): die Konservierung zwischen den Genom-Bereichen ist sowohl in der Orientierung als auch der Abfolge der Gene identisch. Die analysierte Region des *Xenopus tropicalis*-Genoms um Cygb umfasst einen Bereich von 4,7 Megabasen auf Scaffold_178. Eine vergleichende Analyse der genomischen Umgebung des *Xenopus tropicalis*-Cygb-Gens legt aufgrund der sehr guten Homologie der flankierenden Gene nahe, dass die Annotierung der Exons 2 und 3 auf Scaffold_178 korrekt und Exon 1 auf Scaffold_6831 seitens der Datenbank falsch eingeordnet ist. Im Mensch liegt Cygb auf Chromosom 17, im Huhn auf Chromosom 18. Aufgrund der Duplikation des Cygb-Gens in den Teleostiern wurde dieser Abbildung kein Vertreter der Fische hinzugefügt. Die Analyse der genomischen Umgebung des duplizierten Cygb-Gens der Teleostier ist in Abbildung 25 separat dargestellt.

GbX konnte bisher (Stand Juni 2007) ausschließlich in Amphibien und Fischen nachgewiesen werden (Roesner et al., 2005; Fuchs et al., 2006). Die untersuchten 3,5 Megabasen des das GbX flankierenden Frosch-Genoms (Abbildung 9C) zeigen eine minimale Homologie zu den Kugelfisch-Genomen: In allen drei untersuchten Spezies ist GbX von SRP14 einerseits und PLEKHG3 andererseits umgeben (vgl. Anhang 7.19). Im Genom von *Xenopus* und *Tetraodon* finden sich außerdem drei invertierte Gene (ANKRD28, PAK6 und BUB1B). Diese Gene sind in dem Genom von *Takifugu* nicht in der Umgebung von GbX zu finden. Da zwischen den untersuchten Bereichen der Kugelfisch-Genome allerdings mehrere, an dieser Position Teleostier-spezifische Gene in identischer Reihenfolge und Orientierung detektiert werden, ist von einem korrekt zusammengefügt Genomabschnitt in den Fischen auszugehen. Auffällig ist der Vergleich der das GbX-Gen flankierenden Bereiche: in den Frosch- und Fischgenomen sind Gene mit konservierten „ankyrin repeat“-Proteindomänen (ANKRD28 und *ANKRD50*) bzw. für Phospholipasen typische Domänen (PLA2G4B und PLCB2) zu finden. Diese indizieren aufgrund ihrer Verbreitung in unterschiedlichsten Proteinen jedoch keine direkte Homologie, sondern vielmehr eine Verwandtschaft der Proteine (Bork, 1993)

und sind in Abbildung 9C durch unterbrochene Linien gekennzeichnet.

Der Befund, dass sowohl Ngb als auch GbX auf Chromosom 10 des *Tetraodon*-Genoms liegen, scheint nach heutigem Wissensstand ob der dazwischen liegenden 1,09 Megabasen keinerlei Relevanz zu besitzen.

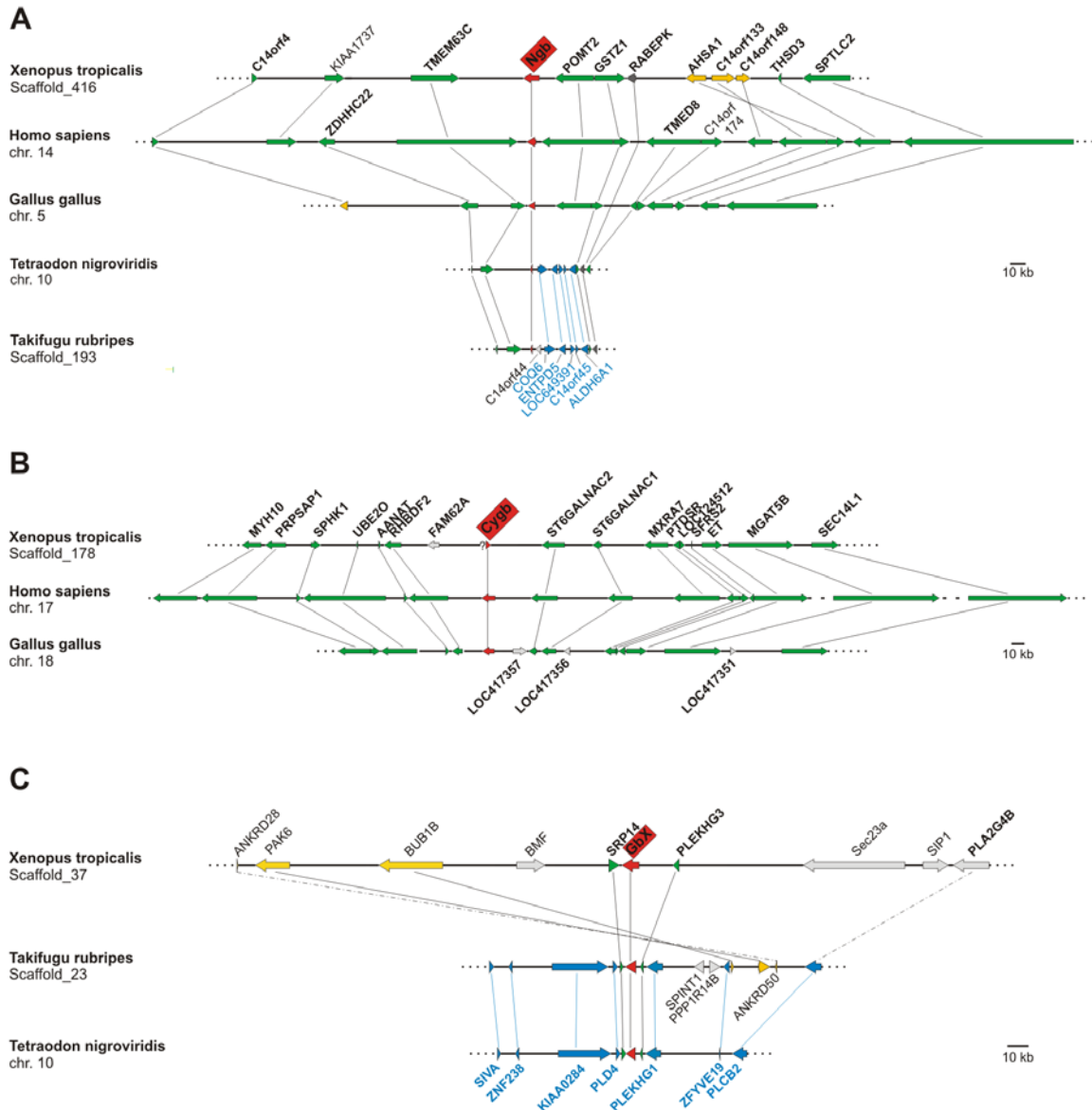


Abbildung 9:
Komparative Genom-Analysen syntäner Globingen-Regionen.

Vergleich syntäner flankierender Regionen von Ngb (A) und Cygb (B) in den Genomen des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus tropicalis* mit *Homo sapiens* und *Gallus gallus* sowie den Kugelfischen *Tetraodon nigroviridis* und *Takifugu rubripes*. Aufgrund der Duplikation des Cygb-Gens in Teleostiern wurde an dieser Stelle auf eine komparative Analyse mit diesen Organismen verzichtet. Die genomische Umgebung von GbX wird in (C) vergleichend zwischen *Xenopus tropicalis* und den Kugelfischen *T. nigroviridis* und *T. rubripes* dargestellt. Position und Transkriptionsrichtung der Gene sind entsprechend ihrer Lage und Orientierung auf den Chromosomen bzw. Scaffolds durch Pfeile verdeutlicht, wobei Gene, die in Lage und Orientierung jenen von *Xenopus tropicalis* entsprechen, grün gekennzeichnet sind. Gelbe Pfeile verdeutlichen eine Änderung von Transkriptionsrichtung oder Position der Gene bezogen auf *Xenopus tropicalis*, blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die an dieser Stelle ausschließlich in Teleostier-Genomen zu finden sind. Graue Pfeile symbolisieren Gene, die an dieser Stelle exklusiv in einem Organismus gefunden wurden. Maßstabsgerechte dargestellte Intergen-Bereiche wurden durch horizontale Linien symbolisiert, gestrichelte horizontale Linien verdeutlichen ihre an dieser Stelle verkürzte Darstellung. Punkte am Beginn bzw. Ende einer genomischen Region symbolisieren die entsprechenden Stellen.

sieren, dass die Datenbank-Informationen über den dargestellten Bereich hinausgehen. Vertikale durchgezogene Linien bezeichnen orthologe Gene, während gestrichelte vertikale Linien Gene mit ähnlichen Protein-Domänen kennzeichnen. Blau dargestellte Linien indizieren Gene, die an dieser Position ausschließlich in Teleostier-Genomen gefunden werden und in gleicher Position und Transkriptionsrichtung zueinander auftreten. Die kodierenden Sequenzen aller in die Abbildung eingeflossenen Gene der Spezies wurden wiederum per Blast-Suche in dem humanen Genom analysiert und so Orthologien detektiert. Bei zwischen den Spezies als ortholog erkannten Genen wurde der Konsistenz halber die Bezeichnung der humanen Gene mit Ihrer Schreibweise für alle Arten übernommen. Alle in der Abbildung verwandten Abkürzungen der Gennamen und ihre Lage in den verschiedenen untersuchten Genomen sind tabellarisch in Anhang 7.19 zusammengefasst. Das Fragezeichen in (B) symbolisiert die an dieser Stelle fehlerhafte Annotierung des *Cygb*-Gens von *Xenopus tropicalis* in der Datenbank.

3.1.4. *In silico*-Analyse von GlobinY und Hämoglobin in *Xenopus tropicalis*

Eine *in silico*-Analyse detektierte das GbY-Gen von *Xenopus tropicalis* auf Scaffold_733 des JGI-Assemblies 4.1. in der direkten Nachbarschaft der Hämoglobingene, die in die Untersuchung mit einbezogen wurden. Insgesamt wurden 14 Hb-Gene im Genom von *Xenopus tropicalis* nachgewiesen. Diese Analyse bezog sich auf Version 4.1. des JGI-Assemblies, in der die Anzahl der gefundenen Gene um vier höher war als in Version 3.0.: hier wurden lediglich zehn Hb-Gene identifiziert. Die Diskrepanz beruht auf der besseren Abdeckung und überarbeiteten Anordnung der genomischen Daten in Version 4.1 des *Xenopus*-Genomprojektes. Die ältere Version 3.0. lag einer Vorab-Veröffentlichung dieses Kapitels meiner Arbeit zugrunde (Fuchs et al., 2006), in der die bis dahin detektierten Hb-Gene von 01-11 nummeriert worden waren. Alle weiteren Hb-Gene wurden als ab 12 aufsteigende Nummern fortgeführt.

Die Hb-Gene sind in Version 4.1. auf Scaffold_357 (Hb1-6 und Hb12-15) beziehungsweise Scaffold_733 (Hb7-11) annotiert. Abbildung 10 verdeutlicht die Lage und Orientierung der einzelnen Gene maßstabsgerecht zueinander, wobei die identische Transkriptionsrichtung aller Hb-Gene deutlich wird; GbY liegt invertiert dazu.

Alle Hb-Gene zeigen eine genomische Organisation in 3 Exons und 2 Introns. Die Exons der Larven wie adulten α -Hb-Gene sind jeweils 95, 205 und 129 Nukleotide lang, die der β -Hb-Gene umfassen je 92, 223 und 129 bp. Die unterschiedliche Länge der Gene (beispielsweise von Hb 08, vgl. Abbildung 10) ist auf die unterschiedliche Länge der Introns zurückzuführen.

Die Scaffolds_357 und _733 zeigen intern größere Lücken, welche beim Zusammenfügen der Genomdaten seitens der Datenbank nicht einwandfrei gefüllt werden konnten, und in Abbildung 10 durch Unterbrechungen der Linien bzw. Pfeile angedeutet sind. Die gestrichelte Linie deutet ein möglicherweise auch in *Xenopus tropicalis* gegebenes Arrangement der Hbs in einem Cluster an. Diese gekoppelte Anordnung der α - und β -Hbs wurde bereits 1980 durch Hybridisierungs-Experimente in *Xenopus tropicalis* angedeutet (Jeffreys et al., 1980), für den nahe verwandten Krallenfrosch *Xenopus laevis* konnte sie durch Analysen von cDNA-Klonen bestätigt werden (Patient et al., 1980; Hosbach et al., 1983). Andererseits findet sich auch in der Annotation bei

Xenopus tropicalis ein direkter Hinweis: das adulte β -Hb liegt auf Scaffold_357, auf dem sonst ausschließlich α -Hbs annotiert sind. Eine Verbindung zwischen dem adulten und den larvalen β -Hbs ist daher wahrscheinlich. Weiteren Aufschluss bringt eine Analyse der Gene POLR3K, C16orf33 und RHBDF1: alle drei Gene finden sich im humanen Genom in genau dieser Reihenfolge am äußersten Ende des kurzen Armes von Chromosom 16 in der unmittelbaren Nachbarschaft der Hb-Gene des α -Clusters, gefolgt von einem als LUC7L1 benannten Gen. LUC7L1 wiederum findet sich in Version 3.1. des JGI-Assemblies in direkter Nachbarschaft von GbY. Diese Lagebeziehung kann in Version 4.1. nicht mehr nachvollzogen werden, das Gen ist nun auf Scaffold_466 notiert. In diesem Fall ist allerdings eher von einer fehlerhaften Annotierung seitens der Datenbank in Version 4.1. auszugehen.

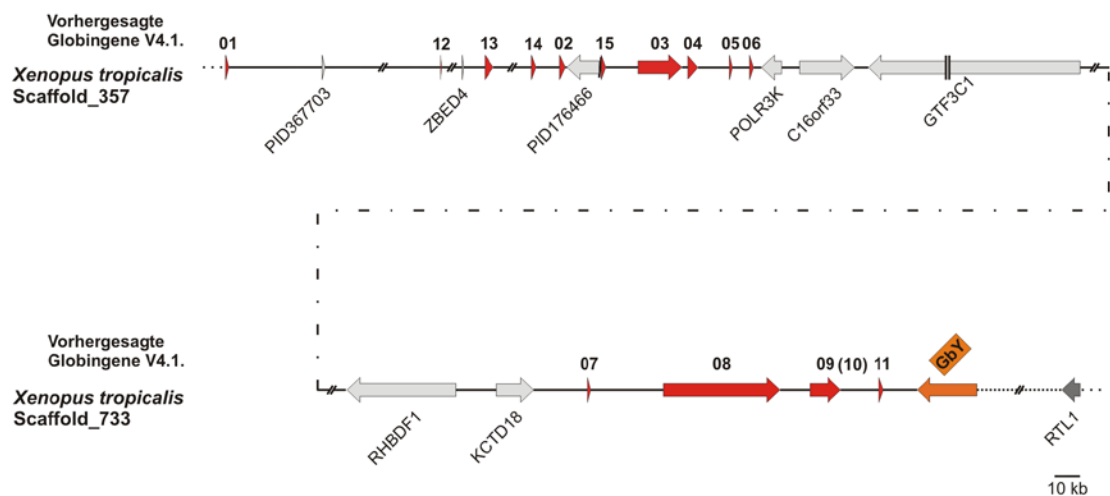


Abbildung 10:
Genom-Analyse von GbY und der Hb-Gene in *Xenopus tropicalis*.

Die Gene sind maßstabsgerecht entsprechend ihrer Lage und Transkriptionsrichtung als Pfeile dargestellt, wobei die Hb-Gene rot und das GbY-Gen orange hervorgehoben sind. Intergen-Bereiche sind maßstabsgerecht durch horizontale Linien verdeutlicht. Unterbrechungen in Genen oder intergenischen Bereichen verdeutlichen die lückenhafte Abdeckung der Information seitens der Datenbank. Die gestrichelte Linie deutet die mögliche Verbindung zwischen den bisher auf zwei unterschiedlichen Scaffolds notierten Hb-Genen von *Xenopus tropicalis* an. Die Darstellung basiert auf Version 4.1. des JGI-Assemblies, die Hb-Gene wurden entsprechend von 1-15 benannt (vgl. Anhang 7.19). Das als Hb 10 in Klammer notierte Gen repräsentiert eine höchstwahrscheinlich inkorrekte Annotation seitens der Datenbank in Version 3.0, die bereits als solche erkannt wurde (Fuchs et al., 2006) und in Version 4.1 eliminiert wurde.

Weitere Unterstützung findet die Hypothese bei einem Vergleich des entsprechenden syntänen Bereiches in dem Japanischen Kugelfisch *Takifugu rubripes*: auch hier liegen die Gene POLR3K und C16orf33 in unmittelbarer Nachbarschaft. Das Gen RHBDF1, gefolgt von MPG und C16orf35, findet sich in einem durch drei Gene (AANAT, MGRN1 und C16orf5) gebildeten Abstand invertiert im Kugelfisch-Genom wieder. Auch in diesem Organismus liegen in diesem Bereich des Genomes Globingene: zwei α -larvale Hb-Gene sind auf Scaffold_15 notiert. Abbildung 11 visualisiert die Lagebeziehung der Gene von *Xenopus tropicalis*, *Homo sapiens* und *Takifugu rubripes*.

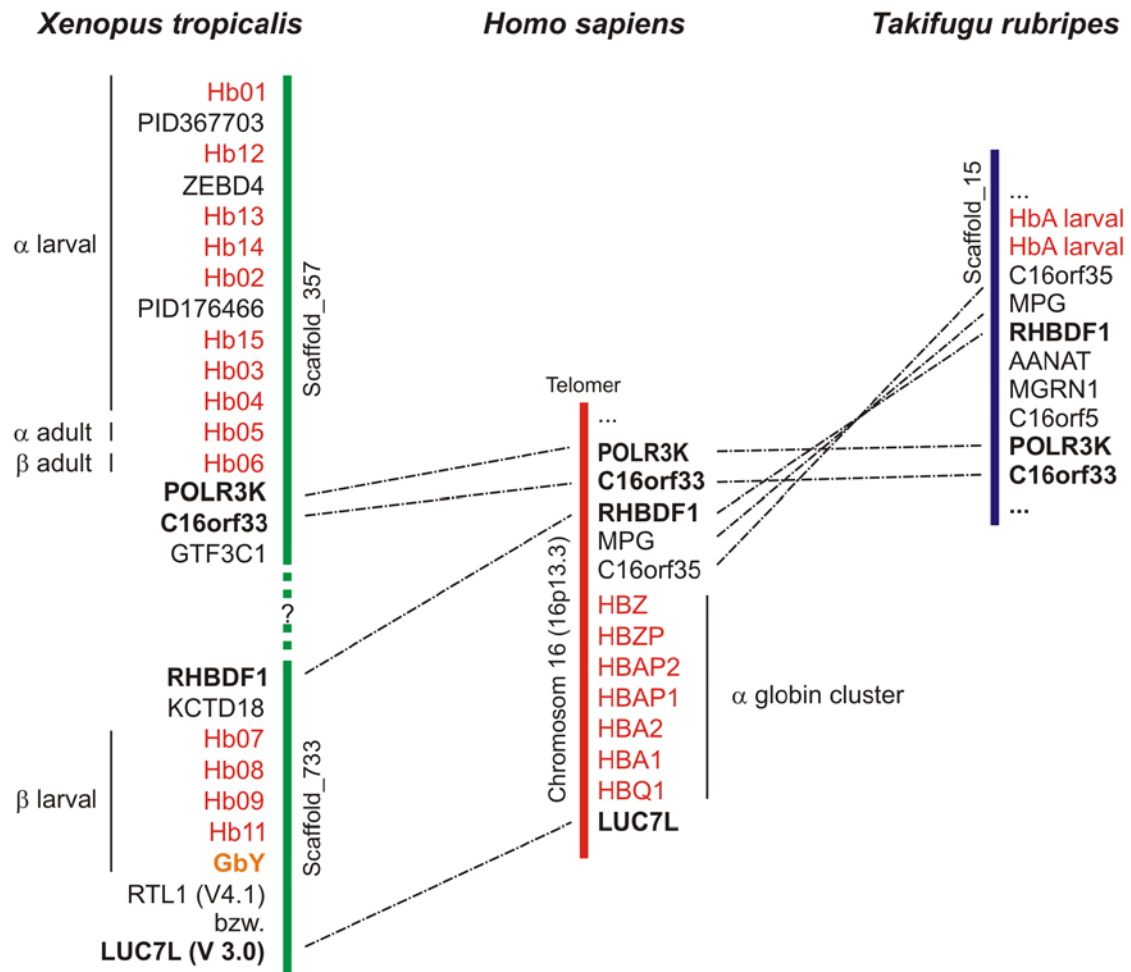


Abbildung 11:

Vergleich der auf verschiedenen Scaffolds notierten Hb-Gene von *Xenopus tropicalis* in ihrem genomischen Kontext mit den syntänen Regionen von *Homo sapiens* und *Takifugu rubripes*.

Die Abbildung gibt die Abfolge der Gene wieder; homologe Gene sind durch horizontale Linien verdeutlicht, die Hb-Gene sind rot hervorgehoben. Die Benennung erfolgte bei orthologen Genen entsprechend der des humanen Genoms, sonst durch die Angabe der Protein-Identitätsnummer der Datenbank.

Durch Blast-Suchen und eine phylogenetische Analyse (Abbildung 12) konnten von den 14 gefundenen Hbs acht als potentiell α -larval und eines als α -adult identifiziert werden, ein weiteres repräsentiert wahrscheinlich ein β -adultes Hb und vier Proteine sind den β -larvalen Hbs zuzuordnen.

Der Stammbaum verdeutlicht die phylogenetische Beziehung der einzelnen Hämoglobine: die α -Hbs bilden eine distinkte Gruppe zu den β -Hbs. Dabei veranschaulicht der Baum, dass die Hbs auch innerhalb der α - bzw. β -Hbs in Beziehung stehen: so bilden die Hbs 01, 02, 13 und 14 von *Xenopus tropicalis* einen deutlichen Ast innerhalb der Gruppe der α -Hbs. Auch Hb 03 und Hb 15 von *Xenopus tropicalis* bilden zusammen mit „Hb α T5 larval“ von *Xenopus laevis* eine Gruppe, wodurch diese beiden Gene ebenfalls als larval eingeordnet werden können. *Xenopus tropicalis* Hb 04 gruppiert mit einem als „Hb α T3 larval“ benannten Protein des gleichen Organismus (Knöchel et al., 1988), der Vergleich beider Sequenzen zeigt eine vollständige Identität der Aminosäuren. Auch Hb 05 des tropischen Krallenfrosches gruppiert mit einer in der Datenbank als „Hb α adult“ benannten Sequenz (Knöchel et al., 1986; Stalder et al., 1988). Der Aminosäurevergleich beider

Sequenzen zeigt eine absolute Übereinstimmung, womit Hb 05 als adultes α -Hb von *Xenopus tropicalis* identifiziert ist. Der Ast der adulten α -Globine ist im Vergleich mit jenen anderer Gruppen im Stammbaum deutlich länger. Dieser Befund ist mit der Tatsache zu erklären, dass alle anderen Hbs vom larvalen Typ und damit enger miteinander verwandt sind und weniger Aminosäure-Austausche untereinander zeigen als zum adulten α -Hb. Auffällig ist der extrem lange Ast von Hb 12, welches offensichtlich deutliche Abweichungen zu den anderen α -Hbs zeigt. Eine Sequenzanalyse von Hb 12 weist mehrere Punktmutationen auf: an Stelle des für Methionin codierenden Start-Kodons ATG findet sich das Triplet ATA (Isoleucin). Zusätzlich zu diesem nicht vorhandenen Start-Kodons wird an Stelle des für die Funktion von Globinen entscheidenden, distalen Histidins ein Leucin eingebaut, wodurch die Fähigkeit der Ligandenbindung nicht mehr gegeben ist. Eine weitere Punktmutation führt zu einem vorgezogenen Stopp-Kodon und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Aminosäuresequenz. In einem Alignment zeigt eine Analyse der C-terminal des Stopp-Kodons von Hb 12 gelegenen Aminosäuren jedoch eine auffällige Übereinstimmung biochemisch ähnlicher Aminosäuren mit anderen α -Hb-Genen. In Ihrer Gesamtheit sprechen diese Befunde für ein Pseudogen (Hb 12 ψ), das aus einem ursprünglich aktiven *Hb*-Gen entstanden ist. Diese Hypothese wird durch eine EST-Suche in der NCBI-Datenbank unterstützt: für diese Sequenz wird kein einziger Eintrag in *Xenopus tropicalis* gefunden und offensichtlich keine aktive mRNA gebildet.

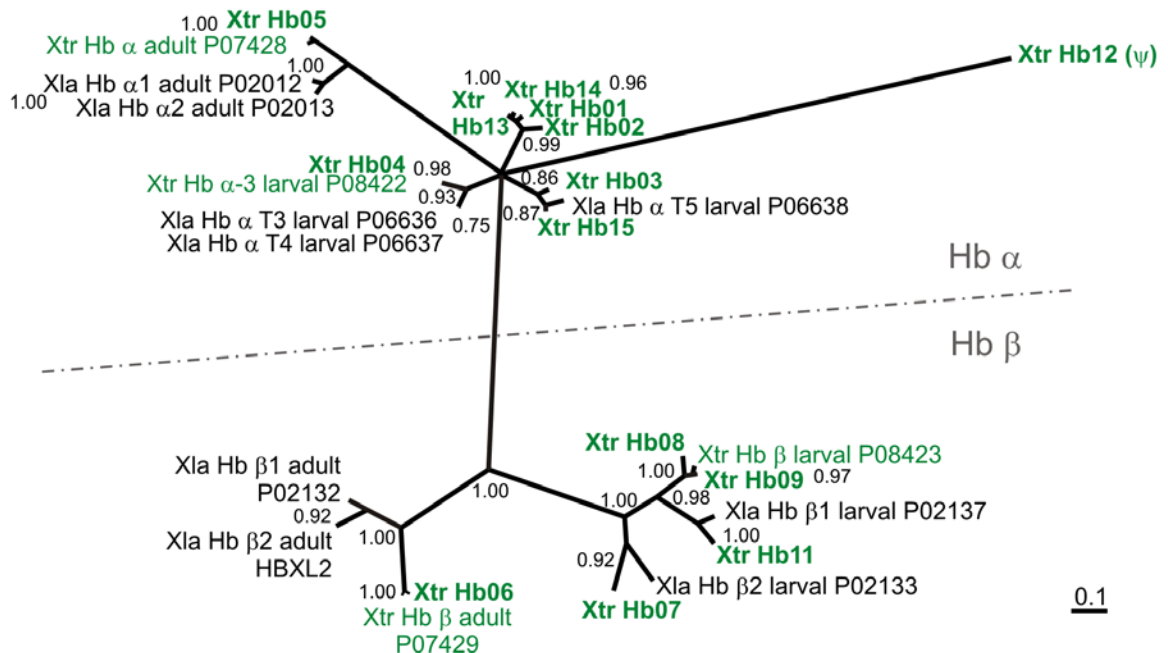


Abbildung 12:

Phylogenetische Relation der Hämoglobine von *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis*.

Der Stammbaum wurde mit MrBayes und dem PAM-Modell der Aminosäureevolution erstellt, der Größenstandard repräsentiert 0.1 PAM-Distanzen, die Zahlen an den Astverzweigungen geben die Vorhersagewahrscheinlichkeit für diese wieder. Die Hämoglobine von *Xenopus tropicalis* wurden grün gekennzeichnet, die in ihrem genomischen Kontext beschrieben, von 1-15 benannten Hbs wurden zusätzlich durch eine dicke Schrift hervorgehoben. Alle Abkürzungen der Organismen und Proteinennamen sowie die entsprechenden Accession-Nummern finden sich in Anhang 7.7, das diesem Stammbaum zugrunde liegenden Aminosäure-Alignment in Anhang 7.8.2.

Die β -Hbs zeigen ebenfalls eine interne Gruppenbildung: die adulten *Xenopus* Hbs bilden einen eigenen, von den larvalen β -Hbs unterschiedlichen Ast. Xtr Hb 06 ist demnach das adulte β -Hb (Knöchel et al., 1986), während die Hbs 07, 08, 09 und 11 der larvalen Gruppe zuzuordnen sind. Dabei sind die Hbs 08 und 09 am engsten miteinander verwandt und gruppieren mit Xtr Hb β larval P08423 (Knöchel et al., 1987), gefolgt von Xtr Hb 11, das einen etwas weiteren phylogenetischen Abstand zeigt. Xtr Hb 07 stellt das larvale β -Hb mit den meisten Sequenzabweichungen zu den andern larvalen β -Hbs dar, gruppiert jedoch deutlich mit den β -larvalen Hbs.

Durch bereits 1979 durchgeführte Hybridisierungsversuche und Sequenzierungen wurde ermittelt, dass im tetraploiden Genom von *Xenopus laevis* zwei Hb-Cluster vorliegen (Hentschel et al., 1979). Die Benennung der Gene erfolgte je nach Forschergruppe als „1 bzw. 2“ (um W. Knöchel und R. Weber) oder „major und minor“ (um J.G. Williams). In beiden Fällen kennzeichneten sie jedoch die orthologen Hbs in den beiden Clustern. Ein Vergleich der Hb-Gene von *Xenopus tropicalis* mit jenen von *Xenopus laevis* zeigt keine eindeutige Zuordnung der Gene des tropischen Krallenfrosches zu einem der beiden Cluster von *Xenopus laevis* (Abbildung 12). In drei Fällen weisen die Gene von *Xenopus laevis* untereinander eine größere Ähnlichkeit zueinander auf als zu einem der *Xenopus tropicalis*-Hbs. Beispielsweise bilden beide adulten α -Hbs von *Xenopus laevis* eine distinkte Gruppe, obwohl die Gene im Genom des afrikanischen Krallenfrosches auf die zwei Hb-Cluster verteilt sind. Lediglich die β -larvalen Hbs 1 und 2 von *Xenopus laevis* zeigen eine vermutlich orthologe phylogenetische Beziehung zu Hb 11 bzw. 07 von *Xenopus tropicalis*. Dieser Befund weist auf eine Akkumulation der Veränderungen innerhalb der duplizierten Hb-Cluster zeitlich nach der Diversifikation der *Xenopus*-Spezies hin.

3.1.5. Die Hämoglobin-Transkription in der Entwicklung von *Xenopus*

Eine *in silico* durchgeführte Überprüfung der mRNA-Transkription der verschiedenen Hb-Gene von *Xenopus tropicalis* (Xtr Hb 01-15, vgl. Abbildung 10) zeigte eine differenzielle Transkription der mRNA in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Krallenfrosches. Die Analyse basierte auf den Daten der tatsächlich in einem Organismus transkribierten mRNAs, den ESTs (expressed sequence tags). Blastn-Suchen mit jedem einzelnen Hb-Gen in der NCBI-Datenbank detektierten ESTs in den aus verschiedenen Entwicklungsstadien hergestellten Gen-Bibliotheken des tropischen Krallenfrosches. Einzige Ausnahme dieser Suchen bildete das Pseudogen Hb 12 ψ : bei Analysen mit dieser Sequenz wurde erwartungsgemäß kein EST-Eintrag gefunden. Die Ergebnisse wurden den jeweiligen Datenbanken zugeordnet und auf die Gesamtzahl der ESTs in der Datenbank bezogen. Die Datenbanken wurden entsprechend den Entwicklungsstadien von Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop und Faber, 1975) in vier Gruppen eingeteilt (NF 10-30, 35-45, 51-64 und adult), die Werte innerhalb der Gruppen addiert und auf die Anzahl der Datenbanken pro Gruppe relativiert.

Die so normalisierten Werte zeigten ein spezifisches Transkriptionsmuster der *Hb*-mRNA in der Frosch-Entwicklung (Abbildung 13): während der frühesten Entwicklungsstufen (NF 10-30) werden ausschließlich larvale α -Hbs (01-04, 12-15) und larvale β -Hbs (08-11) in relativ geringem Maße transkribiert. Diese larvalen Gene werden während der weiteren Froschentwicklung (NF 36-45) weiterhin transkribiert, wobei die Stärke etwas zunimmt. Außerdem wird in diesen Stadien erstmals sehr schwach das adulte β -Hb detektiert. Während der Stadien 51-61 durchläuft *Xenopus tropicalis* die Metamorphose des larvalen zum adulten Tier: alle larvalen und adulten Hb-Gene werden transkribiert. Wie erwartet werden die adulten Hbs deutlich stärker als in den früheren Stadien detektiert. Auffällig ist die starke Transkription des α -larvalen Hb 04 sowie der β -larvalen Hbs 07 und 11. In den Adultstadien werden wie erwartet die adulten Hbs am stärksten transkribiert, doch auch die α -larvalen Hbs 03, 04 und 15 sowie die β -larvalen Hbs 08 und 11 werden gefunden. Die α -larvalen Hbs 01, 02, 12, 13 und 14 werden in diesem Entwicklungsstadium nicht mehr transkribiert. In den aus adulten Geweben hergestellten EST-Banken werden die meisten Einträge der adulten Hbs in Herz und Leber gefunden. Diese Gewebe sind stark durchblutet und die Frage, ob die Tiere vor der Organ-Präparation perfundiert wurden, konnte anhand der gegebenen Daten nicht geklärt werden. Der Rückschluss auf eine tatsächliche stärkere Expression der adulten Hbs in Herz und Leber ist daher nicht möglich.

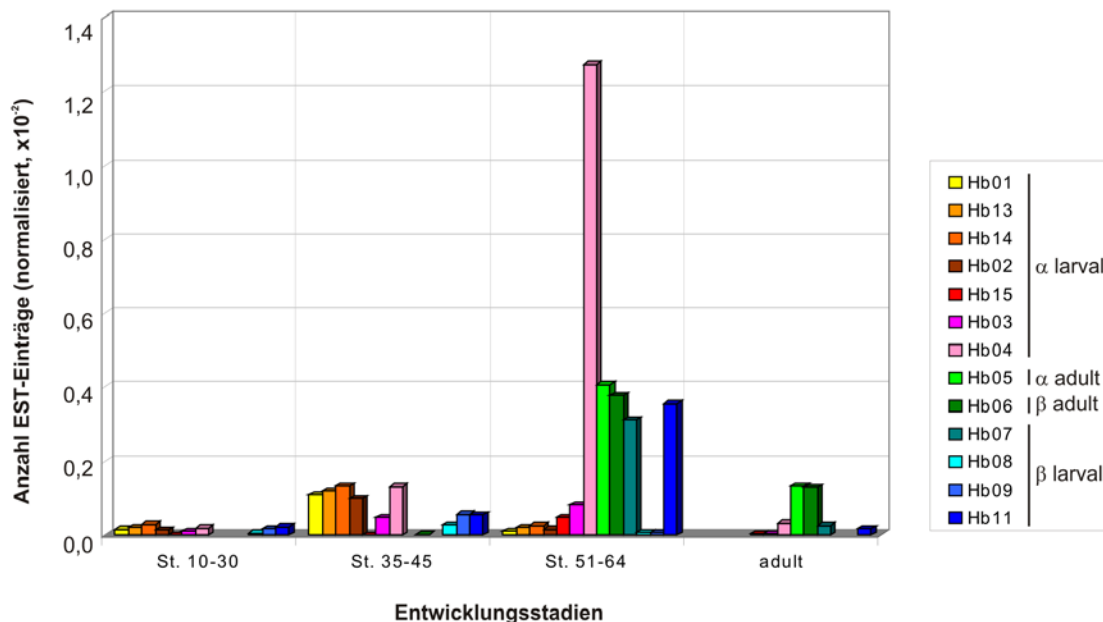


Abbildung 13:

***In silico*-Transkriptionsanalyse der Hb-Gene 01-15 von *Xenopus tropicalis*.**

Die durch Blastn-Analysen in der NCBI-Datenbank gefundenen EST-Einträge mit einem E-Wert von 0.0 wurden ausgezählt und den entsprechenden EST-Datenbanken zugeordnet. Diese wurden entsprechend der Entwicklungsstadien nach Nieuwkoop und Faber geordnet in 4 Gruppen zusammengefasst (NF 10-30, NF35-45, NF 51-64, adult) und auf die Anzahl der EST-Einträge pro Datenbank sowie die Anzahl der Datenbanken pro Gruppe normalisiert.

3.1.6. Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* in *Xenopus*

Mittels RT-PCR wurden die bis dato ausschließlich *in silico* nachgewiesenen kodierenden Sequenzen von *Xenopus tropicalis* *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* amplifiziert. Die im 3'-Bereich zunächst unbekannte Sequenz von *Ngb* wurde mit einer 3'RACE-Reaktion vervollständigt, die Amplifikate wurden aufgereinigt, kloniert und sequenziert. Entsprechend wurden die cDNAs, soweit möglich, auch in dem nahe verwandten Krallenfrosch *Xenopus laevis* nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden der Datenbank des „European bioinformatics institute“ (<http://www.ebi.ac.uk>) übermittelt und dort unter den folgenden Accession-Nummern registriert: Xtr *Ngb* (AJ634914), Xtr *GbX* (AJ634915), Xla *Ngb* (AM041065), Xla *Cygb* (AJ635232), Xla *GbY* (AJ635233).

Resultierend konnten in diesem Versuchsteil die *in silico*-Daten der Globine von *Xenopus tropicalis* bestätigt und die Gene teilweise erstmals in *Xenopus laevis* nachgewiesen werden. Darauf basierend wurden die Globingen-Sequenzen von *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis* vergleichend mit jenen anderer Vertebraten analysiert.

Die kodierende Sequenz von *Ngb* des tropischen Krallenfrosches wurde aus Gehirn-cDNA amplifiziert und umfasst von Start- bis Stopp-Kodon 495 bp, das davon abgeleitete Protein besteht aus 164 Aminosäuren bei einem vorhergesagten Molekulargewicht von 18,7 kDa. Aufgrund zusätzlicher Aminosäuren im N- wie auch im C-Terminus des Proteins ist das *Ngb* von *Xenopus tropicalis* 13 Moleküle länger als die Mammalier-*Ngb*s und vier Reste länger als das orthologe Huhn-Protein (Anhang 7.8.5).

Durchschnittlich zeigt das *Ngb* des tropischen Krallenfrosches eine 67%ige Identität bzw. 85%ige Ähnlichkeit zu den Mammalier-*Ngb*s, eine 31%ige Identität bzw. 47%ige Similarität zu den Fisch-*Ngb*s und eine 59%ige Übereinstimmung bzw. 80%ige Ähnlichkeit zum *Ngb* des Haushuhnes. Ausgehend von einer Divergenz der Mammalier und Amphibien vor etwa 360 Millionen Jahren (Kumar und Hedges, 1998) lässt sich eine durchschnittliche Substitutionsrate von $0,61 \times 10^{-9}$ Aminosäuren pro Position pro Jahr für *Xenopus tropicalis* *Ngb* berechnen. Dieser Wert stimmt gut mit dem für Vögel berechneten Wert von $0,62 \times 10^{-9}$ Aminosäure-Austauschen pro Position pro Jahr überein (Kugelstadt et al., 2004) und liegt etwas höher als der für Mammalier ermittelte Wert von etwa $0,4 \times 10^{-9}$ Aminosäure-Austauschen pro Position pro Jahr (Wystub et al., 2004).

Das *Ngb*-Protein von *Xenopus tropicalis* besitzt das konservierte distale und proximale Histidin an den Positionen E7 und F8, wie auch das Phenylalanin an Position CD1. Dieses ist, wie das ebenfalls konservierte Leucin an Position F4, essentiell für den Hämkontakt. Weitere im *Xenopus*-*Ngb* konservierte Aminosäuren finden sich an den Positionen B6 (Glycin) und C2 (Prolin), wobei das Glycin aufgrund der nicht vorhandenen Seitenkette eine Annäherung der E- und der B-Helix zulässt, während das Prolin die C-Helix terminiert.

In den ansonsten zwischen den Spezies konservierten Bereichen werden sechs Frosch-spezifische Aminosäure-Austausche gefunden: Diese betreffen die Positionen E2 (Austausch von P nach A), E5 (L→T), E13 (L→T), EF9 (E→D), G15 (M→A) und H18 (A→S) und sind alle isofunktionaler Natur. Von den für die mögliche Bildung einer internen Disulfidbrücke im Menschen diskutierten Cysteinreste an den Positionen CD5 und D5 (Hamdane et al., 2004; Hamdane et al., 2005) ist im tropischen Krallenfrosch nur das Cystein D5 konserviert. Allerdings findet sich an Position EF4 ein Cystein, das möglicherweise als Bindungspartner in einer Disulfidbrücke dienen könnte.

Weder in genomischen, noch in EST-Datenbanken wurde Neuroglobin bisher (Stand Juni 2007) *in silico* in *Xenopus laevis* identifiziert (vgl. Anhang 7.9.). Durch die Verwendung von *Xenopus tropicalis*-spezifischen *Ngb*-Oligonukleotiden in einer RT-PCR konnte *Ngb* jedoch partiell in *Xenopus laevis* amplifiziert werden. Mittels einer 3'-RACE wurde die CDS dieses cDNA-Bereiches vervollständigt. Eine 5'-RACE war jedoch in mehreren Versuchen erfolglos, so dass die CDS des *Ngb*-Gens von *Xenopus laevis* im Anfangsbereich unvollständig bleibt. Insgesamt konnten 425 Nukleotide der kodierenden Sequenz isoliert werden. Sofern von einer identischen Länge der Sequenz wie in *Xenopus tropicalis* ausgegangen wird, fehlen voraussichtlich 55 bp am 5'-Ende. Die partielle *Ngb*-Sequenz von *Xenopus laevis* kann in 140 Aminosäuren translatiert werden. Innerhalb der überlappenden Bereiche zeigen die *Ngb*-Sequenzen beider Krallenfrösche eine Übereinstimmung von 93% auf Nukleotidebene, die Identität auf Proteinebene beträgt 96% mit nur fünf isofunktionalen Aminosäure-Austauschen. Der C-Terminus des *Xenopus laevis* *Ngb* ist 5 Aminosäuren kürzer als der von *Xenopus tropicalis*, was auf einem durch einen Basenaustausch hervorgerufenen, vorgezogenen Stopp-Kodon beruht.

Die Sequenz des *Xenopus laevis* *Cygb*-Gens wurde in den EST-Daten der NCBI-Datenbank unter den Accession-Nummern CD360300 und CF238220 identifiziert. Basierend auf diesen Daten wurde die CDS mittels einer RT-PCR aus dem Gehirn von *Xenopus laevis* amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die komplette CDS umfasst 540 bp, die übersetzte Proteinsequenz besteht aus 179 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 20,7 kDa. Die Proteinelänge ist damit identisch zu der des Huhn-*Cygb* (179 Aminosäuren, vgl. Anhang 7.8.6) und deutlich kürzer als die der Mammalier-*Cygb*s mit 190 Aminosäuren (Burmester et al., 2002; Kugelstadt et al., 2004).

Die *Cygb*-Sequenz von *Xenopus tropicalis* wurde ebenfalls *in silico* in zwei EST-Einträgen (BC076983 und NM_001006869) gefunden, entsprechend amplifiziert, kloniert und sequenziert.

Die *Cygb*s von *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* zeigen die gleiche Länge der kodierenden Sequenzen mit 93% Nukleotid-Identität. Auf Proteinebene liegt die Identität bei 94%, die Similarität bei 97%. Verglichen mit den Mammalier-*Cygb*s zeigen die Frösche eine 69%ige Identität und 87%ige Ähnlichkeit, die Übereinstimmung zwischen den Frosch- und Huhn-*Cygb*s liegt bei 73%, die Similarität bei 89%.

Bezogen auf diese Werte wird eine Substitutionsrate von $0,54 \times 10^{-9}$ Aminosäuren pro Position pro Jahr für die *Xenopus*- und Mammalier-Cygb's berechnet. Diese Rate ist etwas höher als die von Mammaliern und Huhn ($0,43 \times 10^{-9}$ Aminosäure-Austausche pro Position pro Jahr), aber etwa viermal so hoch wie der ausschließlich für Mammalier-Cygb's ermittelte Wert von $0,13 \times 10^{-9}$ Austauschen pro Position pro Jahr (Wystub et al., 2004).

Die funktionell wichtigen Aminosäuren an den Positionen E7 (distales Histidin), F8 (proximales Histidin), CD1 (Phenylalanin), B6 (Glycin) und C2 (Prolin) sind in beiden *Xenopus*-Cygb's konserviert. An Position F4 findet sich statt eines konservierten Leucins die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Valin. 23 Aminosäure-Austausche sind, verglichen mit den Sequenzen der Mammalier und des Haushuhnes, froschspezifisch. Elf dieser Austausche führen zum Einbau physikochemisch unterschiedlicher Aminosäuren. Von den zwei Cystein-Resten, die eventuell für eine molekulinterne Disulfidbrücken-Bildung zuständig sein könnten (Hamdane et al., 2003), ist lediglich ein Cystein an Position B2 in *Xenopus* konserviert.

Das GbX-Gen wurde ursprünglich durch Analysen der genomischen *Xenopus tropicalis*-Daten gefunden und die wahrscheinliche kodierende Sequenz daraus abgeleitet. Diese wurde dann aus den Herzen von insgesamt drei *Xenopus tropicalis*-Individuen per RT-PCR amplifiziert und das PCR-Produkt direkt sequenziert. Die PCR-Produkte aus zwei Tieren wurden zudem kloniert und insgesamt 21 Klone auf beiden Strängen sequenziert.

Ein aus den direkten Sequenzierungen hergestelltes Alignment weist heterogene Sequenzierungssignale an spezifischen Stellen auf, welche mit Nukleotidunterschieden der klonierten Sequenzen übereinstimmen. Dabei werden 22 heterogene Positionen gefunden, welche ein Verhältnis von 18 Transitionen zu 4 Transversionen aufweisen und in sieben Aminosäure-Austauschen und einem vorgezogenen Stopp-Kodon resultieren. Die Sequenzen der 21 Klone können drei unterschiedlichen Gruppen zugeteilt werden: Version A kodiert für ein funktionell intaktes Protein mit einem konservierten proximalen Histidin an Position F8 und einer weiteren charakteristischen Kombination ausgetauschter Aminosäuren. Diese sind in Abbildung 14A als Aminosäuren „T-Q-H-V-R-Q-A-Q“ angegeben und liegen an den Positionen A15, A16, F8, G15, G17, GH2, H26 und HC3 der α -Helices der Globine, wobei das proximale Histidin (grün dargestellt) aus Gründen der Vergleichbarkeit mit angegeben wurde. In Version B (Abbildung 14B) ist das proximale Histidin durch einen Nukleotid-Austausch durch ein Prolin ersetzt, so dass das resultierende Protein nicht mehr in der Lage ist, Sauerstoff zu binden. Ansonsten zeigt diese Version die Aminosäuren „I-Q-P-A-C-H-E-R“ an den beschriebenen Positionen. Version C weist die gleiche Aminosäure-Kombination wie Version B auf, zusätzlich tritt jedoch ein vorgezogenes Stopp-Kodon auf, das in Abbildung 14C durch ein rot dargestelltes „*“ symbolisiert wird. Resultierend kann auch in Version C des *GbX*-Gens aufgrund der Aminosäure-Abfolge „I-*P-A-C-H-E-R“ kein funktionelles Protein gebildet werden. Die Kombination eines intakten proximalen Histidins mit einem vorgezogenen Stopp-Kodon wurde in keinem der Klone gefunden. In den 21 analysierten Fällen sind die Versionen in einem Verhältnis von

7A:4B:10C vertreten, alle drei Versionen können in beiden untersuchten Tieren nachgewiesen werden (2A:1B:2C bzw. 5A:3B:8C). Dies deutet auf das Vorhandensein zweier paraloger Kopien von *GbX* in *Xenopus tropicalis* hin: Kopie A („T-Q-H-V-R-Q-A-Q“, kein Stopp-Kodon) und Kopie B/C („I-Q/*-P-A-C-H-E-R“ ohne bzw. mit vorgezogenem Stopp-Kodon). Die Kopien B und C stellen möglicherweise Allel-Varianten des Gens dar, das sich offenbar auf dem Weg zu einem Pseudogen ψ befindet.

Interessanterweise zeigt die Sequenz des GbX-Gens im JGI-Assembly 4.1. eine gemischte Form der charakteristischen Aminosäure-Austausche mit der Abfolge „I-Q-H-A-R-Q-E-R“ mit einem funktionellen distalen Histidin und ohne vorgezogenes Stopp-Kodon (Abbildung 14D).

In Anhang 7.8.7 sind die Sequenzen der vier möglichen Proteine von GbX angegeben. Die in der Datenbank unter der Accession-Nummer AJ634915 eingetragene Sequenz entspricht Version B, wobei an Position F8 durch den Eintrag eines „X“ auf den möglichen Austausch des proximalen Histidins durch ein Prolin hingewiesen wird.

Generell zeigt das GbX-Protein die in Globinen konservierten Aminosäuren an den Positionen B6 (Glycin), C2 (Prolin), CD1 (Phenylalanin), E7 (distales Histidin) und F4 (Leucin) (vgl. Anhang 7.8.7).

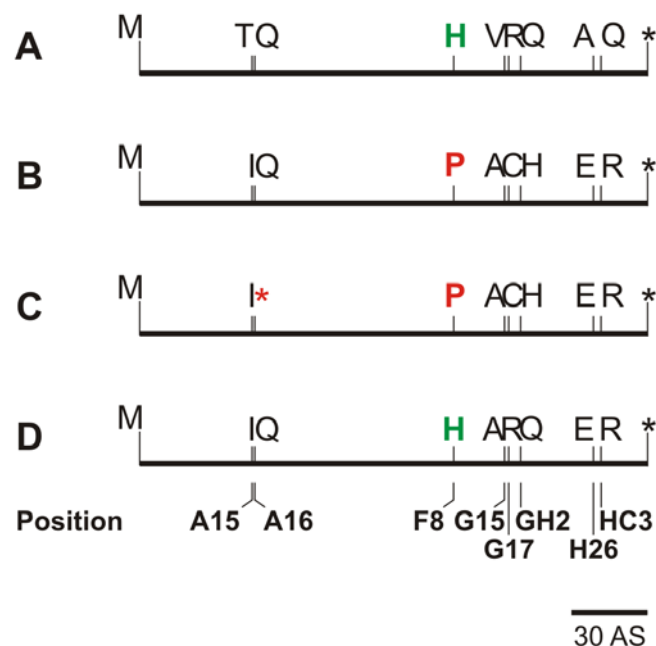


Abbildung 14

Grafische Darstellung der verschiedenen Varianten der kodierenden Sequenz des GbX-Gens.

Die kodierende Sequenz wird maßstabsgerecht durch die horizontale Linie mit einem Methionin (M) als Start-Kodon und einem * als Stopp-Kodon dargestellt. Die für die einzelnen Varianten typischen Aminosäuren sind oberhalb der Linie abgekürzt wiedergegeben (vgl. Anhang 7.2), ihre jeweilige helikale Position ist basal verzeichnet. Die Varianten A und B/C könnten paraloge Duplikate von *GbX* repräsentieren. Die Varianten B und C unterscheiden sich lediglich durch ein vorgezogenes Stopp-Kodon (*) in C und könnten verschiedene Stadien der Non-Funktionalisierung dieser Version auf verschiedenen Allelen repräsentieren. Die Variante D stammt aus der genomischen Datenbank des JGI und präsentiert ein Sequenzmosaik, das durch rekombinieren Genverlust entstanden sein könnte.

Bis heute wurde *in silico* kein EST-Eintrag von GbX in *Xenopus laevis* detektiert (Stand Juni 2007), doch konnten via RT-PCR auf Gehirn-cDNA mit Oligonukleotiden von *Xenopus tropicalis* 268 bp des Gens amplifiziert werden. Diese partielle Sequenz kann in 88 Aminosäuren translatiert werden und zeigt in den überlappenden Bereichen 91% Identität und 96% Similarität zu GbX von *Xenopus tropicalis*. Basierend auf einer als wahrscheinlich angesehenen Divergenz der Actinopterygii und Sarcopterygii vor etwa 420 Millionen Jahren (Benton, 1990) lässt sich eine durchschnittliche Substitutionsrate von $0,89 \times 10^{-9}$ Aminosäuren pro Position pro Jahr berechnen.

Eine tBlastx-Suche mit dem humanen *Cygb* als Suchsequenz detektierte eine zusätzliche, bisher unbekannte Globinsequenz in den EST-Daten von *Xenopus laevis* (Accession-Nummer BP713304, BP675910, BX848720, BJ038309, BJ052904, BG016324, BG016381 und AW767977) und *Xenopus tropicalis* (Accession Nummer CX400941, CX400940 und CX36643). Dieses Globin gruppiert phylogenetisch zwar nicht direkt zu den Cytoglobinen, zeigt jedoch eine relative Nähe dazu (vgl. Abbildung 7) und hat intensiven Blast-Suchen zufolge keine eindeutigen Orthologe in den Genomen anderer Vertebraten. Aufgrund dieser Fakten und seiner bisher unbekanntenen Funktion wurde es der Nomenklatur folgend als GbY benannt.

Die kodierende Sequenz von GbY wurde via RT-PCR vollständig aus dem Herz-Muskel von *Xenopus laevis* amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die CDS umfasst 471 Nukleotide und lässt sich in 156 Aminosäuren übersetzen, das vorhergesagte Protein hat ein Molekulargewicht von 17,8 kDa und zeigt die bekannten konservierten Aminosäuren wie das distale und proximale Histidin ebenso wie die wichtigen Aminosäuren an den Positionen B6, C2, CD1 und F4 (Anhang 7.8.8).

Die CDS des *in silico* zu den Analysen hinzugezogenen *GbY*-Gens von *Xenopus tropicalis* hat die gleiche Länge und zeigt eine 79%ige Identität bzw. 95%ige Similarität auf Aminosäureebene zu *GbY* von *Xenopus laevis*. Im Vergleich mit den anderen Globinen zeigt damit das *GbY*-Gen eine geringere Konservierung zwischen *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis*. Diese Beobachtung spiegelt sich in der ermittelten Austauschrate von $1,29 \times 10^{-9}$ Aminosäuren pro Position pro Jahr bei einer Divergenz des afrikanischen und tropischen Krallenfrosches vor 30 Millionen Jahren wieder (Bisbee et al., 1977).

3.1.7. Differentielle mRNA-Transkription von *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* in adulten Krallenfröschen

Die Untersuchung der mRNA-Transkription von *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* erfolgte, basierend auf den *in silico* gewonnenen Daten, durch die Amplifikation der kodierenden Gensequenzen mittels qualitativer RT-PCR. Die cDNAs wurden durch Reverse Transkription aus den Gesamt-RNAs verschiedener Gewebe adulter *Xenopus laevis*-Individuen gewonnen. Für jede Reaktion wurde die gleiche Menge RNA eingesetzt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden für jedes Gewebe Proben aus mindestens zwei Tieren gewonnen, die Resultate dieser biologischen Replikate entsprachen

sich in allen Fällen. Die PCR wurde für alle vier Gene auf alle cDNAs durchgeführt, als Positiv-Kontrolle diente die Amplifikation von *β-actin*, in der Negativ-Kontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt.

Soweit möglich, wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen auf den tropischen Krallenfrosch ausgedehnt, limitierender Faktor war hierbei die verfügbare Materialmenge. Da der Schwerpunkt der mRNA-Transkriptionsanalyse aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von *Xenopus tropicalis* immer auf den afrikanischen Krallenfrosch ausgelegt war, werden die Ergebnisse in *Xenopus tropicalis* lediglich ergänzend angeführt.

Ngb wird im afrikanischen Krallenfrosch besonders stark im Gehirn und Auge transkribiert, auch in Darm, Ovar und Niere konnten distinkte Signale unterschiedlicher Stärke gezeigt werden. In Herzmuskel, Leber und Skelettmuskel konnte mittels PCR keine mRNA-Transkription von Ngb nachgewiesen werden (Abbildung 15A).

Im tropischen Krallenfrosch kann die Ngb-mRNA ebenfalls in Darm, Ovar und Auge nachgewiesen werden, in Herzmuskel und Leber wird kein Amplifikat nachgewiesen.

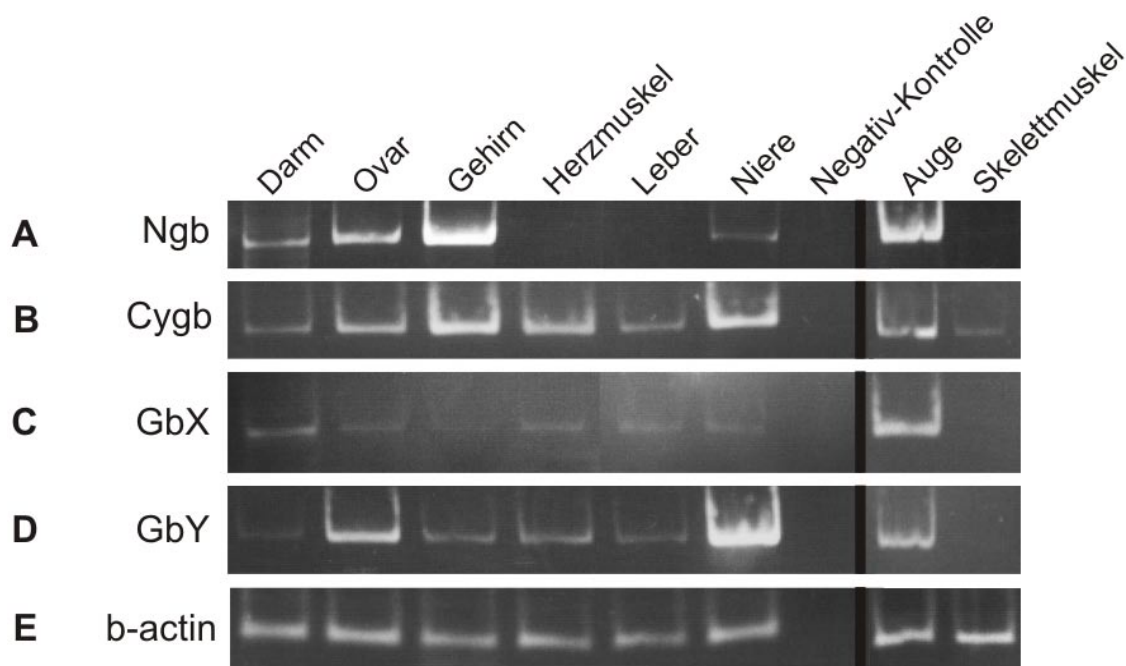


Abbildung 15: Transkriptionsanalyse verschiedener Globin-Gene in adulten Geweben von *Xenopus laevis* per qualitativer RT-PCR.

Aus den angegebenen Geweben wurde Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die mRNA-Transkription von Ngb (A), Cygb (B), GbX (C) und GbY (D) per PCR nachgewiesen. Die Amplifikate wurden mittels Gel-elektrophorese aufgetrennt und visualisiert. Die Amplifikation von *β-actin* in allen Geweben via RT-PCR dient sowohl als Nachweis der Unversehrtheit der präparierten RNA als auch der Kontrolle des Einsatzes gleicher Mengen Gesamt-RNA aller Gewebe in den Reaktionen.

Eine *Cygb*-Transkription kann in allen untersuchten Geweben von *Xenopus laevis* nachgewiesen werden, wobei die Signale in Hirn und Niere etwas stärker als in den anderen Geweben sind (Abbildung 15B). Im tropischen Krallenfrosch wird *Cygb* per RT-PCR im Ovar nachgewiesen, Nachweise in anderen Geweben wurden nicht geführt.

GbX wird besonders stark im Auge transkribiert, schwächere Signale finden sich in allen analysierten Geweben mit Ausnahme des Skelettmuskels (Abbildung 15C). In *Xenopus tropicalis* können *GbX*-Signale in Auge, Darm, Hirn und Herzmuskel detektiert werden, in Ovar, Leber und Skelettmuskel wird keine Amplifikation beobachtet.

GbY zeigt eine distinkte Transkription in allen untersuchten Geweben von *Xenopus laevis* mit Ausnahme des Skelettmuskels, besonders starke Signale sind in Niere und Ovar nachweisbar (Abbildung 15D). Im tropischen Krallenfrosch wird *GbY* in Darm und Herz nachgewiesen, andere Gewebe wurden nicht spezifisch untersucht.

Als Positivkontrolle diente in diesem Versuch β -actin, das in allen Geweben erfolgreich amplifiziert werden konnte. Dadurch wurde zum einen die Integrität, zum anderen die Reinheit der RNA überprüft und jeweils erfolgreich verifiziert. Die Negativkontrolle zeigte generell kein Signal und bestätigt damit die erbrachten Ergebnisse (Abbildung 15E).

Ergänzend wurden die *in silico* verfügbaren EST-Einträge der Gene überprüft: von *Ngb* existierten in *Xenopus laevis* keinerlei EST-Einträge (Stand Juni 2007), in *Xenopus tropicalis* wurden dreizehn EST-Einträge detektiert: sie stammen aus Datenbanken, die aus adultem Darmgewebe, larvalen bzw. adultem Gehirn und Rückenmark und larvalen Gewebe der Stadien 36-41 hergestellt wurden (Stand Juni 2006, vgl. Anhang 7.9). *Cygb* wird in drei Einträge einer aus Augen adulter afrikanischer Krallenfrösche hergestellten Datenbank gefunden (Stand Juni 2006). Von *Xenopus tropicalis* *Cygb* werden zwei Einträgen gefunden: ein Eintrag stammt aus einer aus Embryonen der NF-Stadien 14-19 hergestellten Datenbank, der andere aus adulter Milz. Von *GbX* werden weder in *Xenopus tropicalis* noch in *Xenopus laevis* EST-Einträge detektiert. Für *GbY* können in *Xenopus laevis*-spezifischen EST-Datenbanken 25 Einträge über die volle Länge der CDS gefunden werden: zwei stammen aus dem Neuroektoderm früher Embryonalstadien, ein Eintrag wird in einer Bank aus Embryonen des Stadiums 14 detektiert und ein Eintrag in einer aus embryonaler Haut hergestellten EST-Bank gefunden. Elf weitere Einträge stammen aus von Embryonen der Stadien 10 bis 24 hergestellten Datenbanken. Für *GbY* von *Xenopus tropicalis* werden insgesamt zehn Einträge gezählt. Sie stammen aus Datenbanken von Tieren der Entwicklungsstadien 36-41, von adultem Magengewebe sowie von Gehirnen und Retinae der Stadien 25-35 (Anhang 7.9).

Die detektierte mRNA-Transkription in Adult-Tieren legt die Frage nahe, ab welchem Entwicklungsstadium die mRNA der analysierten Gene transkribiert wird und wo diese lokalisiert ist. Die Untersuchungen dazu wurden an verschiedenen Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis* beginnend mit sehr jungen Embryonalstadien über Neurulation und Gastrulation bis über die Metamorphose zum Adulttier hinaus durchgeführt. Die zeitliche mRNA-Transkription wurde qualitativ per RT-PCR untersucht und via Real-Time PCR quantifiziert, die Lokalisation der Transkription wurde in relativ jungen Embryonalstadien mit der Methode der „Whole Mount *in situ*-Hybridisierung (WMHIS) analysiert. Diese Arbeiten wurden von Frau Junge im Rahmen ihrer von mir labortekhnisch betreuten Diplomarbeit erbracht (Junge, 2006), die Ergebnisse fließen an dieser Stelle in meine Arbeit ein.

Mit Versuchen zur Klärung der zellulären Lokalisation der mRNA-Transkription in ausgewählten Geweben von Adulttieren wurde (von mir) begonnen, doch bedürfen die Bedingungen der *in situ*-Hybridisierungsversuche noch ausgiebiger Sondentests und Modifikationen der Hybridisierungsbedingungen.

3.1.8. Nachweis der mRNA-Transkription ausgewählter Globingene in der Entwicklung von *Xenopus laevis*

Frau Junge analysierte ergänzend im Rahmen Ihrer Diplomarbeit die mRNA-Transkription in der Entwicklung des afrikanischen Krallenfrosches. Dieser Versuch erfolgte qualitativ durch den Nachweis der mRNA-Transkription via RT-PCR und quantitativ mit der Methode der Real-Time RT-PCR. Beide Systeme basieren auf den in verschiedenen Entwicklungsstadien gewonnenen *Xenopus laevis*-Embryonen und der aus Ihnen präparierten Gesamt-RNA. Ergänzend wurden die Versuche jeweils auch mit Gesamt-RNA aus den Geweben adulter Tiere durchgeführt.

3.1.8.1. mRNA-Transkriptionsnachweis via RT-PCR

Embryonen von *Xenopus laevis* wurden nach der hormonellen Stimulation eines Zuchtpaares mit humanem Chorion-Gonadotropin und der extrakorporal erfolgenden Befruchtung gewonnen. Die Eier wurden gesammelt und entsprechend der nach Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop und Faber, 1975) eingeteilten Stadien bestimmt (vgl. Anhang 7.15, nach <http://www.xenbase.org/atlas/NF/NF-all.html> und <http://www.bio.davidson.edu/people/balom/StagingTable/xenopushome.html>).

Die Gesamt-RNA wurde nach den Entwicklungsstadien getrennt präpariert, quantifiziert (Anhang 7.10.1) und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese (Abbildung 16) visualisiert die insgesamt gute Qualität der aus den Stadien 6-38 bzw. 54->60 gewonnenen Gesamt-RNA, während sich die Qualität der aus den Stadien 45-46, 47 und 49 als eher schlecht erwies. Auch die Qualität der RNA aus den Stadien 48, 50 und 51 war aufgrund von Degradation eingeschränkt. Außerdem

präparierte Frau Junge auch Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben von adulten afrikanischen Krallenfröschen, wobei die gute Verfügbarkeit adulter *Xenopus laevis*-Tiere hier der Validierung der angewandten Methoden diente. Auch die RNA-Qualität der Adultstadien wurde mittels eines FA-Agarosegels beurteilt: demzufolge sind die Präparationen aus Leber, Herz und Skelettmuskel als gut einzustufen, während bei jenen aus Auge, Gehirn, Lunge und Darm wohl Degradierungsprozesse zum Abbau der 28S rRNA geführt haben.

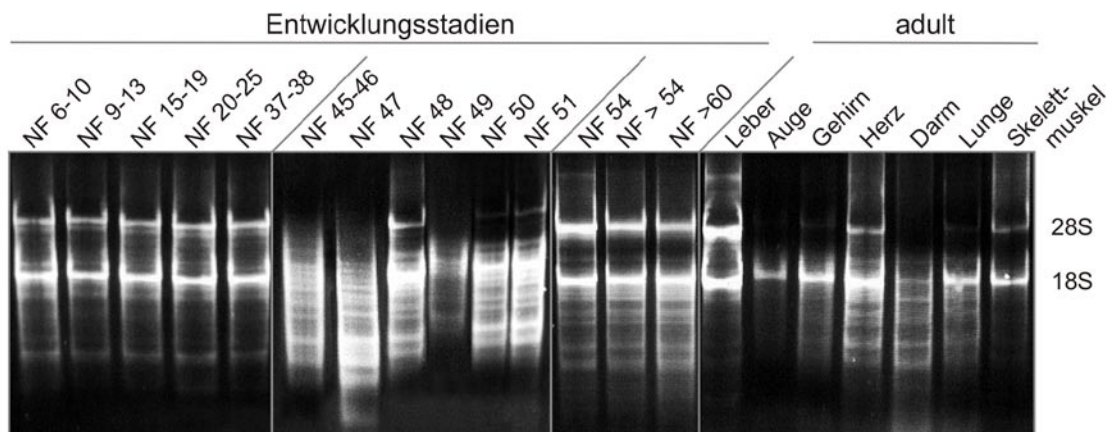


Abbildung 16:
Gelelektrophoretische Auftrennung der aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien und adulten Exemplaren von *Xenopus laevis* isolierten Gesamt-RNAs.

Auf 1,2%ige denaturierende FA-Agarosegele wurden 500 ng RNA pro Spur aufgetragen; die Proben zeigen bis auf die Stadien NF 46, 47 und 49 eine akzeptable Qualität, welche anhand des Erhaltungszustandes der 28s- bzw. 18s-rRNA beurteilt wurde.

Für die reverse Transkription wurden je 500 ng bzw. 750 ng RNA eingesetzt, eine PCR mit den angegebenen Oligonukleotiden durchgeführt (Anhang 0) und die Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 17). Die Größe der Amplifikate wurde durch die Auswahl entsprechender Oligonukleotide bewusst unter 400 bp gehalten, um auch bei partiell degradierten RNAs noch Aussagen treffen zu können.

Die Ergebnisse der RT-PCR (Abbildung 17) zeigten für jedes der analysierten Gene sowohl in den Entwicklungsstadien- als auch Adult-Geweben ein spezifisches Expressionsmuster.

Das Amplifikat des *Ngb*-Gens wird ab Stadium NF 37-38 detektiert, in der früheren Entwicklung des afrikanischen Krallenfrosches wird keine *Ngb*-mRNA gebildet. Ab NF 50 bzw. 51 kommt es zu einem Anstieg des nachgewiesenen *Ngb*-Amplifikates; auch kann die *Ngb*-mRNA in allen adulten Geweben nachgewiesen werden, wobei die Detektion in Skelettmuskel und Herz äußerst schwach ist. Alle anderen Gewebe zeigen eine starke Amplifikation mit einem Maximum in Auge und Gehirn.

Cygb-mRNA wird schwach ab den frühesten Embryonalstadien durch die gesamte Entwicklung von *Xenopus laevis* hinweg detektiert; auch in allen adulten Geweben wird die *Cygb*-mRNA nachgewiesen. Ab NF 51 kommt es zu einem massiven Anstieg der Expression von *Cygb*-mRNA.

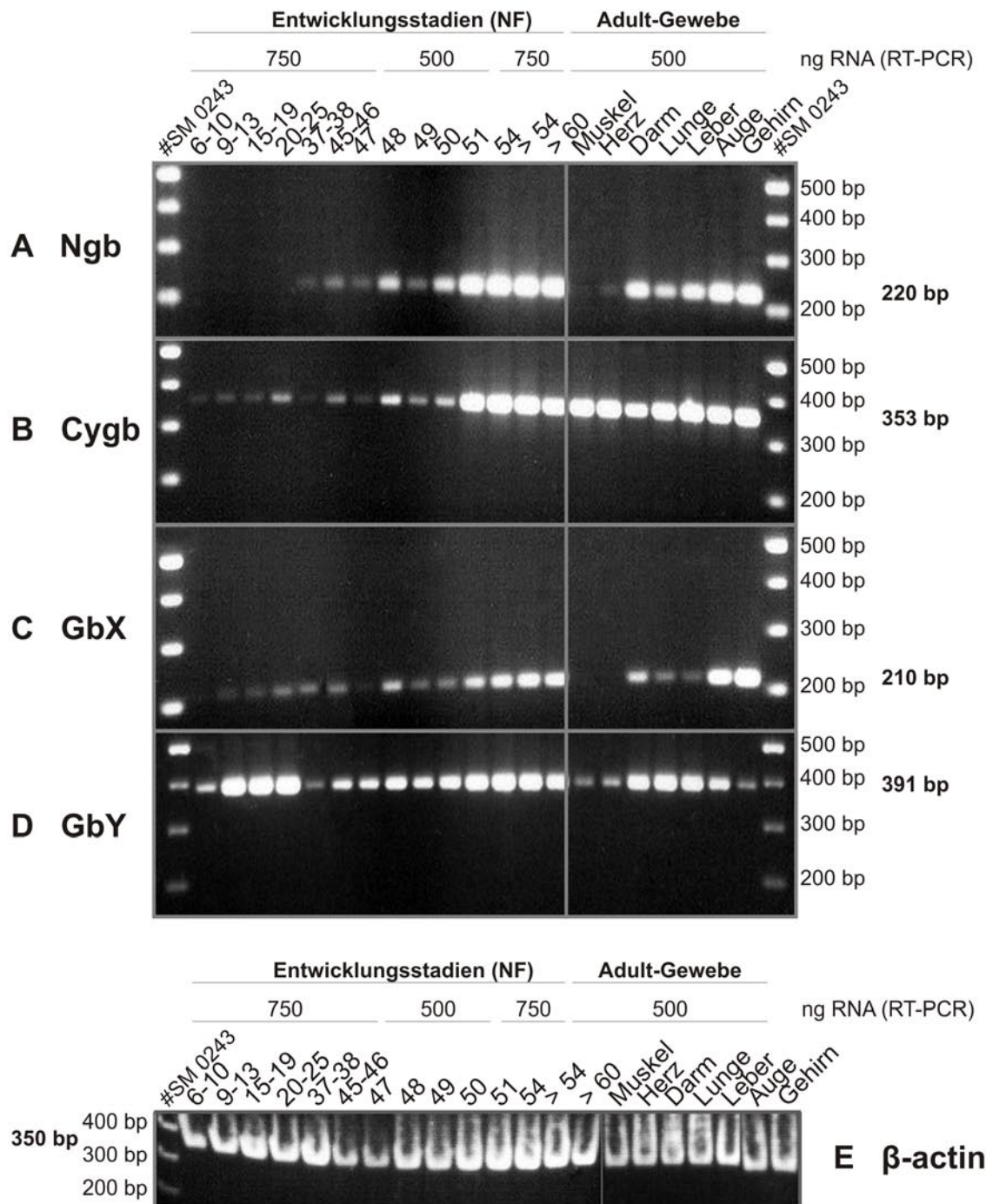


Abbildung 17:

Qualitative RT-PCR Transkriptionsanalyse von Ngb (A), Cygb (B), GbX (C) und GbY (D) in verschiedenen Entwicklungsstadien und adulten Geweben von *Xenopus laevis*.

In die RT-PCR wurden 500 ng bzw. 750 ng Gesamt-RNA eingesetzt, auf ein 1,6%iges horizontales Agarosegel wurden je 13 µl des PCR-Produktes pro Spur aufgetragen. Die Amplifikation von β-actin (E) diente als interne Kontrolle der eingesetzten RNA und einer konstanten Reversen Transkriptions-Reaktion in allen Proben. Die Tiere wurden gemäß der Einteilung von Nieuwkoop und Faber (NF, Anhang 7.15) den entsprechenden Entwicklungsstadien zugeordnet.

Auch die mRNA von GbX wird im afrikanischen Krallenfrosch bereits ab den frühen Entwicklungsstadien transkribiert, die Amplifikate lassen sich in allen Entwicklungsstadien nachweisen. Auch hier kommt es ab Stadium NF 51 zu einem Anstieg in der mRNA-Expression. In den Geweben des adulten *Xenopus laevis* ist ein Maximum der Transkription in Auge und Gehirn zu beobachten, im Herz und dem Skelettmuskel hingegen kann kein Amplifikat detektiert werden. Alle weiteren adulten Gewebe weisen ein Signal mit schwächeren Fluoreszenz-Intensitäten als in Auge und Gehirn auf.

GbY-mRNA kann bereits in frühen Entwicklungsstadien mit einem lokalen Maximum der Transkription in den Stadien 9-25 deutlich nachgewiesen werden. Die mRNA wird während der gesamten Entwicklungsdauer detektiert und findet sich in allen adulten Geweben, wobei in Muskel, Herz und Hirn nur schwache Signale nachgewiesen werden.

Der Nachweis der β -actin-mRNA dient als Positivkontrolle. Anhand des ubiquitär als Komponente des Zytoskelettes in eukaryotischen Zellen exprimierten Gens wird der generelle PCR-Essay bestätigt, schwächere Fluoreszenz-Signale, beispielsweise in den NF-Stadien 45-46 bzw. 47, sind auf die eingeschränkte RNA-Qualität zurückzuführen (Abbildung 16).

3.1.8.2. Quantifizierung der Transkription von *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* in der Entwicklung des afrikanischen Krallenfrosches

Mittels der sehr sensitiven Methode der Real-Time RT-PCR wurde die mRNA-Transkription sowohl in den Entwicklungsstadien als auch den adulten Geweben von *Xenopus laevis* quantifiziert. Dabei wurde die Vergleichbarkeit der Methoden der qualitativen RT-PCR und der Real-Time RT-PCR analysiert.

Frau Junge führte diesen Versuch unter meiner Betreuung durch und präparierte für alle Entwicklungsstadien und adulte Gewebe mit Ausnahme des Auges neue cDNA, wobei sie jeweils 500 ng Gesamt-RNA einsetzte (Abbildung 16 und Anhang 7.10.1). Durch den Einsatz gleicher RNA-Mengen sollten die Resultate der Real-Time RT-PCR innerhalb der Stadien und Gewebe vergleichbar werden, was bei dem Versuch der qualitativen RT-PCR durch den Einsatz verschiedener RNA-Mengen nicht möglich war (vgl. Abbildung 17). Außerdem wurde die Länge der Amplifikate durch die Konstruktion neuer Oligonukleotide auf maximal 175 Nukleotide begrenzt, um eine optimale Nachweiseffizienz auch in partiell degradierten RNAs erreichen zu können (Anhang 7.10.2). Die mögliche Amplifikation kontaminierender genomischer DNA wurde durch die intronüberspannende Lage eines Oligonukleotids pro Gen ausgeschlossen.

Die Normalisierung erfolgte durch den Abgleich der eingesetzten Gesamt-RNA (Bustin, 2000), die Auswertung der Real-Time RT-PCR-Ergebnisse wurde anhand der für jedes Gen erstellten Standard-Eichgeraden durchgeführt. Die Auswertung der Standard-Eichgeraden (Ausgangskopienzahl, Korrelationskoeffizienten und Steigung) sind in Anhang 7.10.3 für die einzelnen Gene wiedergegeben. Die Darstellung der relativen Expression und der Standardabweichung beruht auf der höch-

sten Kopienzahl eines jeden Essays, die als 100% definiert wurde. Entsprechend wurden die durchschnittlichen Kopienanzahlen und Standardabweichungen der Triplikate berechnet, die relativen Werte wurden jeweils über den Säulen des Diagramms in Abbildung X11 wiedergegeben. Die Rohdaten der Real-Time RT-PCR-Ergebnisse wurden in Anhang 7.10.4 aufgeführt.

Für Ngb kann in den frühen Entwicklungsstadien (NF 6-19) mit der Real-Time RT-PCR keine Amplifikation nachgewiesen werden (Abbildung 18A). In Stadium 20-25 wird ein Signal in lediglich einem Ansatz des Triplikates detektiert, dieses ist daher als nicht gesichert anzusehen. Ab NF 37-38 erfolgt eine kontinuierliche Detektion mit einem Maximum der Ngb-Transkription in Stadium 51 mit 43,5%. Je weiter die Metamorphose zum Adulttier hin fortschreitet, umso geringer wird die Transkription von Ngb.

In allen adulten Geweben kann eine Transkription von Ngb nachgewiesen werden, wobei große gewebespezifische Unterschiede auftreten: im Gehirn erfolgt demnach die stärkste Detektion (100%) gefolgt vom Darm mit knapp 16%. Die Transkription von Leber und Lunge beträgt nur etwa 7%, die von Herz und Muskel ist mit weniger als 1% innerhalb der adulten Gewebe am geringsten.

Die Spezifität der eingesetzten Oligonukleotide erwies sich anhand der erstellten Dissoziationskurve als sehr gut, es konnten keine Primerdimere oder unspezifische Produkte mit anderen Absorptionsmaxima nachgewiesen werden. Auch die Negativkontrollen zeigten keinerlei Verunreinigungen. Die Effizienz der PCR betrug 65,5%.

In den frühen Entwicklungsstadien NF 6-25 kann mit der Methode der Real-Time RT-PCR keine Cygb-Transkription nachgewiesen werden (Abbildung 18B). Diese beginnt ab NF 37-38, dauert während der Entwicklung an und zeigt einen deutlichen Anstieg in NF 51. Je weiter die Metamorphose fortschreitet, desto geringer wird die Transkription von Cygb. In den Geweben des adulten afrikanischen Krallenfrosches kann die Transkription von Cygb in allen analysierten Geweben in unterschiedlichen Stärken nachgewiesen werden: die stärkste Transkription wird im Gehirn beobachtet. Daran gemessen beträgt die Transkriptionsrate im Herz etwa 47%, gefolgt von Leber und Lunge mit knapp 38% bzw. 34,4%. Die Transkription in Darm und Skelettmuskel fällt deutlich geringer aus. Die Standardabweichung ist in allen Entwicklungsstadien und Geweben gering, lediglich im Hirn ist sie relativ hoch (20,65%).

Die Dissoziationskurve der eingesetzten Oligonukleotide detektierte in allen Entwicklungsstadien und einigen adulten Geweben ein zusätzliches Maximum, das vermutlich durch schwache Primerdimere oder unspezifische Produkte verursacht wurde. In der Negativkontrolle konnten keine Signale nachgewiesen werden, die PCR-Effizienz lag bei 77,3%.

Der Transkriptionsnachweis der GbX-mRNA in der Entwicklung von *Xenopus laevis* gelingt erstmals sicher ab Stadium NF 37-38, hier können die Signale in allen Proben des Triplikats detektiert werden (Abbildung 18C). Generell erfolgt der Nachweis der GbX-mRNA im Vergleich mit den anderen Genen auf einem sehr geringen Niveau. Bereits in Stadium 20-25 ergibt sich in nur einer Probe des entsprechenden Triplikates eine Signaldetektion, diese wird jedoch als nicht gesichert angesehen. Die Transkription von GbX setzt sich bis NF 50 auf etwa gleich bleibendem Niveau fort, um zu Beginn der Metamorphose in Stadium 51 sprunghaft einen etwa dreimal so hohen Wert und die maximale Transkription in der Entwicklung zu erreichen. In der weiterführenden Umgestaltung zum Adulttier hin nimmt die Transkriptionsaktivität von GbX in *Xenopus laevis* kontinuierlich auf etwa ein Fünftel des Maximalwertes ab.

In den Geweben des adulten afrikanischen Krallenfrosches kann GbX in allen untersuchten Geweben mit massiven gewebespezifischen Transkriptionsunterschieden nachgewiesen werden. Die Kopienzahl ist im Gehirn am höchsten, bezogen darauf zeigen die anderen analysierten Werte minimale Transkriptionsraten von 0,09% bis 2,6%. Im Muskel kann nur in einer von drei Proben ein Signal detektiert werden, in diesem Gewebe ist die Transkription von *GbX* nicht gesichert.

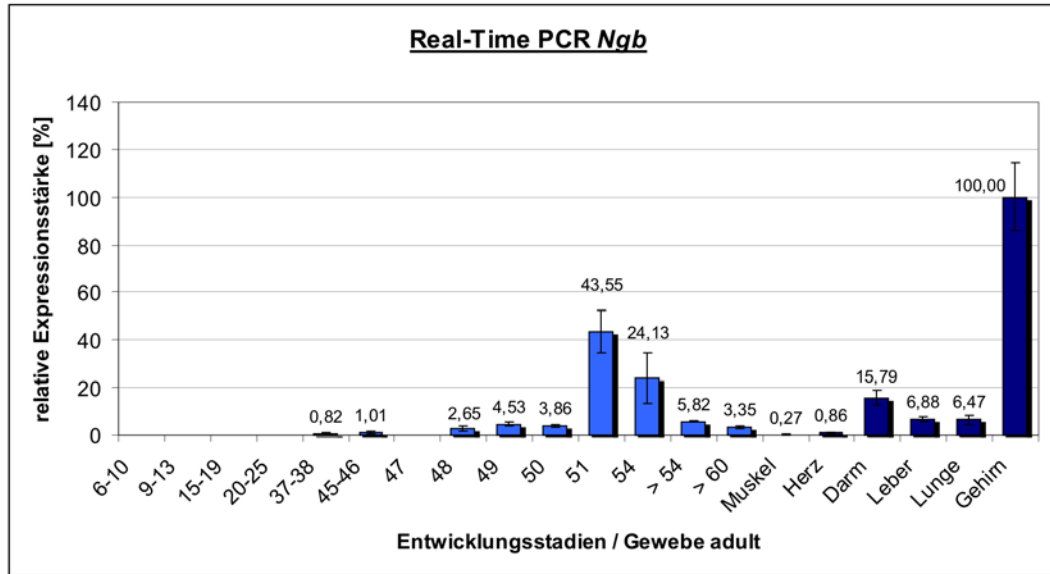
Die Spezifität der Oligonukleotide dieses Versuchsteiles war sehr gut, die Dissoziationskurve zeigte nur ein Maximum. Die Negativkontrolle war frei von jedem Signal, die PCR-Effizienz betrug 83,2%.

Die Transkriptionsaktivität von GbY beginnt bei *Xenopus laevis* bereits sehr früh und maximal in Stadium 15-19, in den Stadien davor kann keinerlei Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 18D). In Stadium 20-25 können immerhin noch 90% der Kopienzahlen detektiert werden, doch schon im Stadium 37-38 reduziert sich dieser Wert auf etwa ein Drittel. Während der Stadien NF 45 bis 50 lassen die Kopienzahlen auf eine sehr geringe Transkriptionsaktivität von *GbY* schließen, diese liegt zwischen 0,2% und knapp 5% bezogen auf den maximalen Wert von Stadium 15-19. Zu Beginn der Metamorphose kommt es zu einem erneuten Anstieg der Transkription, die in Stadium 54 ein erneutes Maximum erreicht (89% des Wertes von Stadium 15-19), um dann jedoch wieder rapide abzunehmen (20% bzw. 5,6% in den Stadien >54 bzw. >60).

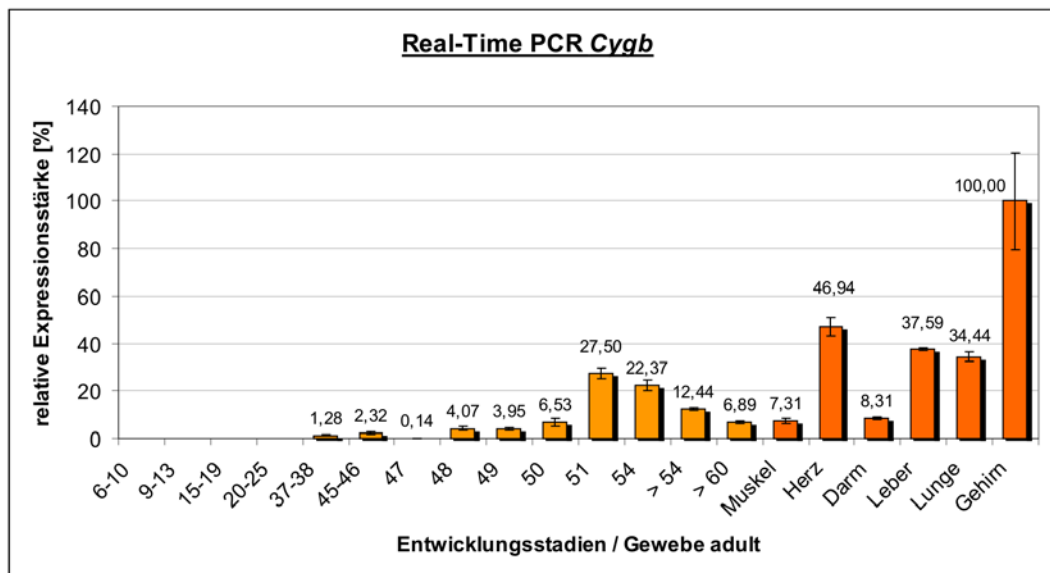
In adulten *Xenopus*-Geweben zeigt sich ein gewebespezifisches Transkriptionsmuster von GbY: das Maximum wird innerhalb der analysierten Gewebe in der Lunge detektiert. Bezogen darauf zeigen auch Darm und Leber eine deutliche Transkription (Abbildung 18), während der Nachweis in Skelettmuskel, Herz und Hirn schwach ausfällt.

Auch in diesem Versuchsteil zeigte die Dissoziationskurve die hohe Spezifität der Oligonukleotide, die Negativkontrolle war frei von Signalen und die Effizienz der Real-Time RT-PCR betrug 79%.

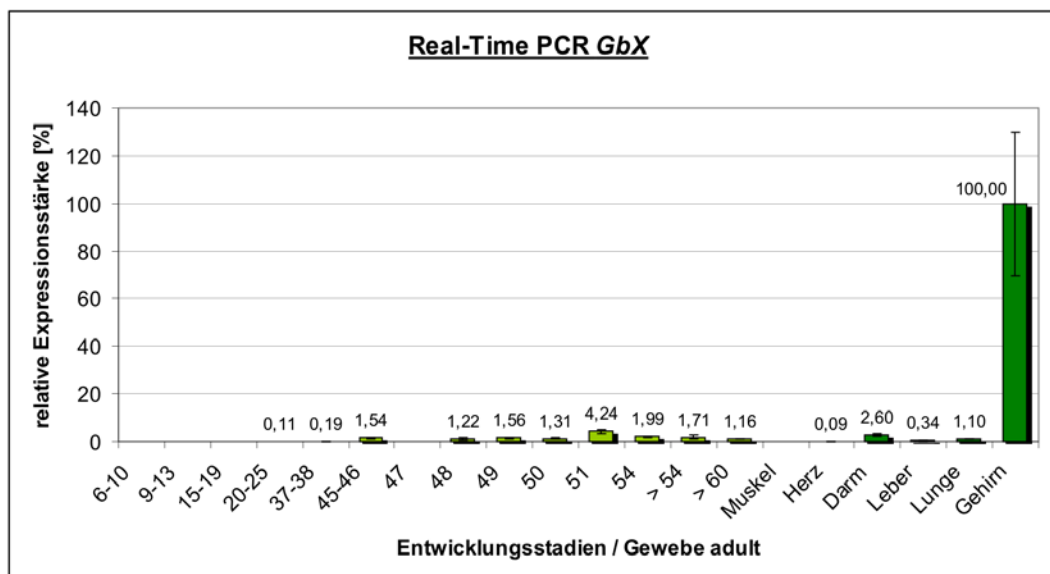
A



B



C



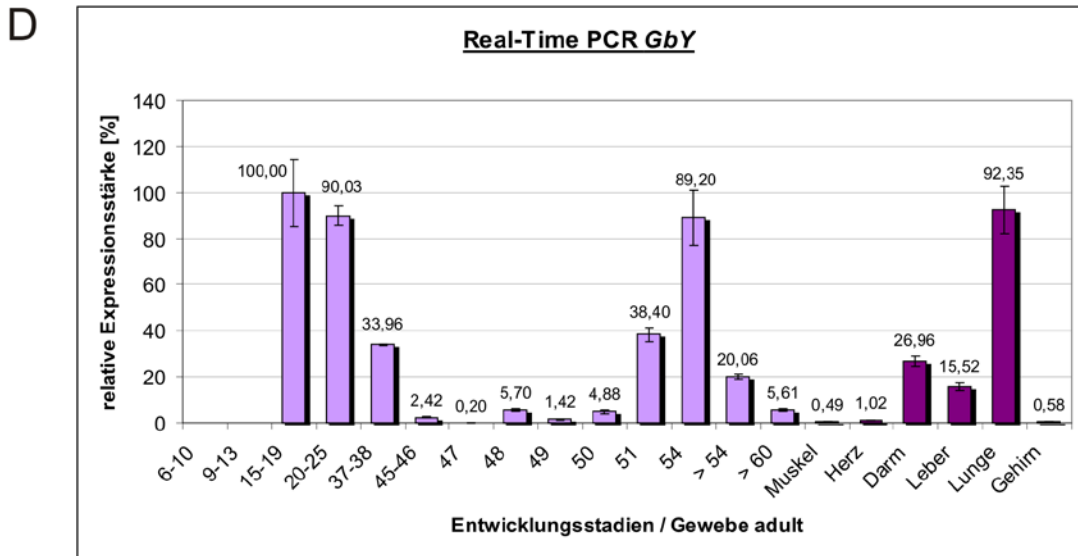


Abbildung 18:

Transkriptionsanalyse ausgewählter Globine in *Xenopus* durch Real-Time RT-PCR.

Die Darstellung zeigt die mittels Real-Time RT-PCR analysierte Transkription von Ngb (A), Cygb (B), GbX (C) und GbY (D) in verschiedenen Entwicklungsstadien und adulten Geweben von *Xenopus laevis*. In den Säulendiagrammen jedes einzelnen Gens wurde die stärkste Expression als 100% definiert, alle anderen Werte prozentual darauf bezogen und jeweils an den Säulen angegeben. Die Rohdaten der Ergebnisse, auf welchen diese Abbildung basiert, sind in Anhang 7.10.4 wiedergegeben.

Auffällig bei einem Vergleich aller vier analysierten Gene war die Probe des Stadiums 47: Ngb und GbX zeigten keine Detektion, bei Cygb und GbY fanden sich 24,8 bzw. 120,9 durchschnittliche Kopien. Bei allen untersuchten Genen wurden sowohl in jüngeren als auch älteren Entwicklungsstadien stärkere Signale detektiert, so dass die extrem schwache bzw. nicht erfolgte Amplifikation des Stadiums 47 wahrscheinlich auf eine unterdurchschnittliche Qualität der RNA zurückzuführen ist.

Die schematischen Darstellungen der untersuchten Globingen-Transkriptionsraten verdeutlichen, dass jedes der Gene im Laufe der Entwicklung wie auch in den adulten Geweben von *Xenopus laevis* ein spezifisches Muster der Transkriptionsaktivität zeigt. Augenfällig ist in diesem Vergleich die geringe Transkription von GbX sowohl in der Entwicklung als auch in den adulten Geweben mit Ausnahme des Gehirnes: von allen untersuchten Globinen scheint die Transkription von GlobinX mengenmäßig am geringsten zu sein, gleichwohl ist der Nachweis als spezifisch anzusehen.

Ein direkter Vergleich der höchsten absoluten Kopienzahl eines jeden Essays, bezogen auf die Effizienz des jeweiligen Real-Time PCR-Versuchs, bestätigt dies: die Transkriptionsrate von GbX ist mit Abstand am geringsten, gefolgt von Cygb mit einem fast sechs Mal so hohen Wert (Abbildung 19). Ngb wird gut 12 Mal stärker transkribiert als GbX, GbY sogar gut 20 Mal stärker als GbX. Bei diesem Vergleich ist zu beachten, dass die Werte für Ngb, Cygb und GbX aus dem adulten Gehirn stammen, während die höchste Kopienzahl von GbY in dem Entwicklungsstadium 15-18 gefunden wird.

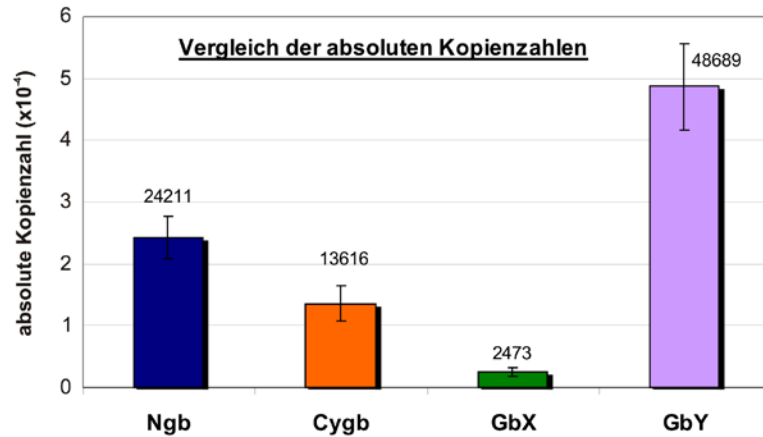


Abbildung 19:

Vergleich der maximalen absoluten Kopienzahlen der Real-Time PCR-Ergebnisse von Ngb, Cygb, GbX und GbY in *Xenopus laevis*.

Beachtet werden muss die unterschiedliche Lokalisation der Expressionen: Ngb, Cygb und GbX werden maximal im adulten Gehirn transkribiert, während der Wert für GbY aus Gesamt-Embryonen des Entwicklungsstadiums NF 15-18 stammt (vgl. 7.11).

3.1.9. mRNA-Transkriptionsnachweis durch Whole Mount *in situ*-Hybridisierungen

Aus den Analysen der qualitativen RT-PCR und quantitativen Real-Time PCR resultierten die zeitlichen mRNA-Transkriptionsmuster während der Entwicklung, doch die räumliche Lokalisation der mRNA-Expression in Körpersegmenten, Organen und Geweben blieb unbekannt. Durch *in situ*-Hybridisierungen an ganzen *Xenopus laevis*-Embryonen konnte die mRNA-Transkription von Ngb, Cygb, GbX und GbY lokalisiert werden.

Dieser Versuch der „Whole Mount *in situ*-Hybridisierung“ (WMHIS) wurde von Frau Junge im Rahmen Ihrer von mir praktisch betreuten Diplomarbeit durchgeführt. Sie analysierte mit dieser Methode die Lokalisation der mRNA-Transkription der Globin-Gene und verwendete zusätzlich spezifische Kontroll-Marker, um die Organ-Strukturen innerhalb der Embryonen eindeutig zuzuordnen zu können. Von besonderem Interesse waren dabei die aus den Vorversuchen bekannten Orte der stärksten Transkriptionsaktivität wie Herz, Neurone und Muskel.

Als spezifischer Marker für die Skelettmuskulatur wurde eine antisense-Mlc-1-Sonde eingesetzt. Diese detektiert die „myosin light chain“ (Mlc-1, Accession Nummer BC099306), die in larvalen Stadien von *Xenopus* besonders in den Somiten nachgewiesen werden kann. Ein spezifischer Nachweis für das sich entwickelnde Nervensystem wurde mit der antisense-Nrp-1-Sonde erbracht: diese detektiert die mRNA des neuralen Ribonukleoproteins 1 (Nrp-1, M34894), das erstmals in Stadium NF13 in der Neuralen Platte nachgewiesen werden kann. Ab Stadium 26 findet sich die mRNA in dem gesamten Zentralen Nervensystem, ab NF 38 kann sie nur noch in den Augen, dem Gehirn, der Epiphyse und der Nasengrube detektiert werden. Eine antisense-Ct-1-Sonde diente als Marker des sich entwickelnden Herzens durch den Nachweis des „Cardiac Troponins 1“ (L25721)

ab NF28 (vgl. http://xtropicalis.cpsc.ucalgary.ca/index/expression_gene_name.html). Abgesichert wurde der Versuch durch den Einsatz der sense-Sonde von Mlc-1, einer nicht markierten Wasser-Kontrolle, sowie einer bereits vom Hersteller des „*in vitro*-Transkriptions-Kits“ markierten bakteriellen antisense Neo-RNA abgesichert. Die zur Generierung der Sonden eingesetzten Oligonukleotide sowie die Länge der resultierenden Sonden sind in Anhang 0 und 7.11.1 wiedergegeben.

Die Konzentration der markierten Sonden wurde photometrisch bestimmt, die Markierungseffizienz mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse untersucht und die einzusetzende Sonden-Menge zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse angeglichen (vgl. Anhang 7.11.2 und 7.11.3). Die Methode der Whole Mount *in situ*-Hybridisierung wurde modifiziert nach Harland (Harland, 1991) an Embryonen der Entwicklungsstadien NF 20-38 durchgeführt. Aufgrund der sehr schwachen mRNA-Transkription-nachweise der zu untersuchenden Gene in RT-PCR bzw. Real-Time PCR wären Detektionen in früheren Entwicklungsstadien zu unsicher, während der Nachweis in älteren Embryonen durch die zunehmenden Zellschichten limitiert wird.

Die Lokalisation der mRNA-Transkription der analysierten Gene sind in Tabelle 1 zusammengefasst. In der WMISH konnten spezifische Signale der *Ngb*-mRNA-Transkription in vier Embryonen der Entwicklungsstadien NF 24-26 in Kopf bzw. Gehirn detektiert werden (Abbildung 20A1), die entsprechenden Negativkontrollen wiesen keine Signale auf (Abbildung 20A2). In den Stadien NF 34-37 konnten in zwei von fünf analysierten Embryonen schwache Signale im Kopfbereich und der Ohrplakode detektiert werden, diese Resultate wurden jedoch aufgrund der Inkonsistenz des Nachweises als nicht gesichert angesehen (Abbildung 20B1). Die Negativkontrollen waren signalfrei (Abbildung 20B 2), die Mlc-1-Positivkontrolle zeigte die erwartete Färbung der Somiten (Abbildung 20 D).

Die aus anderen Mammaliern bekannte neuronale Lokalisation der *Ngb*-mRNA (Burmester et al., 2000; Hankeln et al., 2005) konnte durch den Einsatz des neuronalen Ribonukleoproteins-1 (*Nrp-1*) als neuronalem Marker bestätigt werden: Signale wurden im gesamten zentralen Nervensystem (NF 24-26) bzw. im Gehirn (NF 34-37) detektiert (Abbildung 20C1/2). Diese Orte des Nachweises entsprechen den Literaturangaben einer frühen ubiquitären Expression von *Nrp-1* im zentralen Nervensystem sowie einer späteren mRNA-Transkription unter anderem in Gehirn und Auge (<http://xtropicalis.cpsc.ucalgary.ca/>). Die in NF 25-26 detektierten Signale von *Ngb* entsprechen in ihrer Lokalisation im Bereich von Kopf und Gehirn jenen von *Nrp-1*, sind jedoch schwächer ausgeprägt (vgl. Abbildung 20A1 & C1).

	Ngb	Cygb	GbX	GbY
NF 24-26	Kopf/Gehirn (n=4)	Kopf/Gehirn (n=6)	Kopf/Gehirn, opt. Vesikel (n=3), (*1)	Kopf/Gehirn (n=1) (*1)
NF 34-37	Kopf/Gehirn, Ohrplakode (n=2)	Kopf/Gehirn, Herz (n=5)	Hirn, Ohrplakode (n=2)	Herz, Ohrplakode (n=2), (*2)

Tabelle 1:**Überblick über die nachgewiesenen Signale der WMHIS in *Xenopus laevis*-Embryonen.**

Die Ergebnisse der in der WMHIS erbrachten Signale sind (unter Angabe der jeweiligen Anzahl untersuchter Embryonen in Klammer) angegeben. (*1) zeigte leichte Farbsignale in der Negativkontrolle; bei (*2) waren diese auf Herz und Ohrplakode beschränkt.

Transkriptionssignale der *Cygb*-mRNA konnten in den Entwicklungsstadien 24-26 in mehreren Embryonen deutlich im Gehirn bzw. Kopfbereich detektiert werden (Abbildung 20E1), die entsprechenden Negativkontrollen waren frei von Signalen (Abbildung 20E2) und die Mlc-1-Positivkontrolle zeigte deutliche Farbsignale in den Somiten (Abbildung 20H). In Stadium NF 34-37 konnten zwar weiterhin schwache Signale im Kopfbereich nachgewiesen werden, diese waren jedoch in ihrer Intensität nicht deutlich unterschiedlich zu den Negativkontrollen. Ein Nachweis im Kopfbereich gilt daher in den älteren Entwicklungsstadien als nicht gesichert (Abbildung 20F1/2). Weiterhin war in mehreren Versuchstieren ein starke Färbung im Brustbereich der Tiere zu beobachten, die entsprechenden Negativkontrollen wiesen in diesem Bereich eine deutlich schwächere Färbung auf, so dass diese Farbsignale als spezifischer Nachweis für *Cygb* angesehen wurden. Aufgrund der EST-Daten wurde vermutet, dass dieses Farbsignal die *Cygb*-mRNA in dem sich entwickelnden Herz der Embryonen nachweist. Um die Farbsignale dem sich entwickelnden Herzen zuordnen zu können, wurde ein Farbnachweis mit dem herzspezifischen Marker Ct-1 (cardiac troponin-1) durchgeführt. Damit wurde ein sehr deutliches Signal in den Embryonen erzeugt, das in seiner Lage dem in der Literatur beschriebenen, auf das Myokard beschränkten Nachweises entsprach (<http://xtropicalis.cpsc.ucalgary.ca/>). Der *Cygb*-Nachweis konnte damit in den Stadien NF 34-37 eindeutig dem Herzen zugeordnet werden. Schwache *Cygb*-Signale wurden in dieser Nachweisreaktion zudem auch im Kopfbereich beobachtet: diese entsprechen in ihrer Intensität jedoch der Negativkontrolle und wurden daher als unspezifische Farbeinlagerungen eingeordnet.

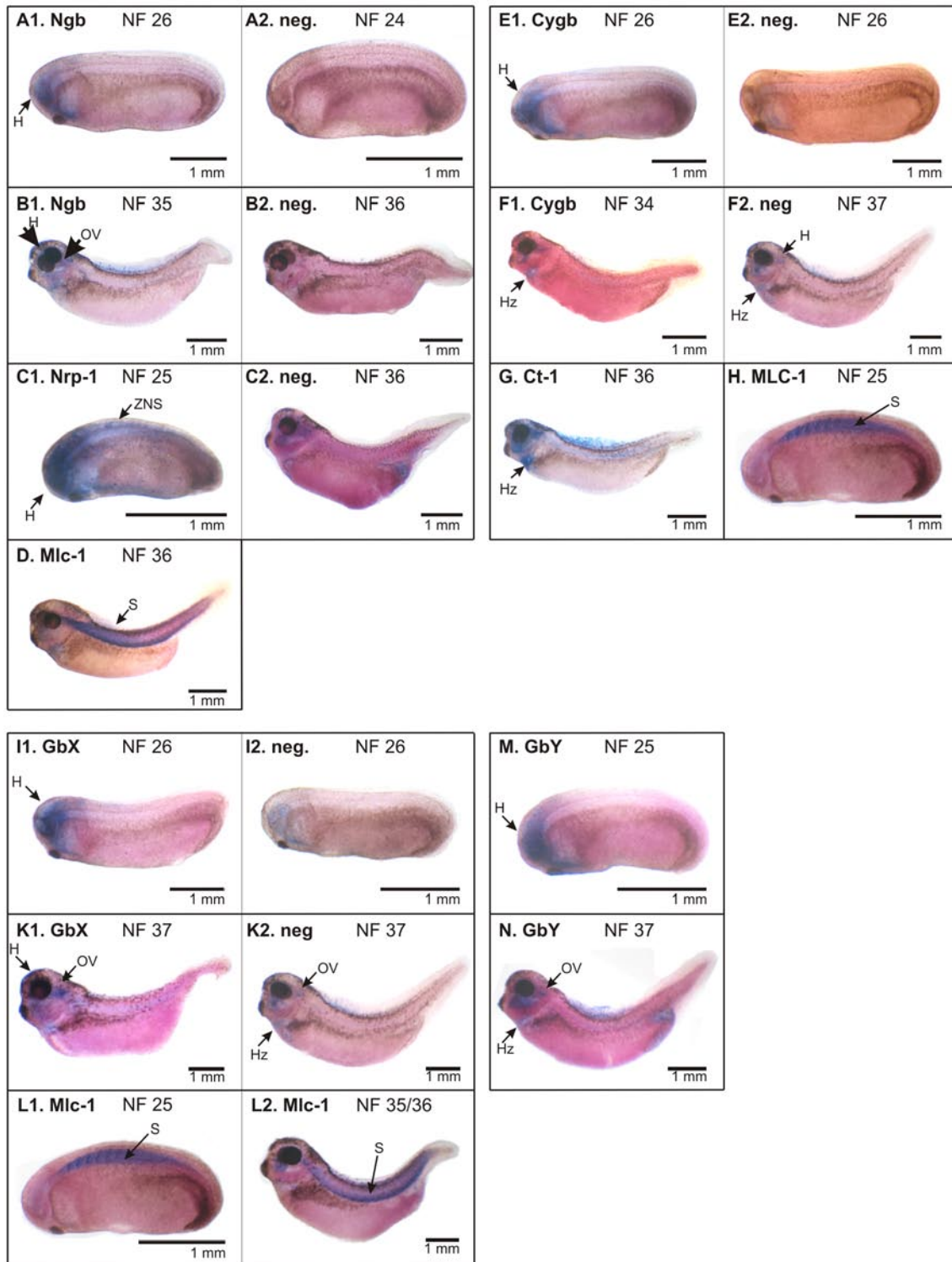


Abbildung 20

Hellfeldaufnahmen der WMHIS-Ergebnisse in *Xenopus laevis*-Embryonen von *Ngb* (A, B), *Nrp-1* (C) und *Mlc-1* (D) als Positivkontrolle, *Cygb* (E, F), *Ct-1* (G) und der zugehörigen Kontrolle (H), *GbX* (I, K) mit Positivkontrolle (L) sowie *GbY* (M, N).

Dargestellt ist jeweils die laterale Ansicht der anterior - posterior ausgerichteten Embryonen in unterschiedlichen, nach der Zeittafel von Nieuwkoop und Faber bestimmten Entwicklungsstadien (NF, Anhang 7.15); die Signale erscheinen als blau-violetter Farbniederschlag. Die Abkürzungen bezeichnen die Regionen: (H) Hirn, (Hz) Herz, (OV) optischer Vesikel, (S) Somiten, (ZNS) Zentrales Nervensystem.

Die mRNA-Transkription von GbX wurde in den Stadien NF 24-26 als Farbsignal im Kopf nachgewiesen, wobei dieses auf den Bereich der optischen Vesikel beschränkt war (Abbildung 20I1). Die Negativkontrollen, die gleichzeitig für GbX und GbY durchgeführt wurden, waren bis auf einen minimalen Farbnachweis in der Wasserkontrolle, der die optischen Vesikel leicht anfärbte, frei von Signalen (Abbildung 20I2). Da das Signal der Wasserkontrolle jedoch deutlich schwächer war als das der eigentlichen Probe, wurde die mRNA-Transkription im optischen Vesikel als spezifisch angesehen. Die Entwicklungsstadien NF 34-37 zeigten deutliche Signale im hinteren Kopfbereich und der Ohrplakode, während in den Negativkontrollen in diesem Bereich kein Farbsignal detektiert werden konnte. Allerdings waren in der Negativkontrolle leichte Signale im Herz zu beobachten, die die Signale gleicher Lokalisierung und Stärke in der *GbX*-Probe als unspezifisch erscheinen ließen (Abbildung 20K1/2). Die Mlc-1-Positivkontrolle detektierte in allen Stadien wie erwartet die Somiten (Abbildung 20L1/2).

GbY-mRNA konnte in den Tieren des Entwicklungsstadiums NF 24-26 durch intensive Farbsignale im Bereich des Kopfes bzw. Gehirnes nachgewiesen werden (Abbildung 20M). Da der Versuch aufgrund des limitierten Tiermaterials nur einmal durchgeführt werden konnte, ist das Ergebnis trotz der bis auf ein minimales Signal im optischen Vesikel freien Negativkontrolle nicht abgesichert (Abbildung 20I2). In den älteren Entwicklungsstadien (NF 34-37) waren leichte Signale im Bereich der Ohrplakode und des Herzens zu beobachten, die sich allerdings in dieser Farbintensität auch in einer der Negativkontrollen zeigten und daher nicht als Ergebnis gewertet wurden (Abbildung 20N bzw. K2). In allen untersuchten Entwicklungsstadien detektierte die Mlc-1-Positivkontrolle die Somiten (Abbildung 20L1/2).

3.1.10. Rekombinante Protein-Expression von *Xenopus tropicalis* Ngb, Cygb, GbX und GbY

Mit der rekombinanten Expression der Proteine Ngb und GbX von *Xenopus tropicalis* wurde die induzierte Expression der in einen pET-Vektor ligierten DNA mit einer anschließenden selektiven Aufreinigung von mir etabliert, Frau Junge exprimierte darauf basierend im Rahmen Ihrer Diplomarbeit Cygb und GbY.

Die Amplifikation der Gene erfolgte jeweils in einer PCR unter Standard-Bedingungen (Tabelle 2A). Das Amplifikat wurde in einer weiteren PCR mittels spezieller Primer mit einer NdeI- bzw. BamHI-Restriktionsschnittstelle versehen und so eine gerichtete Klonierung in den Expressionsvektor ermöglicht (vgl. Tabelle 2A und Anhang 7.13). Zum Überprüfen der PCR-Amplifikate wurden diese zunächst ungerichtet in den pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) kloniert, sequenziert und analysiert.

Für Ngb des tropischen Krallenfrosches zeigt ein Alignment der Sequenzierungsergebnisse mit dem in der NCBI-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ634914 annotierten Ngb-Gen von *Xenopus tropicalis* eine 100%ige Übereinstimmung der Nukleotide beider Sequenzen.

Cygb wurde aufgrund einer verbesserten Löslichkeit in einer verkürzten Form generiert (Hamdane et al., 2003). Dieses im Folgenden als „Cygb Δ NC“ bezeichnete Protein ist N-terminal um 16 AS und C-terminal um 13 AS verkürzt (Anhang 7.12). Die direkte Sequenzierung des cDNA-Amplifikates von Cygb Δ NC zeigte einen einzelnen Austausch an der helikalen Position A13, der in dem Austausch von Alanin zu der physikochemisch nicht ähnlichen Aminosäure Glutaminsäure resultiert. Dieser Polymorphismus wurde bereits in der direkten Sequenzierung des PCR-Amplifikates als vermutliche Heterozygotie festgestellt, wodurch die Möglichkeit einer physiologischen Relevanz dieser Variante gegeben ist. Daher wurde das Protein basierend auf dieser Sequenz rekombinant exprimiert.

GbX existiert, wie unter 3.1.6. beschrieben, in verschiedenen Varianten. Bei der Auswahl der zur Expression eingesetzten Konstrukts wurde darauf geachtet, dass die als „Version A“ bezeichneten Variante ausgewählt wurde: diese resultiert in einem vollständigen Protein von 200 Aminosäuren und besitzt die für die Ligandenbindung verantwortlichen Aminosäuren. Die Sequenzierung belegte, dass das proximale Histidin an der helikalen Position F8 erhalten war (Anhang 7.12).

In einer direkten Sequenzierung des PCR-Amplifikates von GbY aus *Xenopus tropicalis* wurde ein einzelner Polymorphismus der Sequenz an Position B15 beobachtet (A→T), der sich auf Aminosäureebene in dem Austausch eines Leucins durch ein histochemisch ähnliches Methionin äußerte. Da die physiologische Relevanz dieser auf PCR-Ebene nachgewiesenen Heterozygotie nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde das Amplifikat zur Expression des rekombinanten Proteins eingesetzt.

Die Expressionsbedingungen wurden in Testreihen optimiert, die ermittelten idealen Konzentrationen von IPTG und δ -Aminolävulinsäure sowie die optimalen Expressionszeiten und -temperaturen sind in Tabelle 2B wiedergegeben. Der Löslichkeitstest zeigte zwar jeweils die größere Menge der rekombinanten Proteine im Präzipitat; der geringere lösliche Anteil konnte jedoch unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden.

Die rekombinante Expression der Proteine von *Xenopus tropicalis* erfolgte unter den optimierten Bedingungen in den angegebenen Volumina LB-Medium, die Zellen wurden pelletiert und unter nativen Bedingungen lysiert (Tabelle 2C). Die chimären Proteine wurde über das His-Tag an Ni-NTA-Agarose gebunden und selektiv aufgereinigt, die Kontrolle des Versuches erfolgte durch die Auftrennung der während des Versuches entnommenen Proben über eine SDS-PAGE. Dabei konnte das bis dahin theoretisch bestimmte Molekulargewicht der Proteine anhand der eingesetzten

Standardmarker bestätigt werden (Abbildung 21A-C & Anhang 7.6). Die das jeweilige, rekombinant exprimierte Protein enthaltenden Eluate wurden vereint, aufkonzentriert, die Konzentration mit der Bradford-Methode bestimmt und die Gesamtmenge rekombinanten Proteins berechnet (Tabelle 2D).

		Xtr Ngb	Xtr GbX	Xtr Cygb ΔNC	Xtr GbY
A	Amplifikation				
	cDNA	Gehirn	Herzmuskel	Auge	Ovar
	Oligonukleotid-Paar 1	Xtr Ngb 0F/ Xtr Ngb 0R	Xtr Glob F4/ Xtr Glob R2	Xtr CygbAF Nde/ Xtr CygbAR Bam	Xtr GbY F/ Xtr GbY R
	Größe des Amplifikates	495 bp	603 bp	559 bp	471 bp
	Oligonukleotid-Paar 2	Xtr Ngb Nde F/ Xtr Ngb Bam R	Xtr Glob F4 Nde/ Xtr Glob R2 Bam	Xtr Cygb Mini F/ Xtr Cygb Mini R	Xtr CygbB F Nde/ Xtr CygbB R Bam
	Größe des Amplifikates	514 bp	622 bp	456 bp	490 bp
B	Optimierte Expressionsbedingungen				
	IPTG-Konzentration	1 mM	1 mM	1 mM	0,75 mM
	δ-ALS-Konzentration	1 mM	1mM	1 mM	1 mM
	Expressionsdauer/	4h/	4h/	4h/	20h/
	Expressionstemp./	24°C/	24°C/	24°C/	24°C/
	Größe des Expressionsansatzes	2 Liter	4 Liter	2,6 Liter	1,96 Liter
C	Aufreinigung des rekombinanten Proteins				
	Methode der Aufreinigung	nativ	nativ	nativ	nativ
	theoretisches Molekulargewicht des chimären Proteins	20,5 kDa	24,9 kDa	19,1 kDa	19,7 kDa
D	Resultate der Proteinaufreinigung				
	Konzentration [mg/ml]	7,9	4,57	5,13	4,03
	Finale Proteinmenge	14,2 mg	8,2 mg	11,3 mg	12,1 mg
	Farbe des rekombinanten Proteins	Intensives Hellrot	Orange	Schwach orange-gelb	Orange-rot

Tabelle 2:

Übersicht über die Amplifikationsbedingungen (A), optimierten Expressionsbedingungen (B) und Aufreinigung (C) sowie der Expressionsergebnisse (D) der rekombinanten Proteine Ngb, Cygb-ΔNC, GbX und GbY von *Xenopus tropicalis*.

Ein Aliquot des rekombinanten Ngb, Cygb ΔNC und GbY wurde per SDS-Page aufgetrennt und die Reinheit mit der sensitiven Silberfärbung untersucht, wodurch Banden mit einem Proteingehalt von bis zu 1 ng detektieren werden konnten (vgl. beispielhaft Abbildung 21 A3 und C2). Dabei wurde deutlich, dass die rekombinant exprimierten Proteine in einer guten Reinheit vorlagen, Bakterien-Proteinen waren nicht übermäßig stark vertreten. Das His-Tag der rekombinant exprimierten Proteine wurde jeweils in einem Western-Blot mit einem gegen das anti-His-Antikörper nachgewiesen (vgl. beispielhaft Abbildung 21C3 & C4).

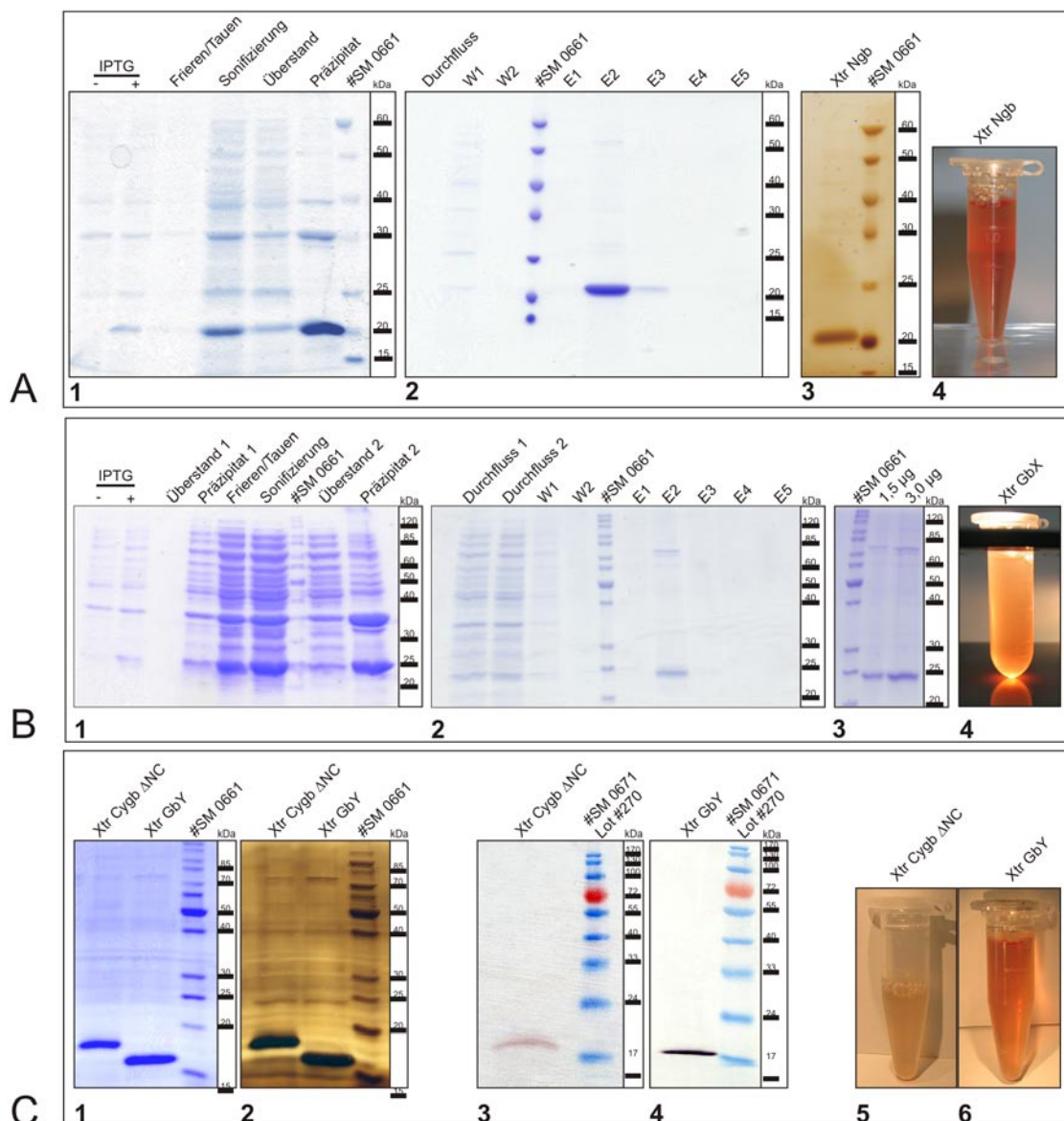


Abbildung 21

Rekombinante Protein-Expression von Ngb (A), GbX (B), Cygb ΔNC und GbY (C).

Ansichten von mit Coomassie bzw. Silber gefärbten SDS-PAGEs sowie beispielhafter Western-Blot-Analysen. A1 und B1 zeigen die Auftrennung der während der Lyse genommenen Proben, A2 und B2 geben beispielhaft den Verlauf der selektiven Proteinaufreinigung wieder (W=Waschschritt, E=Elution). B3 und C1 zeigen die aufkonzentrierten Endprodukte der rekombinanten Expressionen als Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE, A3 und C2 zeigen eine entsprechende Silberfärbung. C3&4 repräsentieren beispielhafte Western-Blot-Analysen mit einem Anti-His-Antikörper. Die Abbildungen A4, B4 sowie C5 & 6 zeigen die Färbungen der rekombinant exprimierten Proteine.

3.1.11. Spektralanalyse der rekombinant exprimierten Proteine von *Xenopus tropicalis*

Die rekombinanten Proteine liegen nach der Lyse der Expressionszellen und der selektiven Aufreinigung über NiNTA-Agarose in oxygenierter Form, also mit gebundenem Sauerstoff vor (Van Doorslaer et al., 2003). Dieser kann den Proteinen mittels stark reduzierend wirkendem Na-Dithionit entzogen werden, wobei die Wertigkeit des Eisen-Ions als FeII im Phorphyrinring der Globine erhalten bleibt.

Die Spektren aller rekombinant exprimierten Proteine des tropischen Krallenfrosches wurden in ihrer oxygenierten bzw. deoxygenierten Form von 400-700 nm aufgenommen (Abbildung 22). Die Proteine wiesen die für Globine charakteristischen Absorptionsmaxima auf (Tabelle 3): das Absorptionsmaximum der Soret-Bande lag in oxygeniertem Zustand bei 414 nm und verschob sich bei allen Proben mit der Deoxygenierung in den längerwelligen Bereich (424 nm bzw. 427 nm). Die Amplitude der deoxygenierten Probe war dabei jeweils höher als die der oxygenierten. Im Bereich um 530 nm, der als β -Bande bezeichnet wird, kam es bei der Deoxygenierung zu einer minimalen Verschiebung (528 nm, 531 nm, 533 nm); die Maxima der α -Bande lagen bei etwa 560 nm und wurden durch die Deoxygenierung ebenfalls nur minimal verschoben.

Die charakteristischen Werte der Absorptionsmaxima ließen bei Ngb, Cygb Δ NC, GbX und GbY von *Xenopus tropicalis* auf eine Hexakoordination des Eisen-Ions schließen.

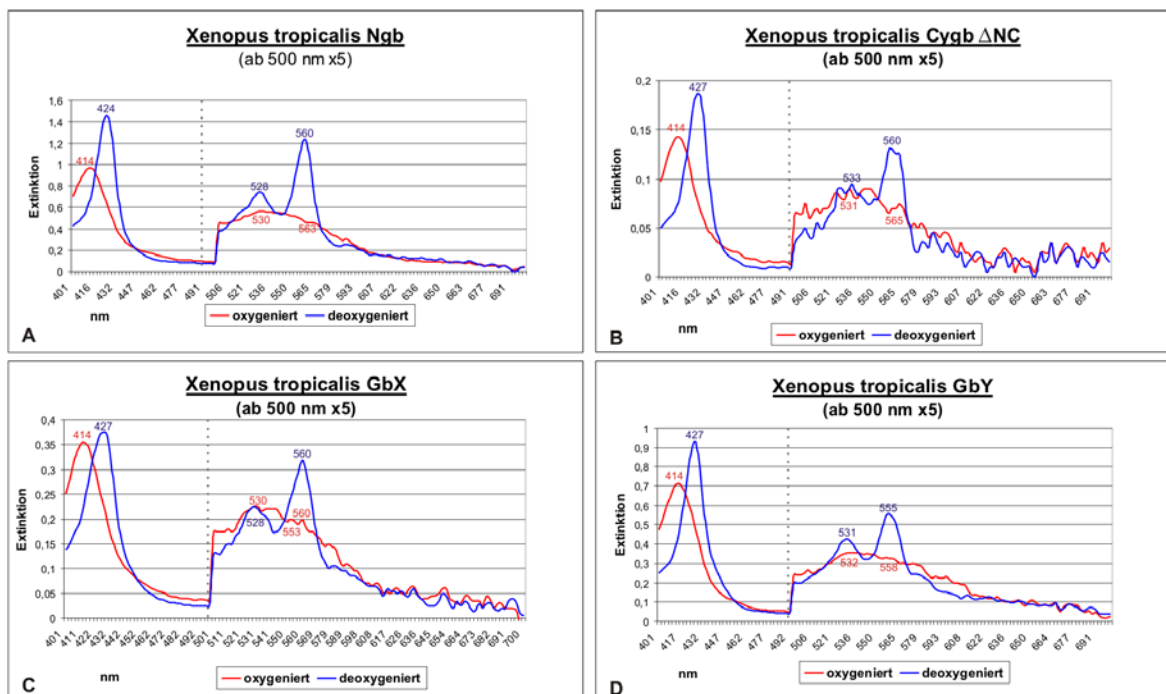


Abbildung 22:

UV/Vis-Spektren der rekombinant exprimierten Proteine Ngb (A), Cygb- Δ NC(B), GbX (C) und GbY (D) in (rot) oxygeniertem und (blau) deoxygeniertem Zustand.

Die Absorptionsmaxima sind angegeben, die Werte wurden für eine bessere Darstellung ab 500 nm fünfmal überhöht dargestellt. Die Spektren von Cygb- Δ NC und GbY wurden von F. Junge erstellt.

	Ngb		Cymb Δ NC		GbX		GbY	
	Ox. [nm]	Deox. [nm]	Ox. [nm]	Deox. [nm]	Ox. [nm]	Deox. [nm]	Ox. [nm]	Deox. [nm]
Soret-Bande	414	424	414	427	414	427	414	427
β-Bande	530	528	531	533	530/553	528	532	531
α-Bande	563	560	565	560	560	560	555	558

Tabelle 3:

Absorptionsmaxima von Ngb, Cymb- Δ NC, GbX und GbY.

Die rekombinant exprimierten Proteine von *Xenopus tropicalis* wurden mit Na-Dithionit deoxygeniert und die Absorptionsmaxima der oxygenierten (ox.) bzw. deoxygenierten (deox.) Proteine angegeben

3.2. Analyse von Cygb und Ngb in Teleostiern

In einem ersten Teilabschnitt wurde das in Teleostiern dupliziert vorliegenden Cytoglobin *in silico* in mehreren Spezies detektiert. Die Duplikate wurden in Ihrer genomischen Organisation analysiert, phylogenetisch eingeordnet und die molekulare Evolution untersucht. Die Analysen bestätigten die Annahme, dass es sich bei Cygb-1 und -2 um duplizierte Varianten eines in einem gemeinsamen Teleostier-Vorläufer singular vertretenen Cygb-Gens handelte.

Neben diesen *in silico*-Analysen wurden die Gen-Varianten experimentell in *Tetraodon nigroviridis*, *Danio rerio* und *Oryzias latipes* amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die zelluläre Lokalisation der mRNA-Transkription von Cygb-1, Cygb-2 und Ngb wurde in *Danio rerio* mittels *in situ*-Hybridisierungsversuchen vergleichend analysiert. Die Versuchsergebnisse erwiesen sich dabei für Ngb als eindeutig, während hingegen die entsprechenden Cygb-Ergebnisse vorläufig waren; ihre Problematik wird erläutert. Ergänzend wurde das Protein von *Danio rerio* Cygb-1 rekombinant exprimiert und seine Konformation mittels einer UV-Spektralanalyse untersucht. Die rekombinante Expression von Cygb-2 war aufgrund unerwarteter Probleme nicht erfolgreich.

3.2.1. Duplizierte Cygb-Gene in Teleostiern

Basierend auf *in silico*-Analysen konnte die Existenz von zwei unterschiedlichen Varianten des Cygb-Gens in Teleostiern nachgewiesen werden. Die als Cygb-1 bzw. Cygb-2 benannten Genvarianten wurden in dem Grünen Kugelfisch *Tetraodon nigroviridis*, dem Japanischen Pufferfisch *Takifugu rubripes*, dem Reiskärppling *Oryzias latipes*, dem Zebraäbrbling *Danio rerio* und dem Dreistacheligen Stichling *Gasterosteus aculeatus* nachgewiesen. Cygb-1 konnte zudem in der Fettköpfigen Elritze *Pimephales promelas*, dem Karpfen *Cyprinus carpio* und dem „red tail sheller“ *Ptyochromis sp.*, Cygb-2 in dem Lachs *Salmo salar* durch Blast-Suchen detektiert werden.

3.2.2. Analyse der Gen-Organisation von *Cygb-1* und *-2* in Kugelfischen

Durch Blast-Suchen wurden zwei Cygb-Varianten (Cygb-1 und -2) in dem Genom von *Tetraodon nigroviridis* detektiert. Die genomischen Daten wurden mit Hilfe des NCBI-Programmes „Spidey“ mit den als EST-Einträgen verfügbaren Sequenzdaten verglichen und die Lage von Exons und Introns bestimmt. Die Sequenz von Cygb-1 ist im Genom von *Tetraodon* bis dato (Version 4.1., Stand Juni 2007) korrekt auf einem bisher nicht näher bezeichneten Chromosom verzeichnet und besteht aus 3 Exons und zwei Introns (Abbildung 23).

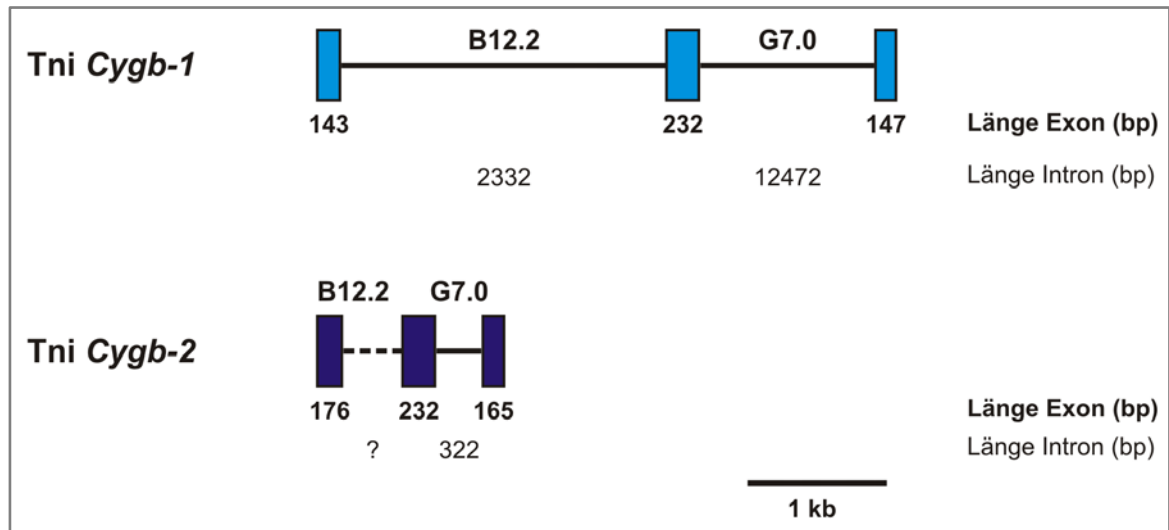


Abbildung 23:

Die genomische Organisation des dupliziert in Teleostiern vorliegenden *Cygb*-Gens am Beispiel von *Tetraodon nigroviridis*.

Die Abbildung veranschaulicht die Länge der als Rechtecke symbolisierten Exons und der als durchgehende Linie symbolisierten Introns von *Cygb-1* bzw. *Cygb-2*. Die unbekannte Länge des Introns 1 von *Cygb-2* wird durch ein Fragezeichen an der gestrichelten Linie repräsentiert.

Die Annotation von *Cygb-2* wies in der Datenbank einige Probleme auf: bei einer Blast-Suche mit der kompletten CDS wurden lediglich die Exons 2 und 3 im Genom von *Tetraodon* auf einem nicht näher spezifizierten Chromosom erkannt, während Exon 1 nicht detektiert wurde. Erst eine separate Blast-Suche mit der Sequenz von Exon 1 detektierte die ersten 97 Nukleotide in relativer Nähe zu den Exons 2 und 3, wobei zwischen Exon 1 und 2 repetitive Sequenzen verzeichnet waren (Abbildung 24). Die verbleibenden 79 Basenpaare von Exon 1 konnten nicht gefunden werden und auch die Annotation von Exon 2 wies am 5'-Ende Fehler auf: Der Datenbank-Annotation nach würde das *in vivo* 232 Nukleotide lange Exon 2 252 bp umfassen. Offensichtlich wurden 20 Nukleotide des 3'-Endes von Intron 2 mit zu Exon 2 gezählt, obgleich sich an dieser Stelle eine "AG"-Splice-Akzeptorstelle befindet. Die Länge von Intron 1 des *Cygb-2*-Gens konnte somit in *Tetraodon* nicht genau bestimmt werden, eine Abschätzung anhand des in der Datenbank gegebenen Größenstandards legte jedoch eine Länge von etwa 420 bp nahe. Ein Vergleich beider *Cygb*-Genvarianten in *Tetraodon* zeigte, dass die Introns von *Cygb-1* deutlich länger sind als von *Cygb-2* (Abbildung 23).

Annotations-Schwierigkeiten traten ebenfalls im Genom des nahe verwandten Kugelfisches *Takifugu rubripes* auf: hier konnten alle 3 Exons von *Cygb-1* ohne Probleme identifiziert werden, während von *Cygb-2* nur Exon 2 komplett und Exon 3 partiell auf Scaffold_2329 gefunden wurden, Exon 1 wurde in diesem Scaffold nicht detektiert. Auch in diesem Genom waren für die Intronbereiche von *Cygb-2* repetitive Sequenzen verzeichnet.

In dem Genom von *Danio rerio* wurden die Exons 2 und 3 der *Cygb-1*-Variante auf Chromosom 3 detektiert, Exon 1 war in der Datenbank nicht auffindbar (Stand Juni 2007). Intron 2 besaß in diesem Genom eine Länge von 3 kb. Die Annotation von *Cygb-2* hingegen bereitete im Zebrafisch keine Probleme und war damit konträr zu jener der Kugelfische: die Exons 1, 2 und 3 waren

auf Chromosom 6 von *Danio* eingetragen. Mit 19 kb (Intron 1) bzw. 12 kb (Intron 2) sind die Introns dieses Gens deutlich länger als die orthologen der Kugelfische.

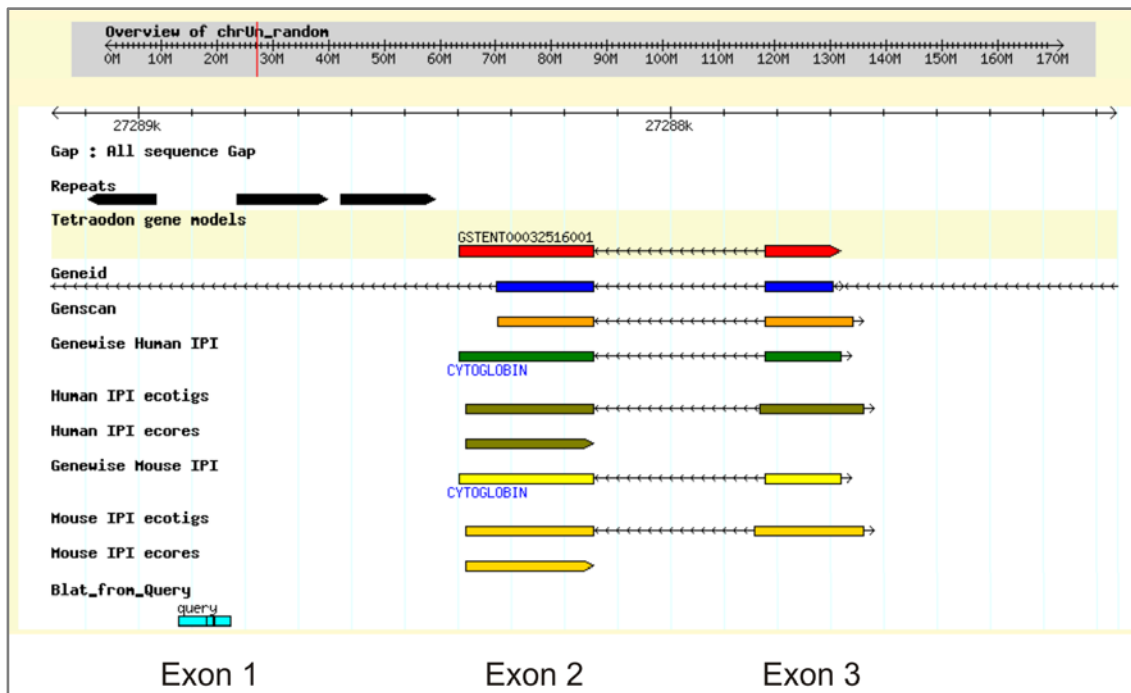


Abbildung 24

Screenshot einer Blast-Suche mit der CDS von *Cygb-2* im Genom von *Tetraodon nigroviridis*.

Die Exons 2 und 3 waren im Genom-Browser bereits als kodierende Sequenzen verzeichnet, Exon 1 hingegen wurde partiell in einer gesondert durchgeführten Suche etwa 420 bp upstream von Exon 2 gefunden und war seitens der Datenbank bisher nicht als kodierend erkannt. Kodierende Bereiche waren in der Datenbank durch farbige Pfeile markiert.

Nach der Identifikation von *Cygb-1* und *-2* in den Genomen von *Tetraodon nigroviridis* und *Takifugu rubripes* wurden die Gene in ihrem genomischen Kontext vergleichend betrachtet. Die umliegenden Gene wurden mittels reverser Blast-Suchen im menschlichen Genom auf Orthologien hin analysiert, die Namensgebung erfolgte entsprechend der des humanen Genoms. Die Gene der Teleostier wurden gemäß der Länge ihrer kodierenden Bereiche und der Transkriptionsrichtung komparativ zu der syntänen Genomregion von *Homo sapiens* graphisch dargestellt (Abbildung 25). Der Vergleich mit dem syntänen Bereich von *Cygb-2* war in *Takifugu rubripes* nicht möglich, da die entsprechenden genomischen Bereiche seitens der Datenbank nicht zusammengefügt waren (Stand Juni 2007).

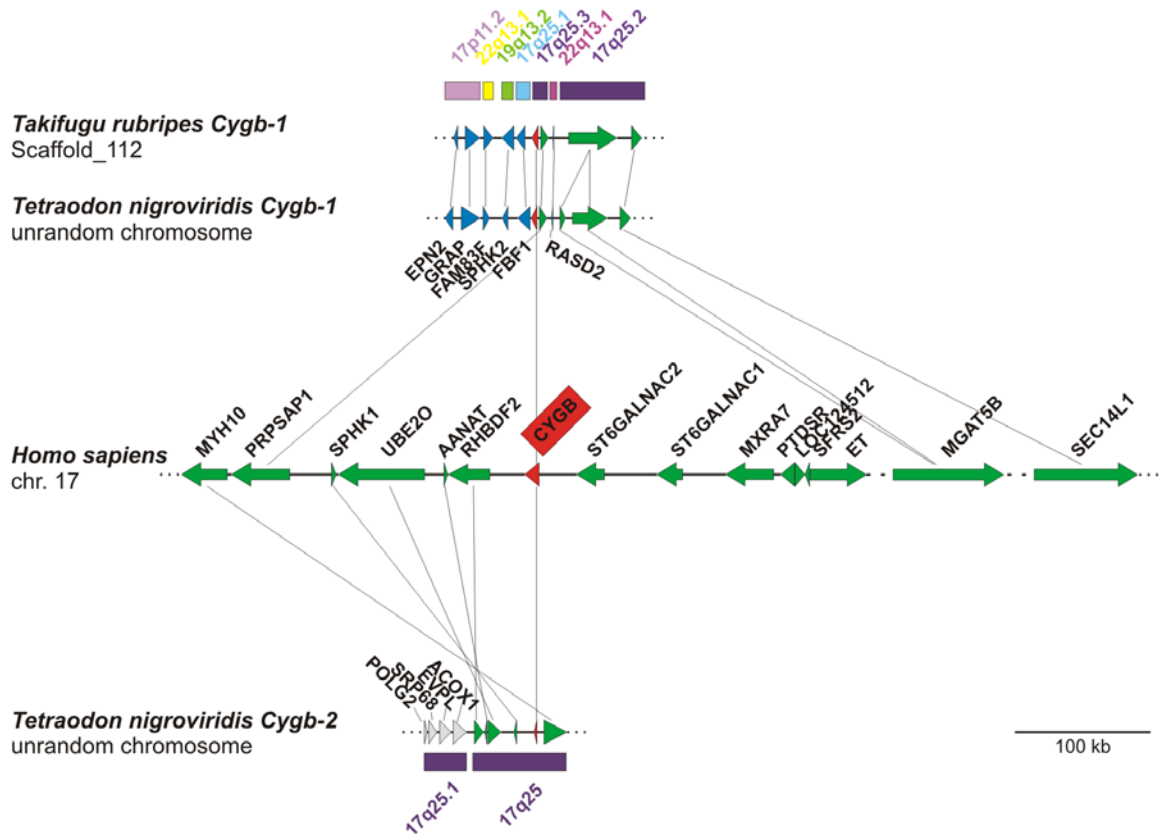


Abbildung 25

Vergleich der syntänen Cygb-Regionen von *Tetraodon nigroviridis* und *Homo sapiens*.

Die duplizierten Cygb-Versionen -1 und -2 von *Tetraodon* wurden zusammen mit der umgebenden Genomregion erfasst und die Gene in Länge und Transkriptionsrichtung maßstabsgerecht durch Pfeile symbolisiert. Die Ergebnisse von Cygb-1 konnten in den Teleostiern durch Daten des nahe verwandten Japanischen Kugelfisches *Takifugu rubripes* gestützt werden, für Cygb-2 war dies aufgrund der Datenlage nicht möglich. Gene, die in Cygb-1 an dieser Stelle ausschließlich in den Teleostier-Genomen gefunden wurden, sind blau dargestellt, während Gene, die an syntäner Stelle auch im Menschen vertreten waren, grün hervorgehoben sind. Die Sequenzen aller in diesem Zusammenhang analysierten Fisch-Gene wurden revers mit dem humanen Genom verglichen und so Orthologien detektiert. Entsprechend identifizierte Gene wurden durch vertikale Linien verdeutlicht, die Benennung erfolgte entsprechend des menschlichen Genoms (vgl. Anhang 7.19). Intergenbereiche wurden mit durchgehenden horizontalen Linien maßstabsgerecht verdeutlicht, während gestrichelte horizontale Linien eine nicht maßstabsgetreue Darstellung derselben andeuten. Punkte zu Beginn bzw. Ende eines Genom-Abschnittes symbolisieren, dass es sich lediglich um einen Ausschnitt eines Chromosoms oder Scaffolds handelt. Die farbigen Balken am oberen bzw. unteren Ende der Abbildung verdeutlichen die Lage der entsprechenden Gene im humanen Genom.

3.2.3. Phylogenetische Einordnung und molekulare Evolution der paralogen Cytoglobine

Die duplizierten Cytoglobine der Teleostier wurden zum einen generell in einen Stammbaum der Globine eingeordnet, zum anderen wurde die phylogenetische Beziehung von Cygb-1 und Cygb-2 verschiedener Spezies im Detail analysiert.

Der Stammbaum zur übergeordneten Evolution der unterschiedlichen Globintypen (Abbildung 26A) zeigt drei Hauptäste und damit phylogenetische Gruppen: Ngb gruppiert mit GbX (Roesner et al., 2005), ebenso bilden Mb und Hb einen gemeinsamen Ast. Auch die Cytoglobine der Teleostier

zeigen mit den Cygbs der Tetrapoden eine distinkte Gruppierung. Eine monophyletische Gruppierung von Cygb und Mb (Burmester et al., 2002) ist in diesem Stammbaum aufgrund der geringen Auflösung an der Basis nicht nachvollziehbar, aber aufgrund von Genomdaten wahrscheinlich.

Prinzipiell zeigen die Cytoglobine eine Monophylie, Cygb-1 und -2 der Teleostier sind offensichtlich Paraloge. Dies verdeutlicht die detailliertere Betrachtung der phylogenetischen Beziehungen der duplizierten Fisch-Cygb-Gene: in beiden Bäumen bilden die Cygb-2-Proteine der Teleostier eine distinkte Gruppe zu den entsprechenden Proteinen der Tetrapoden wie auch zum Cygb-1 der Fische. Indes ist die Zuordnung der Cygb-1-Proteine der Teleostier nicht vollends geklärt, da im Stammbaum nach Bayes die Cygb-1-Proteine der Cyprinidae (Zebrabärbling, Karpfen und Elritze) einen gesonderten, basal zu den Teleostier-Tetrapoden-Cygbs stehenden Ast bilden (Abbildung 26B1, Pfeil), die gleiche Familie aber in dem auf der Distanz-Matrix basierenden Baum eine eindeutige Gruppierung mit den Cygb-1-Proteinen der anderen Teleostier zeigt (Abbildung 26B2, Pfeil).

In beiden Fällen sind die Unterstützungswerte gering und eine eindeutige Zuordnung der Cygb-1-Proteine der Familie der Cyprinidae innerhalb der Teleostier nicht möglich.

Familienpezifisch gruppieren wie erwartet die Gene der Vertreter der Tetraodontidae (*Tetraodon*, *Takifugu*) ebenso zusammen wie die der Salmonidae (Forelle und Lachs) und der Cyprinidae (*Danio*, Karpfen und Elritze). *Gasterosteus*, Medaka und *Ptyochromis* zählen zu den Percomorpha; ihre Gene bilden eine nicht weiter aufgetrennte Gruppe (vgl. Abbildung 6).

Basierend auf einer Divergenz der Actinopterygii und Sarcopterygii vor 420 Millionen Jahren (Benton, 1990) können durchschnittliche Substitutionsraten von $0,84 \times 10^{-9}$ bzw. $0,61 \times 10^{-9}$ Aminosäureaustausche pro Position pro Jahr für Cygb-1 bzw. Cygb-2 der Teleostier gegenüber dem humanen Cygb berechnet werden (Tabelle 4 A). Diese Evolutionsraten sind höher als die des Haushuhn-Cygbs ($0,43 \times 10^{-9}$ Aminosäureaustausche pro Position pro Jahr) und der Mammalier-Cygbs ($0,3 \times 10^{-9}$ Aminosäureaustausche pro Position pro Jahr) (Kugelstadt et al., 2004; Wystub et al., 2004), indizieren aber dennoch eine konservative Evolution der paralogen Fisch-Cygbs. Entsprechend deuten die berechneten Quotienten aus nichtsynonymen (dn) zu synonymen (ds) Nukleotidsubstitutionen auf eine starke „reinigende Selektion“ in Cygb-1 und -2 hin (Tabelle 4 B), wodurch beide Gene funktionell in den Teleostier-Genomen erhalten werden.

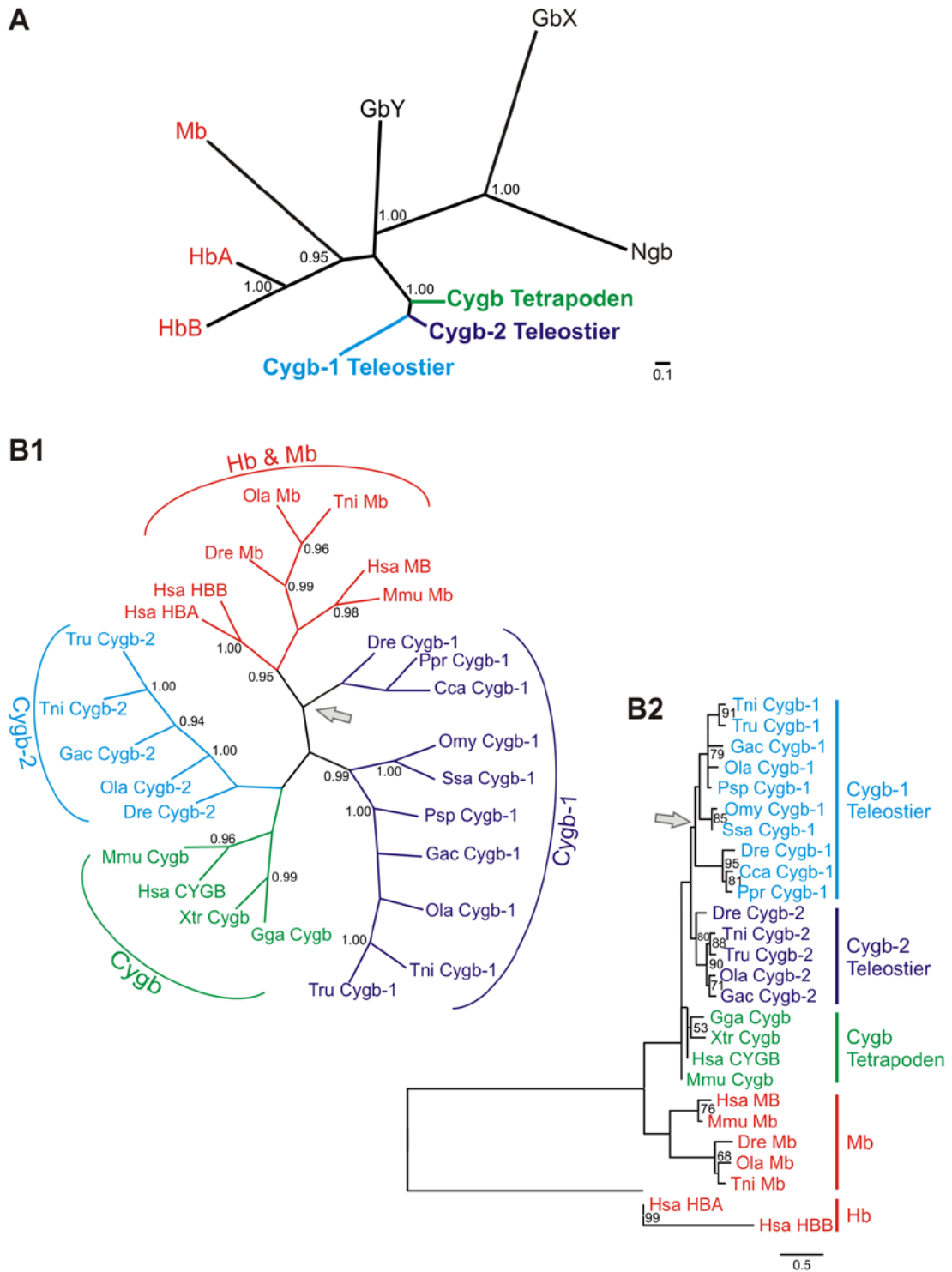


Abbildung 26:
Phylogenie der duplizierten Teleostier-Cytoglobine.

Genereller Stammbaum der Globine zur Einordnung der duplizierten Teleostier-Cytoglobine nach der Bayes'schen Methode ((A), PAM-Matrix, 500000 Generationen, burn-in=25000) und detaillierte Betrachtung der phylogenetischen Beziehungen von Cygb-1 und -2 nach Bayes ((B1), PAM-Matrix, 500000 Generationen, burn-in=25000) bzw. der Neighbor-Joining-Methode ((B2) JTT-Modell mit paarweiser Deletion und 1000 Replikationen). Die Proteine sind in Gruppen zusammengefasst farbig markiert. Die für verschiedene Spezies eines übergeordneten Taxons berechneten Einzel-Astlängen wurden in (A) der Übersichtlichkeit halber addiert, der Durchschnitt gebildet und dieser als Gesamt-Astlänge aufgetragen. Pfeile weisen auf die unterschiedliche Einordnung der Cygb-1 der Cypriniden in den verschiedenen Berechnungsmodellen hin, die Zahlen spiegeln die posterioren Wahrscheinlichkeiten (A, B1) bzw. „Bootstrap“-Unterstützungswerte (B2) wieder. Die den Stammbäumen zugrunde liegenden Aminosäure-Alignments sind mit Angabe der Spezies als Anhang 7.7, 7.8.3 und 7.8.4 A aufgeführt.

		A	B		
		Aminosäure- Austauschrate (x 10 ⁻⁹)	Nukleotid-Austausche		
			dn (x 10 ⁻⁹)	ds (x 10 ⁻⁹)	dn/ds
Cygb-1 (Teleostier)	Hsa <i>Cygb</i>	0,84	0,48	1,31	0,37
	Gga <i>Cygb</i>	0,87	0,49	1,66	0,30
	Xtr <i>Cygb</i>	0,88	0,49	2,18	0,23
<i>Cygb-2</i> (Teleostier)	Hsa <i>Cygb</i>	0,61	0,36	1,67	0,22
	Gga <i>Cygb</i>	0,69	0,37	1,32	0,28
	Xtr <i>Cygb</i>	0,69	0,39	2,71	0,14
Dre Cygb-1	Hsa <i>Cygb</i>	0,92	0,50	1,37	0,37
Ola Cygb-1		0,75	0,43	1,60	0,27
Tni Cygb-1		0,83	0,47	1,16	0,41
Tru Cygb-1		0,89	0,49	1,15	0,43
Dre Cygb-2	Hsa <i>Cygb</i>	0,51	0,31	3,02	0,10
Ola Cygb-2		0,62	0,40	1,09	0,37
Tni Cygb-2		0,64	0,37	1,30	0,29
Tru Cygb-2		0,66	0,36	1,26	0,29

Tabelle 4:

Austauschraten von Aminosäuren (A) bzw. Nukleotiden (B) der duplizierten Teleostier-*Cygb*s mit ausgewählten Vertebraten-*Cygb*s.

Die durchschnittlichen Werte der Teleostier *Cygb-1* bzw. -2 wurden mit den Daten von *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Tetraodon nigroviridis* und *Takifugu rubripes* berechnet und mit denen des Menschen (Hsa, *Homo sapiens*), des Haushuhnes (Gga, *Gallus gallus*) und des tropischen Krallenfrosches (Xtr, *Xenopus tropicalis*) verglichen. Zudem wurden die berechneten Werte der *Cygb*-Duplikate jedes Fisches gegen das humane *Cygb* aufgezeigt.

3.2.4. Amplifikation und Quantifizierung der Transkription duplizierter *Cygb*-Gene in Teleostiern

3.2.4.1. Amplifikation und Analyse der Cytoglobin-Duplikate

Praktisch erfolgte die Amplifikation der zuvor durch Blast-Suchen detektierten Fragmente der *Cygb*-Duplikate per RT-PCR aus verschiedenen Geweben von *Tetraodon nigroviridis* und *Oryzias latipes*. Die Sequenz des mittlerweile als *Cygb-1* benannten Gens von *Danio rerio* war bereits bekannt. Die kodierenden Sequenzen wurden, sofern nötig, durch RACE-Reaktionen vervollständigt. Die Amplifikate wurden kloniert, sequenziert und die Ergebnisse an das „European Bioinformatics Institute“ (<http://www.ebi.ac.uk>) übermittelt. Sie sind dort unter folgenden Accession-Nummern registriert: *Danio rerio* (Dre *Cygb-2*, AJ635229), *Oryzias latipes* (Ola *Cygb-1*, AJ635227; Ola *Cygb-2*, AJ635228) und *Tetraodon nigroviridis* (Tni *Cygb-1*, AJ635230; Tni *Cygb-2*, AJ635231).

Die Aminosäuresequenzen wurden in einem Alignment vergleichend mit dem humanen und murinen Cygb dargestellt (Abbildung 27), wobei auch die ausschließlich *in silico* detektierten Daten duplizierter Cytoglobine von Teleostiern einfließen.

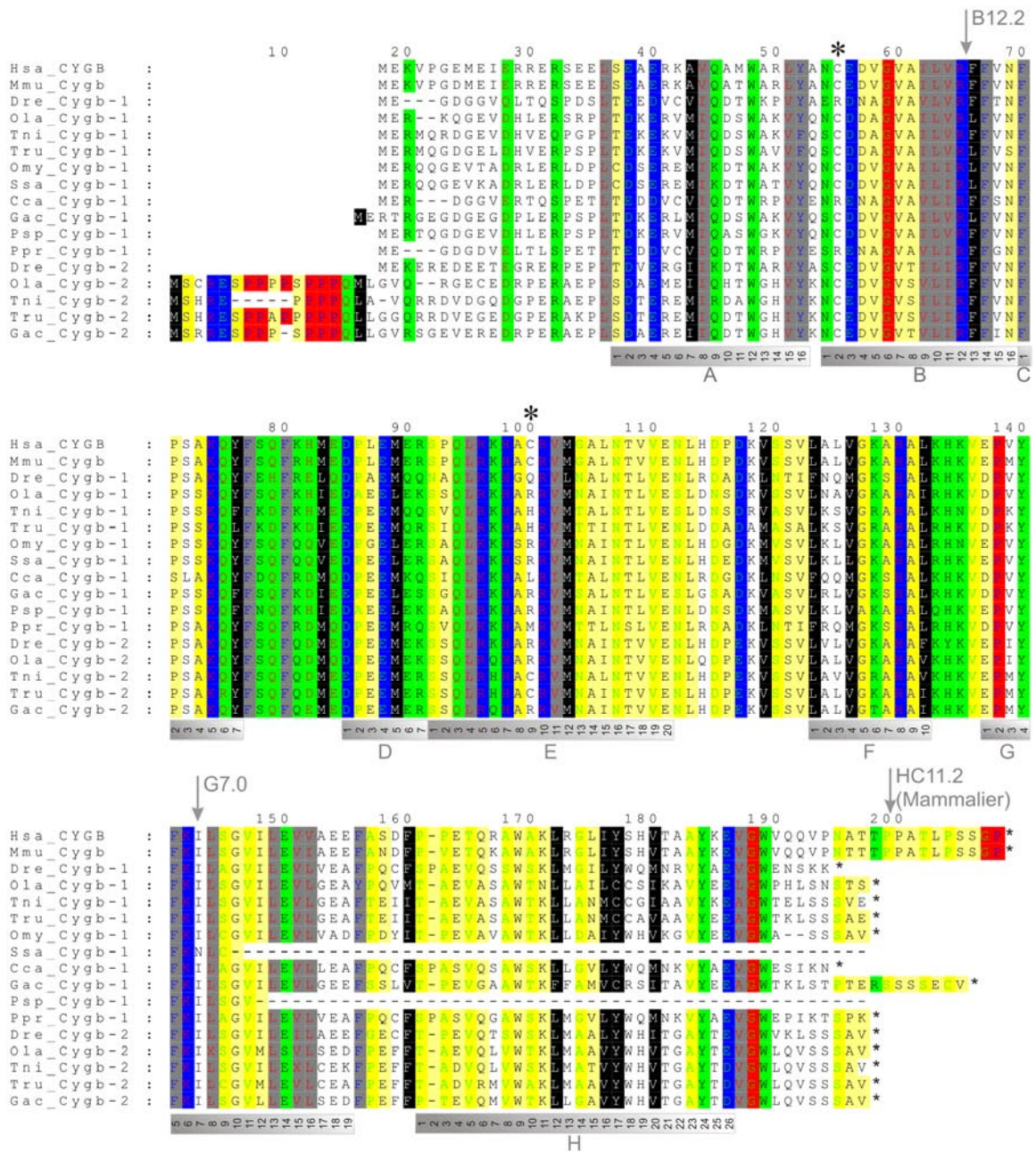


Abbildung 27:

Aminosäure-Alignment der Cygb-Gene von Teleostiern, Mensch und Maus.

Unterhalb der Sequenzen ist die typische α -helikale Anordnung entsprechend dem Myoglobin der Mammalier graphisch dargestellt und von A-H benannt, die dazu gehörende Nummerierung befindet sich unterhalb des Alignments. Die Cysteinreste zur Ausbildung einer Disulfidbrücke im humanen Cygb sind durch einen * symbolisiert. Die farbige Codierung innerhalb des Alignments spiegelt identische bzw. histochemisch ähnliche Aminosäuren nach folgendem Code wieder: **Proline & Glycin**, **winzig & klein**, **Positiv / Negativ geladen**, **Amphoter & polar**, **Aliphatisch & aromatisch**, **Hydrophob**. Folgende Sequenzdaten wurden verwendet: *Homo sapiens* (Hsa Cygb, Accession-Nummer NM_134268), *Mus musculus* (Mmu Cygb, NM_030206), *Danio rerio* (Dre Cygb-1, CAC86225; Dre Cygb-2, CAG25612), *Oryzias latipes* (Ola Cygb-1, CAG25610; Ola Cygb-2, CAG25611), *Tetraodon nigroviridis* (Cygb-1, CAG25613; Tni Cygb-2, CAG25614), *Takifugu rubripes* (Tru Cygb-1, PID 712480; Tru Cygb-2, PID 575005), *Oncorhynchus mykiss* (Omy Cygb-1, CAD68070), *Cyprinus carpio* (Cca Cygb-1, CA967584), *Gasterosteus aculeatus* (Gac Cygb-1, DW653184; Gac Cygb-2, DV003487), *Ptyochromis sp.* (Psp Cygb-1, BJ694179), *Pimephalus promelas* (Ppr Cygb-1, DT203316), *Salmo salar* (Ssa Cygb-2, DW555071).

Das Alignment visualisiert die unterschiedliche Länge der Cygb-Gene: in den Teleostiern umfasst die komplette kodierende Sequenz von Cygb-1 zwischen 525 Nukleotiden und 570 Nukleotiden und lässt sich in Proteine von 174 Aminosäuren bis 189 Aminosäuren übersetzen. Cygb-2 ist zwischen 540 Nukleotiden und 591 Nukleotiden lang und resultiert in Proteinen von 179 Aminosäuren bis 196 Aminosäuren (Tabelle 5).

	Nukleotide	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]
Dre Cygb-1	525	174	19,9
Ola Cygb-1	534	176	20,0
Tni Cygb-1	540	179	20,1
Tru Cygb-1	540	179	19,9
Gac Cygb-1	570	189	21,0
Omy Cygb-1	534	177	20,2
Ppr Cygb-1	535	177	20,3
Cca Cygb-1	(524)	(174)	
Psp Cygb-1	(390)	(130)	
Ssa Cygb-1	(384)	(128)	
<hr/>			
Dre Cygb-2	540	179	20,6
Ola Cygb-2	585	194	22,0
Tni Cygb-2	573	190	21,8
Tru Cygb-2	591	196	22,3
Gac Cygb-2	588	195	22,3

Tabelle 5:

Zusammenfassung der kodierenden Sequenzen bezüglich ihrer Länge auf Nukleotidebene, den abgeleiteten Aminosäuresequenzen sowie des theoretisch berechneten Molekulargewichtes der Proteine.

Nicht komplett in den Datenbanken vorhandene Sequenzen wurden in Klammer gesetzt, ihr Molekulargewicht nicht angegeben. Die verwendeten Abkürzungen der Speziesnamen und Gene sind in Abbildung 27 aufgeschlüsselt.

Die größere Länge von Cygb-2 ist auf eine N-terminale, prolinreiche Extension zurückzuführen. Diese existiert - mit Ausnahme von *Danio rerio* - exklusiv in den analysierten Teleostiern, nicht jedoch in dem als single-copy-Gen vorliegenden Cygb der Mammalier, Vögel und Reptilien. Eine Analyse der 5' des Start-Kodons gelegenen Nukleotide in *Danio rerio* und deren Translation detektiert jedoch eine prolinreiche Sequenz mit deutlichen Ähnlichkeiten zu den Cygb-2-Genen anderer Teleostier. An Stelle des Start-Kodons ATG der anderen Teleostier-Cygb-2-Gene findet sich im Zebraquariabbling ein CTG-Triplett. Dies lässt vermuten, dass die N-terminale Verkürzung in *Danio* relativ zu den anderen Cygb-2-Genen der Teleostier durch eine Mutation von ATG nach CTG zustande gekommen ist. Intern zeigen die Sequenzen deutliche Übereinstimmungen, was durch die farbliche Kodierung der biochemisch ähnlichen Aminosäuren in Abbildung 27 visualisiert wird. Die Identitäten und Similaritäten der Aminosäuren wie auch die Übereinstimmung der Nukleotide sind in Anhang 7.16. zusammengefasst. Demnach zeigen die Cygb-1-Gene der Teleostier eine durch-

schnittliche Aminosäure-Identität bzw. Ähnlichkeit von 52,4% bzw. 67,2% zu dem menschlichen *Cygb*-Gen; für *Cygb-2* der Teleostier betragen die Werte der Identität bzw. Similarität 62,9% bzw. 74,2%. Die Werte verdeutlichen, dass das *Cygb-2*-Gen der Fische etwas näher mit dem humanen *Cygb* verwandt ist als *Cygb-1*. Das gleiche Ergebnis reflektiert auch der nach der Bayes-Methode berechnete Stammbaum der Cytoglobine in Abbildung 26 B1.

Neben diesen Besonderheiten verfügen die *Cygb*-Duplikate der Teleostier über die wichtigen, Struktur und Funktion vermittelnden Aminosäuren der Globine wie das distale bzw. proximale Histidin (helikale Position E7 bzw. F8), ein Phenylalanin an Position CD1 sowie ein Glycin an Position B6. Das normalerweise invariante Prolin an Position C2 ist im *Cygb-1* des Karpfens *Cyprinus carpio* durch ein physikochemisch ähnliches Serin ersetzt (Abbildung 27). Die in Mammaliern konservierten Cystein-Reste an den Positionen B2 und E9 sind in den Teleostiern lediglich in den *Cygb-2*-Sequenzen der Kugelfische konserviert, in den anderen Teleostiern finden sich an den entsprechenden Positionen zumindest eine andere Aminosäure. Die Cysteine sind in Abbildung 27 durch einen „*“ symbolisiert und werden im Menschen als *in vitro* Disulfidbrücken-bildend diskutiert, wodurch unter sauerstoffreichen Bedingungen die Affinität von *Cygb* für den Liganden erhöht wird (Hamdane et al., 2003). Die fehlende Konservierung der entsprechenden Cysteinreste in den Teleostiern legt nahe, dass Fische nicht über die Affinitätserhöhung bezüglich des Sauerstoffes verfügen.

Die *Cygb*-Gene der Fische weisen die typische Organisation in 3 Exons und 2 Introns an den Stellen B12.2 und G7.0 auf. Das Mammalier-spezifische Intron an Position HC11.2 und das nachfolgende Exon 4 ist in den Fischen nicht vertreten. Lediglich in *Gasterosteus aculeatus* findet sich gegenüber den anderen Fischen eine exklusive, C-terminale Verlängerung, eine *in silico*-Analyse der genomischen Daten zeigt jedoch eindeutig die Organisation von *Cygb-2* des Dreistacheligen Stichlings in drei Exons und zwei Introns. Die Existenz des Introns HC11.2 bleibt damit exklusiv auf Mammalier beschränkt.

3.2.4.2. Quantifizierung der Transkription von *Cygb-1* und *-2* in Teleostier-Geweben

Mögliche gewebespezifische Unterschiede in der Expression von *Cygb-1* und *Cygb-2* wurden qualitativ per RT-PCR in *Danio rerio* und *Tetraodon nigroviridis* untersucht, die quantitative Analyse erfolgte mit der Methode der Real-Time RT-PCR in *Danio rerio*. Beide Versuche wurden von Anne Luckhardt im Rahmen Ihrer von mir praktisch betreuten Diplomarbeit durchgeführt.

In der RT-PCR dienten aus verschiedenen Geweben von *Danio rerio* bzw. *Tetraodon nigroviridis* gewonnene und revers transkribierte Gesamt-RNAs als Matrize zur Amplifikation von *Cygb-1* und *-2*. Als Positivkontrolle wurde in jedem Gewebe β -actin amplifiziert, in einer Negativkontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. Die PCRs wurden unter Standardbedingungen durchgeführt,

die Amplifikate über Agarosegele aufgetrennt, visualisiert, dokumentiert und komparativ betrachtet. Daten zur RNA und beispielhafte Bilder der Agarosegele und die eingesetzten Oligonukleotide sind in Anhang 0 und 7.17 aufgeführt.

Die RT-PCR-Ergebnisse (Tabelle 6) zeigen, dass *Cygb-1* und *Cygb-2* in allen analysierten Geweben beider Spezies transkribiert werden. Die Transkription von *Cygb-1* ist in den Geweben von eher gleicher Stärke mit einem leichten Fokus im Herz von *Danio rerio*, der in *Tetraodon* nicht beobachtet werden kann. Für *Cygb-2* hingegen wird in beiden Teleostiern ein besonders starkes Signal im Auge beobachtet, in *Tetraodon* ein zusätzliches im Gehirn. In allen anderen analysierten Geweben findet sich eine weniger starke, jedoch immer noch deutlich ausgeprägte Transkription von *Cygb-2*.

		Auge	Darm	Gehirn	Haut	Kieme	Leber	Muskel	Herz	Ovar
Cygb-1	Tni	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
	Dre	+	+	+	+	+	+	+	⊕	+
Cygb-2	Tni	⊕	+	⊕	+	+	+	+	+	nd
	Dre	⊕	+	+	+	+	+	+	+	+
β-actin	Tni	+	+	+	+	+	+	+	+	nd
	Dre	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 6:

Qualitativer Vergleich der mRNA-Transkription von *Cygb-1* und *Cygb-2* in *Tetraodon nigroviridis* und *Danio rerio*.

Die Tabelle repräsentiert eine generelle Expression durch ein „+“, ein ausbleibendes PCR-Amplifikat wird durch ein „-“ repräsentiert. Die in den verglichenen Geweben maximale Transkription wurde durch ein „⊕“ dargestellt. Vervollständigend sind die Amplifikationsergebnisse von *β-actin* dargestellt. In einem Organismus nicht durchgeführte Analysen sind durch ein „nd“ symbolisiert.

Mit der sensitiveren Methode der Real-Time RT-PCR wurden diese qualitativen Ergebnisse anhand der absoluten Kopienzahlen (Anhang 7.17) quantifiziert, wobei die wesentlichen Aussagen der RT-PCR verifiziert werden konnten.

Demnach bestätigten die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR eine ubiquitäre mRNA-Transkription von *Cygb-1* und *Cygb-2* in allen analysierten Geweben (Abbildung 28). Die Transkription von *Cygb-1* war fast durchweg weniger stark ausgeprägt als die von *Cygb-2* und reichte von einem Quotienten_{Cygb-1/Cygb-2} von 0,6 im Herz bis 0,004 im Gehirn. Beide Gene zeigten ihre maximale Expression im Gehirn. *Cygb-1* wurde in abnehmendem Maße in Herz, Darm, Auge, Leber, Kieme, Muskel und Haut transkribiert. *Cygb-2* wurde entsprechend in Auge, Muskel, Herz, Leber, Darm, Kieme und Haut von *Danio rerio* nachgewiesen. Die Expression von *Cygb-2* zeigten damit einen deutlicheren Fokus in den neuronalen Geweben des Gehirns und Auges als *Cygb-1*, das - mit Ausnahme von Darm und Kieme - konstant auf einem niedrigeren Niveau als *Cygb-2* in den untersuchten Gesamt-RNAs detektiert wurde. Eine komparative Betrachtung der absoluten Kopienzah-

len (Anhang 7.17) zeigte eine 300fache bzw. 250fach stärkere Transkription von *Cygb-2* in Gehirn bzw. Auge als *Cygb-1*.

Die Versuchsbedingungen der Real-Time RT-PCR wurden durch die Amplifikation des ubiquitär exprimierten β -actins überprüft, das in den untersuchten Geweben jedoch in deutlich unterschiedlichem Maße exprimiert wurde (Abbildung 28). Durch die unterschiedliche Transkriptionsstärke scheidet dieses Gen als Haushaltsgen zur Normalisierung der Globindaten aus. Die Normalisierung erfolgte daher auf RNA-Ebene (Bustin, 2000).

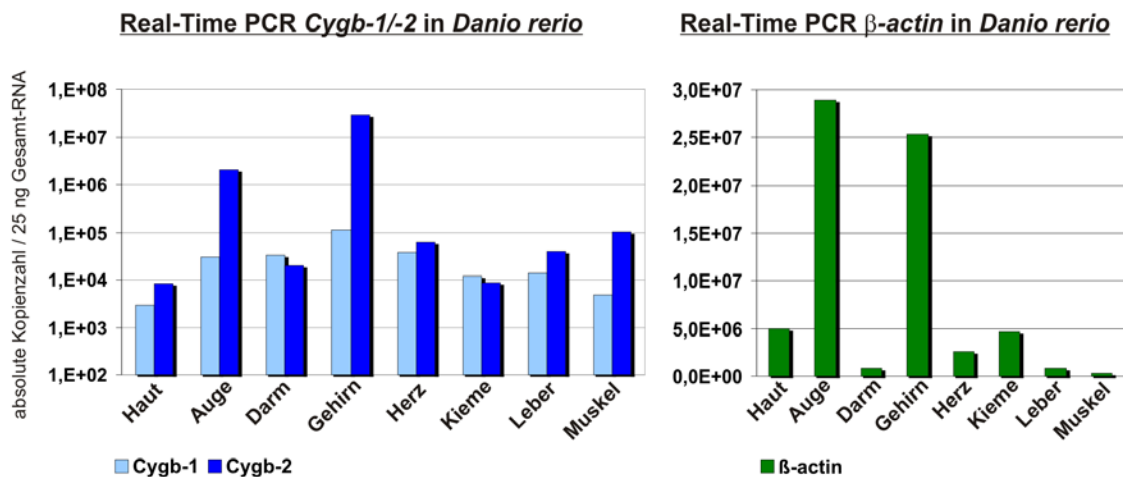


Abbildung 28:

Komparative Darstellung der Real-Time PCR-Ergebnisse der duplizierten *Cygb*-Gene sowie β -actin in verschiedenen Geweben von *Danio rerio*.

Angegeben sind die absoluten Kopienzahlen pro 25 ng Gesamt-RNA in den analysierten Geweben des Zebra-bärblings (vgl. dazu auch Anhang 7.17).

3.2.5. Zelluläre mRNA-Lokalisation von *Ngb*, *Cygb-1* und *Cygb-2* in *Danio rerio*

Das Muster der mRNA-Transkription wurde für *Ngb*, *Cygb-1* und *Cygb-2* vergleichend mit der Methode der *in situ*-Hybridisierung in *Danio rerio* analysiert.

3.2.5.1. Zellulärer Nachweis der *Ngb*-mRNA in *Danio rerio*

Der Nachweis der *Ngb*-mRNA wurde mit *in situ*-Hybridisierungsversuchen an 10 μ m-Kryosektionen eines frontal in Serie geschnittenen Kopfes von *Danio rerio* durchgeführt. Entsprechend der aus verschiedenen Mammaliern bekannten *Ngb*-Lokalisation wurde dabei von Beginn an ein besonderes Augenmerk auf die Retina des Fisches gelegt (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002; Wystub et al., 2003; Laufs et al., 2004).

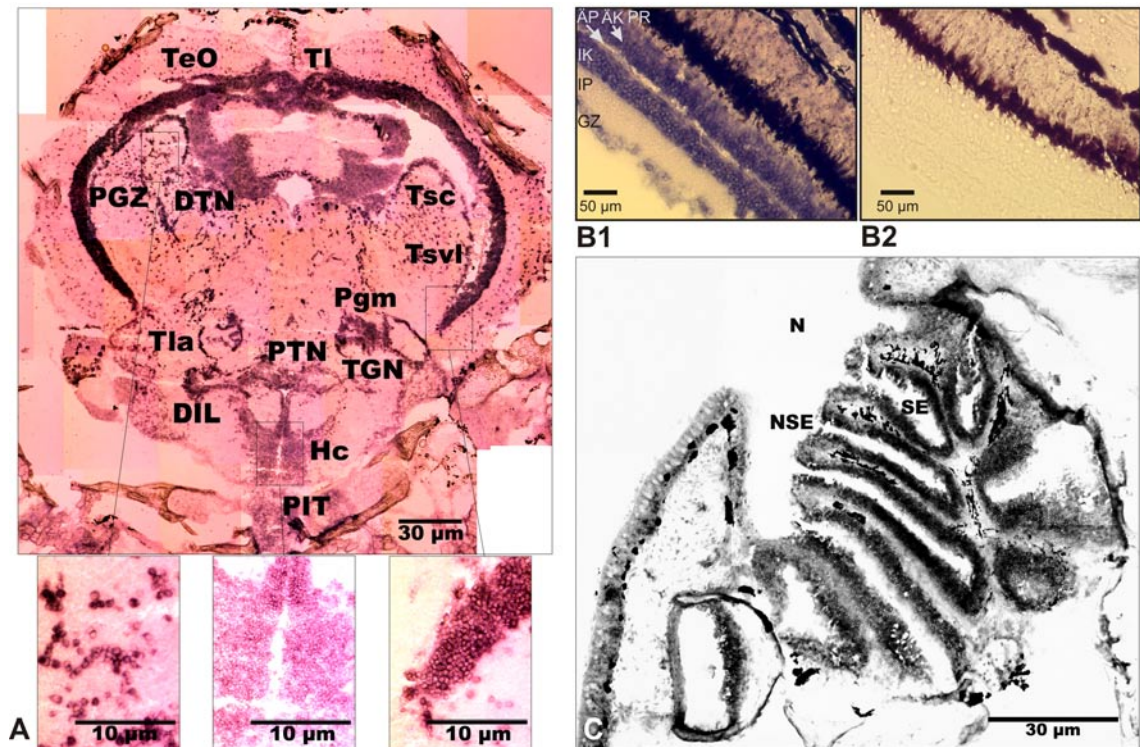


Abbildung 29: Ergebnisse der *Ngb-in situ*-Hybridisierung in Gehirn (A), Retina (B) und Riechepithel (C) von *Danio rerio*.

(A) zeigt eine Kryo- und H&E-färbte Querschnitt durch das Mesencephalon des Zebrafisches, der mit der *Ngb*-antisense-Sonde hybridisiert wurde. Positive Signale sind in Neuronen der unterschiedlichsten Gehirnregionen detektierbar, wovon drei als Ausschnittsvergrößerung gezeigt sind: links das Tegmentum, mittig die kaudale Zone des periventriculären Hypothalamus und rechts die ventrale Region der periventriculären grauen Zone des Tectum opticum. (B) zeigt einen Ausschnitt der Retina, (B1) repräsentiert die Hybridisierung mit der *Ngb*-antisense-Sonde, (B2) die entsprechende Negativkontrolle. (C) zeigt eine *Ngb*-antisense-Hybridisierung einer Kryo- und H&E-färbte Querschnitt durch das Riechepithel von *Danio rerio*. Die verwendeten Abkürzungen sind: (ÄK) Äußere Körnerzellschicht, (ÄP) Äußere Plexiforme Schicht, (DIL) Diffuser Nucleus des inferioren Lappens, (DTN) Dorsales Tegmentum, (GZ) Ganglienzellschicht, (Hc) caudale Zone des periventriculären Hypothalamus, (IK) Innere Körnerzellschicht, (IP) Innere Plexiforme Schicht, (NSE) nicht-sensorisches Epithel, (Pgm) medialer proglomerularer Nucleus, (Pgz) periventriculäre graue Zone des Tectum opticum, (PIT) Glandula pituitaria, (PR) Photorezeptoren, (PTN) posteriorer tuberaler Nucleus, (SE) sensorisches Epithel, (TeO) Tectum opticum, (TGN) tertiärer gustatorischer Nucleus, (TL) Torus longitudinalis, (Tla) Torus lateralis, (Tsvl) ventrolateraler Nucleus des Torus semicircularis.

In den mikroskopisch ausgewerteten Schnitten fand sich die *Ngb*-mRNA als violett gefärbtes Signal perinukleär in den neuronalen Somata distinkter Gehirnbereiche. Diese umfassten das Telencephalon ebenso wie das Diencephalon, das Mesencephalon und das Rhombencephalon (vgl. Anhang 7.18). Ein besonders starkes Signal wurde unter anderem in der periventralen Zone des Tectum opticum im posterioren Mesencephalon (Abbildung 29A) detektiert. Weitere Signale wurden in verstreut in der weißen Substanz des Gehirns liegenden Neuronen gefunden. Ebenso wurden Farbsignale in neuronalen Populationen des präglomerale Nucleus, des posterioren tubulären Nucleus, des Torus longitudinalis, des Hypothalamus und der Hypophyse wie auch in weiteren Gehirnregionen detektiert. Außerdem konnte die *Ngb*-mRNA in Bereichen des visuellen Systems, bevorzugt dem Tectum opticum und dem Torus semicircularis als Bereichen des Mesencephalons nachgewiesen werden. Auch im Telencephalon und Rhombencephalon konnten Signale der mRNA-Transkription von *Ngb* nachgewiesen werden (*Area dorsalis telencephali* und *Medulla oblongata*).

Intensive Signale wurden auch in der Retina detektiert (Abbildung 30B) und entsprachen im Wesentlichen der bereits analysierten *Ngb*-mRNA-Lokalisation in Mammaliern (Schmidt et al., 2003; Schmidt et al., 2005). In der Retina des Zebrafährblings zeigten die äußeren und inneren nukleären Zellschichten, die Ganglienzellschicht und die inneren Segmente der Photorezeptorzellen deutliche Farbsignale, während die äußere plexiforme Schicht und die äußeren Segmente der Photorezeptorzellen ungefärbt erschienen. Weitere Signale wurden im Telencephalon detektiert, die dort besonders den *Bulbus olfactorius* betrafen. Auch im sensorischen Epithel des Riechorgans konnten Nachweise einer *Ngb*-mRNA-Transkription geführt werden (Abbildung 30C). Dieser Versuchsteil meiner Arbeit wurde bereits in einer Veröffentlichung zusammengefasst (Fuchs et al., 2004).

3.2.5.2. Zellulärer Nachweis der *Cygb-1* und *-2* -mRNA in *Danio rerio*

Entsprechende *in situ*-Hybridisierungsversuche sollten die zelluläre Lokalisation der mRNA von *Cygb-1* und *-2* in *Danio rerio* analysieren. Problematisch erwies sich dabei neben einer immer wieder positiven „sense“-Probe (Abbildung 30A2 & B2) eine mitgeführte bakterielle „Neomycin-Gen“ antisense-Kontrolle, die unerwartet ein deutliches Hybridisierungssignal in *Danio* hervorrief (Abbildung 30C). Dieser Befund stellte die Spezifität der Detektionen von *Cygb-1* und *-2* in Frage. Beispielhafte Abbildungen der Ergebnisse in der Retina von *Danio rerio* sind dennoch in der folgenden Bildtafel dargestellt.

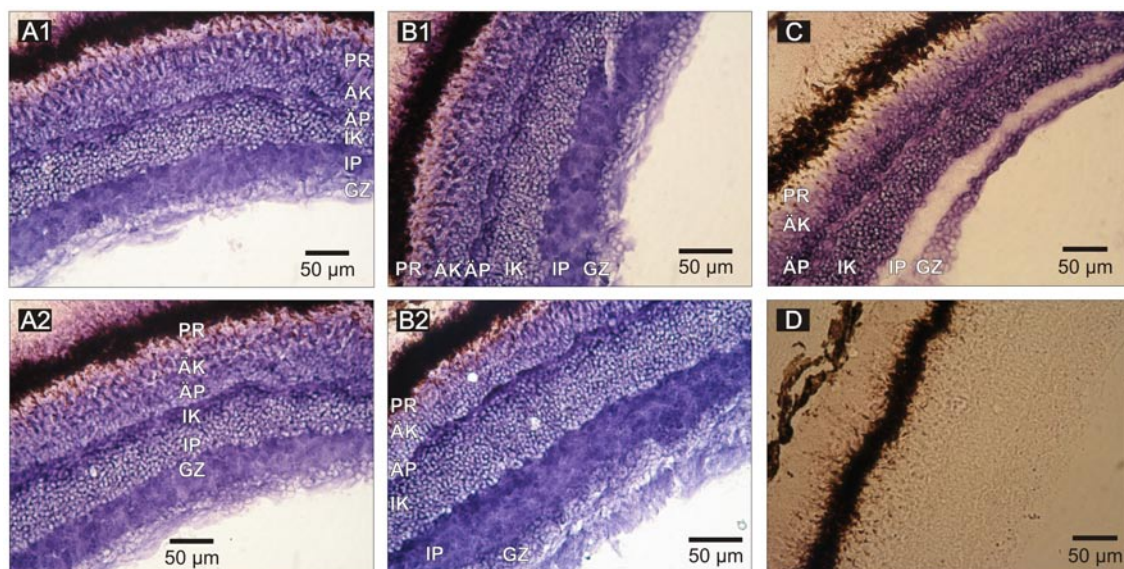


Abbildung 30:

***In situ*-Hybridisierungen mit *Cygb-1* (A), *Cygb-2* (B), einer „Neo-Kontrolle“ (C) und der Negativkontrolle (D) in der Retina von *Danio rerio* (nach A. Luckhardt).**

A1, B1 und C zeigen die Ergebnisse der antisense-Sonden der jeweiligen Gene, A2 und B2 die der sense-Sonden. Sowohl in den antisense wie den sense-Proben werden identische Farbesignale detektiert. Die Verteilung von *Cygb-1*, *Cygb-2* und *Neo* scheint relativ identisch zu sein, in der Negativkontrolle werden keine Signale beobachtet. Die Schichten der Retina sind folgendermaßen benannt: (GZ) Ganglienzellschicht, (IP) Innere Plexiforme Schicht, (IK) Innere Körnerzellschicht, (ÄP) Äußere Plexiforme Schicht, (ÄK) Äußere Körnerzellschicht, (PR) Photorezeptoren.

3.2.6. Rekombinante Expression von *Danio rerio* Cygb-1

3.2.6.1. Herstellung eines Expressions-Konstrukts

Die Klonierungsstrategie mit dem Ziel der rekombinanten Expression von *Danio rerio* Cygb-1 führte in einem ersten Schritt zur Amplifikation der kodierenden Sequenz des Gens vom ATG-Start bis zum Stopp-Kodon, in einem zweiten Schritt wurden diesem Amplifikat in einer weiteren PCR am 5'-Ende eine NdeI- und am 3'-Ende eine BclI-Schnittstelle angefügt (Tabelle 7A). Dieses Konstrukt wurde ungerichtet in den Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, vgl. Anhang 7.14) ligiert, sequenziert und die korrekte Amplifikation des gewünschten Produktes verifiziert. Das Produkt wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme NdeI und BclI aus pGEM[®]-T Easy exzisiert und gerichtet in den mit NdeI und BamHI linearisierten Expressionsvektor pET15B ligiert. In dieser Reaktion waren die Enden der BclI-Schnittstelle und der BamHI-Schnittstelle kompatibel, das ligierte Resultat war mit keinem der beiden Enzyme zu schneiden (vgl. Anhang 7.13).

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden in einem Alignment mit der in der Datenbank unter der Accession-Nummer AJ320232 eingetragenen kodierenden Nukleotidsequenz des Gens verglichen und in die abgeleitete Aminosäuresequenz übersetzt. Das vergleichende Alignment zeigte sieben Nukleotidaustausche (Anhang 7.8.9A), wovon drei stiller Natur waren und sich nicht auf Aminosäure-Ebene auswirken. Drei weitere Austausche führten zum Einbau histochemisch ähnlicher Aminosäuren und lediglich ein Basenaustausch bewirkte den Einbau einer andere Aminosäure: an Position 169 des Alignments wurde Glutamin (E) statt Valin (V) eingebaut (Anhang 7.8.9B). Dieser Austausch befand sich am Ende der E-Helix und damit an einer für die Sauerstoffbindung oder Faltung des Proteins nicht relevanten Position, so dass dieses Konstrukt in den Expressionsvektor pET15b kloniert und zur rekombinanten Proteinexpression gebracht wurde.

3.2.6.2. Rekombinante Expression von *Danio rerio* Cygb-1

Die rekombinante Expression erfolgte unter den optimierten Bedingungen in insgesamt 4 Litern Medium (Tabelle 7A, B). Die Zellen wurden pelletiert, lysiert und das Protein über die selektive Bindung des His-Tags an eine NiNTA-Agarosematrix aufgereinigt. Bei jedem Versuchsschritt entnommene, per SDS-PAGE aufgetrennte Proben zeigten die erfolgreiche Bindung des Proteins an die Matrix: der Durchfluss enthielt nur Bakterienproteine, nicht jedoch das rekombinant exprimierte Cygb-1 (Abbildung 31B). Die nachfolgenden Waschschrte reduzierten nicht selektiv gebundene Bakterien-Proteine, in den Elutionen wurde das rekombinant exprimierte Protein von der Matrix gelöst. Das Eluat zeigte eine leicht gelbe Färbung, das theoretisch berechnete Gewicht des inklusive His-Tag 190 Aminosäuren langen Proteins von 21,7 kDa konnte mittels einer SDS-PAGE anhand des Größenstandards verifiziert werden (Tabelle 7C). Das Volumen der Elution wurde eingengt

und mittels der Bradford-Methode eine Endkonzentration von 3,8 mg/ml Cygb-1 bei einem Gesamtvolumen von 1 ml Probe bestimmt (Tabelle 7D).

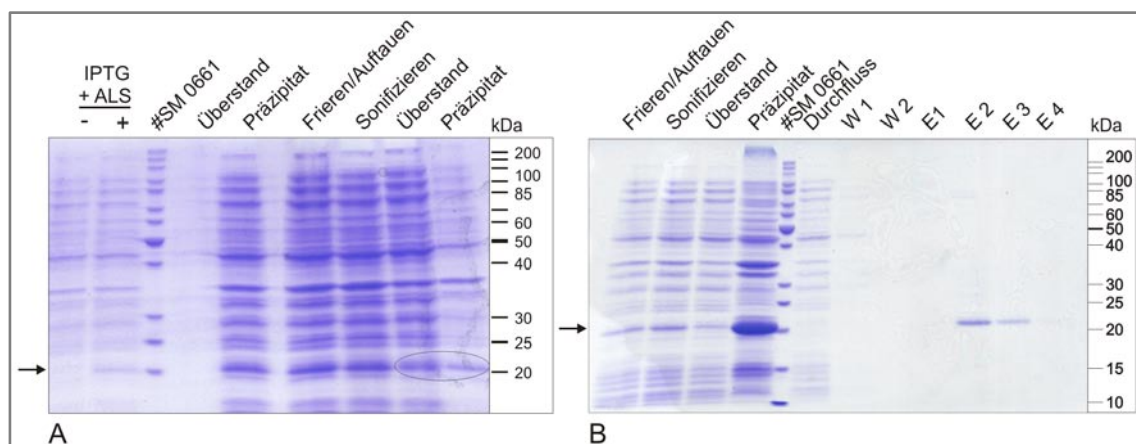


Abbildung 31: SDS-PAGE der lysierten Proben des Vorversuches zur Feststellung der Proteinlöslichkeit (A) sowie der lysierten und aufgereinigten Proben des Hauptversuches (B).

W=Waschschritt, E=Elutionsschritt, #SM 0661 = Größenstandard, vgl. Anhang 7.6.

A	Amplifikation	
	cDNA	Gehirn
	Oligonukleotid-Paar 1	Dre Cygb-1 F norm/Dre Cygb-1 ISH OR
	Größe des Amplifikates	525 bp
	Oligonukleotid-Paar 2	Dre Cygb-1 F Nde/Dre Cygb-1 R BclI
	Größe des Amplifikates	545 bp
B	Optimierte Expressionsbedingungen	
	IPTG-Konzentration	1 mM
	δ-ALS-Konzentration	1mM
	Expressionsdauer/Expressionstemperatur/ Größe des Expressionsansatzes	1h/24°C/4 Liter
C	Aufreinigung des rekombinanten Proteins	
	Methode der Aufreinigung	nativ
	theoretisches Molekulargewicht des chimären Proteins	21,7 kDa
D	Resultate der Proteinaufreinigung	
	Konzentration	3,8 mg/ml
	Finale Proteinmenge	3,8 mg
	Farbe des rekombinanten Proteins	Leicht gelb

Tabelle 7: Zusammenfassung der (A) Amplifikations-, (B) Expressions- und (C) Aufreinigungsbedingungen sowie (D) der Resultate der rekombinanten Expression von Cygb-1 des Zebraärb-lings *Danio rerio*.

3.2.6.3. Spektralanalyse des Cygb-1-Proteins von *Danio rerio*

Nach der rekombinanten Expression lag das Protein aufgrund des Sauerstoffmangels in der Zellsuspension deoxygeniert vor. Während der Lyse der Bakterienzellen nahmen die Proteine wieder Luftsauerstoff auf und befanden sich dann in einem oxygenierten Zustand (Van Doorslaer et al., 2003). Künstlich konnte der deoxygenierte Zustand durch die Reduktion des Sauerstoffs mittels Na-Dithionit hergestellt werden, die Zustandsänderung wurde durch die Aufnahme eines Spektrums überprüft. Der Vergleich der Spektren des oxygenierten und deoxygenierten rekombinanten Proteins ließ wesentliche Unterschiede der Zustandsformen erkennen (Abbildung 32): das Absorptionsmaximum der Soret-Bande war von 414 nm im oxygenierten Zustand nach 427 nm im deoxygenierten Zustand verschoben. Außerdem war die Amplitude der deoxygenierten höher als die der oxygenierten Probe. Das deoxygenierte Aliquot zeigte für die α -Bande einen Wert von 558 nm, während die oxygenierte Probe ein Absorptionsmaximum bei 555 nm aufwies. Die charakteristischen Werte der Soret- und der α -Bande wiesen das rekombinante *Danio rerio* Cygb-1-Protein als hexakoordiniertes Globin aus.

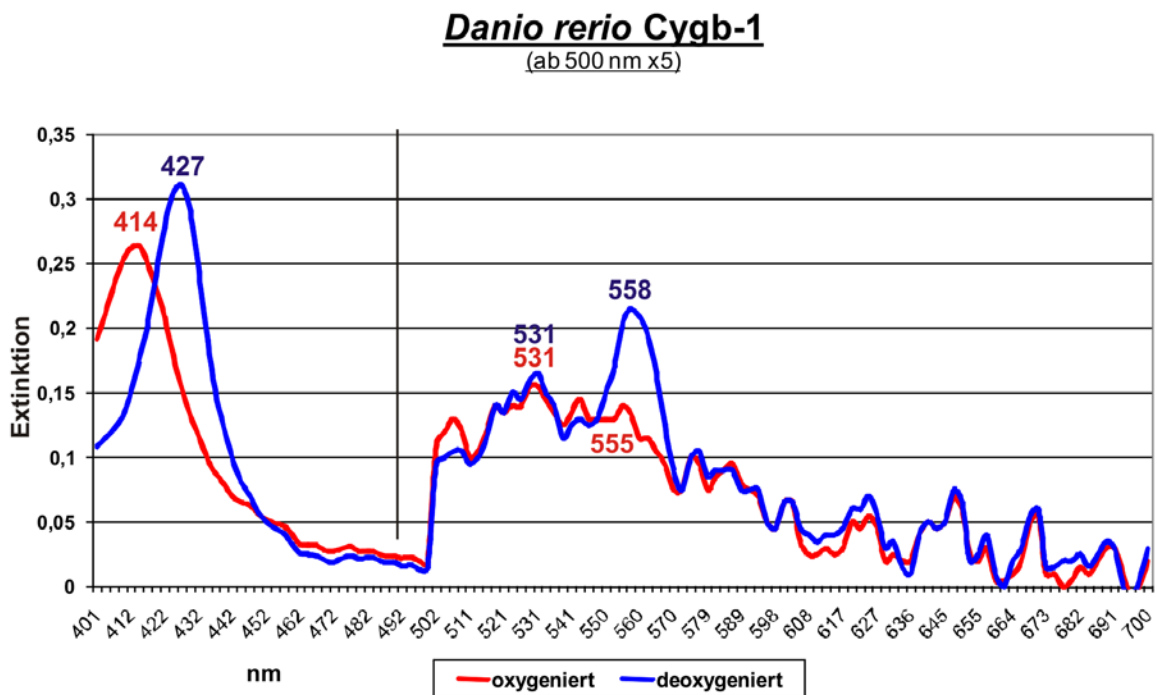


Abbildung 32:

Spektren des oxygenierten bzw. mit Na-Dithionit deoxygenierten, rekombinant exprimierten Cygb-1-Proteins von *Danio rerio*.

Die Werte der lokalen Maxima sind an den Kurven angegeben.

4. Diskussion

4.1. Das „phylogenomische Profil“ von Globinen in Vertebraten

Blut spielt seit jeher in den verschiedensten Kulturen eine wesentliche Rolle. Verantwortlich für diese Bedeutung ist seine bereits früh verstandene Rolle zur Aufrechterhaltung des Lebens. Heute ist bekannt, dass der Gasaustausch als eine wesentliche Funktion des Blutes durch das darin enthaltene Hämoglobin vermittelt wird. Dieses trug zusammen mit dem ebenfalls schon länger bekannten Myoglobin als wesentliches Modell zur grundlegenden Erforschung von Proteinstrukturen und –funktionen bei und diente zur Aufklärung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Tierarten (Kendrew, 1959; Perutz, 1964a, b; Dickerson und Geis, 1983). Kurz vor Beginn dieser Arbeit konnten der Familie der Globine mit der Entdeckung von Neuroglobin und Cytoglobin zwei weitere Mitglieder hinzugefügt werden (Burmester et al., 2000; 2002). In dieser Arbeit wurden die bis dato überwiegend an Mammaliern untersuchten Charakteristika dieser neuen Globine durch gezielte Analysen der Genome von Amphibien und Teleostiern ausgedehnt. Neben den vier bekannten konnten zwei neue Globine detektiert werden, die aufgrund ihrer bisher unbekanntes Funktion als GlobinX und GlobinY bezeichnet wurden. GlobinX wurde in Amphibien und Teleostiern detektiert (Roesner et al., 2005), während GlobinY ausschließlich in Amphibien nachgewiesen wurde (Fuchs et al., 2006). Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Teleostier in ihrem Globinrepertoire über zwei paraloge Kopien des Cytoglobingens verfügen (Fuchs et al., 2005).

Die Analyse der Globine in ihrem phylogenetischen Kontext, Untersuchungen ihrer Sequenz- und Strukturmerkmale und die Charakterisierung ihrer Expressionsmuster in Amphibien und Teleostiern gaben im Vergleich mit den bereits bei Mammaliern bekannten Daten Hinweise auf generelle Eigenschaften dieser respiratorischen Proteine in Vertebraten.

4.1.1. Neuroglobin in Fischen und Fröschen

4.1.1.1. Neuroglobin: konservierter genomischer Kontext seit 420 Millionen Jahren

Die *in silico* Analyse der genomischen Region um Neuroglobin detektierte in den syntänen Bereichen von Krallenfrosch, Mensch, Huhn eine sehr hohe Konservierung der Genanordnung. Die umgebenden Gene waren in Abfolge wie Transkriptionsrichtung in einem Bereich von 5,9 Mb (bezogen auf das humane Genom) identisch, lediglich in *Xenopus* fand sich eine drei Gene umfassende Inversion. Die regionale Konservierung lässt darauf schließen, dass bereits ein letzter gemeinsamer Vorfahre der Tetrapoden vor etwa 330-350 Millionen Jahren (Benton und Donoghue, 2007) über eben diese Genabfolge verfügte. Die weitere Analyse der syntänen Bereiche in den Kugelfischgenomen detektierte ebenfalls eine in Abfolge und Transkriptionsrichtung weitgehende Über-

einstimmung der Gene. Somit ergibt sich eine starke Evidenz für die in Abbildung 33 dargestellte Genabfolge in einem letzten gemeinsamen Vorfahren der Tetrapoden und Teleostier vor etwa 420 Millionen Jahren (Kumar und Hedges, 1998).

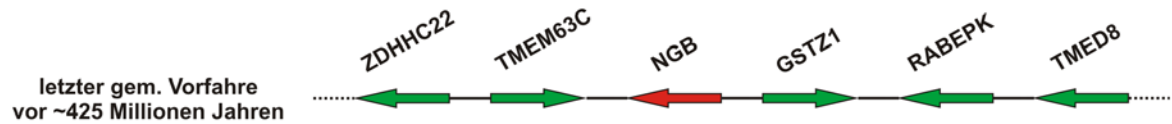


Abbildung 33:
Hypothetische Abfolge und Transkriptionsrichtung der das Neuroglobin-Gen umgebenden Gene in einem gemeinsamen Vorfahren von Sarcopterygii und Actinopterygii vor etwa 420 Millionen Jahren.

In allen bisher analysierten Teleostier-Genomen lag Neuroglobin als Einzelkopie vor, auch wenn es wahrscheinlich im Zuge einer Fisch-spezifischen Genomduplikation (vgl. 4.1.3.2) ursprünglich verdoppelt wurde. Das aus einer solchen Duplikation resultierende polyploide Genom unterliegt nachfolgenden Mechanismen, die nach und nach Gene bzw. Genomabschnitte eliminieren, um so letztlich wieder einen annähernd diploiden Zustand herzustellen (Voff, 2005). Im Zuge eines solchen als „Reduplikation“ bezeichneten Prozesses wurde wahrscheinlich auch eine der beiden das Neuroglobin enthaltenden genomischen Regionen eliminiert. Hinweise darauf gaben die in den Kugelfisch-Genomen ausschließlich als Einzelkopie vorliegenden Gene ZDHHC22, TMEM63C, GSTZ1 und TMED8 der Neuroglobin-Umgebung (vgl. Abbildung 33 und Anhang 7.19). Zwar wird auch die Duplikation großräumiger Bereiche an Stelle des gesamten Teleostier-Genoms diskutiert (Robinson-Rechavi et al., 2001), doch scheint das Szenario der Gesamt-Duplikation eines Vorläufer-Genoms aufgrund des heutigen Wissensstandes wahrscheinlicher (vgl. 4.1.3.2). Die nach einem Duplikationsereignis erhöhte Rate von Rearrangements (Sémon und Wolfe, 2007b, a) könnte die im syntänen Ngb-Bereich der Teleostier zusätzlich gefundenen Gene erklären.

Die das Neuroglobin umgebenden Gene kodieren für Proteine mit unterschiedlichsten Aufgaben: ZDHHC22 repräsentiert ein Zinkfinger-Protein mit Acyltransferase-Funktion, TMEM63C stellt ein Transmembran-Protein mit bisher unbekannter Funktion dar. TMED8 ist ein Transmembran-Protein mit wahrscheinlicher Transporterfunktion für das Endoplasmatische Retikulum. GSTZ1 besitzt als Enzym detoxifizierende Funktionen, Defekte des Proteins führen zu Störungen im Aminosäurestoffwechsel und bedingen beispielsweise die Phenylketonurie. Für GSTZ(-/-)-Knock out-Mäuse konnte gezeigt werden, dass viele der durch GSTZ1-induzierten Enzyme „antioxidative response elements“ (ARE) regulieren. Diese AREs sind sensitiv für oxidativen Stress und werden über den Keap/Nrf2-Stoffwechselweg aktiviert (Blackburn et al., 2006). Eine Beziehung zu Neuroglobin kann jedoch aufgrund des heutigen Wissensstandes für keines dieser Proteine abgeleitet werden.

Gleichwohl zeigt ein neues Projekt, das die Entschlüsselung der Funktionen der nicht für Proteine kodierenden Bereiche des humanen Genoms zum Ziel hat, dass diese entgegen der bisherigen Annahme zum überwiegenden Teil funktionell zu sein scheinen. So konnte das „ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements)-Projekt“ (Gerstein et al., 2007; Weinstock, 2007) zeigen, dass 90% der nicht für Proteine kodierenden Bereiche des menschlichen Genoms vermutlich transkribiert werden und möglicherweise regulatorische Funktionen besitzen. Vor diesem Hintergrund ist die starke Konservierung des gesamten Genombereiches von Neuroglobin neu zu bewerten und auf solche regulatorischen Elemente hin zu untersuchen.

Auch die Konservierung der Intronpositionen ist vor dem von ENCODE gezeigten Hintergrund unter Umständen von einer wichtigeren Funktion als bisher angenommen. Bisher war lediglich bekannt, dass der Vergleich von Intronpositionen Auskunft über die langfristige Evolution eines Gens geben konnte, wenngleich für Globine sowohl die Herkunft wie auch die Positionsstabilität der Introns nicht unumstritten sind (Hankeln et al., 1997; Logsdon et al., 1998). Alle in dieser Arbeit analysierten Globine der Amphibien und Teleostier wiesen die in den meisten Vertebraten und Invertebraten konservierten Introns an den Positionen B12.2 und G7.0 auf (Hardison, 1996; Hankeln et al., 1997; Burmester et al., 2000; Burmester et al., 2002; Fuchs et al., 2005; Roesner et al., 2005; Fuchs et al., 2006). Neuroglobin besitzt zusätzlich zu diesen als ursprünglich angesehenen Globin-Introns (Dixon und Pohajdak, 1992; Hardison, 1996) ein zusätzliches, zentrales Intron an Position E11.0. Für Vertebraten und Pflanzen konnte die Präsenz eines zentralen Introns mit divergenter Position in der E-Helix gezeigt werden (Ebner et al., 2003). Nach ENCODE könnten konservierte Intronpositionen aufgrund bisher unverstandener struktureller Gegebenheiten durchaus funktionelle Relevanz besitzen.

4.1.1.2. Neuroglobin im Sequenzvergleich: ein äußerst stark konserviertes Globin

Nicht nur die genomische Struktur, sondern auch die kodierende Sequenz gibt Auskunft über die Konservierung eines Gens im Laufe der Evolution: die Bewahrung bzw. Veränderung ihrer Länge kann Hinweise auf zum Beispiel hinzugewonnene oder verlorene Signal- oder Funktionsdomänen geben. Für Neuroglobin konnte gezeigt werden, dass die Proteinelänge der Frösche und Fische aufgrund N- und C-terminaler Extensionen leicht von der des Mammalier-Neuroglobins abweicht: das Neuroglobin von *Xenopus tropicalis* ist 13 Aminosäuren länger als das der Mammalier und vier Aminosäuren länger als das Huhns. Die Neuroglobin-Sequenzen der Teleostier sind mit drei bzw. sechs zusätzlichen Aminosäuren am N- bzw. C-Terminus ebenfalls etwas länger als das der Mammalier. Die N-terminalen, zusätzlichen Aminosäuren von Krallenfrosch, Zebrabärbling und Huhn zeigen physikochemische Ähnlichkeiten und legen nahe, dass diese in einem Vorläufer-Neuroglobin vorhanden waren und in den Mammaliern verloren gingen. Ihre Bedeutung ist unklar, Signalpeptide wie beispielsweise Kernlokalisationssignale konnten darin nicht detektiert werden.

Die Aminosäuresubstitutionsrate verhält sich reziprok zur Stärke des Selektionsdrucks auf ein Gen im Laufe der Evolution: ein hoher Selektionsdruck bedingt eine niedrige Substitutionsrate. Für das Neuroglobin der Frösche war die Aminosäuresubstitutionsrate mit $0,61 \times 10^{-9}$ Austauschen etwa doppelt so hoch wie die der Mammalier-Neuroglobine ($0,32 \times 10^{-9}$ Austausche pro Position pro Jahr, (Wystub et al., 2004)), und entsprach fast dem für das Neuroglobin der Vögel berechneten Wert von $0,62 \times 10^{-9}$ Aminosäure-Austauschen pro Position pro Jahr (Kugelstadt et al., 2004). Für das Neuroglobin der Teleostier wurde eine etwas höhere Substitutionsrate von $0,95 \times 10^{-9}$ Austausche pro Position pro Jahr berechnet (Wystub et al., 2004). Im Vergleich mit den für Hämoglobin α und β bzw. Myoglobin der Mammalier berechneten Werten ($1,03 \times 10^{-9}$, $1,17 \times 10^{-9}$ bzw. $0,97 \times 10^{-9}$ Austauschen pro Position pro Jahr, (Wystub et al., 2004)) betragen die Austauschwerte im Neuroglobin der Vertebraten nur ein Drittel bis die Hälfte der im Mammalier-Hämoglobin beobachteten Werte und waren daher als für Globine niedrig einzuordnen. Das Neuroglobin-Gen unterliegt somit einem starken Selektionsdruck und wurde im Verlauf der Evolution nicht nur in Mammaliern, sondern auch in Amphibien und Teleostiern seit über 420 Millionen Jahren sehr gut konserviert. Möglicherweise könnte diese Konservierung Hinweise auf eine über die sauerstoffbindende Fähigkeit hinausgehende Funktion von Neuroglobin geben. Für diese wäre, wie beispielsweise der Vergleich von Neuroglobin zu Myo- bzw. Hämoglobin der Vertebraten zeigt, auch eine Aminosäure-Identität von nur 21-25% (Burmester et al., 2000) ausreichend. Für Neuroglobin wäre daher beispielsweise die eine starke Konservierung erfordernde Funktion als struktureller Interaktionspartner für bislang unbekannte Proteine hypothetisch denkbar.

Für das humane Neuroglobin wurde die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke über die Cysteine an den Positionen CD7 und D5 gezeigt (Hamdane et al., 2004). Die Spaltung einer solchen Disulfidbrücke durch Reduktion oder Modifikation der Cysteinreste geht mit einer Verringerung der O_2 -Affinität um den Faktor 10 einher und legt nahe, dass der Redoxstatus der Zelle eine regulatorische Rolle in der Sauerstoffaffinität der Globine spielt (Hamdane et al., 2004). Ob dies auch für das in dieser Arbeit näher charakterisierte Neuroglobin der Frösche und Fische zutrifft, bleibt abzuwarten. Das Neuroglobin von *Xenopus* verfügte über zwei Cysteinreste an den Positionen D5 und EF4, *Xenopus tropicalis* zeigte diese Aminosäure zudem an Position E19. In den Fischen war lediglich ein Cystein an der helikalen Position D5 konserviert. Daher ist zumindest für das Frosch-Neuroglobin theoretisch die Möglichkeit zur Ausbildung einer internen Disulfidbrücke gegeben, während dies für die Teleostier fast auszuschließen ist. Die einen weiten Bereich des Vertebraten-Stammbaumes abdeckenden Ergebnisse dieser Arbeit relativieren die bisher ausschließlich für das humane Neuroglobin gezeigte Existenz einer intramolekularen Disulfidbrücke und ihrer postulierten physiologischen Bedeutung.

4.1.1.3. Neuroglobin: in Tetrapoden hexakoordiniert

Die Konservierung der essentiellen Aminosäuren, insbesondere des distalen und proximalen Histidins, deutete die generelle Fähigkeit des Neuroglobins von Fröschen zur Sauerstoffbindung an. Tatsächlich zeigte das deutlich rot gefärbte (Abbildung 34), rekombinant exprimierte Neuroglobin-Protein von *Xenopus tropicalis* die Fähigkeit der reversiblen Sauerstoffbindung. Die Spektralanalysen des oxygenierten bzw. deoxygenierten Neuroglobins zeigten mit drei Maxima die Charakteristika hexakoordinierter Globine (Burmester et al., 2000). Die Soretbande mit ihrer hohen Amplitude im Bereich von etwa 425 nm, sowie die α - und β -Banden gaben einen deutlichen Hinweis auf die His-Fe-His-Bindung. Sobald diese durch die Mutation des distalen Histidins aufgehoben wird, ändert sich das Deoxy-Spektrum zu dem eines pentakoordinierten Globins (Dewilde et al., 2001). Diese beispielsweise durch Hämoglobin und Myoglobin repräsentierten Globine weisen aufgrund der ungebundenen sechsten Koordinierungsstelle des Fe^{2+} -Ions lediglich ein Maximum auf (Arredondo-Peter et al., 1997). Die bathochrome Verschiebung der Soretbande im deoxygenierten Zustand beruht somit auf der Bindung des distalen Histidins E7 an die sechste Koordinationsstelle des Eisenions, wodurch der heterozyklische Ring des Histidins das Π -Elektronensystem der Hämgruppe vergrößert und die Absorption in den längerwelligen Bereich verschoben wird. Die damit verbundene Rotverschiebung des Farbtons der deoxygenierten Globine konnte in dieser Arbeit aufgrund der eingesetzten kleinen Proteinmengen optisch nicht beobachtet werden, wurde aber für größeren Volumina beschrieben (Roesner, 2007). Durch die beispielsweise bereits für das humane und murine Neuroglobin gezeigte Hexakoordination (Tabelle 8) und dem in dieser Arbeit für *Xenopus* erbrachten Nachweis konnte das hexakoordinierte Bindungsschema von Neuroglobin als Charakteristikum für alle Tetrapoden gezeigt werden.

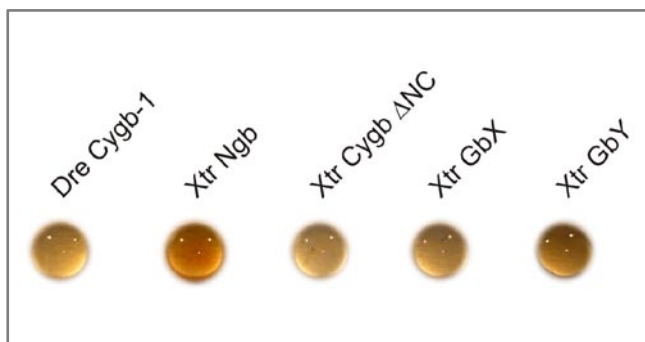


Abbildung 34:
Vergleichende Darstellung des Farbspektrums des rekombinant exprimierten Cytoglobins (Cygb bzw. Cygb Δ NC), Neuroglobins (Ngb), GlobinX (GbX) und GlobinY (GbY) von *Danio rerio* (Dre) bzw. *Xenopus tropicalis* (Xtr) in ihrem Oxy-Zustand.

Die Proteinkonzentrationen sind: Dre Cygb-1: 3,8 mg/ml, Xtr Ngb: 7,9 mg/ml, Xtr Cygb Δ NC: 5,1 mg/ml, Xtr GbX: 4,6 mg/ml, Xtr GbY: 4,0 mg/ml.

Die Hexakoordinierung des Eisenions ist ein phylogenetisch betrachtet sehr altes Prinzip (Burmester et al., 2000) und stellt im Vergleich zu pentakoordinierten Proteinen vermutlich die stammesgeschichtlich ältere Version dar (Kundu et al., 2003; Kiger et al., 2004). Sie wurde ursprünglich in Pflanzen, Cyanobakterien und Invertebraten beschrieben und durch die Entdeckung von Neuroglobin und Cytoglobin erstmals auch in Vertebraten nachgewiesen (Burmester et al., 2000; Burmester et al., 2002; Burmester et al., 2004; Hankeln et al., 2004). Ihre funktionelle Bedeutung ist bisher nicht geklärt. Die Verdrängung des distalen Histidins E7 als interner Ligand und die an-

schließende Bindung eines externen Liganden bewirken eine biphasische Reaktion mit der Lösung des endogenen Liganden als geschwindigkeitslimitierenden Schritt (Dewilde et al., 2001). Es wird vermutet, dass der interne Ligand zu einer geringeren Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffaffinität des Fe²⁺-Ions und einer höheren thermalen Stabilität der Proteine führt (Kiger et al., 2004; Hamdane et al., 2005; Hundahl et al., 2006). Die Ausbildung hexakoordinierter Proteine könnte somit ein möglicher Weg gewesen sein, eine Temperaturunabhängigkeit der Ligandenbindung zu erreichen und die Funktionsfähigkeit der Proteine bei unterschiedlichsten Temperaturen zu gewährleisten. Damit könnte die Hexakoordination für poikilotherme Tiere wie Amphibien und Fische, die zum Teil extremen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind, besonders interessant sein (Kiger et al., 2004; Hundahl et al., 2006). Die in den homoiothermen Mammaliern und Aves nachgewiesenen hexakoordinierten Globine repräsentieren nach dieser Hypothese ein Relikt aus früheren Zeiten der Evolution. Des Weiteren wird eine mögliche Schutzfunktion der Hexakoordination bezüglich oxidativem Stress diskutiert, wodurch die Bildung von zytotoxischen, vierwertigen Eisenionen verhindert wird (Herold et al., 2004).

	Absorptionsmaxima [nm]		Koordination	Quelle
	Oxy	Deoxy		
Xtr Ngb	414/530/563	424/528/560	hexa	diese Arbeit
Hsa Ngb	413/536/561 418/540/572	424/529/559 425/529/559	hexa hexa	Dewilde et al., 2001 Trandafir et al., 2004
Mmu Ngb	426/530/560 411/533/560	423/528/558	hexa hexa	Van Doorslaer et al., 2003 Nienhaus et al., 2004
Sso nHb	414/537/573	426/530/560	hexa	Dewilde et al., 2005
Dre Cygb-1	414/531/555	427/531/558	hexa	diese Arbeit
Xtr Cygb-ΔNC	414/531/565	427/533/560	hexa	diese Arbeit
Hsa Cygb	414/533/563	428/531/559	hexa	Sawai et al., 2003
Rno Cygb	415/531	427/531/560	hexa	Kawada et al., 2001
Xtr GbX	414/530/553/560	427/528/560	hexa	diese Arbeit
Dre GbX	415/536/562	428/531/561	hexa	Rösner, 2007
Xtr GbY	414/532/555	427/531/558	hexa	diese Arbeit

Tabelle 8:

Absorptionsmaxima hexakoordinierter Globine unterschiedlicher Vertebraten-Spezies.

Vergleichend sind unter Angabe der Quelle die Werte der Spektralanalysen (Soret-/ β-, α-Bande) der oxygenierten bzw. deoxygenierten Proteine Neuroglobin (Ngb), „nerve hemoglobin“ (nHb), Cytoglobin (Cygb), GlobinX (GbX) und GlobinY (GbY) folgender Spezies angegeben: *Xenopus tropicalis* (Xtr), *Homo sapiens* (Hsa), *Mus musculus* (Mmu), *Spizula solidissima* (Sso), *Danio rerio* (Dre), *Rattus norvegicus* (Rno).

4.1.1.4. Neuroglobin wird auch in Amphibien und Teleostiern vorwiegend neuronal transkribiert

In dieser Arbeit wurde die Expression von Neuroglobin in adulten Amphibien detailliert per qualitativer und quantitativer RT-PCR untersucht. Die *in silico* verfügbaren EST-Daten von Neuroglobin wurden vergleichend hinzugezogen. Neuroglobin wurde in adulten Krallenfröschen in allen analysierten Geweben nachgewiesen, wenngleich der Nachweis in nicht-neuronalen Geweben oft nur sehr gering war (vgl. Abbildung 18). Der Fokus des Nachweises für Neuroglobin lag eindeutig auf den neuronalen Geweben Hirn und Auge.

Auch im Zebraquerschnitt *Danio rerio* wurde Neuroglobin im Rahmen dieser Arbeit in Hirn und Auge detektiert. Außerdem wurde das Globin im olfaktorischen Gewebe und erstmals in den Kiemen von *Danio* nachgewiesen.

Neuroglobin in Geweben adulter Vertebraten										
	Nachweis	Hirn	Herz	Leber	Darm	Lunge	Muskel	Auge	Ovar	Niere
Amphibien	EST	+	k.A.	k.A.	+	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
	Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Quantitative RT-PCR	++	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
Teleostier	diese Arbeit, Literatur	+	+	+	k.A.	k.A.	k.A.	+	k.A.	k.A.
Mammalier	Literatur	++	k.A.	k.A.	+	+	k.A.	+++	k.A.	k.A.

Tabelle 9:

Nachweis von Neuroglobin in adulten Vertebraten.

Die Tabelle fasst die Nachweise von Neuroglobin in verschiedenen Geweben adulter Vertebraten zusammen. „+“ indiziert einen Nachweis durch einen *in silico* EST-Eintrag, für alle anderen Gewebe konnte keine Angabe („k.A.“) gemacht werden. Die positiven Nachweise der qualitativen und quantitativen RT-PCR sind durch die grüne Farbe und das „+“ gekennzeichnet, der stärkste Nachweis ist durch „+++“ verdeutlicht. „-“ indiziert einen durchgeführten Nachweis mit negativem Resultat, „n.d.“ steht für einen nicht durchgeführten Versuch. Die zusätzlichen, positiven Neuroglobin-Nachweise der Teleostier (blau) bzw. Mammalier (rot) sind der Literatur entnommen (Burmester et al., 2000; Awenius et al., 2001; Reuss et al., 2002; Wystub et al., 2003; Roesner et al., 2005; Fordel et al., 2007; Wystub, 2007).

Die gewebespezifische Expression von Neuroglobin in Amphibien entsprach den bereits bei Mammaliern erhobenen Daten (vgl. Tabelle 9). Im Menschen wurde Neuroglobin neben dem Hirn und der Retina als prädominanten Expressionsorten auch in Lunge und Darm detektiert (Burmester et al., 2000; Zhang et al., 2001; Mammen et al., 2002; Reuss et al., 2002; Schmidt et al., 2003; Wystub et al., 2003; Laufs et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Weiterhin wurde Neuroglobin in vorwiegend endokrinen Geweben der Maus nachgewiesen: in der Adenohypophyse (Reuss et al., 2002; Wystub, 2007), der Nebenniere und dem Pinealorgan (Wystub, 2007) wurde Neuroglobin genauso detektiert, wie in den Spermatogonien der Testes (Reuss et al., 2002; Wystub, 2007) und den Langerhans-Zellen des Pankreas (Geuens et al., 2003). Diese Nachweise der Neuroglobin-Expression waren nicht auf das murine System beschränkt, sondern wurden auch in Mensch und Ratte erbracht (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002).

Basierend auf der regional weit verbreiteten Detektion von Neuroglobin im Gehirn von Säugern (Mammen et al., 2002; Reuss et al., 2002; Zhang et al., 2002; Wystub et al., 2003) wurde die zelluläre Expression in Teleostiern näher untersucht. Diese Analyse wurde durch mRNA-*in situ*-Hybridisierungen an frontalen Kopf-Kryosektionen von *Danio rerio* durchgeführt, die neben dem Gehirn auch die Augen, das Riechorgan und die Kiemen umfassten. Im Gehirn von *Danio* konnte die Neuroglobin-mRNA deutlich in distinkten Bereichen des Telencephalons, des Diencephalons und Arealen des Mesencephalons wie auch des Rhombencephalons nachgewiesen werden. Die Signale wurden dabei ausschließlich perinukleär in neuronalen Somata, nicht jedoch in Gliazellen detektiert. Die Nachweise entsprachen damit im Wesentlichen den bereits aus dem murinen System bekannten Lokalisationen (Mammen et al., 2002; Reuss et al., 2002; Wystub et al., 2003; Wystub, 2007). Neben dem Hypothalamus als einem wesentlichen Zentrum zur Aufrechterhaltung basaler Körperfunktionen wurden besonders starke Signale auch im *Tectum opticum* von *Danio rerio* detektiert. Dieser Nachweis im Zentrum zur Verarbeitung optischer Reize erscheint hinsichtlich des ebenfalls starken Neuroglobin-Signals in der Retina des Zebraabärlings folgerichtig.

In der Retina von *Danio* wurde die Neuroglobin-mRNA prinzipiell in den gleichen Schichten detektiert wie in der Netzhaut von Maus (Schmidt et al., 2003; Schmidt et al., 2005) und Rind (Schmidt et al., 2003). Im Unterschied zu den Mammaliern konnte jedoch in der Retina des Teleostiers ein deutlich stärker ausgeprägter Nachweis mit mitochondriennaher Lokalisation in den inneren Segmenten der Photorezeptoren beobachtet werden (Fuchs et al., 2004). Dieser Unterschied zu den Mammaliern könnte in der unterschiedlichen Adaptation des Fischauges begründet sein: während Mammalier den Lichteinfall auf die Photorezeptoren bei zunehmender Helligkeit durch die Verengung der Pupille regulieren, ist die Pupille der meisten Fische unbeweglich (Douglas et al., 1998). Teleostier regulieren die Intensität des Lichteinfalls durch das aktive Einziehen der konischen Photorezeptoren in die Pigmentzellschicht (Burnside, 1978). Der mitochondriennahe Nachweis könnte für eine Funktion von Neuroglobin im Sauerstoffmetabolismus sprechen, da die Retina als ein sehr stoffwechselaktives Gewebe mit hohem Energieverbrauch bekannt ist (Yu und Cringle, 2001).

Erstmalig wurde in dieser Arbeit die Lokalisation der Neuroglobin-mRNA im olfaktorischen Gewebe eines Teleostiers nachgewiesen. Bei Mammaliern ist dieses Gewebe gut durch Knochenstrukturen geschützt und wurde daher bislang nicht näher untersucht, wengleich Ergebnisse eines „mRNA-Master-Blots“ Neuroglobin-mRNA im menschlichen *Bulbus olfactorius* nachweisen konnten (Burmester et al., 2000). Im Zebraabärling fanden sich besonders deutliche Neuroglobin-Nachweise im sensorischen Teil des Riechepithels, im *Bulbus olfactorius* und der weiteren Riechbahn (Telencephalon und olfaktorischer Cortex). Von Fischen ist die starke Ausprägung des Geruchssinnes bekannt: Lachse beispielsweise finden ihre Heimatgewässer über tausende von Kilometern hinweg durch den spezifischen Geruch des Wassers wieder (Bargmann, 1996). Damit ist von einer beson-

deren Ausprägung des olfaktorischen Organs in Teleostiern auszugehen, die mit einem erhöhten Energiebedarf korrelieren und eine Funktion von Ngb im Sauerstoffmetabolismus nahe legen könnte.

Auch in den Kiemen von *Danio rerio* wurde ein deutliches Neuroglobin-Signal der *in situ*-Hybridisierung detektiert. Dieses war mit den Chloridzellen der Kiemen zu assoziieren. Die Kiemen stellen das respiratorische Organ der Fische dar, doch neben der Aufgabe des Gasaustausches konnte für dieses Gewebe auch eine wesentliche Rolle im Ionenaustausch und der Exkretion beobachtet werden (Claiborne et al., 2002; Marshall, 2002; Rombough, 2002; Tse et al., 2006; Rombough, 2007). Unter hypoxischen Bedingungen können Fische beispielsweise ihren Stoffwechsel umstellen und Lactat zu Alkohol verstoffwechseln, der über die Kiemen abgegeben werden kann. Dieser mit einem Energieverlust einhergehende Metabolismus verhindert das Übersäuern der Muskulatur der Fische und ermöglicht ihnen auf diese Weise das Überleben langer Perioden unter reduzierten Sauerstoffbedingungen, wie sie beispielsweise in zugefrorenen Gewässern auftreten können (Bickler und Buck, 2007). Auch die Kiemen der Fische sind, wie das Gehirn und die Retina, als stark sauerstoffverbrauchende Gewebe bekannt (Johansen und Pettersson, 1981; Lyndon und Houlihan, 1998). Die Chloridzellen sind in Süßwasserfischen für die Aufnahme von Ca^{2+} -, Cl^- - und möglicherweise auch Na^+ -Ionen aus dem Wasser zuständig und als sehr mitochondrienreich bekannt (Perry, 1997; Rombough, 2002, 2007). Wie bereits in den Photorezeptorzellen der Retina ist also auch in den Kiemen eine Assoziation von Neuroglobin in sehr mitochondrienreichen Zellen zu beobachten. Für Neuroglobin wird damit eine Rolle im Sauerstoffmetabolismus nahe gelegt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit für Neuroglobin eine eindrucksvolle Konservierung in allen bisher analysierten Vertebraten gezeigt werden: das Gen liegt in einem seit mindestens 420 Millionen Jahren konservierte Bereich und unterliegt durch eine für Globine sehr niedrige Substitutionsrate einer starken reinigenden und damit erhaltenden Selektion. Der generelle Nachweis in Mammaliern, Amphibien und Teleostiern wie auch die sehr gut übereinstimmende Lokalisation in annähernd den gleichen Geweben adulter Tiere und – wie das Beispiel der Retina überzeugend belegt – auch den gleichen Zellen lässt eine essentielle Funktion von Neuroglobin in allen Vertebraten vermuten.

In dieser Arbeit wurde zudem erstmals ein detailliertes, temporäres Expressionsprofil von Neuroglobin in einem sich entwickelnden Vertebraten erstellt. Die sich extrakorporal entwickelnden Nachkommen von Amphibien stellten ein für diese Analyse perfektes System dar und standen damit im Gegensatz zu der intrakorporalen Entwicklung der Mammalier. Zudem wiesen die Krallenfrösche eine hohe Zahl von Nachkommen auf und entwickelten sich sehr schnell. Trotz aller Nachteile wurde die mRNA von Neuroglobin in ersten Versuchen auch in den Gehirnen muriner Embryonen nachgewiesen (Laufs, unveröffentlicht).

Die aus adulten Tieren bekannte, vorwiegend neuronale Expression von Neuroglobin führte im Vorfeld des Versuches zu der Annahme einer erstmaligen Expression des Globins zu Beginn der Neurulation. Diese beginnt in *Xenopus* etwa in Stadium NF 12,5 und dauert bis NF 22 an. Überraschenderweise wurden in diesen frühen Stadien jedoch noch keine Neuroglobin-Signale detektiert. Auch EST-Einträge für Neuroglobin waren nicht nachweisbar, obwohl Datenbanken der entsprechenden Entwicklungsstadien existieren. Erste experimentell gesicherte Nachweise einer Neuroglobin-Transkription wurden ab NF 37-38 erbracht (vgl. Tabelle 10). Diese unerwartete zeitliche Diskrepanz zum Beginn der Neurogenese lässt sich durch deren dreistufigen Verlauf der in *Xenopus* schlüssig erklären (Schlosser et al., 2002). Demnach werden in der ersten Phase (NF 9-26) massiv sensorische und motorische Neurone generiert, in der zweiten Phase (NF 22-46) werden nur wenige, überwiegend Interneurone gebildet, die im weitesten Sinne auch sekundäre Sinneszellen und andere Projektionsneurone mit einschließen. Die dritte Phase (NF 46-53) zeichnet sich durch zwei Mechanismen aus: einerseits steigt die Neurogenese durch die beginnende Innervierung der Extremitätenanlagen massiv an, andererseits werden besonders zu Beginn der Metamorphose in einem apoptotischen Prozess viele Motoneurone und sensorische Sinneszellen abgebaut (NF 48-53, (Schlosser et al., 2002). Der primäre Nachweis von Neuroglobin-mRNA fällt demnach mit der zweiten Neurogenese-Phase in *Xenopus* zusammen. In dieser Phase werden die sekundären Sinneszellen gebildet, zu denen neben den Geschmacksrezeptoren, die Haarzellen des Innenohres, die Sinneszellen des Gleichgewichtsorgans und – physiologisch (wenn auch nicht anatomisch) gesehen – die Photorezeptoren der Retina zählen.

In der Whole Mount *in situ*-Hybridisierung der *Xenopus*-Embryonen von NF 24/25 wurde ein deutliches Signal im Kopfbereich und der Augenanlage beobachtet. Die tatsächliche Lokalisation des Signals im ZNS konnte durch den Einsatz des *neuronalen Ribonukleoproteins-1 (Nrp-1)* als neuronalem Marker bestätigt werden. In den späteren Stadien NF 37/38 wurde das Neuroglobin-Signal in der Ohrplakode lokalisiert. Der Nachweis in der Augenanlage wie auch der Ohrplakode ist mit der postulierten Expression von Neuroglobin in sekundären Sinneszellen während der *Xenopus*-Entwicklung kompatibel. Der Neuroglobin-Nachweis dieser Stadien wurde durch den Nachweis eines EST-Eintrages in einer aus Gehirn und Rückenmark der Stadien NF 37/38 erstellten Datenbank unterstützt.

In der beginnenden Metamorphose (NF 51) zeigte die Neuroglobin-Expression ihren Höhepunkt in der *Xenopus*-Entwicklung (Tabelle 10) und fiel temporär mit der die beginnende Innervierung der Extremitätenanlagen begleitenden Umgestaltung des Nervensystems zusammen. In dieser Phase bilden sich bevorzugt Motoneurone und sensorische Neurone („dorsal root ganglia“). Zeitlich danach werden in einem apoptotischen Prozess larvale Neurone abgebaut (Schlosser et al., 2002). Diese werden in Folge der morphologischen Umgestaltungen der schwanztragenden Larve zum typischen „Frosch“ mit je zwei Vorder- und Hinterextremitäten ohne Schwanz nicht mehr benötigt und eliminiert, was die Abnahme der Neuroglobin-Expression ab Stadium 54 erklären könnte.

Neuroglobin in der Entwicklung von Krallenfröschen														
Nachweis	6-10	9-13	15-19	20-25	37-38	45-46	47	48	49	50	51	54	>54	>60
EST	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Qualitative RT-PCR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quantitative RT-PCR	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	++	+	+	+
WMHIS	n.d.	n.d.	n.d.	Auge Hirn	Kopf Ohrpl.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 10:

Nachweise von Neuroglobin in der Entwicklung von *Xenopus*.

Die Tabelle fasst die experimentellen bzw. durch *in silico*-Analysen erbrachten Nachweise von Neuroglobin in der Entwicklung von *Xenopus* zusammen. Das „+“ indiziert einen in diesem nach Nieuwkoop und Faber (NF) eingeteilten Stadium verfügbaren EST-Eintrag, das „-“ deutet entsprechend einen negativen Nachweis in der vorhandenen Datenbank an. Die positiven Nachweise der qualitativen und quantitativen RT-PCR sind durch die grüne Farbe und das „+“ gekennzeichnet, der stärkste Nachweis der quantitativen RT-PCR ist durch „++“ verdeutlicht. „-“ indiziert einen durchgeführten Nachweis mit negativem Resultat, „n.d.“ steht für einen nicht durchgeführten Versuch. Die in der WMHIS detektierten Organe sind in angegeben. Ohrpl = Ohrplakode.

Vergleichende Daten in Säugern liegen aufgrund der deutlich schwereren Probengewinnung bisher lediglich in ersten Versuchen aus murinen Embryonen vor (Laufs, unveröffentlicht): durch die mittels quantitativer Real-Time RT-PCR durchgeführten Versuche wurde die Neuroglobin-mRNA im murinen Fötalstadium 10 schwach nachgewiesen. Bis zur Geburt und darüber hinaus bis in adulte Mäuse von 6 Wochen wurde dann ein kontinuierlicher Anstieg von Neuroglobin detektiert. Die Geburt ist ein kritischer Moment in der Säugerentwicklung und für das Auftreten hypoxischer Zustände bekannt (Bickler und Donohoe, 2002). Zudem ist der neugeborene Organismus einem weitaus höheren Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt als im Mutterleib (Felderhoff-Mueser et al., 2004). Unter der Hypothese, dass Neuroglobin eine Funktion als Hypoxieschutz besitzt, könnte die Heraufregulation der mRNA um den Geburtszeitpunkt und danach einen Schutz vor Hypoxie darstellen. Zudem ist der neugeborene Organismus beispielsweise durch die sich teilenden und differenzierenden Zellen stark stoffwechselaktiv und produziert in seinem steigenden Metabolismus zunehmend „reactive oxygen species“ (ROS): auch in deren Detoxifikation könnte Neuroglobin eine mögliche Rolle spielen (Herold et al., 2004; Fordel et al., 2007).

Aufgrund der systemischen Unterschiede in der Entwicklung von Krallenfrosch und Maus sind die Ergebnisse der Neuroglobin-Expression in *Xenopus*-Embryonen nicht direkt mit denen des murinen Systems vergleichbar: weder weisen die *Xenopus*-Embryonen eine Geburt, noch die Maus-Embryonen eine Metamorphose auf.

Zusammenfassend konnte für Neuroglobin in der Entwicklung von Krallenfröschen durch Real-Time RT-PCR-Versuche eine Expression gezeigt werden, die mit der Entstehung von sekundären Sinneszellen korreliert zu sein scheint. Dieses Ergebnis wurde durch den Neuroglobin-Nachweis per WMHIS in der Augenanlage und der Ohrplakode unterstrichen. Der ebenfalls mit dieser Methode erbrachte Nachweis von Neuroglobin im Bereich des sich entwickelnden Gehirns wurde durch einen aus diesem Gewebe stammenden EST-Eintrag abgesichert. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die aus adulten Tieren bekannte, neuronale Expression von Neuroglobin auch für die Entwicklungsstadien von *Xenopus* Gültigkeit besitzt.

4.1.2. Das Neuroglobin-verwandte GlobinX ist auf Amphibien und Teleostier beschränkt

4.1.2.1. Phylogenetische Analysen geben Hinweise auf zwei Globin-Familien im Tierreich

In dieser Arbeit konnte in Amphibien das bereits in Teleostiern nachgewiesene und dort neu entdeckte GlobinX detektiert werden (Roesner et al., 2005). Der *in silico*-Nachweis in den Genomen anderer Vertebraten-Spezies blieb erfolglos und eine zukünftige Detektion ist in den Amnioten aufgrund der fortgeschrittenen Aufklärung der Säuger Genome unwahrscheinlich. Damit ist GlobinX auf die Anamnia (Amphibien und Teleostier) beschränkt. Vergleiche zeigten, dass GlobinX mit 26-35% die größte Sequenz-Ähnlichkeit mit dem Neuroglobin der Vertebraten aufweist, während die Similaritäten von GlobinX zu Myoglobin mit 18-26%, zu Hämoglobin mit 15-25% und Cytoglobin der Vertebraten mit 22-26% deutlich geringer sind (Roesner et al., 2005).

Die Einordnung in den phylogenetischen Stammbaum der Vertebraten-Globine zeigte GlobinX in einer distinkten Gruppe mit Neuroglobin (vgl. Abbildung 7). Damit muss dieses Globin bereits vor der Trennung von Tetrapoden und Knochenfischen vor 420 Millionen Jahren existiert haben (Benton, 1990; Benton und Donoghue, 2007). Ein um die Globine von Protostomiern erweiterter Stammbaum (Abbildung 35, nach Roesner et al., 2005) zeigte die Bildung von drei Hauptästen: in Linie (1) fanden sich die meisten Globine der Invertebraten, während sich in Linie (2) die Hämoglobine, Myoglobine und Cytoglobine der Vertebraten einordneten. Neuroglobin und GlobinX hingegen fanden sich in Linie (3) in einem ursprünglicheren Ast zusammen mit diversen Globinen von Protostomiern wie Deuterostomiern wieder. Dies belegt *i.* dass die Linien (1) und (2) divergierten, als sich Protostomier und Deuterostomier trennten (Roesner et al., 2005), *ii.* dass die Linie (3)

eine sehr viel ursprünglichere Stellung einnimmt und wahrscheinlich schon vor der Auftrennung der Protostomier und Deuterostomier vor 600-700 Millionen Jahren existierte (Burmester et al., 2000) und *iii.* dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Bilateria zumindest über zwei distinkte Vorläufer-Globine verfügte: eines bildete in Folge unter anderem den Ursprung für Neuroglobin und GlobinX der Vertebraten, das andere legte die Grundlage für die Metazoenglobine der Linien (1) und (2) (Roesner et al., 2005).

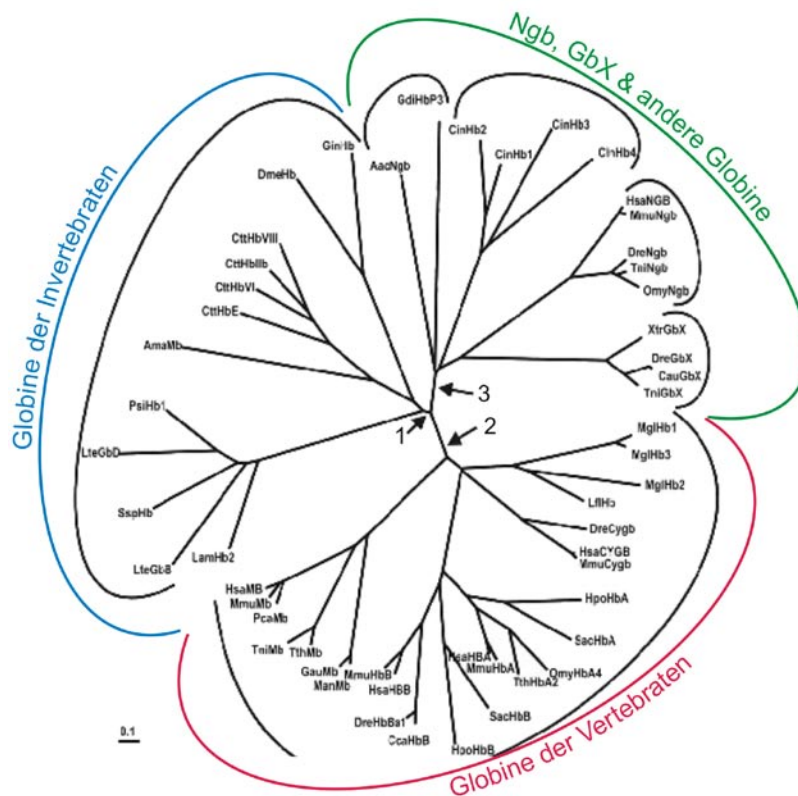


Abbildung 35:
Neighbor Joining-Stamm-
baum ausgewählter Glo-
bine des Tierreiches
 Der Baum basiert auf einer WAG Substitutionsmatrix mit Gamma-Korrektur, die Ziffern bezeichnen die im Text angegebenen Verzweigungen (verändert nach Roesner et al., 2005).

Nach dem heutigen Wissen lassen sich die beiden Globin-Familien weder nach strukturellen noch funktionellen Aspekten eindeutig voneinander abgrenzen: in beiden Familien finden sich penta- und hexakoordinierte Globine (Pesce et al., 2002; Burmester und Hankeln, 2004; Roesner et al., 2005) ebenso wie O₂-speichernde, myoglobinähnliche und O₂-transportierende, hämoglobin-ähnliche Proteine. Dies belegt die Flexibilität innerhalb der Superfamilie der Globine hinsichtlich Struktur und Funktion und verdeutlicht den Beitrag erweiterter Datensätze zu einem fortschreitenden Verständnis evolutionärer Prozesse und der zum Teil immer noch unbekanntem Globinfunktionen.

4.1.2.2. Der Verlust von GlobinX in Amnioten ist wahrscheinlich auf genomische Rearrangements zurückzuführen

Die Analyse des syntänen genomischen Bereiches von GlobinX im tropischen Krallenfrosch und in den Kugelfischen detektierte die Konservierung jeweils eines in Anordnung und Transkriptionsrichtung identischen, flankierenden Gens in der unmittelbaren Umgebung von GlobinX. Die Anordnung 5'-SRP14-3' → 3'-GbX-5' → 3'-PLEKHG3-5' besteht damit seit mindestens 420 Millionen Jahren (Kumar und Hedges, 1998). In *Danio rerio*, dessen Genom fortschreitend geordnet wird, war GlobinX auf einem nicht näher zugeordneten Scaffold ebenfalls in der direkten Nachbarschaft von SRP14 und PLEKHG3 verzeichnet, weitere Gene fanden sich auf diesem Genomabschnitt nicht. Im humanen Genom war SRP14 auf Chromosom 15, PLEKHG3 hingegen auf Chromosom 14 annotiert. Die fehlende Konservierung der genomischen Umgebung von GlobinX in Säugern indiziert ein Rearrangement dieses Bereiches, in dessen Folge das Globin in einem Mammalier-Vorläufer verloren ging.

4.1.2.3. Zwei GlobinX-Gene in *Xenopus tropicalis*?

Die Analyse der Genom-Struktur von GlobinX belegte für Amphibien Introns an den Positionen B12.2, E10.0, G7.0 und H10.0 (vgl. Abbildung 8), die der aus Fischen bekannten Verteilung entsprachen (Roesner et al., 2005). Während die Introns der Positionen B12.2 und G7.0 als die in den meisten Vertebraten- wie Invertebraten-Globinen konservierten und damit ursprünglichen gelten (Dixon und Pohajdak, 1992; Hardison, 1996), konnte das Intron an Position H12.0 bisher in keinem anderen Globin detektiert werden. Dies führte zu der Vermutung, dass dieses Intron erst nach der Trennung von GlobinX und den anderen Globinen entstanden ist (Fuchs et al., 2006). Bei einem Vergleich der zentralen Introns E11.0 von GlobinX und E10.2 von Neuroglobin fiel die um lediglich ein Nukleotid verschobene Position auf. Obwohl denkbar ist, dass die Introns der E-Helix in beiden Globinen unabhängig voneinander entstanden sind, erscheint diese Hypothese aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft beider Genlinien eher unwahrscheinlich. Hinsichtlich der wahrscheinlichen Entstehung aus einem gemeinsamen Vorläufer-Globin könnten Neuroglobin und GlobinX damit als Beispiel für die sehr seltene Verschiebung der Exon-Intron-Grenze („intron sliding“) dienen, deren genauer Mechanismus bisher lediglich durch das sehr unwahrscheinliche, gleichzeitige Stattfinden zweier unabhängiger Mutationsereignisse erklärt werden kann (Stoltzfus et al., 1997). Ein zentrales Intron in der E-Helix mit leicht divergenter Position konnte in diversen Globinen verschiedener Vertebraten, Invertebraten und Pflanzen gezeigt werden (Hankeln et al., 1997; Ebner et al., 2003). Die vier Hämoglobine der Seescheide *Ciona intestinalis*, die eine phylogenetische Nähe zu Neuroglobin zeigen, verfügen ebenfalls über ein Intron an Position 10.2 (Ebner et al., 2003). Dies lässt die Spekulation zu, dass das zentrale Intron der E-Helix frühzeitig in der Evolution und möglicherweise an Position E10.2 entstanden war. Anderer-

seits könnte die E-Helix der Globine aufgrund bisher unverstandener struktureller Gegebenheiten die Entstehung zusätzlicher Introns begünstigen.

Das GlobinX-Protein von *Xenopus tropicalis* war mit 200 Aminosäuren deutlich länger als das humane Neuroglobin mit 151 Aminosäuren, zeigte jedoch eine identische Länge mit dem GlobinX von Zebraquappe und Goldfisch (Roesner et al., 2005). Die zusätzlichen Aminosäuren des GlobinX sind auf N- und C-terminale Extensionen von etwa 25 Aminosäuren zurückzuführen, die laut PSORT II (Nakai und Horton, 1999) keinerlei Signal-Peptid enthalten. Wie für das GlobinX der Fische (Roesner et al., 2005) wurde laut dieser Analyse auch für das Protein des tropischen Krallenfrosches eine cytoplasmatische Lokalisation vermutet. Die Analyse zeigte zudem, dass sich der N-Terminus des GlobinX-Proteins der Amphibien wie auch der Teleostier aufgrund der durch die Aminosäuren vermittelten Ladungsbedingungen in die Zellmembran integrieren könnte.

Die durchschnittliche Substitutionsrate von GlobinX, die basierend auf der als wahrscheinlich angesehenen Divergenz der Actinopterygii und Sarcopterygii vor etwa 420 Millionen Jahren (Benton, 1990) ermittelt wurde, war mit $0,89 \times 10^{-9}$ Aminosäuren pro Position pro Jahr etwas höher als die des Neuroglobins der Krallenfrösche, doch niedriger als der für das Myoglobin der Mammalier berechnete Wert von $0,97 \times 10^{-9}$ Austausche pro Position pro Jahr (Wystub et al., 2004).

Gleichzeitig zeigten die unabhängig in zwei tropischen Krallenfröschen erbrachten Sequenzierungen der GlobinX-Amplifikate in dieser Arbeit deutliche Polymorphismen an spezifischen Stellen der kodierenden Sequenz. Dieser Befund führte zu der Idee, dass das GlobinX-Gen dupliziert in *Xenopus tropicalis* vorliegen könnte, wenngleich ein entsprechender Nachweis in der Genom-Datenbank nicht erbracht werden konnte (Stand Juni 2007). Gleichwohl zeigte die aus einem stark ingezüchteten tropischen Krallenfrosch stammende Datenbanksequenz ein Mosaik-Muster der Austausche gegenüber den verschiedenen, im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Varianten von GlobinX (vgl. Abbildung 14). Dieses Mosaik könnte möglicherweise durch den Verlust eines GlobinX-Gens durch ungleiches oder intrachromosomales „Crossing-over“ in dem ingezüchteten Krallenfrosch entstanden sein, wie es beispielsweise für die Globine von *Chironomus thummi* bekannt ist (Trewitt et al., 1995). Durch Rekombinationen über Heteroduplex-Strukturen und Genkonversionen können letztlich Sequenzmosaike entstehen (Bollag et al., 1992). In den zwei in dieser Arbeit analysierten tropischen Krallenfröschen hingegen deuteten die erbrachten cDNA-Daten auf eine schrittweise Entwicklung des funktionellen GlobinX zu einem infunktionellen Pseudogen hin: neben der Sequenz für ein intaktes GlobinX-Protein konnte eine kodierende Version mit einem Prolin anstelle des Histidins F8 detektiert werden. Dieses Protein weist zwar immer noch die charakteristische Globin-Faltung auf, kann jedoch kein Häm binden und ist infunktionell. Zudem konnte eine weitere Version sequenziert werden, in der eine Punktmutation zu einem die Translation vorzeitig beendenden, vorgezogenen Stopp-Codon führt.

Da GlobinX ähnlich konserviert war wie Neuroglobin, war das Auftreten einer Punktmutation in den von *Xenopus* sequenzierten cDNAs umso erstaunlicher. Diese deutet unter Umständen auf das Vorhandensein von zwei Genvarianten für GlobinX in dem tropischen Krallenfrosch hin. Neben dem Cytoglobin der Teleostier wäre das GlobinX der Krallenfrösche ein weiteres Beispiel für ein dupliziert vorliegendes Globin.

Die rekombinant exprimierte, funktionelle Version von GlobinX des afrikanischen Krallenfrosches zeigte die Charakteristika eines hexakoordinierten Bindungsschemas für Sauerstoff und entsprach in dieser Eigenschaft sowohl dem rekombinant exprimierten GlobinX des Zebraärbblings (Roesner, 2007) als auch dem des phylogenetisch nächsten Verwandten, dem Neuroglobin. Weitere Untersuchungen zur Ligandenbindung von GlobinX auf Basis des in dieser Arbeit rekombinant exprimierten Proteins stehen noch aus.

4.1.2.4. GlobinX: in Amphibien und Teleostiern ubiquitär exprimiert

In der *Xenopus*-Entwicklung wurde die *GlobinX*-mRNA temporär von den ersten Stadien an detektiert und unterschied sich damit grundlegend von den Expressionsmustern der anderen Globine (vgl. Abbildung 18 und Tabelle 11). Der Nachweis zum Zeitpunkt der beginnenden Transkription embryonaler Gene in der „midblastula transition“ (NF 8-9) indizierte eine wahrscheinlich grundlegende Funktion von GlobinX in der Embryonalentwicklung. Das detektierte Signal war vergleichsweise schwach und die mRNA von GlobinX daher gegenüber den anderen Globinen unterrepräsentiert. Dies erklärt das Fehlen von EST-Datenbankeinträgen für GlobinX in *Xenopus*-Embryonen. Ein Vergleich der absoluten mRNA-Kopienzahlen in Stadium 51, der beginnenden Metamorphose, verdeutlicht die geringe Expressionsstärke von GlobinX gegenüber Neuroglobin, Cytoglobin und GlobinY: in diesem Stadium der maximalen GlobinX-Transkription sind etwa 38 Mal mehr Cytoglobin-, 128 Mal mehr Neuroglobin- und 436 Mal mehr GlobinY-mRNA-Moleküle nachweisbar (Abbildung 36A).

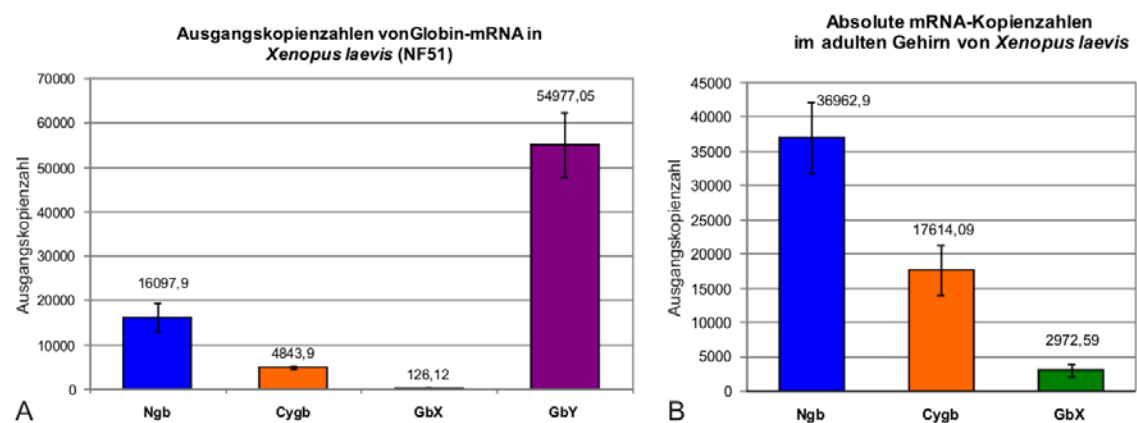


Abbildung 36: Kopienzahlen ausgewählter Globine in der Entwicklung (NF 51 (A)) und adultem Gehirn (B) von *Xenopus laevis*.

Räumlich lokalisierte die WMHIS GlobinX-mRNA in den jüngeren *Xenopus*-Stadien besonders im Bereich der optischen Vesikel, in den älteren Embryonen (NF 36-37) im Bereich des Hinterhirns und der Ohrplakode. Auch in adulten Krallenfröschen wurde die mRNA dieses Globins bevorzugt in Gehirn und Auge detektiert, wenngleich auch in diversen Organen (Herz, Leber, Darm, Lunge, Ovar, Niere) Nachweise erbracht werden konnten. Diese vorwiegend mit neuronalen Strukturen assoziierten Nachweise lassen sich angesichts der phylogenetischen Verwandtschaft von GlobinX mit Neuroglobin erklären und suggerieren eine primäre Rolle von GlobinX im ZNS.

GlobinX im sich entwickelnden Krallenfrosch															
	Nachweis	6-10	9-13	15-19	20-25	37-38	45-46	47	48	49	50	51	54	>54	>60
Xenopus	EST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Quantitative RT-PCR	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	WMHIS	n.d.	n.d.	n.d.	Opt.V.	Hirn, Ohrpl.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GlobinX im adulten Krallenfrosch bzw. Goldfisch															
	Nachweis	Gehirn	Herz	Leber	Darm	Lunge	Muskel	Auge	Ovar	Niere					
Xenopus	EST	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	-	+	+	+					
	Quantitative RT-PCR	+	+	+	+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.					
cau	Literatur	+	+	+	+	n.d.	+	+	n.d.	+					

Tabelle 11:

Nachweise von GlobinX in *Xenopus* und dem Goldfisch *Carassius auratus*.

Die Tabelle fasst die experimentellen bzw. durch *in silico*-Analysen erbrachten Nachweise von GlobinX in *Xenopus* zusammen und vergleicht sie für die adulten Tiere mit den aus dem Goldfisch *Carassius auratus* bekannten Daten. Für GlobinX wurde weder in Entwicklungsstadien noch Geweben adulter Tiere ein EST-Eintrag detektiert. Die durch die qualitative und quantitative RT-PCR erbrachten positiven Nachweise sind in *Xenopus* durch die grüne Farbe und das „+“ kenntlich gemacht, ein „-“ symbolisiert einen durchgeführten Versuch mit negativem Resultat. Nicht durchgeführte Versuche sind durch „n.d.“ kenntlich gemacht. Opt.V. = optischer Vesikel; Ohrpl. = Ohrplakode. Die Daten des Goldfisches *Carassius auratus* (Cau) wurden nach Roesner et al., 2005 und Roesner, 2007 vergleichend ergänzt.

Ein Vergleich der quantitativen Nachweise in der Entwicklung wie in den adulten Geweben von *Xenopus* zeigte die maximale Transkription der GlobinX-mRNA im Gehirn adulter Tiere. In Relation dazu lagen die Nachweise in allen analysierten Entwicklungsstufen und adulten Geweben bei lediglich 0,1-4,2%. Insgesamt war jedoch die Transkription der GlobinX-mRNA gegenüber den anderen Globinen auch in den adulten Krallenfröschen sehr gering und setzt damit die bereits in den Entwicklungsstadien beobachtete Tendenz fort. Die komparative Betrachtung der absoluten Kopienzahlen zeigten im Vergleich mit Neuroglobin nur 8%, im Vergleich mit Cytoglobin nur 17% GlobinX-mRNA im Gehirn (Abbildung 36B).

Die generell schwache Transkription von GlobinX gegenüber den anderen Krallenfrosch-Globine entsprach tendenziell den im Goldfisch erbrachten Nachweisen: in diesem Teleostier betrug die

GlobinX-Konzentration im Vergleich zu Neuroglobin lediglich 4% im Auge und 2% im Hirn (Roesner, 2007). Entsprechend zu *Xenopus* konnte für adulte Fische durch quantitative Real-Time RT-PCR-Versuche eine im Vergleich mit anderen Globinen schwache Expression in zahlreichen Organen wie Herz, Leber, Darm, Kieme, Skelettmuskel, Milz und Niere gezeigt werden. Zudem schien die GlobinX-Expression auch im Fisch altersabhängig zu sein: in relativ alten Zebrafischen konnte eine bis zu 10fach erhöhte Konzentration gegenüber jüngeren adulten Tieren nachgewiesen werden (Roesner, 2007).

Insgesamt deuten die Ergebnisse der bisherigen Analysen auf eine noch unbekannt Funktion von GlobinX hin. Da das Globin bisher ausschließlich in aquatisch lebenden Tieren nachgewiesen wurde und sein Verlust in den einem langfristig konstanten Luftsauerstoff ausgesetzten Landlebewesen offenbar gut toleriert wurde, könne es eine mögliche Funktion bei kurzfristigen Schwankungen des Sauerstoffgehaltes innehaben. Andererseits deuten die differierenden Nachweise in Teleostiern verschiedener Altersstufen eventuell auf eine entwicklungsabhängige Funktion von GlobinX hin.

4.1.3. Fische verfügen über zwei paraloge Cytoglobin-Kopien

Teleostier stellen mit über 27000 rezenten Arten mehr als die Hälfte der bekannten Vertebraten-Spezies und über 99% der Actinopterygii (Christoffels et al., 2004; Nelson, 2006). Die Sequenzierung verschiedener Fischgenome wird daher unter dem Aspekt neuer Einblicke in die Evolution von Genen und Genomen dieser erfolgreichen Vertebraten-Gruppe betrieben. Tatsächlich konnte ich bereits im Vorfeld dieser Arbeit (Fuchs, 2002) durch Datenbankanalysen die Existenz von zwei Cytoglobin-Duplikaten in Teleostiern nachweisen. In dieser Arbeit wurde der Nachweis der Duplikate *in silico* wie experimentell auf zahlreiche Fisch-Spezies ausgedehnt. Die Resultate legen nahe, dass die als Cygb-1 und Cygb-2 benannten Gene für Teleostier obligatorisch sind.

4.1.3.1. Phylogenetische Analysen bestätigen die Monophylie der Cytoglobine

Die Einordnung der Cygb-Proteinsequenzen in einen phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 26A) belegte die Monophylie der Cytoglobine von Fischen und Tetrapoden, ebenso wie die Paralogie der Teleostier-Cytoglobine-1 und -2. Die beschriebene Verwandtschaft von Cytoglobin und Myoglobin (Burmester et al., 2002; Kugelstadt et al., 2004) konnte zwar an diesem Stammbaum nicht nachvollzogen werden, ist aber durch die Paralogie der Genomregionen von Cytoglobin und Myoglobin belegt (Burmester et al., 2002). Die stammesgeschichtlich unklare Zuordnung der Cygb-1-Proteine der Cypriniden unter dem Bayes-Modell bzw. dem Neighbor-Joining-Algorithmus (vgl. Abbildung 26B, C) ist wahrscheinlich auf die nicht vollständig geklärte phylogenetische Einordnung der Familie der Cyprinidae zurückzuführen (Chen et al., 2004; Mayden et al., 2007).

Die komparative Analyse der das Cytoglobin umgebenden Gene in *Homo sapiens*, *Xenopus tropicalis* und *Gallus gallus* zeigte eine in Abfolge und Transkriptionsrichtung fast vollständige syntäne Konservierung der Gene in den analysierten 4,7 Megabasen des *Xenopus*-Genoms, die damit in dieser Form seit rund 330-350 Millionen Jahren (Benton und Donoghue, 2007) besteht (Abbildung 37). Vor der von ENCODE gezeigten großen Bedeutung der nicht für Proteine kodierenden Bereiche des humanen Genoms erscheint die starke Konservierung dieses Genomabschnittes umso auffälliger und sollte Gegenstand weiterer Analysen hinsichtlich möglicher regulatorischer Elemente sein.

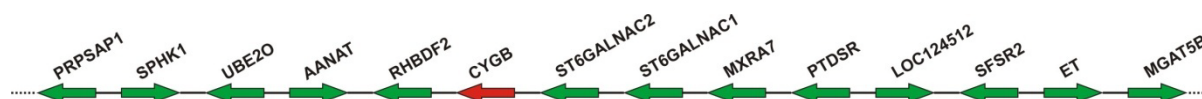


Abbildung 37:
Hypothetische Abfolge und Transkriptionsrichtung der das Cygb-Gen umgebenden Gene in einem gemeinsamen Vorfahren der Tetrapoda vor etwa 330-350 Millionen Jahren.

4.1.3.2. Die Cytoglobin-Duplikate der Teleostier resultieren aus einer Genomduplikation

Die Analyse der paralogen Cytoglobine war in Teleostiern auf die durch Sequenzierprojekte weitgehend vollständig analysierten Genome der Kugelfische limitiert. Der Vergleich mit dem syntänen Bereich des humanen Cytoglobins zeigte orthologe Gene sowohl in der Nachbarschaft von Cygb-1 als auch Cygb-2 (Abbildung 25). Im Bereich des Kugelfisch-Cygb-1 betraf dies hauptsächlich Gene aus der „Upstream“-region des humanen Cytoglobin-Gens, im Bereich von Cygb-2 Gene aus der „Downstream“-region des menschlichen Cytoglobins, die einem Rearrangement von Abfolge und Transkriptionsrichtung unterlagen (Fuchs et al., 2005). In einem gemeinsamen Vorfahren von Actinopterygii und Sarcopterygii vor mehr als 420 Millionen Jahren (Kumar und Hedges, 1998) waren höchstwahrscheinlich die Gene PRPSAP1, SPHK1, UBE2O, AANAT, RHBDF1, CYGB und MGAT5B vorhanden, über deren genaue Abfolge und Transkriptionsrichtung in diesem hypothetischen Vorläufergenom keine Aussage getroffen werden konnte.

Der Nachweis orthologer Gene des Menschen in der Umgebung beider Cytoglobin-Varianten bestätigte einerseits deren Entstehung per Genomduplikation, andererseits wurde das diesem Ereignis folgende Rearrangement des Genoms deutlich. Dieses verlagerte die duplizierte Genomregion inklusive des Teleostier-Cytoglobins in unterschiedliche Bereiche des Genoms: in *Danio rerio* sind die paralogen Cytoglobine auf den Chromosomen 3 bzw. 6 verzeichnet.

Das Duplikationsereignis in einem Teleostier-Vorläufer könnte lediglich Segmente des Genoms umfasst haben, aufgrund des heutigen Wissensstandes wird jedoch eine das gesamte Genom umfassende Duplikation als wahrscheinlich erachtet. Dieses ausschließlich einen Vorläufer der Teleostier betreffende Ereignis wird unter dem Begriff der „3R-Hypothese“ beschrieben, und soll

sich vor etwa 300-450 Millionen Jahren ereignet haben (Meyer und Schartl, 1999; Taylor und Brinkmann, 2001; Taylor et al., 2001; Taylor et al., 2003; Van de Peer et al., 2003; Venkatesh, 2003; Christoffels et al., 2004; Hoegg et al., 2004; Vandepoele et al., 2004; Meyer und Van de Peer, 2005). Tatsächlich konnten komparative Genomanalysen von *Danio*, *Tetraodon* und *Takifugu* mit dem menschlichen Genom mehrere hundert in den Teleostiern dupliziert vorliegende Gene detektieren, die im humanen Genom ausschließlich einmal vorhanden sind (Jaillon et al., 2004).

Das Resultat einer Gesamtgenom-Verdoppelung stellt einen polyploiden Organismus dar, in dem die Chromosomen als identische Duplikate vorliegen (Taylor et al., 2003). Die Polyploidie als Folge einer Duplikation ermöglicht zum einen ein erhöhtes intra- wie interchromosomales Rearrangement (Van de Peer et al., 2001; Sémon und Wolfe, 2007a), zum anderen wird durch einen massiven Verlust redundanter Genkopien wieder ein diploider Zustand des Genoms angestrebt (Taylor und Brinkmann, 2001; Volff, 2005; Brunet et al., 2006; Sémon und Wolfe, 2007b).

Diese als „Reduplikation“ bezeichnete Rückführung auf ein diploides Genom kann mittels verschiedener Szenarien erreicht werden (Abbildung 38): Zum einen kann eine Genkopie nachteilige Mutationen anhäufen und zu einem nicht länger exprimierten Pseudogen werden („Nonfunktionalisierung“). Zum anderen können sich durch die Akkumulation vorteilhafter Mutationen neue Funktionen eines Genes herausbilden, wobei in beiden Szenarien jeweils eines der Gene die ursprüngliche Funktion beibehält. Diese so genannte „Neofunktionalisierung“ wird als ein wesentlicher Bestandteil zur Erlangung neuer Funktionen von Genen und als „Motor der Evolution“ betrachtet (Ohno, 1999). Das Schicksal des Funktionsverlustes ereilt 50-90% der durch Duplikation entstandenen Genpaare (Nadeau und Sankoff, 1997). Außerdem kann der Verlust verschiedener Genduplikate in geographisch separierten Populationen zu einer genetischen Isolation und damit indirekt zur Speziation führen (Lynch und Conery, 2000). Tatsächlich verfügen die Teleostier mit etwa 27000 rezenten Arten (Nelson, 2006) über eine sehr große Diversität, sie besiedeln unterschiedlichste Lebensräume in verschiedenartigsten Klima- und Tiefenzonen und haben sich Salz- wie Süßwasserhabitate erschlossen.

Neben den Modellen der Non- bzw. Neofunktionalisierung ist noch ein drittes Szenario für das Schicksal von Genduplikaten beschrieben: die Subfunktionalisierung (Force et al., 1999; Lynch und Force, 2000; Postlethwait et al., 2004). Dabei werden die regulatorischen und strukturellen Subfunktionen des ursprünglichen Gens komplementär auf beide Genkopien verteilt. Um die ursprüngliche Funktion auszuüben, müssen sich die beiden Kopien ergänzen (Postlethwait et al., 2004). Die Subfunktionen können räumlich getrennt sein („spacial subfunction partitioning“), die Genkopien also beispielsweise in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Dieser qualitativen Aufteilung der Subfunktionen steht die quantitative gegenüber („qualitative“ versus „quantitative subfunction partitioning“), in der degenerative Mutationen zu einer Reduktion der Genprodukt-Menge

beider Duplikate führen und nur die Summe beider Duplikate die benötigte Menge Genprodukt bilden kann. Weiterhin denkbar ist eine temporäre Aufteilung („temporal subfunction partitioning“), wobei die Gene zeitlich unterschiedlich in den gleichen Geweben exprimiert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit einer strukturellen Aufteilung („protein subfunction partitioning“), wobei es durch degenerative Mutationen zum komplementären Verlust von essentiellen Protein-domänen kommt, sodass die Genprodukte beider paraloger Genkopien benötigt werden, um sich zu dem ursprünglich funktionellen Protein ergänzen zu können (Postlethwait et al., 2004).

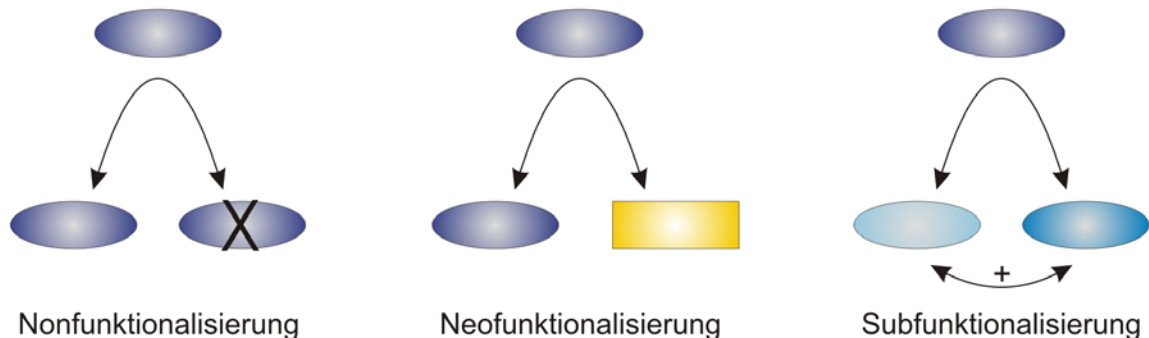


Abbildung 38:

Mögliche Szenarien nach einer Genduplikation.

Bei der Nonfunktionalisierung bleibt die Funktion des Vorläufergens in einer Kopie vorhanden, die andere Kopie häuft Mutationen an und verliert ihre Funktionalität (Pseudogen). Nach dem Neofunktions-Modell bleibt eine der Kopien in Struktur und Funktion entsprechend dem Vorläufergen erhalten, während das andere Gen sukzessive mutiert und neue Funktionen übernehmen kann. Bei der Subfunktionalisierung verändern sich beide Gene, bleiben aber aktiv und komplementieren sich in ihrer Funktion.

4.1.3.3. Die paralogen Teleostier-Cytoglobine geben noch heute Hinweise auf ihren gemeinsamen Ursprung

Der gemeinsame Ursprung der paralogen Cytoglobine wird noch heute an der identischen Intronverteilung deutlich: die paralogen Teleostier-Cygb's verfügen über Introns an den helikalen Positionen B12.2. und G7.0 und entsprechen damit dem Cytoglobin der Amphibien. Das lediglich in Mammaliern detektierte N-terminale Intron an Position HC11.2 wird weder in Cygb-1 noch Cygb-2 der Pisces nachgewiesen.

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen konnten weitere Anhaltspunkte für einen gemeinsamen Ursprung der Cytoglobin-Duplikate geben. So zeigen die Nukleotid-Austauschraten eine reinigende Selektion für Cygb-1 und -2 der Teleostier an. Die durchschnittlichen Aminosäure-Substitutionsraten im Vergleich mit dem orthologen humanen Globin sind mit $0,84 \times 10^{-9}$ Austauschen pro Position pro Jahr für das Cygb-1 der Teleostier um $0,23 \times 10^{-9}$ Austausche pro Position pro Jahr höher als für Cygb-2 (vgl. Tabelle 4). Damit zeigen die Teleostier-Cygb's gegenüber dem Cytoglobin der Mammalier ($0,29 \times 10^{-9}$ Austauschen pro Position und Jahr, Wystub et al., 2004) eine etwas beschleunigte Evolution. Diese ist mit der in Teleostiergenen beobachteten und auf die Genomduplikation zurückgeführte, generell erhöhten Aminosäure-Austauschrate vereinbar (Brunet et al., 2006).

Wie in den Tetrapoden sind auch in den Cytoglobinen der Teleostier die für Struktur und Hämbindung essentiellen Aminosäuren der Globine erhalten. Lediglich im Karpfen ist das ansonsten invariante Prolin an Position C2 durch ein Serin ersetzt. Dieses verhält sich jedoch physikochemisch ähnlich und der durch diese Aminosäure bedingte „Knick“ zwischen der B- und der C-Helix des Proteins bleibt wahrscheinlich erhalten. Aufgrund der Konservierung charakteristischer Aminosäuren konnte von der Funktionalität beider Proteine in den Fischen ausgegangen werden. Tatsächlich bestätigte das rekombinant exprimierte Cygb-1 von *Danio rerio* diese Annahme: das Protein konnte Sauerstoff reversibel binden und zeigte in seinem Deoxy-Zustand ein hexakoordiniertes Bindungsschema des Fe²⁺-Ions für O₂. Auch unter diesem Gesichtspunkt verhielt sich das Cytoglobin-1 von *Danio* analog zu dem Cytoglobin der Tetrapoden und zeigt den gemeinsamen Ursprung des Gens in der Evolution. Die rekombinante Expression des Cygb-2 von *Danio* gelang innerhalb dieser Arbeit nicht. Aufgrund der bisher für alle Cytoglobine festgestellten Monophylie, den identischen Intronpositionen, dem reinigenden und damit funktionserhaltenden Selektionsdruck und nicht zuletzt der Konservierung der für die Hämbindung und Globinstruktur essentiellen Aminosäuren ist jedoch auch für dieses Globin von einer Hexakoordination auszugehen.

Neben allen Gemeinsamkeiten haben sich in den paralogen Cytoglobinen der Teleostier im Lauf der Zeit jedoch auch Unterschiede herausgebildet, die sie von den orthologen Genen beispielsweise der Mammalier differenzieren. So zeigen die Cygb-1-Proteine der Fische zwar einen identisch langen N-Terminus, jedoch einen verkürzten C-Terminus. Die Ausnahme hiervon bildet zum einen der Dreistachelige Stichling *Gasterosteus aculeatus*, der über einen gegenüber den anderen Fischarten um zwei Aminosäuren verlängerten N-Terminus und einen um acht Aminosäuren verlängerten C-Terminus, jedoch nicht über das Mammalier-spezifische Intron an Position HC11.2. verfügt (vgl. 7.8.4). Dieses gegenüber anderen Teleostier-Cygb's verlängerte Ende scheint damit mehrmals in der Evolution konvergent entstanden zu sein. Die andere Ausnahme bilden Zebraquarienfisch und Karpfen, bei denen der C-Terminus im Vergleich mit den anderen Cygb-1-Proteinen um 3 Aminosäuren verkürzt ist. Da die ebenfalls in der Familie der Cyprinidae eingeordnete Elritze *Pimephales promelas* jedoch nicht über den beschriebenen vorgezogenen C-Terminus verfügt, scheint es sich hierbei nicht um eine generelle Entwicklung innerhalb dieser Familie zu handeln (Abbildung 39).

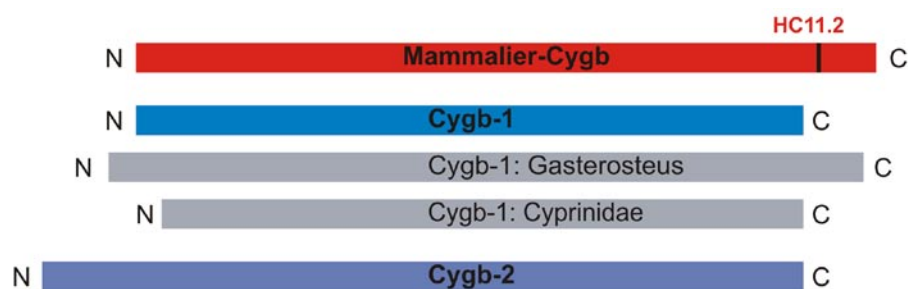


Abbildung 39:
Darstellung der divergenten N- und C-terminalen Extensionen der Teleostier-Cytoglobine-1 und -2 im Vergleich zu Cygb der Mammalier.

Das Cygb-2 der Teleostier hingegen zeigte (mit Ausnahme des Zebrabärblings) eine charakteristische N-terminale Verlängerung, während der C-Terminus der Länge von Cygb-1 entsprach. Der in den bisher analysierten Teleostiern (Kugelfische, Stichling und Reiskärpfling) um 12 bis 17 Aminosäuren verlängerte N-Terminus war auffallend prolinreich. Im Zebrabärbling konnte diese prolinreiche Extension noch in der 5'-untranslatierten Region nachgewiesen werden, doch wird offensichtlich ein anderes Methionin als Start-Codon benutzt. Prolin führt aufgrund seiner sterisch „sperrigen“ Seitenkette zu einer veränderten Faltung der α -Helices. Die Frage nach der Funktionalität dieser auffallenden N-terminalen Verlängerung in den Teleostiern kann gegenwärtig nicht beantwortet werden.

Auch die für das Cytoglobin des Menschen *in vitro* gezeigte Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke über konservierte Cysteine an den Positionen B2 und E9 (Hamdane et al., 2003) kann für die Cytoglobine der Teleostier weitestgehend ausgeschlossen werden: lediglich im Cygb-2 der Kugelfische wurden entsprechend konservierte Cysteine detektiert. Für das humane Cytoglobin wurde gezeigt, dass die Disulfidbrücken-Bildung die Affinität des Globins für Sauerstoff steigerte (Hamdane et al., 2003). Eine erste Hypoxie-Studie an *Danio rerio* zeigte jedoch keinerlei Regulation der Cygb-Paraloga (Roesner et al., 2006): Cygb scheint damit in den Fischen nicht an einer akuten Antwort auf Hypoxie beteiligt zu sein.

4.1.3.4. Die differentiellen Expressionsmuster von Cygb-1 und Cygb-2 sind mit dem Modell der Subfunktionalisierung kompatibel

Die Expression von Cygb-1 und -2 wurde durch qualitative bzw. quantitative RT-PCR-Analysen in allen untersuchten Geweben von *Tetraodon nigroviridis* und *Danio rerio* nachgewiesen. Mit Ausnahme des Darmes und der Kieme, in der die Expression von Cygb-1 minimal stärker als die von Cygb-2 war, wurde Cygb-2 in allen Geweben mit deutlich höheren mRNA-Kopienzahlen als Cygb-1 detektiert (vgl. Abbildung 28). Der stärkste Unterschied in der Expression wurde im Gehirn detektiert: Cygb-2 wurde gut 290 Mal stärker transkribiert als Cygb-1 (vgl. 7.17C). Mit den maximalen Nachweisen in Gehirn und Auge wurde Cygb-2 mit einem deutlichen Schwerpunkt in neuronalen Geweben detektiert, während Cygb-1 ein eher ubiquitäres Expressionsmuster in den analysierten Geweben zeigte (vgl. Abbildung 28). Demnach betrug der Unterschied zwischen der maximalen und minimalen Expression für Cygb-1 knapp $9,9 \times 10^4$ Kopien, für Cygb-2 3×10^7 Kopien. Unter Ausschluss der neuronalen Gewebe (Hirn und Auge) lag die Differenz für Cygb-2 bei nur $9,4 \times 10^4$ Kopien und damit in der Größenordnung von Cygb-1. Diese Berechnung verdeutlicht die besonders starke Expression von Cygb-2 in Gehirn und Auge. Um die Stärke dieser Expression besser einschätzen zu können, wurde folgende Überlegung angestellt: in einem Gramm Gehirn eines Menschen mittleren Alters finden sich etwa 46 Millionen Neurone (Devaney und Johnson, 1980). Überträgt man diesen Wert auf die Teleostier, so wurden pro Real-Time RT-PCR-Ansatz etwa 5,8

Millionen Nervenzellen eingesetzt. Unter Einberechnung der entsprechenden Nachweise für *Cygb-1* und *Cygb-2* ergab sich daraus ein Expressionswert von 19 mRNA-Molekülen *Cygb-1* und 5200 Molekülen *Cygb-2* in *Danio rerio*. Laut Bustin ist ein Gen mit 12000, 200 bzw. 10 Moleküle als stark, mittel bzw. schwach transkribiert zu bezeichnen (Bustin, 2000). *Cygb-1* gehört demnach zu den schwach exprimierten Genen im Gehirn, *Cygb-2* des Zebrafisch hingegen zu den mittel bis hoch transkribierten Genen.

			Gehirn	Herz	Leber	Darm	Muskel	Auge	Haut	Kieme	Ovar
Cygb-1	Tni	Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
	Dre	Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Quantitative RT-PCR	++	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
Cygb-2	Tni	Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	n.d.
	Dre	Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Quantitative RT-PCR	++	+	+	+	+	+	+	+	n.d.

Tabelle 12:

Vergleich der *Cygb-1* und *Cygb-2* Nachweise in adulten Teleostiern.

Dargestellt sind die in *Tetraodon nigroviridis* (Tni) und *Danio rerio* (Der) per qualitativer bzw. quantitativer RT-PCR erbrachten mRNA-Nachweise von *Cygb-1* und *Cygb-2*. Positive Nachweise sind durch ein „+“ symbolisiert. Die stärksten Nachweise der quantitativen RT-PCR sind neben durch ein „++“ und den etwas dunkleren Blauton kenntlich gemacht. Nicht durchgeführte Versuche sind durch „n.d.“ kenntlich gemacht.

Der ubiquitäre Nachweis der *Cygb*-Duplikate in den analysierten Geweben von *Danio* und *Tetraodon* ist mit dem Szenario der Subfunktionalisierung kompatibel. Eine strikt räumliche Partitionierung kann ausgeschlossen werden, da beide Gene in denselben Geweben nachgewiesen wurden. Allerdings zeigt *Cygb-2* einen klaren Expressionsschwerpunkt in Gehirn und Auge, so dass eine tendenziell räumliche Auftrennung der Expressionsmuster erkennbar wird. Diese Beobachtung wiederum könnte auf unterschiedliche Funktionen der paralogenen *Cygb*-Gene hinweisen: bereits in Mammaliern wurde das als Einzelkopie vorliegende *Cygb* einerseits ausschließlich zytoplasmatisch in Fibroblasten bzw. Fibroblasten-ähnlicher Zelltypen nachgewiesen (Nakatani et al., 2004), andererseits wurde es zytoplasmatisch und nukleär in spezifischen Neuronen des Gehirns, im peripheren Nervengewebe des Colons (Schmidt et al., 2004) und in Neuronen der Retina (Schmidt et al., 2005) detektiert. Dieses differierende Expressionsmuster in den Rodentia deutet darauf hin, dass *Cygb* durchaus unterschiedliche Aufgaben in den unterschiedlichen Geweben wahrnehmen könnte: In den Fibroblasten könnte *Cygb* eine Rolle in der Kollagensynthese übernehmen (Schmidt et al., 2004), während die nukleäre Expression in den Neuronen der Retina beispielsweise auf eine regulatorische und kommunizierende Rolle von *Cygb* zwischen Zytoplasma und Nukleus als O₂-Sensor hindeuten könnte (Schmidt et al., 2005). Außerdem wäre die Versorgung der im Kern lokalisierten

NO-Synthasen (Giordano et al., 2002) mit O₂ für die NO-Synthese durch Cygb denkbar (Giordano et al., 2002; Schmidt et al., 2005). Die paralogen Cygb-Gene der Fische könnten folglich Globine mit nicht strikt getrennten Funktionen repräsentieren, wobei Cygb-2 seine Funktion vorwiegend in neuronalen Geweben ausübt, Cygb-1 hingegen ubiquitär in mannigfaltigen Geweben zum Einsatz kommt. Die konkrete Untersuchung der funktionellen Bedeutung der zellulären Lokalisation könnte hier den entscheidenden Hinweis liefern. Die quantitative Subfunktionalisierung kann für das Cygb der Teleostier weitgehend ausgeschlossen werden. Die Real-Time RT-PCR-Analyse belegt eine unterschiedlich starke Expression von Cygb-1 und -2: im Falle einer sich ergänzender Genproduktmenge zweier paraloger Gene wäre jedoch eher von einer gleichmäßigen Expression der Duplikate auszugehen. Eine strukturelle Subfunktionalisierung erscheint aufgrund der unterschiedlich starken mRNA-Nachweise eher unwahrscheinlich. Eine temporär unterschiedliche Expression von Cygb-1 und Cygb-2 ist für die sich entwickelnden Teleostier nicht auszuschließen. Eine Analyse der EST-Profile des Zebraärbblings in der UniGene-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>) zeigte einen Nachweis von Cygb-1 in schlüpfenden, larvalen und adulten Tieren, während Cygb-2 in schlüpfenden Tieren, jedoch nicht in larvalen und nur sehr gering in adulten Exemplaren nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis impliziert zwar auf den ersten Blick eine mögliche temporäre Subfunktionalisierung der paralogen Teleostier-Cytoglobine in der Entwicklung von Danio, stimmt jedoch mit dem geringen Nachweis von Cygb-2 in adulten Tieren nicht mit den in dieser Arbeit erbrachten Ergebnissen überein und bleibt daher spekulativ.

4.1.4. Das single-copy-Cytoglobin der Frösche ist konserviert

Im Genom von *Xenopus tropicalis* wurde lediglich eine Kopie des Cytoglobin-Gens detektiert. Dieses zeigte in phylogenetischen Analysen einen monophyletischen Ursprung mit den Cytoglobinen der Mammalier und Teleostier (Abbildung 3). Der syntäne Genombereich ist mit dem anderer Tetrapoden gut konserviert (Abbildung 9).

Die Intronverteilung im *Xenopus*-Cytoglobin entspricht mit Introns an den Positionen B12.2 und G7.0 der der Fische, an Position HC11.2 wird kein Intron detektiert. Das Cytoglobin der Krallenfrösche gleicht in seiner Länge dem des Haushuhnes, doch sind die Aminosäuresequenzen C-terminal 11 Reste kürzer als das orthologe Gen der Mammalier. Dies zeigt, dass das zusätzliche Intron HC11.2 und das vierte Exon des Cytoglobins der Mammalier ausschließlich auf diese beschränkt sind und in der Evolution der Mammalier dazugewonnen wurde.

Die Substitutionsrate des Amphibien-Cytoglobins liegt im Bereich derer anderer Globine, ist jedoch deutlich höher als die der Mammalier-Cytoglobine. Auch dies deutet auf eine ausschließlich auf die Mammalier beschränkte Funktion von Cytoglobin mit einer besonders starken Konservierung der Aminosäuresequenz bei Säugetieren hin. Die funktionell wichtigen, für Globine charakteristische Aminosäuren sind im *Xenopus*-Cytoglobin erhalten, an Position F4 findet sich in den Krallen-

fröschen an Stelle des konservierten Leucins ein Valin, das jedoch auch hydrophobe Eigenschaften besitzt: dieser Austausch sollte unproblematisch sein. Von den zwei konservierten Cystein-Resten im humanen Cytoglobin (Hamdane et al., 2003), die für eine molekülinterne Disulfidbrücken-Bildung zuständig sein könnten, ist in *Xenopus* lediglich das Cystein an Position B2 konserviert. Eine intramolekulare Disulfidbrückenbildung muss daher für die Krallenfrosch-Cytoglobine als eher unwahrscheinlich erachtet werden.

Das rekombinant exprimierte Cytoglobin des tropischen Krallenfrosches zeigte die Charakteristika eines hexakoordinierten Bindungsschemas und entspricht damit dem orthologen Protein der Mammalier und der Fische: die Hexakoordination ist damit für die Cytoglobine aller Vertebraten als charakteristisch anzunehmen.

4.1.4.1. Cytoglobin ist in fibroblastenähnlichen Zellen und neuronalen Strukturen von *Xenopus* nachzuweisen

Die Transkription von Cytoglobin konnte bereits ab den ersten Entwicklungsstadien in *Xenopus* experimentell wie *in silico* detektiert werden (Tabelle 13). Die quantitativen Analysen detektieren eine massive Verstärkung des zunächst schwachen Signals zu Beginn der Metamorphose. Räumlich ist die Cytoglobin-mRNA im Herz (NF 34-37) und im Kopfbereich (NF 24) lokalisiert. In adulten Krallenfröschen wurde Cytoglobin-mRNA in allen analysierten Geweben nachgewiesen, der Fokus lag in Gehirn und Herz (Tabelle 13).

Der massive Nachweis von Cytoglobin-mRNA im Herz ist aus adulten Mammaliern bekannt (Burmester et al., 2002; Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004), in der Entwicklung eines Organismus konnte dieser Nachweis in dieser Arbeit erstmals erbracht werden. In *Xenopus* beginnt die Herzentwicklung mit dem Einsetzen der Gastrulation ab etwa NF 10 mit der Bildung von zwei einfachen bilateralen Vorläufer-Anlagen des Herzens, die während NF 26-33 entlang der Mittellinie zu einem Herzschlauch verschmelzen. Ab NF 35 kann sich dieses primitive Herz kontrahieren, im Folgenden (NF 33-36) kommt es zu einer Rechtsdrehung und der Ausbildung der Herzkammern (NF 39-40). Ab NF 41 werden die Herzklappen ausgebildet, ab NF 44 beginnt die Septierung der Vorhöfe, so dass das Herz ab Stadium 46 – etwa 106 Stunden nach der Befruchtung des Eies – ausgereift ist (Warkman und Krieg, 2007). Das Herz von *Xenopus* besteht aus drei Kammern (ein Ventrikel und zwei Atrien) und bildet damit ein Zwischenstadium zwischen dem zweikammerigen Herz der Teleostier und dem vierkammerigen System der Vögel und Mammalier (Wehner et al., 2005).

Der WMHIS-Nachweis ab NF 34-37 könnte indizieren, dass Cytoglobin erst ab dem Erreichen der Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzellen in nachweisbaren Mengen benötigt wird. Aufgrund des veränderten Metabolismus der Herzzellen ab ihrer Kontraktilität könnte das Globin beispielsweise eine Versorgungsfunktion mit O₂ übernehmen oder im Zuge der Zellatmung gebildete Reaktionsprodukte binden. Diese Funktion wäre vergleichbar mit der von Myoglobin in den Mammaliern

((Wittenberg und Wittenberg, 1987, 1989; Wittenberg und Wittenberg, 2003) und vor dem Hintergrund, dass in *Xenopus* kein Myoglobin nachgewiesen werden konnte, umso interessanter. Denkbar wäre, dass Cytoglobin die Funktion von Myoglobin in *Xenopus* übernommen haben könnte. Andererseits stellt der Beginn der Kontraktion des embryonalen Herzens neue Bedingungen an die Zugbelastung und Stabilität der kardialen Gewebe. Cytoglobin konnte in zahlreichen Geweben verschiedener Vertebraten in fibroblastenähnlichen Zellen nachgewiesen werden (Hankeln et al., 2004; Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Hankeln et al., 2005), die eine wichtige Rolle bei der Kollagensynthese der Extrazellulären Matrix spielen und dieser Stabilität verleihen. Im sich entwickelnden Herzen wäre daher auch eine Wirkung von Cytoglobin – resultierend in einer stabilisierenden Funktion – in der Kollagensynthese denkbar.

Cytoglobin-mRNA in der Entwicklung des Krallenfrosches														
Nachweis	6-10	9-13	15-19	20-25	37-38	45-46	47	48	49	50	51	54	>54	>60
EST	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quantitative RT-PCR	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+
Cytoglobin-mRNA im adulten Krallenfrosch														
Nachweis	Gehirn	Herz	Leber	Darm	Lunge	Muskel	Auge	Ovar	Niere					
Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Quantitative RT-PCR	++	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.					

Tabelle 13:

Nachweise von Cytoglobin-mRNA in *Xenopus*.

Die Tabelle fasst die *in silico* und experimentell erbrachten Nachweise von Cytoglobin-mRNA in *Xenopus* zusammen. Positive Nachweise sind neben dem grünen Farbton durch ein „+“, negative durch ein „-“ verdeutlicht. Der Fokus des Nachweises in der quantitativen RT-PCR wird durch ein „++“ indiziert. Nicht durchgeführte Analysen sind durch „n.d.“ kenntlich gemacht.

Der ebenfalls erbrachte Nachweis von Cytoglobin in der Ohrplakode und dem Gehirn sich entwickelnder bzw. adulter Krallenfrösche deutet zudem auf eine neuronale Expression hin. Tatsächlich wurde die mRNA von Cytoglobin in Mammaliern bereits mehrfach nukleär in Neuronen nachgewiesen und zeigt damit zusätzlich zu der cytoplasmatischen Expression in Fibroblasten ein zweites Expressionsmuster (Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Der Nachweis in derart unterschiedlichen Kompartimenten verschiedener Zellen lässt die Vermutung zu, dass dieses Globin unterschiedliche Funktionen in differenten Geweben wahrnimmt.

4.1.5. *Xenopus* besitzt kein Myoglobin

Die Analyse des Globin-Repertoires von *Xenopus* umfasste auch die Fragestellung, ob Krallenfrösche über Myoglobin verfügen. Zwar basierten die Versuche von Baylor und Pape zur Diffusion von extern eingebrachtem, markiertem Metmyoglobin des Pferdes in einen sich kontrahierenden *Xenopus*-Muskel auf dem als „myoglobinlos“ beschriebenen Muskel des Krallenfrosches (Baylor und Pape, 1988), ein molekularer Nachweis der Nicht-Existenz von Myoglobin in Krallenfröschen wurde allerdings nicht publiziert.

In dieser Arbeit konnte weder in genomischen, noch in EST-Analysen ein Myoglobin-Gen in *Xenopus tropicalis* identifiziert werden. Die zusätzliche Untersuchung der das Myoglobin in Mensch, Huhn und Kugelfisch flankierenden genomischen Bereiche (vgl. Abbildung 40) zeigte, dass dieser Abschnitt des Genoms im Krallenfrosch offensichtlich massiven chromosomalen Rearrangements unterlag. Im Zuge dieser Rearrangements wurde das Myoglobin-Gen wahrscheinlich deletiert und ist nach heutigem Kenntnisstand in *Xenopus* tatsächlich nicht vorhanden.

Weitergehenden Aufschluss bietet die Analyse des Luc7L-Gens, das in Version 3.0 des *Xenopus*-Genomprojektes in unmittelbarer Nähe von GlobinY annotiert ist. Im Takifugu-Genom findet sich, durch lediglich ein Gen von Myoglobin getrennt, ein Luc7L2-Gen. Im Haushuhn flankiert ein Gen der Luc7L-Familie das augenspezifische Globin E (Fuchs et al., 2006). In dem Marsupialier *Sminthopsis macroura*, der „Östlichen Dickschwanz-Schmalfußbeutelmaus“ wird ein Luc7L-Gen unmittelbar neben den Genen des Hämoglobin α -Lokus detektiert (De Leo et al., 2005) und in der Maus findet sich ein entsprechendes Gen in der Nachbarschaft eines α -Pseudo-Hämoglobingens. Diese auffallende Verknüpfung eines Luc7L-Gens mit differenten Globinen indiziert einen orthologen Ursprung von Myoglobin, Hämoglobin, GlobinY und Globin E. In der Umgebung von Neuroglobin und GlobinX kann kein Luc7-Gen detektiert werden und unterstreicht damit die – wie phylogenetische Analysen zeigen - seit etwa 800 Millionen Jahren von den anderen Globinen getrennte Evolution von Neuroglobin und GlobinX zu den anderen Vertebraten-Globinen.

Zwar zeigt keines der analysierten Hämoglobine von *Xenopus* eine wirklich dominante Expression im Herzmuskel, doch Cytoglobin wurde stark in diesem Gewebe nachgewiesen (Abbildung 18). Damit besteht die Möglichkeit, dass Cytoglobin möglicherweise eine myoglobinähnliche Funktion im Herzmuskel des Frosches einnehmen könnte.

Die in dieser Arbeit *in silico* erbrachten Ergebnisse zur Nicht-Existenz von Myoglobin in *Xenopus* wurden experimentell von Xi et al. bestätigt: weder in *Xenopus tropicalis* noch in *Xenopus laevis* konnte eine Myoglobin-mRNA nachgewiesen werden (Xi et al., 2007). Die Autoren zeigten vielmehr einen ausschließlichen Nachweis von Cytoglobin in Herz und Skelettmuskel und postulieren daher, dass Cytoglobin die Funktion von Myoglobin in *Xenopus* übernommen haben könnte. Die in

dieser Arbeit an mehreren adulten Exemplaren von *Xenopus laevis* unabhängig mit verschiedenen Methoden erbrachten Transkriptionsnachweise von Cytoglobin in zahlreichen Geweben wie Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Darm etc. (vgl. Tabelle 13) relativieren diese Ergebnisse zwar deutlich und werden durch entsprechende EST-Nachweise unterstützt. Gleichwohl wurde aber auch in dieser Arbeit Cytoglobin sehr stark im Herz von *Xenopus* nachgewiesen. Somit besteht tatsächlich die Möglichkeit, dass Cytoglobin die Funktion von Myoglobin im Herz von *Xenopus* übernommen haben könnte.

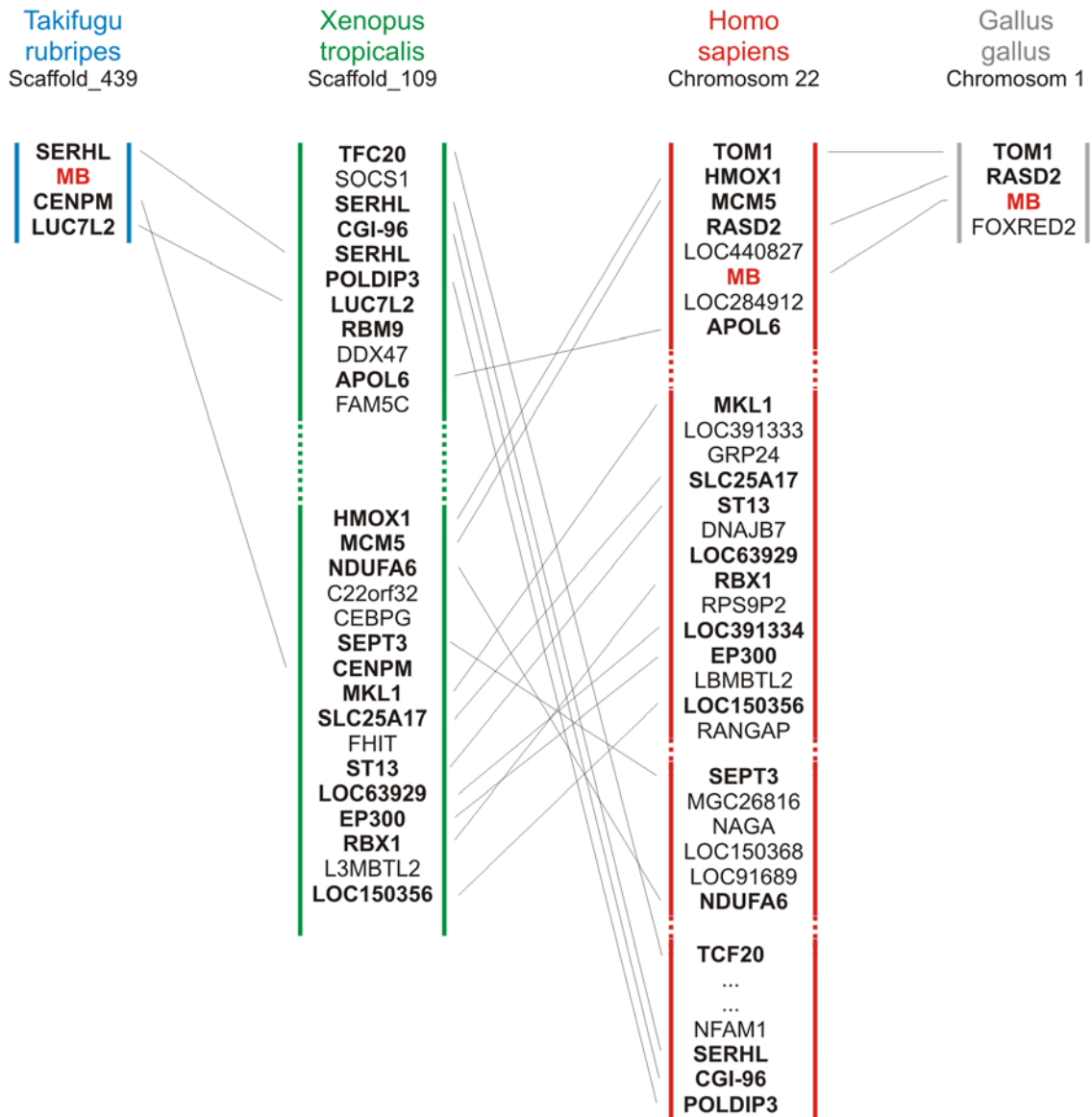


Abbildung 40:
In silico-Analyse der das Myoglobin-Gen umgebenden genomischen Regionen in *Takifugu rubripes* (blau), *Xenopus tropicalis* (grün), *Homo sapiens* (rot) und *Gallus gallus* (grau). Die Gene sind in ihren Abkürzungen auf die Namensgebung des humanen Genoms abgestimmt. Unterbrechungen in den die Gene flankierenden Strichen deuten an, dass weitere, für die Analyse nicht relevante Gendaten in den Datenbanken existieren.

Die Existenz von Lebewesen ohne Myoglobin erscheint ob der als wesentlich erachteten Funktion des Proteins zunächst fragwürdig. Tatsächlich jedoch besitzen beispielsweise antarktische Eisfische aus der Familie der Channichthyidae gar kein Myoglobin beziehungsweise nur Spuren davon im Herzmuskel (Sidell et al., 1997; Moylan und Sidell, 2000). Auch eine Myoglobin-Knockout-Maus konnte problemlos die Deletion des Globins überleben (Gödecke et al., 1999). Sowohl für Eisfische als auch die Knockout-Maus wurden jedoch spezifische Anpassungen wie beispielsweise eine höhere Dichte der Kapillaren und ein vergrößertes Herz beobachtet (Feller et al., 1985; Zummo et al., 1995; Gödecke et al., 1999; Gödecke und Schrader, 2000; Grange et al., 2001; Meeson et al., 2001; Mammen et al., 2003; Schlieper et al., 2004). Ob sich diese oder ähnliche Adaptionen auch in *Xenopus*, einem weiteren Organismus ohne Myoglobin finden, bleibt abzuwarten.

4.1.6. GlobinY und die Hämoglobine in *Xenopus*: Hinweise auf einen gemeinsamen Ursprung

Die Analyse der Hämoglobine von *Xenopus* beschränkte sich in der Vergangenheit ausschließlich auf den allotetraploiden afrikanischen Krallenfrosch. Tatsächlich verfügt *Xenopus laevis* über zwei Hämoglobin-Cluster, die aus einer Genomduplikation vor etwa 30 Millionen Jahren resultierten (Bisbee et al., 1977) und Analysen deutlich erschwerten. Je nach Forschergruppe wurden die Cluster in der Literatur zudem unterschiedlich bezeichnet: als „1 bzw. 2“ (um W. Knöchel und R. Weber) oder „major und minor“ (um J.G. Williams). Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Hämoglobine in dem diploiden *Xenopus tropicalis* stellt die erste umfassende Analyse der Hämoglobingene in einem Amphibium dar.

Im Zuge dieser Untersuchung wurde das bisher ausschließlich in *Xenopus* detektierte, neu entdeckte GlobinY in unmittelbarer Nähe des Hämoglobin-Clusters lokalisiert (vgl. Abbildung 10). Vom humanen Hb-Cluster ist die schrittweise Evolution von Genen per Duplikation bekannt (Dickerson und Geis, 1983). Für *Xenopus* ist daher aufgrund der clusterartigen Anordnung ebenfalls ein gemeinsamer genomischer Ursprung der Hämoglobine und GlobinY denkbar. Diese Hypothese wird durch die gemeinsamen Intron-Positionen in den Hämoglobinen und GlobinY an den Positionen B12.2 und G7.0 gestützt, kann jedoch durch phylogenetische Analysen momentan nicht belegt werden. (Abbildung 7). In diesen nimmt das neu entdeckte GlobinY eine basale Stellung ein (vgl. Abbildung 7), die jedoch aufgrund des geringen phylogenetischen Informationsgehaltes von Globinen mit Vorsicht betrachtet werden muss.

4.1.6.1. GlobinY: ein *Xenopus*-spezifisches Globin mit geringer Konservierung

Das bisher ausschließlich in *Xenopus* detektierte GlobinY ist mit nur 156 Aminosäuren ein relativ kleines Globin. Es weist verglichen mit anderen Globinen erhöhte Substitutionsrate von $1,29 \times 10^{-9}$ Aminosäureaustauschen pro Position und Jahr in *Xenopus* auf (Fuchs et al., 2006). Zum Vergleich: das Neuroglobin von *Xenopus* zeigt im Vergleich mit den orthologen Genen der Mammalier eine Substitutionsrate von $0,61 \times 10^{-9}$ Austauschen pro Position und Jahr, die des GlobinX beträgt $0,89 \times 10^{-9}$ Austausche pro Position und Jahr. Das GlobinY des Krallenfrosches übersteigt mit seiner Austauschrate somit die der β -Hämoglobine der Mammalier mit $1,17 \times 10^{-9}$ Austauschen pro Position und Jahr. Trotzdem weist die Sequenz von GlobinY die für Globine typischen, für die Häm-bindung und Globinfaltung essentiellen Aminosäuren auf. Die Spektralanalyse des rekombinant exprimierten Proteins identifizierte GlobinY als ein Globin mit hexakoordiniertem Sauerstoffbindungsschema (Abbildung 18).

Mit dem bereits in frühen Entwicklungsstadien (NF 15-19) maximalen und auf hohem Niveau bis NF 25 anhaltenden mRNA-Nachweis wich das temporäre Transkriptionsmuster von GbY deutlich von dem der anderen analysierten Globine in *Xenopus* ab (Tabelle 14). Ein Vergleich in Stadium NF 51, der frühen Metamorphose (vgl. Abbildung 36A) zeigte gegenüber Neuroglobin eine mehr als drei Mal so starke Expression von GlobinY, der Vergleich gegenüber Cytoglobin bzw. GlobinX ist mit gut 10 Mal bzw. über 400 Mal mehr GlobinY noch ausgeprägter. GlobinY wurde damit in der Entwicklung der Krallenfrösche von allen in der Real-Time RT-PCR analysierten Genen am stärksten exprimiert.

Die WMHIS untermauerte die in den *in silico*-Daten der Entwicklungsstadien (Anhang 7.9) beobachtete Häufung der mRNA-Detektion von GlobinY in neuronalen Strukturen durch Hybridisierungssignale in Gehirn, Augenanlage (NF 25) und Ohrplakode (NF 37).

Hinsichtlich einer möglichen Funktion von GlobinY im sich entwickelnden Nervensystem fällt das erste Maximum der mRNA-Expression mit der in Stadium 12,5 beginnenden und mit der Schließung des Neuralrohres endenden Neurulation zusammen (Wehner et al., 2005). In der dreistufigen *Xenopus*-Neurogenese (Schlosser et al., 2002) entspricht das erste Maximum der GlobinY-Expression der Bildung primärer sensorischer Neurone, das zweite Maximum der dritten Phase der Neuronen-Entstehung des Rückenmarks, während der die meisten motorischen und sensorischen Neurone gebildet werden (NF 48-53). Durch die anschließende Apoptose vieler Neuronenspezies in den Stadien NF >53 könnte die rapide Abnahme des GlobinY-Nachweises erklärt werden (Coen et al., 2001; Schlosser et al., 2002). Trotz dieser vorwiegend mit neuronalen Strukturen assoziierten Nachweise darf nicht ausgeschlossen werden, dass die Transkription von GlobinY auch in anderen, zeitgleich ablaufenden Entwicklungsprozessen stattfinden könnte, besonders, da das Globin in adulten Fröschen eine äußerst schwache Expression im Gehirn zeigte.

In adulten Tieren lag der Fokus der GlobinY-Detektion in der Lunge, wo der Nachweis deutlich stärker war als die maximale Expression von Ngb im Gehirn (vgl. Abbildung 19). Damit muss GlobinY in adulten Fröschen eher mit gewebespezifischen Funktionen, denn strikt neuronalen Aufgaben korreliert werden. Nicht zuletzt aufgrund der Lage im Hämoglobincluster könnte der massive Nachweis in der Lunge auf eine O₂-versorgende, Hämoglobin-ähnliche Aufgabe von GlobinY hindeuten.

GlobinY-mRNA im sich entwickelnden Krallenfrosch														
Nachweis	6-10	9-13	15-19	20-25	37-38	45-46	47	48	49	50	51	54	>54	>60
EST	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Quantitative RT-PCR	-	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+
WMHIS	n.d.	n.d.	n.d.	Kopf Hirn	Herz Ohrpl.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GlobinY-mRNA im adulten Krallenfrosch														
Nachweis	Gehirn	Herz	Leber	Darm	Lunge	Muskel	Auge	Ovar	Niere					
Qualitative RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Quantitative RT-PCR	+	+	+	+	++	+	n.d.	n.d.	n.d.					

Tabelle 14:

Nachweise von GlobinY in *Xenopus*.

Die Tabelle fasst die *in silico* bzw. experimentell erbrachten Nachweise von GlobinY sowohl in der Entwicklung als auch in adulten Krallenfröschen zusammen. Positive Nachweise sind neben der grünen Farbe durch ein „+“ symbolisiert, die stärksten Signale der quantitativen RT-PCR sind durch ein „++“ dargestellt. Durchgeführte Versuche mit negativem Resultat werden durch ein „-“ indiziert, nicht durchgeführte Versuche durch ein „n.d.“. Ohrpl. = Ohrplakode.

4.1.6.2. Die Hämoglobine von *Xenopus* sind in einem Cluster angeordnet

Nach dem heutigen Kenntnisstand verfügt *Xenopus tropicalis* über insgesamt 14 Hämoglobingene, wovon aufgrund ihrer ontogenetischen Expression und Aminosäuresequenz acht dem α-larvalen und vier dem β-larvalen Typ zugeordnet werden. Zudem verfügt die Spezies über je ein α- bzw. β-adultes Hämoglobin. Alle Hämoglobingene zeigen die genomische Organisation in 3 Exons und 2 Introns an den helikalen Positionen B12.2 und G7.0. Die Gene liegen in 5'-3'-Richtung in der Anordnung „α-(larval–adult)-β-(adult-larval)“ auf zwei noch nicht verknüpften Scaffolds.

Starke Evidenzen sprechen für die tandemartige Anordnung der Hämoglobine in nur einem Cluster: *i.* ein Vergleich der die Hämoglobine umgebenden Gene mit den syntänen Bereichen des Menschen und der Kugelfische zeigt orthologe Gene wie POLR3K, C16orf33, RHBD1 und LUC7 in dem syntänen Genombereich von *Xenopus* (vgl. Abbildung 11). *ii.* Für den afrikanischen Krallenfrosch wurde die Anordnung der Hb-Gene in der Anordnung „α-larval–α-adult–β-adult–β-larval“ nachgewiesen (Jeffreys et al., 1980; Hosbach et al., 1982). Aufgrund der nahen Verwandtschaft ist eine

entsprechende Anordnung auch für den tropischen Krallenfrosch wahrscheinlich. *iii.* Auf einem Scaffold von *Xenopus tropicalis* sind die Gene „ α -larval- α -adult- β -adult“, auf dem anderen Scaffold lediglich die β -larvalen Hb-Gene annotiert. Unter der Annahme, dass auch in *Xenopus tropicalis* die β -Hb-Gene durch Duplikationsereignisse auseinander hervorgegangen sind, erscheint die Verbindung der Hb-Gene in *Xenopus tropicalis* in nur einem Cluster als sehr wahrscheinlich.

Eine Zuordnung der *Xenopus tropicalis*-Hämoglobine zu einem der beiden bekannten Hämoglobin-Cluster des afrikanischen Krallenfrosches ist, wie die phylogenetische Analyse der Hämoglobine zeigen konnte, nicht möglich (Abbildung 12). Die Diversifikation von *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis* wird vor etwa 30 Millionen Jahren eingeordnet (Bisbee et al., 1977). Innerhalb der Linie der afrikanischen Krallenfrösche wird ein Duplikationsereignis vor etwa 1,8 -10 Millionen Jahren vermutet, das letztlich zur Entstehung der zahlreichen Arten von *Xenopus laevis* geführt haben soll (Bisbee et al., 1977). Die nicht eindeutige Relation der Hämoglobine des tropischen Krallenfroschs zu einem der Cluster des afrikanischen Krallenfroschs ist somit folgerichtig auf die erst nach der Trennung von tropischem und afrikanischem Krallenfrosch erfolgte Duplikation des Hb-Clusters in *Xenopus laevis* zurückzuführen.

4.1.6.3. Die Transkriptionsanalyse der *Xenopus*-Hämoglobine gibt Hinweise auf ihre Evolution

Im Menschen sind die Hämoglobingene in Clustern von rund 28 kb Länge (α -Lokus auf Chromosom 16) bzw. rund 270 kb Länge (β -Lokus auf Chromosom 11) angeordnet. Sie werden gemäß ihrer Reihenfolge auf der DNA in der Entwicklung des Organismus exprimiert und es gibt Hinweise darauf, dass das α - bzw. β -Cluster in einem gemeinsamen Mammalier-Vorfahren syntän war (Dickerson und Geis, 1983; Wheeler et al., 2004).

Die Anordnung der Hämoglobine von *Xenopus tropicalis* in wahrscheinlich einem Cluster legt die Vermutung nahe, dass sich die Gene aus je einem α - bzw. β -Vorläufergen durch Duplikationen entwickelten und durch Mutationen nach und nach differenzierte Funktionen ausbildeten. Die vermutlich schrittweise Neubildung der Gene lässt sich in *Xenopus tropicalis* sowohl an dem erstellten Stammbaum der Hämoglobine (Abbildung 12) als auch dem *in silico* analysierten Expressionsmuster (Abbildung 13) nachvollziehen. Demnach zeigen die α - und β -larvalen Hämoglobine einen deutlich kürzeren Ast im Stammbaum als die jeweiligen adulten Hämoglobine und deuten damit auf weniger Veränderungen im Laufe der Zeit hin. Auch die larvalen Hämoglobine zeigen untereinander sowohl im phylogenetischen Stammbaum als auch im temporären Expressionsmuster Gruppierungen. Bei einer gleichmäßigen Anhäufung von Mutationen bezogen auf die Zeit („molekulare Uhr“, (Zuckerandl und Pauling, 1965)) wäre die Entstehung der larvalen Gene ein zeitlich jüngeres Ereignis verglichen mit den „älteren“ adulten Hämoglobin-Genen. Ein alternatives Szenario

rio würde der Befund einer höheren Mutationsrate in den larvalen Hb-Genen denn in den adulten Genen im gleichen Zeitraum implizieren. Unabhängig von dem Modell der molekularen Uhr ist das in Abbildung 41 dargestellte Szenario der Hb-Evolution in *Xenopus tropicalis* denkbar.

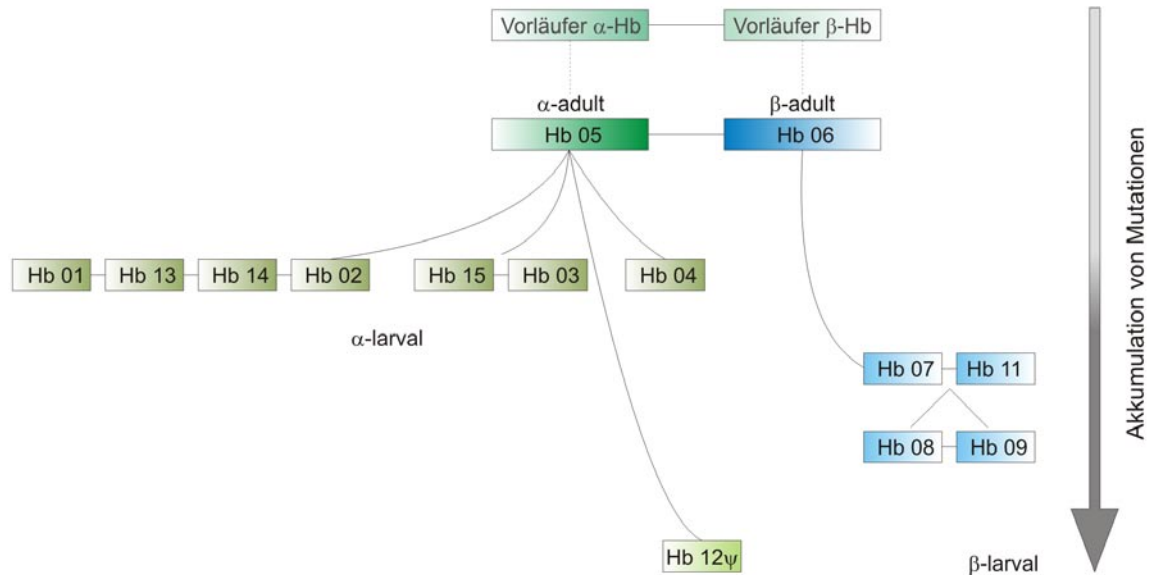


Abbildung 41:

Denkbares Szenario der Hb-Evolution in *Xenopus tropicalis*.

Aus den Vorläufern des α- bzw. β-Hbs bildet sich das rezente α- bzw. β-adulte Hb. Aus dem α-adulten Hb entwickelten sich dann durch tandemrepetitive Duplikationsereignisse die α-larvalen Hbs 01, 13, 14 und 02 ebenso wie die Hbs 15 und 03. Die Entstehung des Hbs 04 aus dem α-adulten Hb scheint unabhängig und nicht mit einem anderen Hb tandemartig stattgefunden zu haben, die Relation des Pseudogens Hb 12 zu einem anderen α-larvalen Hb ist nicht mehr nachzuvollziehen. Die β-larvalen Gene haben sich entsprechend ebenfalls aus dem β-adulten Gen heraus entwickelt, wobei die Hbs 08 und 09 näher miteinander verwandt zu sein scheinen als die sie flankierenden Hbs 07 und 11.

4.1.6.4. Die Hämoglobin-Transkriptionsanalyse zeigt deutliche Unterschiede während der *Xenopus*-Entwicklung

Die *in silico*-Analyse der Hb-Transkription von *Xenopus tropicalis* zeigte in den frühen Larvalstadien eine fast ausschließliche Expression der larvalen Hbs, eine gleichzeitige Expression larvaler und adulter Hbs in der Metamorphose und eine auf die adulten Hbs fokussierte Expression in den Adulttieren. Interessanterweise lässt sich bereits in den späten Larvalstadien (NF 36-41) eine geringe Expression der adulten β-Hbs beobachten, umgekehrt werden larvale Hbs in einem geringen Maß in adulten tropischen Krallenfröschen exprimiert. Trotzdem ist ein Wechsel der Expression von überwiegend larvalen hin zu vornehmlich adulten Hbs sehr deutlich. Die Hb-Varianten werden wahrscheinlich in unterschiedliche Erythrozyten-Typen eingelagert, da es im Lauf der *Xenopus*-Entwicklung zu einem Austausch der larvalen roten Blutkörperchen durch eine adulte Population kommt (Tamori und Wakahara, 2000). Im erwachsenen Menschen konnten fötale und embryonale Hämoglobine ebenfalls in geringem Maße detektiert werden (Lau et al., 2001).

In *Xenopus* wurde die Erythropoiese bisher vorwiegend an dem afrikanischen Krallenfrosch untersucht: erste primitive rote Blutkörperchen entstehen in einem mesodermal entstandenen Äquivalent zum Dottersack der Mammalier, dem „ventral blood island“, (Kau und Turpen, 1983; Maeno et al., 1985; Kikkawa et al., 2001). Im Lauf der Metamorphose werden die primitiven roten Blutkörperchen in der Milz abgebaut (Tamori und Wakahara, 2000), während adulte Erythrozyten in der Leber gebildet werden (Ohinata und Enami, 1991; Weber et al., 1991). Dieser fließende Übergang bedingt den schwachen Nachweis larvaler Erythrozyten in adulten Tieren (Tamori und Wakahara, 2000) und ist kongruent mit der in dieser Arbeit gezeigten geringen Expression adulter Hbs in larvalen Tieren vor der Metamorphose und larvaler Hbs in Adulttieren. Der Austausch larvaler durch adulte Erythrozyten wird, wie die Metamorphose, hormonell durch Thyroxin induziert (Tamori und Wakahara, 2000).

Der Wechsel der Genexpression wie der Erythrozytenproduktion von larval zu adult innerhalb der Metamorphose legt nahe, dass in larvalen roten Blutkörperchen ausschließlich larvale Hbs gebildet werden, in den adulten Erythrozyten ausschließlich adulte Hbs. Tamori und Wakahara zeigten dies für je ein nicht näher bezeichnetes larvales bzw. adultes Hb. Die vorliegende Arbeit konnte belegen, dass es sich dabei um ein für alle Hbs von *Xenopus* gültiges, universelles Muster zu handeln scheint.

Die Expression der adulten Hbs konnte in der hier durchgeführten *in silico*-Analyse am stärksten in der Leber adulter Tiere, die den Bildungsort der adulten Erythrozyten darstellt, nachgewiesen werden. Diese Korrelation verdeutlicht nochmals die vorwiegende Präsenz adulter Hbs in den adulten Erythrozyten.

Hinsichtlich der wahrscheinlichen Deletion von Myoglobin in *Xenopus* bestand die Frage, ob eines der Hämoglobine möglicherweise die Funktion von Myoglobin übernommen haben könnte. Demzufolge wurde die EST-Verteilung in den aus adultem Skelettmuskel bzw. aus adultem Herzmuskel hergestellten Datenbanken analysiert. Im Skelettmuskel wurden zwar knapp drei Mal mehr Einträge für das adulte α -Hb als das adulte β -Hb beobachtet. Eine deutliche Dominanz im Sinne einer fokussierten Expression dieses Hämoglobins im Skelettmuskel kann jedoch aufgrund der insgesamt wenigen Nachweise in diesen Datenbanken nicht postuliert werden. Gleiches gilt für die Hämoglobin-Einträge in der aus adultem Herz erstellten Datenbank. Zusammengefasst gibt es somit bisher keinen direkten Hinweis darauf, dass eines der Hämoglobine die Funktion von Myoglobin im Herz bzw. im Skelettmuskel übernommen haben könnte.

An dieser Stelle soll auf die ebenfalls *in silico* erstellten Expressionsprofile der Datenbank „UniGene“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>) hingewiesen werden. Im Falle der auf Nukleotid- und Aminosäureebene eine hohe Identität zueinander zeigenden Hb-Gene von

Xenopus sind die Abgrenzungskriterien der Datenbank nicht scharf genug fokussiert. Diese nicht deutliche Abgrenzung der einzelnen Hbs voneinander resultiert letztlich in einem von dem in meiner Arbeit mit manueller Unterstützung erstellten differierenden Expressionsprofil und zeigt die Grenzen dieser Datenbank auf.

4.2. Funktionsanalyse und Ausblick

In dieser Arbeit konnten neue Globin-Gene in Fischen und Amphibien detektiert und die Superfamilie so um bisher unbekannte Mitglieder erweitert werden. Die Analyse der Primärstruktur und Expression der Gene zeigte deutliche Gemeinsamkeiten zu den bisher schwerpunktmäßig in Mammaliern erbrachten Ergebnissen. Hinsichtlich dieser Charakteristika sollen die wahrscheinlichen Funktionen der in dieser Arbeit näher untersuchten Globine diskutiert werden.

4.2.1. Neuroglobin besitzt eine Funktion in neuronalen Geweben mit hohem Metabolismus

Für Neuroglobin konnte eine vorwiegend neuronale Expression in Amphibien und Fischen gezeigt werden. Die Resultate dieser Arbeit zeigen eine mit spezifischen Phasen der Neurulation zusammenfallende temporäre Expression in der Entwicklung von *Xenopus*. In adulten Amphibien und Teleostiern wurde eine prädominante Lokalisation in neuronalen Geweben gezeigt, die der vorwiegend aus Mammaliern bekannten Expression entspricht: in der Retina von *Danio* konnte eine besonders hohe Neuroglobin-Konzentration mitochondriennah in den inneren Segmenten der Photorezeptorzellen detektiert werden. Im Gehirn des Zebraäbblings wurde Neuroglobin ausgeprägt in metabolisch stark aktiven Bereichen nachgewiesen. Dieses Expressionsmuster in Amphibien und Teleostiern, das eindrucksvoll den aus Mammaliern bekannten Nachweisen entspricht, muss daher als charakteristisch für das Neuroglobin aller Vertebraten angesehen werden. Gleichzeitig deuten das deutlich ähnliche Expressionsmuster und die starke Konservierung des Gens seit mindestens 420 Millionen Jahren auf eine essentielle, bisher jedoch nicht final geklärte Funktion von Neuroglobin hin.

Seit seiner Entdeckung im Jahr 2000 (Burmester et al., 2000) wurden zahlreiche mögliche Funktionen diskutiert (Hankeln et al., 2004; Brunori und Vallone, 2007). Am wahrscheinlichsten erscheint derzeit – auch aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Nachweise in stark metabolisch aktiven Bereichen der Gewebe - eine Rolle von Neuroglobin im oxidativen Stoffwechsel. Denkbar ist beispielsweise eine Funktion als kurzzeitiger Sauerstoffspeicher zum Schutz vor kurzzeitiger Anoxie, wie er analog für Myoglobin im Muskel gezeigt werden konnte (Wittenberg und Wittenberg, 2003). Gegen diese Funktion scheint die lediglich etwa $1/100$ des Myoglobins im Muskel be-

tragende Menge von Neuroglobin im humanen Gehirn zu sprechen (Burmester et al., 2000). Lediglich in der Retina erreicht die Neuroglobin-Konzentration die Größenordnung des Myoglobins im Muskel (Schmidt et al., 2003). Zu bedenken ist allerdings, dass die Neuroglobin-Konzentration durch Western-Blot-Analysen an Gesamtproteinextrakten ermittelt wurde: da zumindest die Hälfte des humanen Gehirnvolumens durch die kein Neuroglobin exprimierenden Gliazellen bedingt ist (O'Kusky und Colonnier, 1982; Kimelberg und Norenberg, 1989), können die lokalen Neuroglobin-Konzentrationen deutlich höhere Werte erreichen. Damit könnte Neuroglobin durchaus als intrazellulärer Schutz vor kurzzeitiger mitochondrialer Anoxie in Neuronen dienen, indem es innerhalb der besonders metabolisch aktiven Zellen einen konstanten O₂-Partialdruck aufrechterhält.

Neben der O₂-Speicherung und ebenfalls in Analogie zu Myoglobin (Wittenberg und Wittenberg, 1987) könnte Neuroglobin auch in den Sauerstoff-Transport innerhalb der Neurone involviert sein. Dabei könnte es die Diffusion des Sauerstoffs von der Zellmembran zu den Mitochondrien hin erleichtern. Für diese Funktion spricht auch die in dieser Arbeit als besonders ausgeprägt gezeigte Lokalisation von Neuroglobin in den inneren, mitochondrienreichen Segmenten der retinalen Photorezeptorzellen von *Danio rerio*.

Außerdem könnte Neuroglobin eine ähnliche Rolle wie die Flavohämoglobine in der Detoxifikation reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (ROS bzw. NOS) spielen: diese Globine von Bakterien und Hefen wandeln als NO-Dioxygenasen das hoch reaktive Stickstoffmonoxid (NO) unter Verwendung von Sauerstoff in unschädliches Nitrat um (Gardner et al., 1998). Diese Fähigkeit wurde auch für Myoglobin und Hämoglobin gezeigt (Flögel et al., 2001; Gardner, 2005) und für Neuroglobin postuliert (Fago et al., 2004b; Brunori und Vallone, 2007). Anhand *in vitro* erstellter Bindungskinetiken konnte gezeigt werden, dass oxygeniertes bzw. nitrosyliertes Neuroglobin sehr schnelle Redoxreaktionen mit NO bzw. Peroxynitrit (ONOO⁻) eingeht (Herold et al., 2004; Brunori et al., 2005; Herold und Fago, 2005). Durch diese Detoxifikation könnte Neuroglobin durchaus eine neuroprotektive Funktion ausüben. Zudem wurde eine weitere Schutzfunktion des Neuroglobins beschrieben: durch die Reduktion von frei werdendem Cytochrom C könnte es Neurone vor Apoptose schützen (Fago et al., 2006), da nicht reduziertes Cytochrom C in einer Signaltransduktionskaskade letztlich den Zelltod bewirkt. Auch diese hypothetische Funktion wäre kompatibel mit den Daten der vorliegenden Arbeit.

Die Kolokalisation von Neuroglobin und Mitochondrien sollte in stark metabolisch aktiven Geweben weiter untersucht werden. Ein geeignetes Modell stellt hier beispielsweise die Retina des Zebraäbrblings dar: die Retina von *Danio* gleicht in ihren wesentlichen strukturellen Komponenten der Netzhaut der Mammalier (Stenkamp, 2007), ihre Neurogenese ist bekannt (Marcus et al., 1999; Holmqvist et al., 2004; Wong et al., 2005a; Wong et al., 2005b; Wong und Dowling, 2005). Für die Retina des Zebraäbrblings wurde zusätzlich die Existenz einer als „Wundernetz“ (rete mirabile) bezeichneten Struktur beschrieben, die mit ihren feinsten Verzweigungen reichlich Sauerstoff im

Gegenstromverfahren direkt an die äußere Retina transportiert (Marc und Cameron, 2001). Auch die Retina der Krallenfrösche ist hinsichtlich der Neurogenese gut erforscht (Holt et al., 1988; Stiemke und Hollyfield, 1995; Perron et al., 1998; Lopez et al., 2002; Fadool, 2003; Amato et al., 2005). Die Nachkommen beider Spezies entwickeln sich extrakorporal und bieten im Vergleich zu Mammaliern optimale Systeme zur Analyse von Neuroglobin in einem sich entwickelnden Säuger. Auf Basis der in meiner Arbeit rekombinant exprimierten Proteine sollten Antikörper hergestellt werden, die das Neuroglobin-Protein spezifisch detektieren, um so die in Amphibien und Fischen bisher ausschließlich auf mRNA-Ebene geführten Nachweise auf Proteinebene zu erweitern. In weiterführenden Experimenten könnten dann beispielsweise durch „Pull down“-Analysen mögliche Interaktionspartner von Neuroglobin detektiert werden. Gerade aufgrund der sehr starken Konservierung von Neuroglobin in offenbar allen bisher analysierten Vertebraten bieten sich die Krallenfrösche bzw. der Zebraquärling als Modellsystem zur weiteren Erforschung in Entwicklung und Adulttieren an. Denkbar wäre beispielsweise die – im Vergleich zu Säugern – relativ einfache Herstellung von Neuroglobin-knock out-Tieren mit Morpholinos. Diese genspezifischen, kurzen Antisense-Oligonukleotide mit chemisch veränderten Aminosäuren (Summerton und Weller, 1997) binden nach der Oozyten-Injektion an die komplementäre mRNA und verhindern spezifisch die Bildung des entsprechenden Proteins für etwa 50 Stunden (Heasman, 2002). In dieser Zeit sind wesentliche Schritte der Entwicklung beispielsweise von *Xenopus* abgeschlossen (Nieuwkoop und Faber, 1975). In ihrer Wirkweise gleichen die Morpholinos der siRNA, sind jedoch stabiler. Versuche zur Ausschaltung einzelner Gene in Gehirn und Auge existieren (Hanel und Hensey, 2006) und prädestinieren diese Methode in Amphibien und Teleostern zur weiteren Erforschung von Neuroglobin. Ebenfalls denkbar wäre die Generierung transgener Krallenfrösche per RNAi, wie sie für *Xenopus* bereits als erfolgreiche Methode beschrieben wurde (Smith und Mohun, 2005; Li und Rohrer, 2006).

4.2.2. GlobinX: eine Funktion in aquatischen Lebewesen

Das bisher ausschließlich auf Amphibien beschränkte, nahe mit dem Neuroglobin verwandte GlobinX ist in Amphibien und Teleostern ebenfalls konserviert, wenngleich sich eine Kopie des in den Krallenfröschen wahrscheinlich dupliziert vorliegenden Gens zu einem Pseudogen entwickelt. Die funktionelle mRNA wird vergleichsweise schwach bereits in den frühesten Entwicklungsstadien von *Xenopus* detektiert und impliziert eine grundlegende Funktion dieses Globins. Eine Rolle von GlobinX im Gehirn erscheint aufgrund der vergleichsweise schwachen Expression gegenüber den anderen Globinen in diesem Gewebe nahezu ausgeschlossen, wenngleich im Gehirn der für adulte Gewebe stärkste Nachweis dieses Gens erbracht werden konnte. Besonders in der Metamorphose von *Xenopus* jedoch wird die mRNA von GlobinX in weitaus höheren Kopienzahlen nachgewiesen werden als die der anderen Globine.

Diese Nachweise von GlobinX in Geweben des adulten Krallenfrosches entsprechen im Wesentli-

chen den in Teleostiern erbrachten mRNA-Expressionen von GlobinX (Roesner et al., 2005; Roesner, 2007) und belegen damit eine gewisse Konservierung der Expressionsmuster (vgl. Tabelle 11), implizieren aber noch keine direkte Funktion dieses Globins. Gleiches gilt für den Nachweis einer erhöhten Konzentration von GlobinX in älteren gegenüber juvenilen Zebrabärblingen.

Da dieses Globin in vorwiegend bis ausschließlich aquatisch lebenden Organismen detektiert und sein Verlust in Mammaliern und Vögeln offensichtlich gut toleriert wurde, könnte es möglicherweise eine Funktion im Ausgleich von Sauerstoffschwankungen besitzen. Diesen unterliegen Gewässer schon aufgrund von Temperaturschwankungen relativ häufig und bilden damit einen Kontrast zu dem stabilen Sauerstoffgehalt der Luft. Diese Theorie ist vereinbar mit der unter Hypoxie gezeigten Verminderung der GlobinX-mRNA (Roesner et al., 2006; Roesner, 2007). Genauerem Aufschluss können hier zusätzliche biochemische Charakterisierungen des rekombinant exprimierten GlobinX-Proteins geben. Interessant wäre auch die Analyse der Regulation von GlobinX in *Xenopus* unter hypoxischen Bedingungen, die für *Xenopus* offenbar problemlos zu generieren sind (Hastings und Burggren, 1995; Territo und Altimiras, 1998).

4.2.3. Cytoglobin in Amphibien und Fischen: Hinweise auf unterschiedliche Funktionen des Globins

Cytoglobin konnte in dieser Arbeit als Einzelkopie-Gen in Amphibien und als dupliziertes Gen in Teleostiern nachgewiesen werden. Phylogenetische Analysen zeigen die Monophylie aller Vertebraten-Cytoglobine, die zudem einer deutlichen Konservierung unterliegen und damit gemeinsame Funktionen dieses Globins in Vertebraten implizieren.

In dieser Arbeit wurde Cytoglobin qualitativ bereits ab den ersten Entwicklungsstadien von *Xenopus* nachgewiesen, in den adulten Fröschen wurde es ubiquitär in allen analysierten Geweben mit einem Fokus in Herz und Gehirn detektiert. Für Fische wurde ebenfalls ein ubiquitärer Nachweis in allen untersuchten adulten Geweben erbracht, wobei Cygb-1 und Cygb-2 unterschiedliche Expressionsmuster zeigen: Cygb-1 wird bevorzugt in Herz und Hirn exprimiert und entspricht damit dem in Amphibien gezeigten Fokus. Die mRNA von Cygb-2 hingegen wird neben dem Gehirn maximal im Auge nachgewiesen. Die aus einer Genomduplikation resultierenden paralogen Cytoglobine der Teleostier zeigen damit wahrscheinlich eine Subfunktionalisierung mit unterschiedlicher Expression in differenten Geweben.

In Säugern wurde der ursprünglich als ubiquitär betrachtete Nachweis der Cygb-mRNA in fast allen Geweben von Säugern per Northern-Blot-Analyse erbracht (Burmester et al., 2002; Trent und Hargrove, 2002). Deutliche Signale wurden dabei immer auch im Herz und dem Gehirn beobachtet. Immunfärbungen mit Antikörpern detektierten jedoch zwei zelltypspezifische Expressionen des Cytoglobins: einerseits wird dieses rein cytoplasmatisch in Fibroblasten des Bindegewebes und ontogenetisch verwandten Zellen zahlreicher innerer Organe wie Herz, Leber, Niere, Darm, Leber, Lunge und Pankreas nachgewiesen (Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004). Auch in

Osteoblasten und Chondroblasten, die in besonderem Maße an der Entstehung der Extrazellulären Matrix beteiligt sind, wurde Cytoglobin lokalisiert. In Osteozyten und Chondrozyten hingegen wurde Cytoglobin fast gar nicht nachgewiesen (Schmidt et al., 2004). Andererseits wurde Cytoglobin im Kern und Cytoplasma von Neuronen detektiert (Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Diese differente Expression deutet wahrscheinlich auf unterschiedliche Funktionen von Cytoglobin in den verschiedenen Geweben hin. So scheint Cytoglobin einerseits eine Rolle in der Kollagensynthese zu besitzen: in der fibrotischen Leber von Ratten bzw. bei Zellkulturversuchen wurde Cytoglobin verstärkt nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass alle Cytoglobin-positiven Zellen (mit Ausnahme der Haut) auch das kollagenspezifische Hsp47 exprimieren (Nakatani et al., 2004). Dieser Nachweis ist kompatibel mit der für Kollagen-sezernierende Chondrocyten und Osteozyten gezeigten Cytoglobin-Expression (Schmidt et al., 2004). Die Hydroxylierung des Prokollagens durch die Prolyl-Hydroxylase verbraucht molekularen Sauerstoff (Kivirikko und Pihlajaniemi, 1998) und stabilisiert so die charakteristische Tripel-Helix des Kollagens (Mizuno et al., 2003). Der Grad der Hydroxylierung korreliert dabei mit der Menge des verfügbaren Sauerstoffs (Yen et al., 1979). Zwar besitzt die Prolyl-Hydroxylase eine deutlich geringere Sauerstoffaffinität als Cytoglobin (Hirsilä et al., 2003) und lässt so eine unmittelbare Weitergabe von O₂ zwischen Cytoglobin und der Hydroxylase als unwahrscheinlich erscheinen, trotzdem ist eine bisher unbekannt Funktion von Cytoglobin in der Kollagensynthese wahrscheinlich. Prozesse wie Osteogenese, Chondrogenese und Wundheilung sind durch akute Hypoxie gekennzeichnet (Nakatani et al., 2004) und bedingen die Induktion der Kollagensynthese (Agocha et al., 1997). In Ratten wurde unter Hypoxie eine vermehrte Cytoglobin-Expression in Herz und Leber festgestellt (Schmidt et al., 2004).

Der Nachweis von Cytoglobin im Herzen sich entwickelnder Frösche, die zeitlich mit der beginnenden Kontraktion des Herzens zusammenfällt, könnte eine Rolle von Cytoglobin hinsichtlich der sich verändernden mechanischen Ansprüche des Organs und der damit verbundenen Kollagensynthese indizieren. Dem entspräche auch der Nachweis von Cytoglobin in adulten Amphibien bzw. Cygb-1 in Teleostiern. Eine sauerstoffversorgende Rolle von Cytoglobin für den Herzmuskel ist ob des sich verändernden Metabolismus der Herzmuskelzellen mit der beginnenden Kontraktilität ebenfalls denkbar. *Xenopus* stellt ein sehr gutes Modell für die Analyse von Cytoglobin im Herzen dar: die Bildung des Herzens ist optisch in den transparenten Embryonen sehr gut zu beobachten. Ein eindrucksvoller Nachweis könnte beispielsweise durch die Generierung eines mit einem fluoreszenten Reporter wie beispielsweise dem „green fluorescent protein“ (GFP) gekoppelten Cytoglobin-Transgens geführt werden. Auch der Einsatz von Morpholinos wäre hier gut möglich: die generierten, chemisch veränderten Nukleotide lagern sich nach ihrer Injektion in die Oozyte an die komplementäre mRNA an und inhibieren diese für etwa 50 Stunden (Summerton und Weller, 1997; Heasman, 2002). Die an *Xenopus* gut untersuchte Herzentwicklung ist zwar erst etwa 106 Stunden nach der Befruchtung des Eies abgeschlossen (Warkman und Krieg, 2007), doch wesentliche Entwicklungsprozesse finden vorher statt: so ist die Entwicklung des Herzschlauches etwa 35

Stunden nach der Befruchtung abgeschlossen, die Kontraktilität beginnt nach etwa 46 Stunden und die Drehung des Herzens findet in dem Zeitraum von etwa 44-50 Stunden nach der Befruchtung statt (Warkman und Krieg, 2007). Die Inhibition von Cytoglobin durch Morpholinos in den ersten 50 Stunden der Entwicklung von *Xenopus* würde somit wesentliche Schritte der Herzentwicklung betreffen.

In neuronalen Geweben von Mammaliern wurde Cygb sowohl im Zellkern wie auch im Cytoplasma detektiert (Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005; Wystub, 2007). Nachdem die Cytoglobine der Mammalier, Teleostier und Amphibien über kein Kernlokalisierungssignal verfügen, ist die Möglichkeit einer Diffusion von Cytoglobin mit einem Molekulargewicht von nur 21 kDa durch die Kernporen hindurch bisher die einzige Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen (Wystub, 2007). Die Frage nach der Funktionalität des Cytoglobins im Kern kann derzeit aufgrund eines fehlenden Interaktionspartners nicht beantwortet werden. Die Theorie der unterschiedlichen Funktionen von Cygb wird jedoch in besonderem Maße durch die verschiedenen Expressionsmuster der paralogen Cygb-Duplikate der Teleostier unterstützt. Gerade die Teleostier bieten damit ein aussagekräftiges Modell zur Erforschung der unterschiedlichen Cytoglobin-Funktionen: beispielsweise könnten per Morpholino-Technik (Summerton und Weller, 1997) gezielt die einzelnen Cygb-Duplikate ausgeschaltet werden und so ihre Wirkung separat in der Entwicklung und adulten Teleostiern analysiert werden.

4.2.4. GlobinY: eine Funktion im Sauerstoffmetabolismus von Amphibien?

Die bisher ausschließlich in Amphibien nachgewiesene GlobinY-mRNA wurde bereits in den frühen Entwicklungsstadien von *Xenopus* maximal transkribiert und zeigte einen weiteren Expressionsfokus in der Metamorphose und in der Lunge der Adulttiere. Dies impliziert nicht nur eine grundlegende Funktion dieses Globins in der frühen Entwicklung sondern könnte – auch hinsichtlich der Ähnlichkeit der Intronverteilung von GlobinY, Myoglobin und Hämoglobin - auf eine Rolle dieses Globins in der sich ändernden Atmung der Krallenfrösche hindeuten. Zwar besitzen die Larven von *Rana catesbeiana*, dem Nordamerikanischen Ochsenfrosch, von Anfang an parallel Kiemen und Lungen, doch die Sauerstoffversorgung wird in den sich entwickelnden Tieren überwiegend durch Kiemenatmung gedeckt (Gdovin et al., 2006). Während der Metamorphose wird die Atmung dann mehr und mehr auf die Lunge umgestellt (Gdovin et al., 2006). Versuche zeigten, dass die Entwicklung der Lunge maßgeblich an der Gesamtentwicklung von Fröschen beteiligt ist: *Xenopus*-Larven, die an der Lungenatmung gehindert wurden und ihren Sauerstoffbedarf ausschließlich über die Kiemenatmung decken mussten, entwickelten sich deutlich langsamer und konnten die Metamorphose nicht vollständig abschließen (Pronych und Wassersug, 1994). Als Adultus deckt *Xenopus* seinen Sauerstoffbedarf zu 40% aus dem Wasser und zu 60% aus an der Wasseroberfläche aufgenommener Luft (Storch und Welsch, 1996). Die Lokalisation von GlobinY in der Lunge

legt eine Funktion im Sauerstoffmetabolismus, beispielsweise als Transportprotein nahe. Denkbar wäre in *Xenopus* beispielsweise eine Funktion als stark sauerstoffaffines Protein, das die Aufnahme von Sauerstoff aus der Luft unterstützt. Vor dem Hintergrund der sich ändernden Lebensbedingungen der Amphibien nach der Metamorphose ist diese Überlegung durchaus interessant: viele Spezies leben dann nicht mehr bevorzugt im Wasser, sondern an Land. Das Globin könnte hier beispielsweise ebenfalls der Sauerstoffaufnahme dienen, oder aber umgekehrt auch den Organismus vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen. Diese Hypothesen sind spekulativ und bedürfen weiterer Untersuchungen, wenngleich GlobinY mit seiner Beschränkung auf Amphibien sicherlich nicht in den gleichen Fokus des Interesses rücken wird wie Neuroglobin oder Cytoglobin.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die molekulare Evolution von Globinen in Amphibien und Teleostiern untersucht und Analysen zur Genexpression ausgewählter Globine durchgeführt. Die bisher besonders für die neueren Mitglieder der Superfamilie der Globine – Neuroglobin und Cytoglobin – schwerpunktmäßig in Mammaliern erbrachten Daten sollten durch die Analyse in Amphibien und Teleostiern auf ihre generelle Gültigkeit für Vertebraten überprüft werden. Die Analysen zur Genexpression wurden sowohl *in silico*, basierend auf genomischen wie EST-Daten, als auch experimentell durch qualitative und quantitative RT-PCR-Nachweise durchgeführt. Die mRNA-Lokalisation wurde durch *in situ*-Hybridisierungen an Gewebeschnitten beziehungsweise durch Whole mount *in situ*-Hybridisierung an ganzen Embryonen detektiert.

In einem ersten Teil der Arbeit wurde das Globin-Repertoire von *Xenopus tropicalis* umfassend analysiert. Die Expressionsanalyse der gefundenen Globine umfasste nicht nur adulte Tiere, sondern erstmals auch detailliert die Entwicklungsstadien eines Vertebraten. Dabei wurde festgestellt, dass die vorwiegend neuronale Expression des streng konservierten Neuroglobins ein generelles Charakteristikum aller Tetrapoden ist und bereits in der frühembryonalen Entwicklung auftritt. Auch für das als Einzelkopie im Amphibiengenom vertretene Cytoglobin konnte eine strenge Sequenzkonservierung gezeigt werden. Das Expressionsmuster des Amphibien-Cytoglobins stimmte mit dem aus Mammaliern bekannten überein und zeigte konservierte Charakteristika dieses Globins bei Tetrapoden auf. Die Analyse des *Xenopus*-Genoms ergab zudem, dass Krallenfrösche nicht über Myoglobin verfügen. Genomische Vergleiche syntäner Genregionen ließen auf Rearrangements in diesem Genombereich im Verlauf der Evolution schließen, in deren Folge das Myoglobin in den Krallenfröschen deletiert wurde. Die Hämoglobine wurden in *Xenopus tropicalis* erstmals in einem Amphibium umfassend analysiert. Die Gene zeigten demnach eine geclusterte Anordnung: der tropische Krallenfrosch verfügte über je ein funktionelles α - bzw. β -adultes und sieben bzw. vier α - bzw. β -larvale Hämoglobine, die während der Entwicklung bzw. in adulten Tieren charakteristisch exprimiert wurden. Die Analyse der Hämoglobine hinsichtlich ihrer Lage in einem Cluster, ihrer phylogenetischen Relation zueinander und nicht zuletzt ihres Expressionsmusters ließen Rückschlüsse auf ihre Evolution zu. Zusätzlich zu diesen bereits bekannten Globinen konnte im Rahmen dieser Dissertation das Globingen-Repertoires von *Xenopus* um zwei weitere, bisher unbekannte Globine erweitert werden. Diese wurden entsprechend ihrer bisher unbekanntten Funktion als GlobinX und GlobinY bezeichnet. Während GlobinY bisher ausschließlich in Amphibien nachgewiesen werden konnte, wurde GlobinX zudem in Teleostiern detektiert und repräsentiert damit ein auf Anamnia beschränktes Globin. Die rekombinante Proteinexpression von Neuroglobin, Cytoglobin, GlobinX und GlobinY des tropischen Krallenfrosches zeigte ein hexakordiniertes Bindungsschema dieser Globine in ihrem Deoxy-Zustand.

In einem zweiten Teil dieser Dissertation wurden Neuroglobin und Cytoglobin in Teleostiern untersucht und die Analyse für diese zwei Gene somit über die Tetrapoden hinaus auf den gesamten Stammbaum der Vertebraten ausgedehnt. Dabei wurde deutlich, dass die vorwiegend neuronale Expression des seit 420 Millionen Jahren streng konservierten Neuroglobins ein generelles Merkmal dieses Globins in allen Vertebraten ist. Der in Amphibien und Teleostiern erbrachte und mit Ergebnissen in Mammaliern übereinstimmende Nachweis von Neuroglobin in neuronalen Geweben mit einem hohen Stoffwechsel lässt derzeit eine Funktion dieses Globins im Sauerstoffmetabolismus als wahrscheinlich erscheinen. Ob Neuroglobin dabei als kurzzeitiger Sauerstoffspeicher, O₂-Transporter oder aber in der Detoxifikation reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies agiert, bleibt zu untersuchen.

Für Cytoglobin konnte eine offenbar alle Teleostier betreffende Genduplikation nachgewiesen werden. Phylogenetische Analysen zeigen die Monophylie der Vertebraten-Cytoglobine. Der Vergleich der paralogen Cytoglobine der Teleostier mit dem syntenen Genombereich des humanen Cytoglobins zeigte die wahrscheinliche Entstehung der Fisch-Cytoglobine durch eine Genomduplikation in einem Vorfahren aller Teleostier vor etwa 300-450 Millionen Jahren. Die paralogen Cytoglobine zeigten in *Danio rerio* und *Tetraodon nigroviridis* differierende, charakteristische Expressionsmuster, die mit der Theorie der Subfunktionalisierung von Genen in Folge eines Duplikationsereignisses kompatibel sind. Die Analyse zeigte, dass Cygb-1 prädominant in Gehirn und Herz exprimiert wurde, Cygb-2 hingegen bevorzugt in Gehirn und Auge. Dies bestätigte indirekt die Hypothese, nach der das Cytoglobin der Mammalier zwei unterschiedliche Funktionen in differenten Geweben wahrnimmt. Die rekombinante Expression von Cygb-1 des Zebrafischs zeigte zudem, dass auch dieses Globin in seiner Deoxy-Form über ein hexakoordiniertes Bindungsschema verfügt.

6. Literaturverzeichnis

- Agocha, A., Lee, H.W., und Eghbali-Webb, M. 1997. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Mol Cell Cardiol.* 29:2233-44.
- Aida, T. 1921. On the inheritance of color in a fresh-water fish, *Aplocheilichthys latipes* (Temminck and Schlegel), with special reference to sex-linked inheritance. *Genetics* 6:554-573.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-10.
- Amato, M.A., Boy, S., Arnault, E., Girard, M., Della Puppa, A., Sharif, A., und Perron, M. 2005. Comparison of the expression patterns of five neural RNA binding proteins in the *Xenopus* retina. *J Comp Neurol.* 481:331-9.
- Anderson, B., Jr. 1968. Ocular effects of changes in oxygen and carbon dioxide tension. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 66:423-74.
- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M.D., Roach, J., Oh, T., Ho, I.Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S.F., Clark, M.S., Edwards, Y.J., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S.V., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y.H., Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D., und Brenner, S. 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science.* 297:1301-10.
- Arredondo-Peter, R., Moran, J.F., Sarath, G., Luan, P., und Klucas, R.V. 1997. Molecular cloning of the cowpea leghemoglobin II gene and expression of its cDNA in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the recombinant protein. *Plant Physiol.* 114:493-500.
- Awenius, C., Hankeln, T., und Burmester, T. 2001. Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 287:418-21.
- Baldari, C.T., und Amaldi, F. 1976. DNA reassociation kinetics in relation to genome size in four amphibian species. *Chromosoma.* 59:13-22.
- Bargmann, C. 1996. From the nose to the brain. *Nature.* 384:512-3.
- Baylor, S.M., und Pape, P.C. 1988. Measurement of myoglobin diffusivity in the myoplasm of frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 406:247-75.
- Benton, M.J. 1990. Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates. *J Mol Evol.* 30:409-24.
- Benton, M.J., und Donoghue, P.C. 2007. Paleontological evidence to date the tree of life. *Mol Biol Evol.* 24:26-53.
- Berner, R.A. 1999. Atmospheric oxygen over Phanerozoic time. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10955-7.
- Bickler, P.E., und Buck, L.T. 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu Rev Physiol.* 69:145-70.
- Bickler, P.E., und Donohoe, P.H. 2002. Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *J Exp Biol.* 205:3579-86.
- Bisbee, C.A., Baker, M.A., Wilson, A.C., Haji-Azimi, I., und Fischberg, M. 1977. Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science.* 195:785-7.
- Blackburn, A.C., Matthaiei, K.I., Lim, C., Taylor, M.C., Cappello, J.Y., Hayes, J.D., Anders, M.W., und Board, P.G. 2006. Deficiency of glutathione transferase zeta causes oxidative stress and activation of antioxidant response pathways. *Mol Pharmacol.* 69:650-7.
- Bollag, R.J., Elwood, D.R., Tobin, E.D., Godwin, A.R., und Liskay, R.M. 1992. Formation of heteroduplex DNA during mammalian intrachromosomal gene conversion. *Mol Cell Biol.* 12:1546-52.
- Bolognesi, M., Bordo, D., Rizzi, M., Tarricone, C., und Ascenzi, P. 1997. Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog Biophys Mol Biol.* 68:29-68.
- Bork, P. 1993. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins.* 17:363-74.

- Boussios, T., Bertles, J.F., und Clegg, J.B. 1982. Simultaneous expression of globin genes for embryonic and adult hemoglobins during mammalian ontogeny. *Science*. 218:1225-7.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., und Aparicio, S. 1993. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*. 366:265-8.
- Bromham, L., Rambaut, A., Fortey, R., Cooper, A., und Penny, D. 1998. Testing the Cambrian explosion hypothesis by using a molecular dating technique. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:12386-9.
- Brunet, F.G., Crollius, H.R., Paris, M., Aury, J.M., Gibert, P., Jaillon, O., Laudet, V., und Robinson-Rechavi, M. 2006. Gene loss and evolutionary rates following whole-genome duplication in teleost fishes. *Mol Biol Evol.* 23:1808-16.
- Brunori, M., Giuffre, A., Nienhaus, K., Nienhaus, G.U., Scandurra, F.M., und Vallone, B. 2005. Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8483-8.
- Brunori, M., Giuffre, A., Sarti, P., Stubauer, G., und Wilson, M.T. 1999. Nitric oxide and cellular respiration. *Cell Mol Life Sci.* 56:549-57.
- Brunori, M., und Vallone, B. 2007. Neuroglobin, seven years after. *Cell Mol Life Sci.*
- Burki, E., und Fischberg, M. 1985. Evolution of globin expression in the genus *Xenopus* (Anura: Pipidae). *Mol Biol Evol.* 2:270-7.
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., und Hankeln, T. 2002. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol.* 19:416-21.
- Burmester, T., Gerlach, F., und Hankeln, T. 2007. Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia. Springer, New York.
- Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., Schmidt, M., Ebner, B., Gerlach, F., Fuchs, C., und Hankeln, T. 2004. Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution. *IUBMB Life.* 56:703-7.
- Burmester, T., und Hankeln, T. 2004. Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News Physiol Sci.* 19:110-3.
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., und Hankeln, T. 2000. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 407:520-3.
- Burnside, B. 1978. Thin (actin) and thick (myosinlike) filaments in cone contraction in the teleost retina. *J Cell Biol.* 78:227-46.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25:169-93.
- Carothers, A.M., Urlaub, G., Mucha, J., Grunberger, D., und Chasin, L.A. 1989. Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. *Biotechniques.* 7:494-6, 498-9.
- Chada, K., Magram, J., und Costantini, F. 1986. An embryonic pattern of expression of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Nature*. 319:685-9.
- Chen, W.J., Orti, G., und Meyer, A. 2004. Novel evolutionary relationship among four fish model systems. *Trends Genet.* 20:424-31.
- Chomczynski, P., und Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.
- Christoffels, A., Koh, E.G., Chia, J.M., Brenner, S., Aparicio, S., und Venkatesh, B. 2004. *Fugu* genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol.* 21:1146-51.
- Claiborne, J.B., Edwards, S.L., und Morrison-Shetlar, A.I. 2002. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *J Exp Zool.* 293:302-19.
- Coen, L., du Pasquier, D., Le Mevel, S., Brown, S., Tata, J., Mazabraud, A., und Demeneix, B.A. 2001. *Xenopus* Bcl-X(L) selectively protects Rohon-Beard neurons from metamorphic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7869-74.
- Crnogorac-Jurcevic, T., Brown, J.R., Lehrach, H., und Schalkwyk, L.C. 1997. *Tetraodon fluviatilis*, a new puffer fish model for genome studies. *Genomics.* 41:177-84.

- Crosier, P.S., Kaley-Zylinska, M.L., Hall, C.J., Flores, M.V., Horsfield, J.A., und Crosier, K.E. 2002. Pathways in blood and vessel development revealed through zebrafish genetics. *Int J Dev Biol.* 46:493-502.
- Daga, R.R., Thode, G., und Amores, A. 1996. Chromosome complement, C-banding, Ag-NOR and replication banding in the zebrafish *Danio rerio*. *Chromosome Res.* 4:29-32.
- Dasilva, C., Hadji, H., Ozouf-Costaz, C., Nicaud, S., Jaillon, O., Weissenbach, J., und Roest Crollius, H. 2002. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:13636-41.
- Daudin, F.-M. 1802. Histoire naturelle des rainettes, des grenouilles et des crapauds. .
- Dayhoff, M.O., und Orcutt, B.C. 1979. Methods for identifying proteins by using partial sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:2170-4.
- De Leo, A.A., Wheeler, D., Lefevre, C., Cheng, J.F., Hope, R., Kuliwaba, J., Nicholas, K.R., Westerman, M., und Graves, J.A. 2005. Sequencing and mapping hemoglobin gene clusters in the Australian model dasyurid marsupial *Sminthopsis macroura*. *Cytogenet Genome Res.* 108:333-41.
- de Procé, M. 1822. Sur plusieurs espèces nouvelles de poissons et de crustacés observées dans un voyage de France à Manille. . *Bull. Soc. Philomath. Paris:*129-134.
- de Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., und Bolognesi, M. 2004. Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination. *J Mol Biol.* 336:917-27.
- Devaney, K.O., und Johnson, H.A. 1980. Neuron loss in the aging visual cortex of man. *J Gerontol.* 35:836-41.
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuz, V., Aerts, T., Marden, M.C., Caubergs, R., und Moens, L. 2001. Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem.* 276:38949-55.
- di Prisco, G., Cocca, E., Parker, S., und Detrich, H. 2002. Tracking the evolutionary loss of hemoglobin expression by the white-blooded Antarctic icefishes. *Gene.* 295:185-91.
- Dickerson, A.E., und Geis, I. 1983. Hemoglobin: Structure, Funktion, Evolution and Pathology.
- Dixon, B., und Pohajdak, B. 1992. Did the ancestral globin gene of plants and animals contain only two introns? *Trends Biochem Sci.* 17:486-8.
- Douglas, R.H., Harper, R.D., und Case, J.F. 1998. The pupil response of a teleost fish, *Porichthys notatus*: description and comparison to other species. *Vision Res.* 38:2697-710.
- Easter, S.S., Jr., und Malicki, J.J. 2002. The zebrafish eye: developmental and genetic analysis. *Results Probl Cell Differ.* 40:346-70.
- Ebner, B., Burmester, T., und Hankeln, T. 2003. Globin genes are present in *Ciona intestinalis*. *Mol Biol Evol.* 20:1521-5.
- Einstein, A. 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. . *Annalen der Physik.* 17:549-560.
- Fadool, J.M. 2003. Development of a rod photoreceptor mosaic revealed in transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 258:277-90.
- Fago, A., Hundahl, C., Dewilde, S., Gilany, K., Moens, L., und Weber, R.E. 2004a. Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *J Biol Chem.* 279:44417-26.
- Fago, A., Hundahl, C., Malte, H., und Weber, R.E. 2004b. Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins. *IUBMB Life.* 56:689-96.
- Fago, A., Mathews, A.J., Moens, L., Dewilde, S., und Brittain, T. 2006. The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c. *FEBS Lett.* 580:4884-8.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Milligan, A.J., Fennel, K., Cramer, B.S., Aubry, M.P., Berner, R.A., Novacek, M.J., und Zapol, W.M. 2005. The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science.* 309:2202-4.
- Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Sifringer, M., Jarosz, B., Korobowicz, E., Mahler, L., Piening, T., Moysich, A., Grune, T., Thor, F., Heumann, R., Bührer, C., und Ikonomidou, C. 2004. Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis.* 17:273-82.

- Feller, G., Goessens, G., Gerday, C., und Bassleer, R. 1985. Heart structure and ventricular ultrastructure of hemoglobin- and myoglobin-free icefish *Channichthys rhinoceratus*. *Cell Tissue Res*. 242:669-76.
- Fitch, D.H., Bailey, W.J., Tagle, D.A., Goodman, M., Sieu, L., und Slightom, J.L. 1991. Duplication of the gamma-globin gene mediated by L1 long interspersed repetitive elements in an early ancestor of simian primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:7396-400.
- Flögel, U., Gödecke, A., Klotz, L.O., und Schrader, J. 2004. Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *Faseb J*. 18:1156-8.
- Flögel, U., Merx, M.W., Gödecke, A., Decking, U.K., und Schrader, J. 2001. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:735-40.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., und Postlethwait, J. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*. 151:1531-45.
- Fordel, E., Thijs, L., Moens, L., und Dewilde, S. 2007. Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging. *Febs J*. 274:1312-7.
- Freitas, I., Griffini, P., Bertone, V., Bertone, R., Fenoglio, C., Milliere, R., und Vairetti, M. 2002. In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast. *Exp Gerontol*. 37:591-602.
- Freitas, T.A., Hou, S., Dioum, E.M., Saito, J.A., Newhouse, J., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M.A., und Alam, M. 2004. Ancestral hemoglobins in Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:6675-80.
- Fuchs, C. 2002. „Isolierung und Expressionsanalyse von Globingenen bei Fischen und Amphibien“. Diplomarbeit.
- Fuchs, C., Burmester, T., und Hankeln, T. 2006. The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome. *Cytogenet Genome Res*. 112:296-306.
- Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, M., Hamdane, D., Marden, M.C., Hankeln, T., und Burmester, T. 2004. Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding. *J Biol Chem*. 279:24116-22.
- Fuchs, C., Luckhardt, A., Gerlach, F., Burmester, T., und Hankeln, T. 2005. Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes. *Biochem Biophys Res Commun*. 337:216-23.
- Furutani-Seiki, M., Sasado, T., Morinaga, C., Suwa, H., Niwa, K., Yoda, H., Deguchi, T., Hirose, Y., Yasuoka, A., Henrich, T., Watanabe, T., Iwanami, N., Kitagawa, D., Saito, K., Asaka, S., Osakada, M., Kunimatsu, S., Momoi, A., Elmasri, H., Winkler, C., Ramialison, M., Loosli, F., Quiring, R., Carl, M., Grabher, C., Winkler, S., Del Bene, F., Shinomiya, A., Kota, Y., Yamanaka, T., Okamoto, Y., Takahashi, K., Todo, T., Abe, K., Takahama, Y., Tanaka, M., Mitani, H., Katada, T., Nishina, H., Nakajima, N., Wittbrodt, J., und Kondoh, H. 2004. A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev*. 121:647-58.
- Gardner, P.R. 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J Inorg Biochem*. 99:247-66.
- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., und Salzman, A.L. 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:10378-83.
- Garry, D.J., Ordway, G.A., Lorenz, J.N., Radford, N.B., Chin, E.R., Grange, R.W., Bassel-Duby, R., und Williams, R.S. 1998. Mice without myoglobin. *Nature*. 395:905-8.
- Gdovin, M.J., Jackson, V.V., Zamora, D.A., und Leiter, J.C. 2006. Effect of prevention of lung inflation on metamorphosis and respiration in the developing bullfrog tadpole, *Rana catesbeiana*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 305:335-47.
- Gerstein, M.B., Bruce, C., Rozowsky, J.S., Zheng, D., Du, J., Korbil, J.O., Emanuelsson, O., Zhang, Z.D., Weissman, S., und Snyder, M. 2007. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res*. 17:669-81.
- Geuens, E., Brouns, I., Flamez, D., Dewilde, S., Timmermans, J.P., und Moens, L. 2003. A globin in the nucleus! *J Biol Chem*. 278:30417-20.
- Giardina, B., Ascenzi, P., Clementi, M.E., De Sanctis, G., Rizzi, M., und Coletta, M. 1996. Functional modulation by lactate of myoglobin. A monomeric allosteric hemoprotein. *J Biol Chem*. 271:16999-7001.

- Gillemans, N., McMorrow, T., Tewari, R., Wai, A.W., Burgtorf, C., Drabek, D., Ventress, N., Langeveld, A., Higgs, D., Tan-Un, K., Grosveld, F., und Philippsen, S. 2003. Functional and comparative analysis of globin loci in pufferfish and humans. *Blood*. 101:2842-9.
- Giordano, A., Tonello, C., Bulbarelli, A., Cozzi, V., Cinti, S., Carruba, M.O., und Nisoli, E. 2002. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett*. 514:135-40.
- Gödecke, A. 2006. On the impact of NO-globin interactions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 69:309-17.
- Gödecke, A., Flögel, U., Zanger, K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Decking, U.K., und Schrader, J. 1999. Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:10495-500.
- Gödecke, A., und Schrader, J. 2000. Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice--lessons from eNOS and myoglobin knockout mice. *Basic Res Cardiol*. 95:492-8.
- Goodman, M., Czelusniak, J., Koop, B.F., Tagle, D.A., und Slightom, J.L. 1987. Globins: a case study in molecular phylogeny. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 52:875-90.
- Goodman, M., Pedwaydon, J., Czelusniak, J., Suzuki, T., Gotoh, T., Moens, L., Shishikura, F., Walz, D., und Vinogradov, S. 1988. An evolutionary tree for invertebrate globin sequences. *J Mol Evol*. 27:236-49.
- Graf, J.D., und Kobel, H.R. 1991. Genetics of *Xenopus laevis*. *Methods Cell Biol*. 36:19-34.
- Grange, R.W., Meeson, A., Chin, E., Lau, K.S., Stull, J.T., Shelton, J.M., Williams, R.S., und Garry, D.J. 2001. Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281:C1487-94.
- Grapin-Botton, A., und Melton, D.A. 2000. Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet*. 16:124-30.
- Gray, J.E. 1864. Notice of a new Genus (Silurana) of frogs from West Africa. *Annals and Magazine of Natural History, London* 14:315 ff.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B.N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L., und Marden, M.C. 2003. The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. *J Biol Chem*. 278:51713-21.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B.N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L., und Marden, M.C. 2004. Coupling of the heme and an internal disulfide bond in human neuroglobin. *Micron*. 35:59-62.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., und Marden, M.C. 2005. Hyperthermal stability of neuroglobin and cytoglobin. *FEBS J*. 272:2076-84.
- Hamilton, F. 1822. An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Edinburgh & London. . In *Fishes Ganges I-VII+*. 1-405.
- Hanel, M.L., und Hensey, C. 2006. Eye and neural defects associated with loss of GDF6. *BMC Dev Biol*. 6:43.
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T.L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M.C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R.E., Fago, A., und Burmester, T. 2005. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J Inorg Biochem*. 99:110-9.
- Hankeln, T., Friedl, H., Ebersberger, I., Martin, J., und Schmidt, E.R. 1997. A variable intron distribution in globin genes of *Chironomus*: evidence for recent intron gain. *Gene*. 205:151-60.
- Hankeln, T., Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Gerlach, F., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., und Burmester, T. 2004. The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function? *IUBMB Life*. 56:671-9.
- Hardison, R. 1998. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J Exp Biol*. 201:1099-117.
- Hardison, R.C. 1996. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:5675-9.
- Harland, R.M. 1991. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol*. 36:685-95.

- Hastings, D., und Burggren, W. 1995. Developmental changes in oxygen consumption regulation in larvae of the South African clawed frog *Xenopus laevis*. *J Exp Biol.* 198:2465-75.
- Heasman, J. 2002. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol.* 243:209-14.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., und Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-94.
- Hentschel, C.C., Kay, R.M., und Williams, J.G. 1979. Analysis of *Xenopus laevis* globins during development and erythroid cell maturation and the construction of recombinant plasmids containing sequences derived from adult globin mRNA. *Dev Biol.* 72:350-63.
- Herold, S., und Fago, A. 2005. Reactions of peroxynitrite with globin proteins and their possible physiological role. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 142:124-9.
- Herold, S., Fago, A., Weber, R.E., Dewilde, S., und Moens, L. 2004. Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *J Biol Chem.* 279:22841-7.
- Hinchliffe, J.R. 2002. Developmental basis of limb evolution. *Int J Dev Biol.* 46:835-45.
- Hinegardner, R. 1968. Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *Am. Nat.* 102:517-523.
- Hinegardner, R., und Rosen, D.E. 1972. Cellular DNA content and evolution of teleostean fishes. *Am. Nat.* 106:621-644. .
- Hirsch, N., Zimmerman, L.B., und Grainger, R.M. 2002. *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Dev Dyn.* 225:422-33.
- Hirsilä, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K.I., und Myllyharju, J. 2003. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 278:30772-80.
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., und Meyer, A. 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol.* 59:190-203.
- Holland, R.A., und Gooley, A.A., 2nd. 1997. Characterization of the embryonic globin chains of the marsupial Tammar wallaby, *Macropus eugenii*. *Eur J Biochem.* 248:864-71.
- Holland, R.A., Gooley, A.A., und Hope, R.M. 1998. Embryonic globins of the marsupial the Tammar Wallaby (*Macropus eugenii*): bird like and mammal like. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 25:740-4.
- Holmqvist, B., Ellingsen, B., Forsell, J., Zhdanova, I., und Alm, P. 2004. The early ontogeny of neuronal nitric oxide synthase systems in the zebrafish. *J Exp Biol.* 207:923-35.
- Holt, C.E., Bertsch, T.W., Ellis, H.M., und Harris, W.A. 1988. Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron.* 1:15-26.
- Hosbach, H.A., Widmer, H.J., Andres, A.C., und Weber, R. 1982. Expression and organization of the globin genes in *Xenopus laevis*. *Prog Clin Biol Res.* 85 Pt A:115-25.
- Hosbach, H.A., Wyler, T., und Weber, R. 1983. The *Xenopus laevis* globin gene family: chromosomal arrangement and gene structure. *Cell.* 32:45-53.
- Huelsenbeck, J.P., und Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 17:754-5.
- Hughes, M.K., und Hughes, A.L. 1993. Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal, *Xenopus laevis*. *Mol Biol Evol.* 10:1360-9.
- Hundahl, C., Fago, A., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., Burmester, T., und Weber, R.E. 2006. Oxygen binding properties of non-mammalian nerve globins. *Febs J.* 273:1323-9.
- Hundahl, C., Stoltenberg, M., Fago, A., Weber, R.E., Dewilde, S., Fordel, E., und Danscher, G. 2005. Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 31:610-7.
- Ishikawa, Y. 2000. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *Bioessays.* 22:487-95.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Brunet, F., Petit, J.L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubin, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biemont, C., Skalli, Z., Catto-lico, L., Poulain, J., De Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J.P., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K.J., McEwan, P., Bosak, S., Kellis, M., Volff, J.N., Guigo, R., Zody, M.C., Mesirov, J., Lindblad-Toh, K., Birren, B., Nusbaum, C., Kahn, D., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Schachter, V., Quetier, F., Saurin,

- W., Scarpelli, C., Wincker, P., Lander, E.S., Weissenbach, J., und Roest Crolius, H. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. 431:946-57.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Wood, D., Simons, J.P., Kay, R.M., und Williams, J.G. 1980. Linkage of adult alpha- and beta-globin genes in *X. laevis* and gene duplication by tetraploidization. *Cell*. 21:555-64.
- Jenkins, R.J.F. 1991. The early environment. *Metazoan life without oxygen*.
- Johansen, K., und Pettersson, K. 1981. Gill O₂ consumption in a teleost fish, *Gadus morhua*. *Respir Physiol*. 44:277-84.
- Junge, F.A. 2006. Funktionelle Charakterisierung neuartiger Globine bei *Xenopus*. Diplomarbeit.
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin, I.T., Takeda, H., Morishita, S., und Kohara, Y. 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*. 447:714-9.
- Kau, C.L., und Turpen, J.B. 1983. Dual contribution of embryonic ventral blood island and dorsal lateral plate mesoderm during ontogeny of hemopoietic cells in *Xenopus laevis*. *J Immunol*. 131:2262-6.
- Kawada, N., Kristensen, D.B., Asahina, K., Nakatani, K., Minamiyama, Y., Seki, S., und Yoshizato, K. 2001. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 276:25318-23.
- Kendrew, J.C. 1959. Structure and function in myoglobin and other proteins. *Fed Proc*. 18:740-51.
- Kendrew, J.C. 1963. Myoglobin and the structure of proteins. *Science*. 139:1259-66.
- Kiger, L., Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane, D., Baudin-Creuz, V., und Marden, M. 2004. Neuroglobin ligand binding kinetics. *IUBMB Life*. 56:709-19.
- Kikkawa, M., Yamazaki, M., Izutsu, Y., und Maeno, M. 2001. Two-step induction of primitive erythrocytes in *Xenopus laevis* embryos: signals from the vegetal endoderm and the overlying ectoderm. *Int J Dev Biol*. 45:387-96.
- Kimelberg, H.K., und Norenberg, M.D. 1989. Astrocytes. *Sci Am*. 260:66-72, 74, 76.
- Kivirikko, K.I., und Pihlajaniemi, T. 1998. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 72:325-98.
- Klein, S.L., Strausberg, R.L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S.W., und Richardson, P. 2002. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn*. 225:384-91.
- Knöchel, W., Beck, J., und Meyerhof, W. 1987. Nucleotide sequence of the *Xenopus tropicalis* larval beta globin gene. *Nucleic Acids Res*. 15:10062.
- Knöchel, W., Korge, E., Basner, A., und Meyerhof, W. 1986. Globin evolution in the genus *Xenopus*: comparative analysis of cDNAs coding for adult globin polypeptides of *Xenopus borealis* and *Xenopus tropicalis*. *J Mol Evol*. 23:211-23.
- Knöchel, W., Meyerhof, W., Stalder, J., und Weber, R. 1985. Comparative nucleotide sequence analysis of two types of larval beta-globin mRNAs of *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res*. 13:7899-908.
- Knöchel, W., Pfanne, K., Beck, J., und Meyerhof, W. 1988. Nucleotide sequence of a larval alpha globin gene from *Xenopus tropicalis*. *Nucleic Acids Res*. 16:1625.
- Kriegel, J.M., Bhattacharyya, A.J., Nienhaus, K., Deng, P., Minkow, O., und Nienhaus, G.U. 2002. Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7992-7.
- Kugelstadt, D., Haberkamp, M., Hankeln, T., und Burmester, T. 2004. Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochem Biophys Res Commun*. 325:719-25.
- Kumar, S., und Hedges, S.B. 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*. 392:917-20.
- Kumar, S., Tamura, K., und Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 5:150-63.

- Kundu, S., und Hargrove, M.S. 2003. Distal heme pocket regulation of ligand binding and stability in soybean leghemoglobin. *Proteins*. 50:239-48.
- Kundu, S., Trent, J.T., 3rd, und Hargrove, M.S. 2003. Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci*. 8:387-93.
- Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Schmid, M., und Schartl, M. 2000. Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry*. 39:91-5.
- Lau, E.T., Kwok, Y.K., Chui, D.H., Wong, H.S., Luo, H.Y., und Tang, M.H. 2001. Embryonic and fetal globins are expressed in adult erythroid progenitor cells and in erythroid cell cultures. *Prenat Diagn*. 21:529-39.
- Laufs, T.L., Wystub, S., Reuss, S., Burmester, T., Saaler-Reinhardt, S., und Hankeln, T. 2004. Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neurosci Lett*. 362:83-6.
- Lee, L.G., Connell, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D., und Wilson, R.K. 1992. DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res*. 20:2471-83.
- Li, M., und Rohrer, B. 2006. Gene silencing in *Xenopus laevis* by DNA vector-based RNA interference and transgenesis. *Cell Res*. 16:99-105.
- Li, R.C., Lee, S.K., Pouranfar, F., Brittan, K.R., Clair, H.B., Row, B.W., Wang, Y., und Gozal, D. 2006. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain. *Brain Res*. 1096:173-9.
- Liu, Y.T., Old, J.M., Miles, K., Fisher, C.A., Weatherall, D.J., und Clegg, J.B. 2000. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. *Br J Haematol*. 108:295-9.
- Logsdon, J.M., Jr., Stoltzfus, A., und Doolittle, W.F. 1998. Molecular evolution: recent cases of spliceosomal intron gain? *Curr Biol*. 8:R560-3.
- Lopez, J.M., Moreno, N., und Gonzalez, A. 2002. Localization of choline acetyltransferase in the developing and adult retina of *Xenopus laevis*. *Neurosci Lett*. 330:61-4.
- Lynch, M., und Conery, J.S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*. 290:1151-5.
- Lynch, M., und Force, A. 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*. 154:459-73.
- Lyndon, A.R., und Houlihan, D.F. 1998. Gill protein turnover: costs of adaptation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 119:27-34.
- Maeno, M., Tochinai, S., und Katagiri, C. 1985. Differential participation of ventral and dorsolateral mesoderms in the hemopoiesis of *Xenopus*, as revealed in diploid-triploid or interspecific chimeras. *Dev Biol*. 110:503-8.
- Mammen, P.P., Kanatous, S.B., Yuhanna, I.S., Shaul, P.W., Garry, M.G., Balaban, R.S., und Garry, D.J. 2003. Hypoxia-induced left ventricular dysfunction in myoglobin-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285:H2132-41.
- Mammen, P.P., Shelton, J.M., Goetsch, S.C., Williams, S.C., Richardson, J.A., Garry, M.G., und Garry, D.J. 2002. Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J Histochem Cytochem*. 50:1591-8.
- Marc, R.E., und Cameron, D. 2001. A molecular phenotype atlas of the zebrafish retina. *J Neurocytol*. 30:593-654.
- Marcus, R.C., Delaney, C.L., und Easter, S.S., Jr. 1999. Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Vis Neurosci*. 16:417-24.
- Marshall, W.S. 2002. Na(+), Cl(-), Ca(2+) and Zn(2+) transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J Exp Zool*. 293:264-83.
- Mayden, R.L., Tang, K.L., Conway, K.W., Freyhof, J., Chamberlain, S., Haskins, M., Schneider, L., Sudkamp, M., Wood, R.M., Agnew, M., Bufalino, A., Sulaiman, Z., Miya, M., Saitoh, K., und He, S. 2007. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*.
- McCarthy, E.F. 1943. The oxygen affinity of human maternal and foetal haemoglobin. *J Physiol*. 102:55-61.

- Meeson, A.P., Radford, N., Shelton, J.M., Mammen, P.P., DiMaio, J.M., Hutcheson, K., Kong, Y., Elterman, J., Williams, R.S., und Garry, D.J. 2001. Adaptive mechanisms that preserve cardiac function in mice without myoglobin. *Circ Res.* 88:713-20.
- Metzenberg, A.B., Wurzer, G., Huisman, T.H., und Smithies, O. 1991. Homology requirements for unequal crossing over in humans. *Genetics.* 128:143-61.
- Meyer, A., und Schartl, M. 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol.* 11:699-704.
- Meyer, A., und Van de Peer, Y. 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays.* 27:937-45.
- Milton, S.L., Nayak, G., Lutz, P.L., und Prentice, H.M. 2006. Gene transcription of neuroglobin is upregulated by hypoxia and anoxia in the brain of the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*. *J Biomed Sci.* 13:509-14.
- Minning, D.M., Gow, A.J., Bonaventura, J., Braun, R., Dewhirst, M., Goldberg, D.E., und Stamler, J.S. 1999. Ascaris haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature.* 401:497-502.
- Mizuno, K., Hayashi, T., und Bachinger, H.P. 2003. Hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix. Further characterization of peptides with 4(R)-hydroxyproline in the Xaa position. *J Biol Chem.* 278:32373-9.
- Moens, L., Vanfleteren, J., Van de Peer, Y., Peeters, K., Kapp, O., Czeluzniak, J., Goodman, M., Blaxter, M., und Vinogradov, S. 1996. Globins in nonvertebrate species: dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. *Mol Biol Evol.* 13:324-33.
- Moylan, T.J., und Sidell, B.D. 2000. Concentrations of myoglobin and myoglobin mRNA in heart ventricles from Antarctic fishes. *J Exp Biol.* 203:1277-86.
- Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., und Nusslein-Volhard, C. 1994. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol.* 4:189-202.
- Mullis, K.B., und Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Nadeau, J.H., und Sankoff, D. 1997. Comparable rates of gene loss and functional divergence after genome duplications early in vertebrate evolution. *Genetics.* 147:1259-66.
- Nakai, K., und Horton, P. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 24:34-6.
- Nakatani, K., Okuyama, H., Shimahara, Y., Saeki, S., Kim, D.H., Nakajima, Y., Seki, S., Kawada, N., und Yoshizato, K. 2004. Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest.* 84:91-101.
- Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, M., Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M., und Shima, A. 2000. A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics.* 154:1773-84.
- Naruse, K., Hori, H., Shimizu, N., Kohara, Y., und Takeda, H. 2004a. Medaka genomics: a bridge between mutant phenotype and gene function. *Mech Dev.* 121:619-28.
- Naruse, K., Tanaka, M., Mita, K., Shima, A., Postlethwait, J., und Mitani, H. 2004b. A medaka gene map: the trace of ancestral vertebrate proto-chromosomes revealed by comparative gene mapping. *Genome Res.* 14:820-8.
- Nelson, J.S. 2006. Fishes of the world.
- Nieuwkoop, P.D., und Faber, J. 1975. "Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), 2nd Ed."
- O'Kusky, J., und Colonnier, M. 1982. A laminar analysis of the number of neurons, glia, and synapses in the adult cortex (area 17) of adult macaque monkeys. *J Comp Neurol.* 210:278-90.
- Ohinata, H., und Enami, T. 1991. Contribution of Ventral Blood Island (VBI)-Derived Cells to Post-embryonic Liver Erythropoiesis in *Xenopus laevis*. *Develop. Growth & Differ.* 33:299-306
- Ohno, S. 1999. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Semin Cell Dev Biol.* 10:517-22.

- Ordway, G.A., und Garry, D.J. 2004. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol.* 207:3441-6.
- Patient, R.K., Elkington, J.A., Kay, R.M., und Williams, J.G. 1980. Internal organization of the major adult alpha- and beta-globin genes of *X. laevis*. *Cell.* 21:565-73.
- Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M.L., und Harris, W.A. 1998. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol.* 199:185-200.
- Perry, S.F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu Rev Physiol.* 59:325-47.
- Perutz, M.F. 1964a. The Hemoglobin Molecule. *Sci Am.* 211:64-76.
- Perutz, M.F. 1964b. The Structure of Myoglobin and Haemoglobin. *Dan Tidsskr Farm.* 38:113-22.
- Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., und Burmester, T. 2002. Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep.* 3:1146-51.
- Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., und Bolognesi, M. 2003. Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure.* 11:1087-95.
- Pesce, A., Nardini, M., Dewilde, S., Hoogewijs, D., Ascenzi, P., Moens, L., und Bolognesi, M. 2005. Modulation of oxygen binding to insect hemoglobins: the structure of hemoglobin from the botfly *Gasterophilus intestinalis*. *Protein Sci.* 14:3057-63.
- Peschle, C., Mavilio, F., Care, A., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Salvo, G., Samoggia, P., Petti, S., Guerriero, R., Marinucci, M., und et al. 1985. Haemoglobin switching in human embryos: asynchrony of zeta----alpha and epsilon----gamma-globin switches in primitive and definite erythropoietic lineage. *Nature.* 313:235-8.
- Pisano, E., Cocca, E., Mazzei, F., Ghigliotti, L., di Prisco, G., Detrich, H.W., 3rd, und Ozouf-Costaz, C. 2003. Mapping of alpha- and beta-globin genes on Antarctic fish chromosomes by fluorescence in-situ hybridization. *Chromosome Res.* 11:633-40.
- Postlethwait, J., Amores, A., Cresko, W., Singer, A., und Yan, Y.L. 2004. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet.* 20:481-90.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., und Baumeister, K. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science.* 238:336-41.
- Pronych, S., und Wassersug, R. 1994. Lung use and development in *Xenopus laevis* tadpoles. *Can J Zool.* 72:738-43.
- Rasmussen, R. 2001. Quantification on the LightCycler" pp 21-34 in "Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications.
- Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M.H., Burmester, T., und Hankeln, T. 2002. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience.* 115:645-56.
- Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., und Laudet, V. 2001. An ancestral whole-genome duplication may not have been responsible for the abundance of duplicated fish genes. *Curr Biol.* 11:R458-9.
- Roesner, A. 2007. Untersuchungen zur Globinexpression in Karpfenfischen. Dissertation.
- Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., und Burmester, T. 2005. A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Mol Biol Evol.* 22:12-20.
- Roesner, A., Hankeln, T., und Burmester, T. 2006. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol.* 209:2129-37.
- Roest Crollius, H., Jaillon, O., Bernot, A., Pelletier, E., Dasilva, C., Bouneau, L., Burge, C., Yeh, R.F., Quetier, F., Saurin, W., und Weissenbach, J. 2002. Genome-wide comparisons between human and tetraodon. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 11-29.
- Roest Crollius, H., Jaillon, O., Dasilva, C., Ozouf-Costaz, C., Fizames, C., Fischer, C., Bouneau, L., Billault, A., Quetier, F., Saurin, W., Bernot, A., und Weissenbach, J. 2000. Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res.* 10:939-49.
- Rombough, P. 2002. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O₂ uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. *J Exp Biol.* 205:1787-94.

- Rombough, P. 2007. The functional ontogeny of the teleost gill: Which comes first, gas or ion exchange? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.
- Ruud, J.T. 1954. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. *Nature*. 173:848-50.
- Saiki, R.K., Gyllenstein, U.B., und Ehrlich, H.A. 1988. The polymerase chain reaction. In: Davies, K.E. (Hrsg.) *Genome Analysis: A practical approach*.
- Saitou, N., und Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4:406-25.
- Sambrook, J., und Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-7.
- Schlieper, G., Kim, J.H., Molojavyi, A., Jacoby, C., Laussmann, T., Flogel, U., Godecke, A., und Schrader, J. 2004. Adaptation of the myoglobin knockout mouse to hypoxic stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286:R786-92.
- Schlosser, G., Koyano-Nakagawa, N., und Kintner, C. 2002. Thyroid hormone promotes neurogenesis in the *Xenopus* spinal cord. *Dev Dyn*. 225:485-98.
- Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J.C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T., und Burmester, T. 2004. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*. 279:8063-9.
- Schmidt, M., Giessl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., und Burmester, T. 2003. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*. 278:1932-5.
- Schmidt, M., Laufs, T., Reuss, S., Hankeln, T., und Burmester, T. 2005. Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye. *Neurosci Lett*. 374:207-11.
- Sémon, M., und Wolfe, K.H. 2007a. Rearrangement rate following the whole-genome duplication in teleosts. *Mol Biol Evol*. 24:860-7.
- Sémon, M., und Wolfe, K.H. 2007b. Reciprocal gene loss between Tetraodon and zebrafish after whole genome duplication in their ancestor. *Trends Genet*. 23:108-12.
- Shima, A., Himmelbauer, H., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Wittbrodt, J., und Scharf, M. 2003. Fish genomes flying. Symposium on Medaka Genomics. *EMBO Rep*. 4:121-5.
- Sidell, B.D., Vayda, M.E., Small, D.J., Moylan, T.J., Londraville, R.L., Yuan, M.L., Rodnick, K.J., Eppley, Z.A., und Costello, L. 1997. Variable expression of myoglobin among the hemoglobinless Antarctic icefishes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:3420-4.
- Silver, L., und Palis, J. 1997. Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood*. 89:1154-64.
- Smith, S.J., und Mohun, T.J. 2005. Frog transgenesis made simple. *Nat Methods*. 2:897-8.
- Sowa, A.W., Duff, S.M., Guy, P.A., und Hill, R.D. 1998. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:10317-21.
- Stalder, J., Wirthmuller, U., Beck, J., Gruber, A., Meyerhof, W., Knochel, W., und Weber, R. 1988. Primary structure and evolutionary relationship between the adult alpha-globin genes and their 5'-flanking regions of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *J Mol Evol*. 28:64-71.
- Stenkamp, D.L. 2007. Neurogenesis in the fish retina. *Int Rev Cytol*. 259:173-224.
- Stiemke, M.M., und Hollyfield, J.G. 1995. Cell birthdays in *Xenopus laevis* retina. *Differentiation*. 58:189-93.
- Stoltzfus, A., Logsdon, J.M., Jr., Palmer, J.D., und Doolittle, W.F. 1997. Intron "sliding" and the diversity of intron positions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:10739-44.
- Storch, V., und Welsch, U. 1996. Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum.
- Stryer, L. 1997. *Biochemie*.
- Summerton, J., und Weller, D. 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 7:187-95.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X.O., Zhu, Y., und Greenberg, D.A. 2001. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:15306-11.
- Tamori, Y., und Wakahara, M. 2000. Conversion of red blood cells (RBCs) from the larval to the adult type during metamorphosis in *Xenopus*: specific removal of mature larval-type RBCs by apoptosis. *Int J Dev Biol*. 44:373-80.
- Taylor, J.S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A., und Van de Peer, Y. 2003. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res*. 13:382-90.

- Taylor, J.S., und Brinkmann, H. 2001. 2R or not 2R? *Trends Genet.* 17:488-9.
- Taylor, J.S., Van de Peer, Y., Braasch, I., und Meyer, A. 2001. Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356:1661-79.
- Temminck, C.J., und Schlegel, H. 1843. Sive descriptio animalium quae in itinere per Japoniam suscepto annis 1823-30 collegit, notis observationibus et adumbrationibus illustravit P. F. de Siebold. *Pisces, Fauna Japonica* 21-72.
- Territo, P.R., und Altimiras, J. 1998. The ontogeny of cardio-respiratory function under chronically altered gas compositions in *Xenopus laevis*. *Respir Physiol.* 111:311-23.
- Tinsley, R.C., und Kobel, H.R. 1996. The Biology of *Xenopus*.
- Toyama, K. 1916. Some examples of Mendelian characters. *Nihon Ikushugaku Kaiho.* 1:1-9.
- Trent, J.T., 3rd, und Hargrove, M.S. 2002. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem.* 277:19538-45.
- Trent, J.T., 3rd, Watts, R.A., und Hargrove, M.S. 2001. Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *J Biol Chem.* 276:30106-10.
- Trewitt, P.M., Luhm, R.A., Samad, F., Ramakrishnan, S., Kao, W.Y., und Bergtrom, G. 1995. Molecular evolutionary analysis of the YWVZ/7B globin gene cluster of the insect *Chironomus thummi*. *J Mol Evol.* 41:313-28.
- Tse, W.K., Au, D.W., und Wong, C.K. 2006. Characterization of ion channel and transporter mRNA expressions in isolated gill chloride and pavement cells of seawater acclimating eels. *Biochem Biophys Res Commun.* 346:1181-90.
- Uwa, H., und Iwata, A. 1981. Karyotype and cellular DNA content of *Oryzias javanicus* (Oryziatidae, Pisces). *Chromosome Inform. Service* 31:24-26.
- Vallone, B., Nienhaus, K., Brunori, M., und Nienhaus, G.U. 2004a. The structure of murine neuroglobin: Novel pathways for ligand migration and binding. *Proteins.* 56:85-92.
- Vallone, B., Nienhaus, K., Matthes, A., Brunori, M., und Nienhaus, G.U. 2004b. The structure of carbonmonoxy neuroglobin reveals a heme-sliding mechanism for control of ligand affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17351-6.
- Van de Peer, Y., Taylor, J.S., Braasch, I., und Meyer, A. 2001. The ghost of selection past: rates of evolution and functional divergence of anciently duplicated genes. *J Mol Evol.* 53:436-46.
- Van de Peer, Y., Taylor, J.S., und Meyer, A. 2003. Are all fishes ancient polyploids? *J Struct Funct Genomics.* 3:65-73.
- Van Doorslaer, S., Dewilde, S., Kiger, L., Nistor, S.V., Goovaerts, E., Marden, M.C., und Moens, L. 2003. Nitric oxide binding properties of neuroglobin. A characterization by EPR and flash photolysis. *J Biol Chem.* 278:4919-25.
- Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J.S., Meyer, A., und Van de Peer, Y. 2004. Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:1638-43.
- Venkatesh, B. 2003. Evolution and diversity of fish genomes. *Curr Opin Genet Dev.* 13:588-92.
- Vinogradov, S.N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L., und Vanfleteren, J.R. 2006. A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol Biol.* 6:31.
- Volff, J.N. 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity.* 94:280-94.
- Warkman, A.S., und Krieg, P.A. 2007. *Xenopus* as a model system for vertebrate heart development. *Semin Cell Dev Biol.* 18:46-53.
- Weber, R., Blum, B., und Muller, P.R. 1991. The switch from larval to adult globin gene expression in *Xenopus laevis* is mediated by erythroid cells from distinct compartments. *Development.* 112:1021-9.
- Wehner, R., Gehring, W., und Kühn, A. 2005. Zoologie.
- Weinstock, G.M. 2007. ENCODE: more genomic empowerment. *Genome Res.* 17:667-8.
- Welsch, U. 2006. Sobotta Lehrbuch Histologie.
- Wheeler, D., Hope, R.M., Cooper, S.J., Gooley, A.A., und Holland, R.A. 2004. Linkage of the beta-like omega-globin gene to alpha-like globin genes in an Australian marsupial supports the chromosome duplication model for separation of globin gene clusters. *J Mol Evol.* 58:642-52.
- Witan, H. 2003. Neuroglobin und Cytoglobin: Expressionsanalyse während der Entwicklung des Mäusenervensystems und Mutationsanalyse in Krankheitsmodellen. Diplomarbeit.

- Wittbrodt, J., Shima, A., und Schartl, M. 2002. Medaka--a model organism from the far East. *Nat Rev Genet.* 3:53-64.
- Wittenberg, B.A., und Wittenberg, J.B. 1987. Myoglobin-mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:7503-7.
- Wittenberg, B.A., und Wittenberg, J.B. 1989. Transport of oxygen in muscle. *Annu Rev Physiol.* 51:857-78.
- Wittenberg, J.B., und Wittenberg, B.A. 2003. Myoglobin function reassessed. *J Exp Biol.* 206:2011-20.
- Wong, K.Y., Adolph, A.R., und Dowling, J.E. 2005a. Retinal bipolar cell input mechanisms in giant danio. I. Electroretinographic analysis. *J Neurophysiol.* 93:84-93.
- Wong, K.Y., Cohen, E.D., und Dowling, J.E. 2005b. Retinal bipolar cell input mechanisms in giant danio. II. Patch-clamp analysis of on bipolar cells. *J Neurophysiol.* 93:94-107.
- Wong, K.Y., und Dowling, J.E. 2005. Retinal bipolar cell input mechanisms in giant danio. III. ON-OFF bipolar cells and their color-opponent mechanisms. *J Neurophysiol.* 94:265-72.
- Woods, I.G., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D.K., Nix, R., Kelly, P.D., Chu, F., Postlethwait, J.H., und Talbot, W.S. 2005. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 15:1307-14.
- Wullimann, M.F., Rupp, B., und Reichert, H. 1996. Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas. Birkhäuser Verlag., Basel, Boston, Berlin. 139 pp.
- Wystub, S. 2007. Expressions- und Funktionsanalysen von Neuroglobin und Cytooglobin. Dissertation.
- Wystub, S., Ebner, B., Fuchs, C., Weich, B., Burmester, T., und Hankeln, T. 2004. Interspecies comparison of neuroglobin, cytooglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet Genome Res.* 105:65-78.
- Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T., und Reuss, S. 2003. Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci Lett.* 346:114-6.
- Xi, Y., Obara, M., Ishida, Y., Ikeda, S., und Yoshizato, K. 2007. Gene expression and tissue distribution of cytooglobin and myoglobin in the Amphibia and Reptilia: Possible compensation of myoglobin with cytooglobin in skeletal muscle cells of anurans that lack the myoglobin gene. *Gene.*
- Yen, E.H., Sodek, J., und Melcher, A.H. 1979. The effect of oxygen partial pressure on protein synthesis and collagen hydroxylation by mature periodontal tissues maintained in organ cultures. *Biochem J.* 178:605-12.
- Yu, D.Y., und Cringle, S.J. 2001. Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog Retin Eye Res.* 20:175-208.
- Zhang, C., Wang, C., Deng, M., Li, L., Wang, H., Fan, M., Xu, W., Meng, F., Qian, L., und He, F. 2002. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:1411-9.
- Zhang, C.G., Li, L., Deng, M.Y., Xie, F., Wang, C.L., Zhou, W.Q., Wang, H.Y., und He, F.C. 2001. [Coding region cDNA sequence cloning of rat neuroglobin gene, its polymorphism feature and tissue expression profile analysis]. *Yi Chuan Xue Bao.* 28:997-1001.
- Zhao, Y., Ratnayake-Lecamwasam, M., Parker, S.K., Cocca, E., Camardella, L., di Prisco, G., und Detrich, H.W., 3rd. 1998. The major adult alpha-globin gene of antarctic teleosts and its remnants in the hemoglobinless icefishes. Calibration of the mutational clock for nuclear genes. *J Biol Chem.* 273:14745-52.
- Zuckerkindl, E., und Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol.* 8:357-66.
- Zummo, G., Acierio, R., Agnisola, C., und Tota, B. 1995. The heart of the icefish: bioconstruction and adaptation. *Braz J Med Biol Res.* 28:1265-76.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
A. bidest.	Aqua bidestillata
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare, bei Längenangaben für mRNA: Basen
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DNA	„desoxyribonucleic acid“
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
Dre	<i>Danio rerio</i>
E	Extinktion
EST	„expressed sequence tag“
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
Hsa	<i>Homo sapiens</i>
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertoni-Medium
M	Mol
mA	Milli-Ampère
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
Mm	Millimeter
mRNA	„messenger RNA“
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µJ	Mikrojoule
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
NF	Entwicklungssatidium von <i>Xenopus</i> nach der Einteilung von <u>Nieuwkoop</u> und <u>Eaber</u>
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PCR	„polymerase chain reaction“
pM	Pikomol
PM	Präinkuationsmedium
RNA	„ribonucleic acid“
PNS	Peripheres Nervensystem
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„reverse transcriptase polymerase chain reaction“
s	Sekunde
Tni	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
Tru	<i>Takifugu rubripes</i>
U	„units“
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
Xla	<i>Xenopus laevis</i>
Xtr	<i>Xenopus tropicalis</i>
ZNS	Zentrales Nervensytem

7.2. Abkürzungscode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

7.3. Genetischer Standardcode der DNA

Triplett	AS	Triplett	AS	Triplett	AS	Triplett	AS	Triplett	AS
TTT	F	TCT	S	TAT	Y	TGT	C		
TTC	F	TCC	S	TAC	Y	TGC	C		
TTA	L	TCA	S	TAA	STOP	TGA	STOP		
TTG	L	TCG	S	TAG	STOP	TGG	W		
CTT	L	CCT	P	CAT	H	CGT	R		
CTC	L	CCC	P	CAC	H	CGC	R		
CTA	L	CCA	P	CAA	Q	CGA	R		
CTG	L	CCG	P	CAG	Q	CGG	R		
ATT	I	ACT	T	AAT	N	AGT	S		
ATC	I	ACC	T	AAC	N	AGC	S		
ATA	I	ACA	T	AAA	K	AGA	R		
ATG	M	ACG	T	AAG	K	AGG	R		
GTT	V	GCT	A	GAT	D	GGT	G		
GTC	V	GCC	A	GAC	D	GGC	G		
GTA	V	GCA	A	GAA	E	GGA	G		
GTG	V	GCG	A	GAG	E	GGG	G		

7.4. IUPAC-Code für degenerierte Nukleotide

B	Nicht A	R	A oder G
D	Nicht C	S	C oder G
H	Nicht G	V	Nicht T
K	G oder T	W	A oder T
M	A oder C	Y	C oder T
N	Alle 4 Nukleotide		

7.5. Eingesetzte Oligonukleotide

Oligonukleotide zu 3.1.6.

Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* in *Xenopus*

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	
Ngb	Xtr Ngb 0F	ATG GAG AAA GAT CAG CTG TC	
	Xtr Ngb 0R	TTA GAT GCC CTC TCG CTG TT	
	Xtr Ngb F1	AAG AAC TGA TTC GTG AGA GCT GGC	
	Xtr Ngb R1	CCA CGG CTC ATG GAC TGT ACC A	
	Xtr Ngb F2	CAG TAC TAT TTT CCA GGC TAT TTG	
	Xtr Ngb R2	TGC TGA CGG CAG CAT CAA TCA C	
	Xla Ngb 1F	CAG CTG CAT CAT GGC ACA GT	
	Xla Ngb 1R	CAC TGG CAT ACA GCA GGC TC	
	Xla Ngb 2F	CAG GAT TGC CTG AGA TCA GC	
	Xla Ngb 2R	CGA GGC TGG TCA GGT ATT CA	
	Xla Ngb 3F	CAG TCT GGA CAG CTT GTC TTC C	
	Xla Ngb 3R	CAC AGC AGC ATC AAT CAC TGT C	
	Cygb	Xtr Cygb A F Nde	ATC GCC ATA TGG AGA AAG TCC AAG GG
		Xtr Cygb A R Bam	ATC GCG AAT TCT CAC ACA GAG TTA CTG GGG
		Xla Cygb 2 F	ATG GAG AAA GTC CAA GGG
Xla Cygb 2 Nde F		ATG ACC ATA TGG AGA AAG TCC AAG GGG AAA ACG	
Xla Cygb 2 Bam R		ATC GCG GAT CCT CAC ACA GAA TTA CTG GGG TAC	
Xla Cygb 2 F2		TGA GCG AGG TGT CAT CAA	
Xla Cygb 2 R2		CGT ACT CTT CTG CAA AGA CC	
GbX	Xtr Glob F 1	GAA GGG CGA GAC AGC ATG GTG	
	Xtr Glob R	GGC AAC GCT CTT CTC CAC AA	
	Xtr Glob F2	CTC ACT AGA CCA CAC AGA AAC CT	
	Xtr Glob F3	CCT ATT CGT CAG GCT GTT TGA G	
	Xtr Glob F4	ATG GGT TGT ATC CTA TCG AGC TT	
	Xtr Glob R2	TTA TAT TAA TCC TTT ATT CCC CTG TA	
	Xtr Glob F4 Nde	ATG ACC ATA TGG GTT GTA TCC TAT CGA GCT T	
	Xtr Glob R2 Bam	ATG GCG GAT CCT TAT ATT AAT CCT TTA TTC CCC TGT A	
	Xla GbX 0F	TCC GTG ATG TGG ACG ATT TGC	
	Xla GbX 0R	GCA GAG ATA AAT TCA GTT CCC AC	
GbY	Xtr Cygb B F Nde	ATC GCC ATA TGG CTG ATT TAA CAG GAG CCG	
	Xtr Cygb B R Bam	ATC GCG AT CCT TAG GAA TCT GTG TTG GCG TAA CA	

Oligonukleotide zu 3.1.7.

Differentielle mRNA-Transkription von *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* in adulten Krallenfröschen

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Ngb	Xtr Ngb F1	AAG AAC TGA TTC GTG AGA GCT GGC
	Xtr Ngb R1	CCA CGG CTC ATG GAC TGT ACC A
Cygb	Xla Cygb 2 F2	TGA GCG AGG TGT CAT CAA
	Xla Cygb 2 R2	CGT ACT CTT CTG CAA AGA CC
GbX	Xtr NgbL F	GAC ATT GCC AAA GTC GGG GTT A
	Xtr Glob R3	CTT CCA TGC CTC CTC CAC TTC
GbY	XI CYGB Nde F	ATGACCATATGGCTGATTTAACAGCAGC
	XI CYGB Bam R	ATCGCGGATCCTTAGGAATCTGATTTTGTGTAACAG
β-actin	Xla β-actin F	GAA GAG ATT GCA GCG CTC G
	Xla β-actin R	GCG TCA TCT TTT CTC TGT TGG C

Oligonukleotide zu 3.1.8.1.

mRNA-Transkriptionsnachweis via RT-PCR

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Ngb	Xla Ngb 0F	ACA GTA AGC CAG GAC CAG CT
	Xla Ngb 0R	CTA TTC CTG GGA ATC TCT GTG C
	Xla Ngb 1F	CAG CTG CAT CAT GGC ACA G
	Xla Ngb 2R	CGA GGC TGG TCA GGT ATT CA
Cygb	Xla Cygb 0F	AAC GAC ATG GAG CGA TGG GA
	Xla Cygb 0R	CCA AAC TAG CTG TAC GTC AGG G
	Xla Cygb 2F2	GTG AGC GAG GTG TCA TCA A
	Xla Cygb 2R2	CGT ACT CTT CTG CAA TGA C
GbX	Xla GbX 0F	TCC GTG ATG TGG ACG ATT TGC
	Xla GbX 0R	GCA GAG ATA AAT TCA CTT CCC A
GbY	Xla GbY 0F	TAC GCG AAT CCA GAG GAA TCA G
	Xla GbY 0R	CAG CTG TCC AAG AAG TTG TAG
β-actin	Xla β-actin F2	GTG TAA TGG TTG GTA TGG GCC A
	Xla β-actin R2	CCT GGT GTC TTG GGC GTC CAA

Oligonukleotide zu 3.1.8.2.

Quantifizierung der Transkription von *Ngb*, *Cygb*, *GbX* und *GbY* in der Entwicklung des afrikanischen Krallenfrosches

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Ngb	Xla Ngb 0F	ACA GTA AGC CAG GAC CAG CT
	Xla Ngb QPCR 1R	CAA TCA CTG TCA TTA CCA TAC GG
Cygb	<i>Xla</i> Cygb 0F	AAC GAC ATG GAG CGA TGG GA
	<i>Xla</i> Cygb QPCR 1R	GTT GAC AAA GAA CCT GAT CAG
GbX	Xla GbX 0F	TCC GTG ATG TGG ACG ATT TGC
	Xla GbX QPCR 1R	TAT CTG TAG TGG CTT CTG CC
GbY	Xla QPCR GbY 4F	GGG AGC TTA AAC CAA GTC ATT C
	Xla QPCR GbY 3R	GGT CAG TAT TAC CAG AAA CAG CAA C

Oligonukleotide zu 3.1.9.

mRNA-Transkriptionsnachweis durch WMHIS

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
cygb-„antisense“	Xla Cygb 0F	AAC GAC ATG GAG CGA TGG GA
	Xla Cygb T7R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC CCA AAC TAG CTG TAC GTC AGG GG
ngb-„antisense“	Xla Ngb 0F	ACA GTA AGC CAG GAC CAG CT
	Xla Ngb T7R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC CTA TTC CTG GGA ATC TCT GTG C
gbX-„antisense“	Xla GbX 0F	TCC GTG ATG TGG ACG ATT TGC
	Xla GbX T7R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC GCA GAG ATA AAT TCA GTT CCC AC
gbY-„antisense“	Xla GbY 0F	TAC GCG AAT CCA GAG GAA TCA G
	Xla GbY T7R	CAG CTG TCC AAG AAG TTG TAG
nrp-1-„antisense“	Xla Nrp-1 0F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC CCA ACC CAA GGA GGT GATGTC
	Xla Nrp-1 T7R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC CTT GTC GCA CTG ATA TAG CTG C
ct-1-„antisense“	Xla Ct-1 0F	TCA CGG AAG CTC CAA CTG AAC AC
	Xla Ct-1 T7R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC CTT ATA TCC TTG TCT GCA TCG TC
MLC-„sense“	Xla MLC 0R	GCT TCA TAG TTG ATA CAG CCG
	Xla MLC T7F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC CCT GCA TTT GAT CTG TCC AG
MLC-„antisense“	Xla MLC 0F	CCT GCA TTT GAT CTG TCC AG
	Xla MLC T7R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC GCT TCA TAG TTG ATA CAG CCG

Oligonukleotide zu 3.1.10.**Rekombinante Proteinexpression von Xenopus-Globinen**

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Ngb	Xla Ngb OF	ACA GTA AGC CAG GAC CAG CT
	Xla Ngb OR	CTA TTC CTG GGA ATC TCT GTG
	Xtr Ngb Nde F	ATG ACC ATA TGG AGA AAG ATC AGC TGT C
	Xtr Ngb Bam R	ATC GAG GAT CCT TAG ATG CCC TCT CGC TGT T
Cygb	Xtr CygbA F Nde	ATC GCC ATA TGG AGA AAG TCC AAG GG
	Xtr CygbA R Bam	ATC GCG AAT TCT CAC ACA GAG TTA CTG GGG
	Xtr Cygb Mini F	GAG AGG CAT ATG GAG ATA ACG GAG AGT GAG CG
	Xtr Cygb Mini R	GTC CAG AGA TCC TAC TTG TAT GCA GAC AGT
GbX	Xtr Glob F4	ATG GGT TGT ATC CTA TCG AGC TT
	Xtr Glob R2	TTA TAT TAA TCC TTT ATT CCC CTG TA
	Xtr GlobF4 Nde	ATG ACC ATA TGG GTT GTA TCC TAT CGA GCT T
	Xtr Glob R2 Bam	ATG GCG GAT CCT TAT ATT AAT CCT TTA TTC CCC TGT A
GbY	Xtr GbY F	TAC GCG AAT CCA GAG GAA TCA G
	Xtr GbY R	CAG CTG TCC AAG AAG TTG TAG
	Xtr CygbB F Nde	ATC GCC ATA TGG CTG ATT TAA CAG GAG CCG
	Xtr CygbB R Bam	ATC GCG AT CCT TAG GAA TCT GTG TTG GCG TAA CA

Oligonukleotide zu 3.2.4.1.**Amplifikation und Analyse der Cytoglobin-Duplikate**

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Cygb-1	Tni Cygb 1 F	ATG ACC ATA TGG AAA GGA TGC AGA GGG
	Tni Cygb 1 R	ATC GCG GAT CCC TTA AAG TAC TTA GGG TCC
	Ola Cygb 1 F	ATG GAG AGC AGG CAC CCT C
	Ola Cygb 1 R	ATC CTC GAT GTG CTT GAA CTG
	Dre Cygb-1 Fnorm	ATGGAGGGAGACGGAGGAGTG
	Dre Cygb 1 ISH T7 R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC TCA CTT TTT GCT GTT CTC CCA GC
Cygb-2	Tni Cygb 2 F	ATG ACC ATA TGG TTY TTT GTY AAT TTC CC
	Tni Cygb 2 R	ATC GCG GAT CCT CAC ACG GCT GAG CTG GAG AC
	Ola Cygb 2F 5	ATG TCT TGC AGG GAG TCT CCA CCG CC
	Ola Cygb 2 R	TGT GAA GAA TTC TGG GAA ATC TTC
	Ola Cygb 2 R2	TGA GAG CAC GCT CAG CAT TAC G
	Ola Cygb 2R3	GCC ATC AGT TTG GTC CAC A
	Ola Cygb 2R4	CTG GGA AAT CTT CTG AGA GC
	Ola Cygb 2R5	CAG TAC TGA GGA GAC TTT CTC G
	Ola Cygb 2R6	CTG CAT GTC TTG AAA CTG GC
	Ola Cygb 2R 7	TCA CAC CGC CGA GCT GGA CAC CTG
	Dre Cygb V2 F norm	ATG GAG AAA GAG AGG GAG A
	Dre Cygb V2 R norm	TCA GAC TGC TGA GCT GGA TAG

Oligonukleotide zu 3.2.4.2.**Quantifizierung der Transkription von Cygb-1 und -2 in Teleostier-Geweben**

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Cygb-1	Tni Cygb1 0F	ATGGAAAGGATGCAGAGGG
	Tni CygbV1 Ex3 R	TCA CTC CAC TGA GGA CGA CA
	CGBzeb12	GCTGGAGTGGCTGTGCTG
	CGBzeb15	CGGTTCATCTGCCAGTAC
Cygb-2	Tni Cygb2 F	ATG ACC ATA TGG TTY TTT GTY AAT TTC CC
	Tni Cygb2 R	ATC GCG GAT CCT CAC ACG GCT GAG CTG GAG AC
	Dre Cygb2 Ex23 F	CCA ATA TAC TTC AAA ATC TTA AGT GG
	Dre CygbV2 int R	CTC TCC AAA CTC CTC TGC AAG
	Dre CygbV2 int F	GTT GTG AGG ATG TAG GCG TCA C
	Dre Cygb2 ISH 0F	ACA TGA CCC AGA GAA AGT ATC ATC TG
β-actin	Tni β-actin F	ATG GAT GAG GAA ATC GCC GCC
	Tni β-actin R	GTC ATC TTT TCC CTG TTG GCC TTG
	Dre β-actin F	ATG GAT GAG GAA ATC GCT GC
	Dre β-actin R	CTG TGT CAT CTT CTC TCT GTT GGC

Oligonukleotide zu 3.2.5.**Zelluläre mRNA-Lokalisation von Ngb, Cygb-1 und Cygb-2 in *Danio rerio***

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Ngb-sense	Dre Ngb T7 F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC GGT CTC ATC CCG GAC AGC
	Dre Ngb 0R	TCA TGG CTG ACA CCA CAA TG
Ngb-antisense	Dre Ngb 0F	GGT CTC ATC CGGG ACA GC
	Dre Ngb T7 R	TAA TAC GACT CAC TAT AGG GAG ACC ACT CAT GGC TGA CAC CCA ATG
Cygb-1 sense	Dre Cygb1 ISH T7F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC GCG AGA TGC TGA CAA ACT CAA CA
	Dre Cygb 1 ISH 0R	TCA CTT TTT GCT GTT CTC CCA GC
Cygb-1 antisense	Dre Cygb1 ISH 0F	GCG AGA TGC TGA CAA ACT CAA CA
	Dre Cygb 1 ISH T7 R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC TCA CTT TTT GCT GTT CTC CCA GC
Cygb-2 sense	Dre Cygb 2 ISH T7 F	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC ACA TGA CCC AGA GAA AGT ATC ATC TG
	Dre Cygb 2 ISH 0R	
Cygb-2 antisense	Dre Cygb2 ISH 0F	ACA TGA CCC AGA GAA AGT ATC ATC TG
	Dre Cygb 2 ISH T7 R	ACA TGA CCC AGA GAA AGT ATC ATC TG TGA GCT GGA TAG TTT GAC CCA C

Oligonukleotide zu 3.2.6.2.**Rekombinante Expression von *Danio rerio* Cygb-1**

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
Cygb-1	Dre Cygb-1 F norm	ATG GAG GGA GAC GGA GGA GTG
	Dre Cygb-1 ISH OR	TCA CTT TTT GCT GTT CTC CCA GC
	Dre Cygb-1 F Nde	ATGACCATATGGAGGGAGACGGAGGAGTG
	Dre Cygb 1 R BclI	ATC GCT GAT CAT CAC TTT TTG CTG TTC TCC CAG C

7.6. Protein-Standardmarker**7.7. Speziesnamen und Accession-Nummern****Zu Abbildung 7**

Phylogenetische Beziehung der Globine von *Xenopus* relativ zu jenen anderer Vertebraten.

Neuroglobin von *Homo sapiens* (HsaNGB, Accession No. AJ245946), *Mus musculus* (MmuNgb, AJ245945), *Rattus norvegicus* (RnoNgb, AY066001), *Gallus gallus* (GgaNgb, AJ635192), *Tetraodon nigroviridis* (TniNgb, AJ315609), *Danio rerio* (DreNgb, AJ315610), *Oncorhynchus mykiss* (OmyNgb, AJ547800) *Xenopus tropicalis* (XtrNgb, AJ634914), *Xenopus laevis* (XlaNgb, AM041065); **Cytoglobin** von Mensch (HsaCYGB, AJ315162), Maus (MmuCygb, AJ315163), Ratte (RnoCygb, AJ245663), Regenbogenforelle (OmyCygb, AJ547802), Zebrabärbling (DreCygb, AJ320232), Haushuhn (GgaCygb, AJ812227), *X. tropicalis* (XtrCygb, BC076983) and *X. laevis* (XlaCygb, AJ635232); **GlobinX** von *Carassius auratus* (CauGbX, AJ635195), *Danio rerio* (DreGbX, AJ635194), *Tetraodon nigroviridis* (TniGbX, CAG25726) und *Xenopus tropicalis* (XtrGbX, AJ634915); **Agnathen-Globine** von *Lampetra fluviatilis* (Neunauge) Hb (Lfl Hb, P02207), *Myxine glutinosa* (Schleimaal) Hbs 1 and 3 (MglHb1, AF156936; MglHb3, AF184239), **GlobinY** von *X. tropicalis* (XtrGbY, CX400941) und *X. laevis* (XlaGbY, AJ 635233), **Globin E** des Haushuhnes

(GgaGbE, AJ812228), **Myoglobin** von *Physeter catodon* (Pottwal) (PcaMb, P02185), Mensch (HsaMB, M14603), Maus (MmuMb, P04247), Huhn (GgaMb, XM_416292), Zebrabärbling (DreMb, AAR00323), *Mustelus antarcticus* (australischer Glatthai) (ManMb, P14399), *Galeorhinus galeus* (Hundshai) (GauMb, P14397), **Hämoglobin** von Mensch (HsaHBA, J00153; HsaHBB, M36640; HsaHBD, AAL72117; HsaHbE, AAX37048; Hsa HbG, AAB50159; HsaHBZ, AAK61214), Huhn (Gga HbA, XM_414948 und Gga HbB, M73995), des Port-Jackson-Haies *Heterodontus portusjacksoni* (HpoHbA, P02021 und HpoHbB, P02143) und des Dornhaies *Squalus acanthias* (SacHba, A24653 ; SacHbb , B24653) sowie die adulten Hbs von *Xenopus tropicalis* (Xtr Hb05 = Xtr HbA, P07428; Xtr Hb06 = Xtr HbB, P07429).

Zu Abbildung 12

Phylogenetische Relation der Hämoglobine von *Xenopus tropicalis* und *Xenopus laevis*.

Larvale Hämoglobine von *Xenopus laevis*: Xla Hba T3 larval, P06636; Xla Hba T4 larval, P06637, Xla Hba T5 larval, P06638; Xla Hb β 1 larval, P02137; Xla Hb β 2 larval, P02133, **adulte Hämoglobine von *Xenopus laevis*:** Xla Hba1 adult, P02012; Xla Hba2 adult, P02013, Xla Hb β 1 adult, P02132; Xla Hb β 2 adult, HBXL2, **larvale Hämoglobine von *Xenopus tropicalis*:** Xtr Hb α larval, P08422; Xtr Hb β larval, P08423, **adulte Hämoglobine von *Xenopus tropicalis*:** Xtr Hb α adult, P07428; Xtr Hb β adult, P0P07429 sowie die larvalen und adulten Hbs 1-15 von *Xenopus tropicalis* (vgl. Anhang 7.8).

Zu Abbildung 26A, B1 und B2

Phylogenie der duplizierten Teleostier-Cytoglobine

Cytoglobin von *Danio rerio* (Dre Cygb-1, CAC86225; Dre Cygb-2, CAG25612), *Oryzias latipes* (Ola Cygb-1, CAG25610; Ola Cygb-2, CAG25611), *Tetraodon nigroviridis* (Cygb-1, CAG25613; Tni Cygb-2, CAG25614), *Takifugu rubripes* (Tru Cygb-1, ProtID 712480/Scaf_112; Tru Cygb-2, ProtID575005/Scaf_2329), *Gasterosteus aculeatus* (Gac Cygb-1, DW653184; Gac Cygb-2, DV003487), *Oncorhynchus mykiss* (Omy Cygb-1, CAD68070), *Cyprinus carpio* (Cca Cygb-1, CA967584), *Pimephales promelas* (Ppr Cygb-1, DT203316), *Salmo salar* (Ssa Cygb-1, DW555071), *Ptyochromis spec.* (Psp Cygb-1 BJ694179), *Homo sapiens* (Hsa Cygb, NM_134268), *Mus musculus* (Mmu Cygb, NM_030206), *Gallus gallus* (Gga Cygb, AJ812227), *Xenopus tropicalis* (Xtr Cygb, NM_001006869), **Myoglobin** von Mensch (Hsa Mb, NP_976312), Maus (Mmu Mb, NP_038621), *Danio rerio* (Dre Mb, NP_956880), Medaka (Ola Mb, BJ492356) und Tetraodon (Tni Mb, AJ628044) sowie die **Hämoglobine** A und B von *Homo sapiens* (Hsa HbA, NP_000508; Hsa, HbB, NP_000509).

Anhang

```

150      160      170      180      190      200      210
MmuNgb : STVGESLLYMLEKCLGPDFTPA-TRT WSRLYGAVVQAMSRGW---DGE*
GgaNgb : STVGESLLYMLEKCLGAAAFSP-DVRE WIELYSAVVKAMQRGWEVLPED*
HsaNgb : STVGESLLYMLEKCLGPAFTPA-TRA WSQLYGAVVQAMSRGW---DGE*
RnoNgb : STVGESLLYMLEKCLGPDFTPA-TRT WSQLYGAVVQAMSRGW---DGE*
TniNgb : AMVGESLLYMLQCSLQQAAYT-ASLRQ WLNMYSVVVAAMSRGWAK--NGEDKAD*
DreNgb : ALVGESLLYMLQSSSLGPAAYT-SLRQ WLTMYSIVVSAMTRGWAK--NGEHKS*
OmyNgb : AVVGESLLYMLQCSLQGGYTAP-LRQ WLNMYTIVVAAMSRGWAK--NGEKTD*
XtrNgb : NTVGESLLFALESCLGDAFTS-DTRE WSLLYANVVVQMSRGNHRRDSQFREGI*
XtrGbX : QTVGTEPISAVRPMLODKWT-AEVEE WKGFLFAYICTVMERG QEEE--RRHSDGRSLIDGLQGNKGLI*
CauGbX : GYVGAEPICAVRPILKDRWTP-ELEE WKTFLFQYVTSIMREGFLEEERNKRSTQTSRERPKRSTAI*
DreGbX : GYVGAEPICAVRPILKDRWTP-ELEE WKTFLFQYVTSIMREGFLEEERNQRSTQTSRERPKRSTAI*
MglHb3 : KLSAIFVSTIR-----GKA YEKLFSSICTLLRSS DE*
LflHb  : KVLAADIADTVAA-----GDAGFEKLMSMICILLRSA *
MglHb1 : KLSAIFVSTIR-----GKA YEKLFSSICTLLRSS DE*
GgaGbE : RIICDIILQLMEKFKGGDC----KASPEKVTNEICTHLTNI KEAGW*
HsaCygb : KILSGVILEVVAEEFASDFPP-ETQR WAKLRGLIYSHVTAA KEVGVVQVVPNATIPATLPSSGP*
MmuCygb : KILSGVILEVVAEEFANDFFV-ETQR WAKLRGLIYSHVTAA KEVGVVQVVPNTTIPATLPSSGP*
RnoCygb : KILSGVILDVIAEEFANDFFV-ETQR WAKLRGLIYSHVTAA KEVGVVQVVPNTTIPATLPSSGP*
GgaCygb : KILTGMVLEVIAEAYGNDFFP-EAHG WTKMRTLIIYTHVTAA KEAGWVSYPSATL*
DreCygb1 : KILAGVILEVLVEAFPPQCFSPAEEVQSSWSKLMGLIYWQMNRV AEVGEW---NSKK*
DreCygb2 : KILSGVILEVIAEAEFGEFFTP-EVQT SWSKLMMAALYWHITGA TEVGVVVKLSSAV*
OmyCygb : KILCGVILEVLVADFPDYITP-EVAV WTKLLDAIYWHVKGV EEVCGW---SSAV*
XtrCygb : KILTGMVLEVIAEAYAKDFFP-DVQL WNKLRSHLYSHVLSA KEAGWTQYPSNSV*
XlaCygb : KILTGMVLEVIAEAYAKDFFP-DVQL WNKLRSHLYSHVLSA KEAGWTQYPSNSV*
XtrGbY : ELLFLVIVSVFKEALGSGFTF-EQSKSWEKLFSSITYKYLESC ANTDS*
XlaGbY : QLLFLVILITIFKEALGADFFP-EHCKSWEKLFSSITYNPLDSC TKSDS*
ManMb  : TKITTIADVLSSEMYPSEMNA-QVQA FSGAFKIIICSDIEKE KAANFQG*
GauMb  : TKITTIAVGVLSSEMYPSEMNA-QAQA FSGAFKISICSDIEKE KAANFQG*
DreMb  : RLITEVLVVKVMAEKAGLDAAG-QG--LRRVMDAVIGDIGGY EEIGFAG*
GgaMb  : EFISEVILKVIKAEKHAADFGA-DSQA MKKALELFRNDMASK EEFQFQG*
PcaMb  : EFISEAIIHVLHSRHPGDFGA-DAQG MNKALELFRKDIAAK FELGYQG*
HsaMb  : EFISECIIQVLQSKHPGDFGA-DAQG MNKALELFRKDMASN KELGFQG*
MmuMb  : EFISEIIEVLKRRHSGDFGA-DAQG MSAKALELFRNDIAAK FELGFQG*
HpoHbA : QYLSYCLEVALAVHLT-EFSP-ETHC LDKFLTNVCHELSSR R*
SacHbA : PLLTQCILVTLAAHLT-ELKP-ETHC LDKFLCEVATALGSH R*
GgaHbA : KLLSQCIQVVLAVHMGKDYTP-EVHA FDKFLSAVSAVLAEK R*
HsaHbA : KLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPA-VHAS LDKFLASVSTVLTSK R*
XtrHb05 : PLLAHQILVVVAIHFQKQDFPA-THK LDKFLVSVSNVLTSK R*
HsaHbZ : KLLSHCLLVTLAAARFPADFTA-EAHA WDKFLSVVSSVLTSEK R*
HsaHbD : RLLGNVLVLCVLAARFNGKEFTF-QMQA YQKVVAVANALAHK R*
HsaHbE : KLLGNVMVILATHFGKEFTF-EVQA WQKLVSAVAIALAHK R*
SacHbB : KLLANCLEVELGHALHKEFTF-EVQA WSKFNSVVVDALSKG R*
HpoHbB : KLLAKCFVVELGILLKDKFAP-QTQA IWEKYFVVVDALSKG R*
HsaHbG : KLLGNVLVTVLAIHFGKEFTF-EVOA SWOKMVTGVASALSSR R*
HsaHbB : RLLGNVLVLCVLAHFGKEFTF-VQA YQKVVAVANALAHK R*
GgaHbB : RLLGDILIIVLAHFSKDFTP-ECQA WQKLVVVVAHALARK R*
XtrHb06 : KRFCSCCTIISMAQTLQEDFTF-ELQA FEKLFVAIADALGK R*

```

In allen Spezies und Globinen streng konservierte Aminosäuren sind rot markiert, überwiegend konservierte hingegen blau.

Anhang

		90	100	110	120																																			
XLA_HB_A1_ADULT_P02012	:	L	N	I	A	G	S	M	S	K	L	S	D	L	A	Y	D	L	R	V	D	P	G	N	F	P	L	L	A	H	N	I	L	V	V	V	A	M	N	
XLA_HB_A2_ADULT_P02013	:	L	N	I	A	G	S	M	S	K	L	S	D	L	A	Y	D	L	R	V	D	P	G	N	F	P	L	L	A	H	N	L	L	V	V	V	A	M	N	
XLA_HB_A_T3_LARVAL_P06636	:	I	D	D	L	D	A	A	L	S	T	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	V	D	P	G	N	F	K	L	L	S	H	T	I	Q	V	T	L	A	I	H
XLA_HB_A_T4_LARVAL_P06637	:	I	D	D	L	D	S	A	L	S	T	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	I	D	P	G	N	F	K	L	L	S	H	T	I	Q	V	T	L	A	I	H
XLA_HB_A_T5_LARVAL_P06638	:	I	D	D	I	P	H	A	L	S	A	L	S	D	L	A	F	K	L	K	V	D	P	G	N	F	K	L	L	S	H	A	I	Q	V	T	L	A	I	H
XLA_HB_B1_ADULT_P02132	:	M	D	D	I	K	G	Y	Y	A	Q	L	S	K	Y	S	E	T	L	H	V	D	P	L	N	F	K	R	F	G	G	C	L	S	I	A	L	A	R	H
XLA_HB_B1_LARVAL_P02137	:	L	D	D	I	K	N	F	L	S	V	L	S	T	K	A	E	E	L	H	V	D	P	E	N	F	K	R	L	A	D	V	L	V	I	V	L	A	G	K
XLA_HB_B2_ADULT_HBXL2	:	M	D	D	I	K	G	Y	Y	A	Q	L	S	K	H	S	E	T	L	H	V	D	P	A	N	F	K	R	F	G	G	C	L	F	I	T	L	A	H	H
XLA_HB_B2_LARVAL_P02133	:	I	D	S	V	K	S	S	L	Q	Q	L	S	K	I	A	T	E	L	F	V	D	P	E	N	F	K	R	F	G	G	V	L	V	I	V	L	G	A	K
XTR_HB_A_ADULT_P07428	:	L	N	I	A	G	C	L	S	K	L	S	D	L	A	Y	D	L	R	V	D	P	G	N	F	P	L	L	A	H	Q	I	L	V	V	V	A	I	H	
XTR_HB_A3_LARVAL_P08422	:	L	N	D	L	D	A	A	L	S	T	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	V	D	P	G	N	F	K	L	L	S	H	T	I	Q	V	T	L	A	V	H
XTR_HB_B_ADULT_P07429	:	M	D	D	I	K	G	Y	Y	A	Q	L	S	K	Y	S	E	T	L	H	V	D	P	Y	N	F	K	R	F	C	S	T	I	I	S	M	A	Q	T	
XTR_HB_B_LARVAL_P08423	:	L	D	D	V	K	S	H	L	K	G	L	S	K	S	A	E	D	L	H	V	D	P	E	N	F	K	R	L	A	D	V	L	V	I	V	L	A	A	K
XTR_HB01_367746	:	L	N	L	D	E	A	L	S	K	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	V	D	P	G	N	F	R	L	L	S	H	T	I	Q	V	T	L	A	A	H	
XTR_HB02_456769	:	L	N	L	D	A	A	L	S	K	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	V	D	P	G	N	F	R	L	L	S	H	A	I	E	V	T	L	A	V	H	
XTR_HB03_176462	:	L	D	D	I	S	G	A	L	S	A	L	S	D	L	A	Y	K	L	R	V	D	P	G	N	F	K	L	L	S	H	S	I	Q	V	T	L	A	I	H
XTR_HB04_294501	:	L	N	D	L	D	A	A	L	S	T	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	V	D	P	G	N	F	K	L	L	S	H	T	I	Q	V	T	L	A	V	H
XTR_HB05_299768	:	L	N	I	A	G	C	L	S	K	L	S	D	L	A	Y	D	L	R	V	D	P	G	N	F	P	L	L	A	H	Q	I	L	V	V	V	A	I	H	
XTR_HB06_456762	:	M	D	D	I	K	G	Y	Y	A	Q	L	S	K	Y	S	E	T	L	H	V	D	P	Y	N	F	K	R	F	C	S	T	I	I	S	M	A	Q	T	
XTR_HB07_152628	:	L	N	V	K	A	S	L	H	D	L	S	V	T	A	L	K	L	H	V	D	P	E	N	F	K	R	F	G	E	V	L	V	I	V	L	A	K	K	
XTR_HB08_152629	:	L	D	D	V	K	S	H	L	K	G	L	S	K	S	A	E	D	L	H	V	D	P	E	N	F	K	R	L	V	D	V	L	V	I	V	V	A	A	K
XTR_HB09_478564	:	L	N	V	K	S	H	L	K	G	L	S	K	S	A	E	D	L	H	V	D	P	E	N	F	K	R	L	A	D	V	L	V	I	V	L	A	A	K	
XTR_HB11_287141	:	I	D	D	I	K	H	F	L	S	A	L	S	K	K	A	Q	E	L	H	V	D	P	E	N	F	K	R	L	A	D	V	L	A	I	V	V	A	G	K
XTR_HB12_367736	:	M	D	D	L	P	V	H	L	A	S	L	T	G	L	S	L	I	L	Q	I	P	K	N	Y	K	K	S	D	-	K	I	G	M	I	L	F	S		
XTR_HB13_176470	:	L	N	L	D	E	A	L	S	K	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	V	D	P	G	N	F	R	L	L	S	H	T	I	Q	V	T	L	A	A	H	
XTR_HB14_456770	:	L	N	L	D	E	A	L	S	K	L	S	D	L	A	Y	N	L	R	V	D	P	G	N	F	R	L	L	S	H	T	I	Q	V	T	L	A	A	H	
XTR_HB15_DQ224416	:	L	D	D	I	P	H	A	L	S	A	L	S	D	L	A	F	K	L	R	V	D	P	G	N	F	K	L	L	S	H	A	I	Q	V	T	L	A	I	H

		130	140	150																												
XLA_HB_A1_ADULT_P02012	:	F	P	K	Q	F	D	P	A	T	H	K	A	L	D	K	F	L	A	T	V	S	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XLA_HB_A2_ADULT_P02013	:	F	P	K	Q	F	D	P	A	T	H	K	A	L	D	K	F	L	A	T	V	S	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XLA_HB_A_T3_LARVAL_P06636	:	F	H	K	E	F	D	A	A	T	Q	A	A	W	D	K	F	L	A	E	V	A	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XLA_HB_A_T4_LARVAL_P06637	:	F	H	K	E	F	D	A	A	T	Q	A	A	W	D	K	F	L	A	E	V	A	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XLA_HB_A_T5_LARVAL_P06638	:	F	P	A	E	F	N	A	D	A	Q	A	A	W	D	K	F	L	A	V	V	S	A	V	L	V	S	K	Y	R	*	
XLA_HB_B1_ADULT_P02132	:	F	H	E	E	Y	T	P	E	L	H	A	A	Y	E	H	L	F	D	A	I	A	D	A	L	G	K	G	Y	H	*	
XLA_HB_B1_LARVAL_P02137	:	L	G	A	A	F	T	P	Q	V	Q	A	A	W	E	K	F	S	A	G	L	V	A	A	L	S	H	G	Y	F	*	
XLA_HB_B2_ADULT_HBXL2	:	F	G	E	E	Y	T	P	E	L	H	A	A	Y	E	H	L	F	D	V	I	A	D	A	L	G	R	G	Y	H	*	
XLA_HB_B2_LARVAL_P02133	:	L	G	T	A	F	T	P	K	V	Q	A	A	W	E	K	F	I	A	V	L	V	D	G	L	S	O	G	Y	N	*	
XTR_HB_A_ADULT_P07428	:	F	P	K	Q	F	D	P	A	T	H	K	A	L	D	K	F	L	V	S	V	S	N	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB_A3_LARVAL_P08422	:	F	Q	K	E	F	D	A	A	T	Q	A	A	W	D	K	F	L	S	E	V	A	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB_B_ADULT_P07429	:	L	Q	E	D	F	T	P	E	L	Q	A	A	F	E	K	L	F	A	A	I	A	D	A	L	G	K	G	Y	H	*	
XTR_HB_B_LARVAL_P08423	:	L	G	S	A	F	T	P	Q	V	Q	A	A	W	E	K	L	N	A	T	L	V	A	A	L	S	H	G	Y	F	*	
XTR_HB01_367746	:	F	Q	A	D	F	D	A	T	A	Q	A	A	W	D	K	F	L	A	A	I	S	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB02_456769	:	F	P	D	D	F	D	A	T	A	Q	A	A	W	D	K	F	L	A	A	I	S	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB03_176462	:	F	P	A	E	F	N	A	D	A	Q	A	A	W	D	K	F	L	S	V	V	S	S	V	L	V	S	K	Y	R	*	
XTR_HB04_294501	:	F	Q	K	E	F	D	A	A	T	Q	A	A	W	D	K	F	L	S	E	V	A	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB05_299768	:	F	P	K	Q	F	D	P	A	T	H	K	A	L	D	K	F	L	V	S	V	S	N	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB06_456762	:	L	Q	E	D	F	T	P	E	L	Q	A	A	F	E	K	L	F	A	A	I	A	D	A	L	G	K	G	Y	H	*	
XTR_HB07_152628	:	L	G	T	A	F	T	P	K	I	H	A	S	W	E	K	F	I	A	V	L	V	D	G	L	S	O	G	Y	H	*	
XTR_HB08_152629	:	L	G	S	A	F	T	P	Q	V	Q	A	A	W	C	E	K	F	N	A	V	L	V	A	A	L	S	H	G	Y	F	*
XTR_HB09_478564	:	L	G	S	A	F	T	P	Q	V	Q	A	A	W	E	K	L	N	A	T	L	V	A	A	L	S	H	G	Y	F	*	
XTR_HB11_287141	:	L	G	T	A	F	T	P	Q	V	Q	A	A	W	E	K	F	S	A	G	L	V	A	A	L	S	H	G	Y	F	*	
XTR_HB12_367736	:	D	D	Q	I	E	-	L	I	E	K	F	T	W	G	S	F	I	N	T	D	L	S	A	V	I	S	N	S	R	*	
XTR_HB13_176470	:	F	Q	A	E	F	D	A	T	A	Q	A	A	W	D	K	Y	L	A	A	I	S	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB14_456770	:	F	Q	A	D	F	D	A	T	A	Q	A	A	W	D	K	Y	L	A	A	I	S	T	V	L	T	S	K	Y	R	*	
XTR_HB15_DQ224416	:	F	P	A	E	F	N	A	D	A	Q	A	A	W	D	K	F	L	S	V	V	S	S	V	L	V	S	K	Y	R	*	

7.8.3. Zu Abbildung 26A

Phylogenie der duplizierten Teleostier-Cytoglobine.

Die farbige Codierung kennzeichnet identische bzw. physikochemisch ähnliche Aminosäuren nach folgendem Code: **Proline**, **Glycin**, **winzig**, **klein**, **Positiv geladen**, **Negativ geladen**, **Amphoterer Charakter**, **Polar**, **Alphatisch**, **Aromatisch**, **Hydrophob**.

	10	20	30	40	50																																																	
Gga_Ngb	:			MESGM	LSRTGQAL	TRES	WRR	VSGS	P																																													
Hsa_NGB	:			MERP	---	PEL	TRQS	WRAV	SRSP																																													
Tni_Ngb	:			MEKL	--	SKK	KEL	TRGS	WDS	LGKNK																																												
Dre_Ngb	:			MEKL	--	SEK	KGL	TRDS	WES	LGKNK																																												
Omy_Ngb	:			MEKL	--	TEK	KEL	TRVS	WES	LGKDK																																												
Xtr_Ngb	:			MEKDQ	LS	GP	KEL	TRES	WQT	VSQDQ																																												
Xtr_GbX	:	MGCILSS	LGWQ	WRD	SLD	HTE	TET	SPLL	PTLN	--	LSE	QQQL	VES	WRL	I	QHDI																																						
Dre_GbX	:	MGC	ALS	--	GS	GL	T	AGAPE	I	RPG	EEET	PAG	--	LT	TNH	I	R	L	KES	WRL	I	Q	E	D	I																													
Hsa_CYGB	:			MEK	V	P	G	E	M	E	I	E	R	R	E	S	E	E	L	S	E	A	R	K	A	V	Q	A	M	W	A	R	L	Y	A	N	C																	
Mmu_Cygb	:			MEK	V	P	G	D	M	E	I	E	R	R	E	S	E	E	L	S	E	A	R	K	A	V	Q	A	T	W	A	R	L	Y	A	N	C																	
Gga_Cygb	:			MEK	V	Q	G	E	M	E	I	E	R	W	E	R	S	E	E	I	S	D	A	R	K	K	V	I	Q	E	T	W	S	R	V	Y	A	N	C															
Dre_Cygb_1	:			ME	---	G	D	G	V	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	T	E	E	D	V	C	V	I	Q	D	T	W	K	P	V	Y	A	E	R																	
Ola_Cygb_1	:			ME	---	R	K	Q	G	E	V	D	H	L	E	R	S	R	P	L	T	D	K	R	V	M	I	Q	D	S	W	A	K	V	Y	Q	N	C																
Tni_Cygb_1	:			MER	M	Q	R	D	G	E	V	D	H	V	E	Q	P	G	P	L	T	E	K	E	K	V	M	I	Q	D	S	W	A	K	V	F	Q	S	C															
Tru_Cygb_1	:			MER	M	Q	G	D	G	E	L	D	H	V	E	R	P	S	P	L	T	D	K	E	K	V	M	I	Q	D	S	W	A	V	V	F	Q	S	C															
Omy_Cygb_1	:			MER	Q	G	E	V	T	A	D	R	L	E	R	L	D	P	L	C	D	S	E	R	E	M	I	K	D	T	W	A	K	V	Y	Q	N	C																
Dre_Cygb_2	:			MEK	E	R	E	D	E	E	T	E	G	R	E	R	P	E	P	L	T	D	V	E	R	G	I	K	D	T	W	A	R	V	Y	A	S	C																
Ola_Cygb_2	:	M	S	C	E	S	P	P	P	P	S	P	P	P	P	Q	--	M	L	G	V	Q	R	G	E	C	E	D	R	P	E	R	A	E	P	L	S	D	A	E	M	E	I	Q	H	T	W	G	H	V	Y	K	N	C
Tni_Cygb_2	:	M	S	H	E	-	P	P	P	P	--	--	Q	L	--	A	V	Q	R	R	D	V	D	G	Q	D	G	P	E	R	A	E	P	L	S	D	T	E	R	E	M	I	R	D	A	W	G	H	V	Y	K	N	C	
Tru_Cygb_2	:	M	S	H	E	S	P	P	A	P	P	P	P	P	Q	L	L	G	Q	R	R	D	V	E	G	E	D	G	P	E	R	A	K	P	L	S	D	T	E	R	E	M	I	Q	D	T	W	G	H	V	Y	K	N	C
Xtr_Cygb	:			MEK	V	Q	G	E	N	D	M	E	R	W	E	R	L	E	E	I	T	E	S	E	R	G	V	I	K	E	T	W	A	R	V	Y	A	N	C															
Xtr_GbY	:			MAD	L	T	G	A	D	I	E	N	T	E	V	E	N	E	V	W	S	K	I	Y	A	N	P																											
Dre_Mb	:			MAD	H	D	L	V	L	K	C	W	G	A	V	E	A	D																																				
Hsa_MB	:			MG	-	L	S	D	G	S	W	Q	L	V	L	N	V	W	G	K	V	E	A	D	I																													
Hsa_HBA	:			MV	-	L	S	P	A	D	K	T	N	V	K	A	A	W	G	K	V	G	A	H	A																													
Hsa_HBB	:			MVH	-	L	T	P	E	S	K	S	A	V	T	A	L	W	G	K	V	--	N	V																														

	60	70	80	90	100	110																																									
Gga_Ngb	:	VQH	AVV	LFS	LF	D	L	D	L	L	P	L	F	Q	Y	N	C	K	R	F	A	S	P	Q	E	C	L	-	A	A	P	E	F	L	D	I	R	K	V	M	L	V	I	D	A		
Hsa_NGB	:	LEH	AVV	LFA	LF	A	L	E	L	L	P	L	F	Q	Y	N	C	R	O	F	S	S	P	E	D	C	L	-	S	S	P	E	F	L	D	I	R	K	V	M	L	V	I	D	A		
Tni_Ngb	:	VPH	AVV	LFS	LF	E	L	D	E	L	L	N	L	F	H	Y	-	T	N	C	G	S	T	Q	D	C	L	-	S	S	P	E	F	L	D	I	R	K	V	M	L	V	I	D	A		
Dre_Ngb	:	VPH	AVV	LFT	LF	E	L	D	E	L	L	T	L	F	S	Y	-	S	T	N	C	G	D	A	P	E	C	L	-	S	S	P	E	F	L	D	I	R	K	V	M	L	V	I	D	A	
Omy_Ngb	:	VPH	AVV	LFS	LF	E	L	E	L	E	L	L	N	L	F	H	Y	-	T	N	C	G	T	I	Q	D	C	L	-	S	S	P	E	F	L	D	I	R	K	V	M	L	V	I	D	A	
Xtr_Ngb	:	LHH	AVV	LFS	LF	E	L	E	L	E	L	V	F	L	F	Q	Y	N	S	S	H	F	S	K	V	Q	D	C	L	-	S	S	A	E	E	T	E	I	R	K	V	M	T	V	I	D	A
Xtr_GbX	:	AKV	AVV	LFW	LF	E	T	H	E	C	K	D	V	F	F	L	F	-	R	D	V	D	L	Q	A	-	L	R	A	N	K	D	L	R	A	G	L	R	V	L	S	F	V	E	K		
Dre_GbX	:	AKV	AVV	LFW	LF	E	T	H	E	C	K	D	V	F	F	L	F	-	R	D	V	E	D	L	E	R	-	L	R	T	S	R	E	L	R	A	G	L	R	V	M	S	F	I	E	K	
Hsa_CYGB	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	K	H	M	-	E	D	P	L	E	M	E	R	S	P	Q	L	R	K	A	C	R	V	M	G	A	L	N	T	
Mmu_Cygb	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	R	H	M	-	E	D	P	L	E	M	E	R	S	P	Q	L	R	K	A	C	R	V	M	G	A	L	N	T	
Gga_Cygb	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	K	H	M	-	D	T	L	E	M	E	R	S	L	Q	L	R	K	A	Q	R	V	M	G	A	I	N	T		
Dre_Cygb_1	:	DNA	AVV	LIV	FF	T	N	F	S	A	K	Q	Y	F	E	H	F	-	R	E	L	-	O	D	P	A	E	M	Q	Q	N	A	Q	L	K	K	G	Q	R	V	L	N	A	L	N	T	
Ola_Cygb_1	:	DDA	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	S	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	K	H	I	-	E	D	A	E	E	L	E	K	S	S	Q	L	R	K	A	R	V	M	N	A	I	N	T		
Tni_Cygb_1	:	DDA	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	S	K	Q	F	F	K	D	F	-	K	H	M	-	E	E	P	E	E	M	Q	Q	S	V	Q	L	R	K	A	H	R	V	M	T	A	L	N	T	
Tru_Cygb_1	:	DDA	AVV	LIV	FF	V	S	F	S	S	K	Q	L	F	K	D	F	-	K	D	I	-	E	E	P	E	E	M	Q	R	S	I	Q	L	R	K	A	H	R	V	M	T	T	I	N	T	
Omy_Cygb_1	:	DDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	S	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	Q	Q	V	-	E	D	P	G	E	L	E	R	S	A	Q	L	K	K	S	R	R	V	M	N	A	I	N	T	
Dre_Cygb_2	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	Q	D	M	-	E	D	P	E	E	M	E	K	S	S	Q	L	R	K	A	R	R	V	M	N	A	I	N	T	
Ola_Cygb_2	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	Q	D	M	-	O	D	P	E	E	M	E	K	S	S	Q	L	R	Q	A	R	R	V	M	N	A	I	N	T	
Tni_Cygb_2	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	Q	D	M	-	E	E	P	E	E	M	E	R	S	S	Q	L	R	H	A	C	R	V	M	N	A	I	N	T	
Tru_Cygb_2	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	R	Y	F	S	Q	F	-	Q	D	M	-	E	D	P	E	E	M	E	R	S	S	Q	L	R	H	A	C	R	V	M	N	A	I	N	T	
Xtr_Cygb	:	EDV	AVV	LIV	FF	V	N	F	S	A	K	Q	Y	F	S	Q	F	-	K	H	M	-	E	D	P	L	E	M	E	G	S	S	Q	L	R	K	A	R	R	V	M	G	A	V	N	S	
Xtr_GbY	:	EES	AVV	LIV	FF	L	T	Y	Q	T	K	I	Y	F	K	N	L	-	K	N	I	-	S	T	L	Q	E	M	Q	D	N	A	G	I	R	A	G	K	R	V	M	G	A	L	N	H	
Dre_Mb	:	AAN	AVV	LIV	FF	K	E	Y	D	T	L	K	L	F	P	K	F	-	S	G	I	-	-	S	Q	G	D	L	A	G	S	P	A	V	A	A	G	A	T	V	L	K	K	L	G	E	
Hsa_MB	:	PGH	AVV	LIV	FF	K	G	H	E	T	L	E	K	F	D	K	F	-	K	H	L	-	K	S	E	D	E	M	K	A	S	E	D	L	K	K	G	A	T	V	L	T	A	L	G	G	
Hsa_HBA	:	GEY	AVV	LIV	FF	L	S	F	T	T	K	T	Y	F	P	H	F	-	D	L	-	-	-	S	-	-	-	-	-	H	G	S	A	Q	V	K	G	G	K	V	M	D	A	L	T	N	
Hsa_HBB	:	DEV	AVV	LIV	FF	V	V	Y	W	T	Q	R	F	F	E	S	F	-	G	D	L	-	S	T	P	D	A	V	M	G	N	P	K	V	K	A	G	K	V	L	G	A	F	S	D		

Anhang

```

                120          130          140          150          160
Gga_Ngb      : AVSHLEDLPCLEEYLCLNLGRKQA-VGVKVESFSTVGESLLYMLEKCLGAAFSPD
Hsa_NGB      : AVTNVEDLSSLEEYLASLGRKRA-VGVKLSSFSTVGESLLYMLEKCLGPAFTPA
Tni_Ngb      : AVSHLDDLHSLEDFLLNLGRKQA-VGVKQSFAMFVGESLLYMLQCSLGQAYTAS
Dre_Ngb      : AVSHLDDDLHTLEDFLNLGRKQA-VGVNTQSFALVGESLLYMLQSSLGPAYTTS
Omy_Ngb      : AVSHLDNLHTLEDFLNLGRKQA-VGVNTQSFAVVGESLLYMLQCSLGQGYTAP
Xtr_Ngb      : AVSSLDCLSSLDEYLSLGRKRA-VGVKLESFNTVGESLLFALESCLGDAFTSD
Xtr_GbX      : SVARIADCARLEELALELGRSRYR-YNAPPKYYQYVGTEFISAVRPMLQDKWTAE
Dre_GbX      : SVARLDQLERLETLALELGRSRYR-YNAPPKYYGYVGAEFICAVRPILKDRWTPE
Hsa_CYGB     : VENLHDPDKVSSVLALVGKAABALKHKVEPVYFKILSGVILEVVAEEFASDFPPE
Mmu_Cygb     : VENLHDPDKVSSVLALVGKAABALKHKVEPVYFKILSGVILEVVAEEFANDFPVE
Gga_Cygb     : VENLDDPEKVSSVLALVGKAABALKHKVEPVYFKKLTGVMDEVIAEAYGNDFTPE
Dre_Cygb_1   : LVENLRDADKLNTIFNQMGKSALRHKVDPVYFKILAGVILEVLVEAFPQCFSPA
Ola_Cygb_1   : LVESLDNSDKVSSVLNAVGKAAAIRHKVDPVYFKILSGVILEVLGEAYPQVMTAE
Tni_Cygb_1   : LVESLDNSDRVASVLKSVGKAABALKHNVDPKYFKILSGVILEVLGEAFTEIITAE
Tru_Cygb_1   : LVENLDDADAMASALKSVGRAALRHKVDPKYFKILSGVILEVLGEAFTEIITAE
Omy_Cygb_1   : LVENLHDGDKMVSVLKLVGKAABALRHNVDPVYFKILCGVILEVLVADFPDYITPE
Dre_Cygb_2   : VENLHDPEKVSSVLVLVGKAAAFKYKVEPIYFKILSGVILELAEEFGECFTPE
Ola_Cygb_2   : VENLQDPEKVSSVLALVGKAAAVKHKVEPIYFKILSGVILEVLSEDFPEFFTAE
Tni_Cygb_2   : VENLHDPEKVSSVLAVGRAAVKHKVEPMYFKILSGVILEXLCEKFPEFFTAD
Tru_Cygb_2   : VENLHDPEKVSSVLALVGKAAAIKHKVEPMYFKILCGVILEVLCEAFPEFFTAD
Xtr_Cygb     : VENLGDPEKITTVLSIVGKSBALKHKVDPVYFKILTGVMDEVIAEEYAKDFTPD
Xtr_GbY      : VENLKDWDAVCSALSHLAKRQDVHKVEVNNFELLFLVISVFKEALGSGFTPE
Dre_Mb       : LLKAKGD---HAALLKPLANTDANIHKVALNNFRLITEVLVKVMAEKAGLDAG-
Hsa_MB       : LLKKKGH---HEAELKPLAOSBATKHKIIPKYLEFISECILQVLQSKHPGDFAGD
Hsa_HBA      : AVAHVDD---MPNALSALSDLBAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPA
Hsa_HBB      : GAAHLDN---LKGTFATLSELCDCKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGKEFTPP

```

```

                170          180          190          200          210
Gga_Ngb      : VREAWIELYSAVVKAMQRGWEV----LPEGD*
Hsa_NGB      : TRAAWSQLYGAVVQAMSRGW-----DGE*
Tni_Ngb      : LRQAWLNMYSVVVASMSRGWAK--NGEDKAD*
Dre_Ngb      : LRQAWLTMYSIVVSAMTRGWAK--NGEHKSN*
Omy_Ngb      : LRQAWLNMYTIVVAAMSRGWAK--NGEHKTD*
Xtr_Ngb      : TREAWSLLYANVVQSMSRGWHRDSQEQREGI*
Xtr_GbX      : VEEAWKGLFAYICTVMERGYQEEE--RRHSDGRSLIDGLQGNKGLI*
Dre_GbX      : LEEAWKTLFQYVTSIMREGFLEEERNQRSNTQTSSREQPDKRSTAI*
Hsa_CYGB     : TQRAWAKLRGLIYSHVTAAYKEVGWVQQVENATTPPATLPSSGP*
Mmu_Cygb     : TQKAWAKLRGLIYSHVTAAYKEVGWVQQVENTTTPPATLPSSGP*
Gga_Cygb     : AHGAWTKMRTLIYTHVTAAYKEAGWSYPSATL*
Dre_Cygb_1   : EVQSSWSKLMGILYWQMNRVYAEVGWE--NSKK*
Ola_Cygb_1   : VASAWTNLLAILCCSIKAVYEELGWPHLSNSTS*
Tni_Cygb_1   : VASAWTKLLANMCCGIAAVYKEAGWTELSSSVE*
Tru_Cygb_1   : VASAWTKLLANMCCAVAAVYEEEAGWTKLSSSAE*
Omy_Cygb_1   : VAVAWTKLLDAIYWHVKGVYEEVGWA--SSSAV*
Dre_Cygb_2   : VQTSWSKLMAALYWHITGAYTEVGWVKLSSSAV*
Ola_Cygb_2   : VQLVWTKLMAAVYWHVTGAYTEVGWLQVSSAV*
Tni_Cygb_2   : VQLVWSKLMATVYWHVTGAYTDVGWLQVSSAV*
Tru_Cygb_2   : VRMVWAKLMAAVYWHVTGAYTDVGWLQVSSAV*
Xtr_Cygb     : VQLAWNXLRSHLYSHVLSAYKEAGWTQYPSNSV*
Xtr_GbY      : QSKSWEKLFSITYKYLESCYANTDS*
Dre_Mb       : -QGALRRVMDAVIGDIGGYYKEIGFAG*
Hsa_MB       : AQGAMNKALELFRKDMASNYKELGFQG*
Hsa_HBA      : VHASLDKFLASVSTVLTSKYR*
Hsa_HBB      : VQAAYQKVVAGVANALAHKYH*

```

7.8.4. Zu Abbildung 26B1 & B2

Phylogenie der duplizierten Teleostier-Cytoglobine.

Die farbige Codierung kennzeichnet identische bzw. physikochemisch ähnliche Aminosäuren nach folgendem Code: **Proline**, **Glycin**, **winzig**, **klein**, **Positiv geladen**, **Negativ geladen**, **Amphoterer Charakter**, **Polar**, **Alphatisch**, **Aromatisch**, **Hydrophob**.

		10	20	30	40	50										
Hsa_MB	:				MG	LSDGQWQLVNLVWGKVEADI										
Mmu_Mb	:				MG	LSDGQWQLVNLVWGKVEADL										
Dre_Mb	:				MA	HDLVLKCWGAVEADY										
Ola_Mb	:				MA	YDMVLKHWGPVEADY										
Tni_Mb	:				MG	FDMLKFWGPVEADY										
Hsa_CYGB	:		ME	KVPGEMEIER	ERRERSEE	LSEAE	ERKAVQAMWARLYANC									
Mmu_Cygb	:		ME	KVPGDMEIER	ERRERSEE	LSEAE	ERKAVQATWARLYANC									
Gga_Cygb	:		ME	KVQGEIMEIER	WERSEE	ISDAE	KKVIQETWSRYANC									
Xtr_Cygb	:		ME	KVQGENDEMR	WERLEE	ITSE	ERGVIKETWARLYANC									
Dre_Cygb_1	:		ME	--GDGGV	QLTQSPDS	LTEE	VCVIQDTWKPVEAER									
Tni_Cygb_1	:		ME	RMQRDGEVD	HVEQPGP	LTEK	EKVMIQDSWAKVYFQSC									
Tru_Cygb_1	:		ME	RMQDGEVD	HVERPSP	LTDK	EKVMIQDSWAVYFQSC									
Ola_Cygb_1	:		ME	--KQGEVD	DHLERSRP	LTDK	ERVMIQDSWAKVYQNC									
Omy_Cygb_1	:		ME	RQQGEVTA	DRLERLDP	LCDSE	REMIKDTWATVYQNC									
Cca_Cygb_1	:		ME	---DGGV	ERTQSPET	LTED	VCVIQDTWRPVEYENR									
Gac_Cygb_1	:		M	ERTGEGDGE	GPLERPSP	LTDK	ERLMIQDSWAKVYQSC									
Psp_Cygb_1	:		ME	TQGDGEVD	HLERPSP	LTDK	ERVMIQASWGVYQNC									
Ppr_Cygb_1	:		ME	---GDGDV	ELTLPET	LTED	VCVIQDTWRPVEYESR									
Ssa_Cygb_2	:		ME	RQQGEVKA	DRLERLDP	LCDSE	REMIKDTWATVYQNC									
Dre_Cygb_2	:		ME	KEREDEETE	GRERPEP	LTDV	ERGIKDTWARVYASC									
Tni_Cygb_2	:	MSHFE	LA	VORRDVDGQ	DGP	ERAEP	LSDT	EREMIRDAWGHVYKNC								
Tru_Cygb_2	:	MSHFE	LA	VORRDVEGE	DGP	ERAKP	LSDT	EREMIQDTWGHVYKNC								
Ola_Cygb_2	:	MSC	LA	VORRDVEGE	DGP	ERAKP	LSDA	EREMIQDTWGHVYKNC								
Gac_Cygb_2	:	MSR	LA	VORRDVEGE	DGP	ERAKP	LSDA	EREMIQDTWGHVYKNC								
Hsa_HBA	:		MV	LS	PADKTNV	KAAW	GKVG	AHAG	EYGA	ELER	MF	LS	FP			
Hsa_HBB	:		MV	HL	TPEEKSAV	TALW	GKV	--NV	D	EV	GG	EAL	GL	LL	VY	YP

		60	70	80	90	100	110																	
Hsa_MB	:	PGHGQEV	LIRLEFKGH	PE	TLEKFD	KF	-K	HLKSEDEM	KAS	SED	LKKH	GAT	VLTAL	GGI										
Mmu_Mb	:	AGHGQEV	LIGLFKTH	PE	TLDKFD	KF	-K	HLKSEEDM	KGS	SED	LKKH	GCT	VLTAL	LGTI										
Dre_Mb	:	AANGGEV	LNRLFKEY	PD	TLKLFK	KFS	--	GISQGD	LAGS	PAVA	AAH	GAT	VLKK	LDEL										
Ola_Mb	:	NTHGNL	VLRLEFHEY	PET	QKLFK	KFA	--	GIAXGD	MAGNAAL	SAH	GAT	VLKK	LDEL											
Tni_Mb	:	SAHGGM	VLRLEFTE	PET	QQLFP	KFV	--	GIAQSE	LAGNAAV	SAH	GAT	VLKK	LDEL											
Hsa_CYGB	:	EDVGVA	ILVRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-K	BMEDP	LEMERS	Q	LRKH	ACR	VMGAL	NTV										
Mmu_Cygb	:	EDVGVA	ILVRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-R	BMEDP	LEMERS	Q	LRKH	ACR	VMGAL	NTV										
Gga_Cygb	:	EDVGVS	ILIRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-K	BMDDT	LEMERS	L	LRKH	AQR	VMGAL	NTV										
Xtr_Cygb	:	EDVGVS	ILIRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-K	BMEDP	LEMERS	SV	LRKH	HARR	VMGAL	NSV										
Dre_Cygb_1	:	DNAGVA	ILVRFVNF	PS	AKQYFE	HF	-R	ELQD	PAEMQ	QNAQ	LKKH	GQR	VLNAL	NLTL										
Tni_Cygb_1	:	DDAGVA	ILVRFVNF	PS	SKQFFK	DF	-K	MEEP	PEEMQ	QSV	LRKH	HARR	VMTAL	NLTL										
Tru_Cygb_1	:	DDAGVA	ILVRFVNF	PS	SKQYFS	QF	-K	IEEP	PEEMQ	RS	LRKH	HARR	VMTAL	NLTL										
Ola_Cygb_1	:	DDAGVA	ILVRFVNF	PS	SKQYFS	QF	-K	IEDA	EELK	SSQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTL										
Omy_Cygb_1	:	DDVGVA	ILIRFVNF	PS	SKQYFS	QF	-Q	VEDP	EGELERS	SAQ	LKKH	SRR	VMNA	NLTL										
Cca_Cygb_1	:	ENAGVA	ILIRFVNF	PS	AKQYFD	QF	-R	MDP	PEEMK	QSI	LKKH	ALR	MTAL	NLTL										
Gac_Cygb_1	:	DDVGVA	ILVRFVNF	PS	SKQFFS	QF	-K	IEEP	PEEL	ESSQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTL										
Psp_Cygb_1	:	DDVGVA	ILVRFVNF	PS	SKQFFN	QF	-K	IEDA	EELK	SAQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTL										
Ppr_Cygb_1	:	ENAGVA	ILIRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-R	MDP	PEEMR	QSV	LRKH	HARR	VMTT	NSL										
Ssa_Cygb_2	:	DDVGVA	ILIRFVNF	PS	SKQYFS	QF	-Q	VEDP	PEELERS	SAQ	LRKH	SRR	VMNA	NLTL										
Dre_Cygb_2	:	EDVGVT	ILIRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-Q	MDP	PEEMK	SSQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTV										
Tni_Cygb_2	:	EDVGVS	ILIRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-Q	MDP	PEEMERS	SSQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTV										
Tru_Cygb_2	:	EDVGVS	ILIRFVNF	PS	AKRYFS	QF	-Q	MDP	PEEMERS	SSQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTV										
Ola_Cygb_2	:	EDVGVS	ILIRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-Q	MDP	PEEMK	SSQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTV										
Gac_Cygb_2	:	EDVGVT	ILIRFVNF	PS	AKQYFS	QF	-Q	MDP	PEEMERS	SSQ	LRKH	HARR	VMNA	NLTV										
Hsa_HBA	:	TKTY	FPHF	--DL	-S	---	HGSA	QV	KG	GGK	VADAL	TNAV	AH	VD	---	MP	NALSA							
Hsa_HBB	:	TQR	FFES	-GDL	-ST	FD	AVMGNP	KV	KA	BG	KV	LG	A	F	S	DGL	AHL	DN	---	L	KG	T	F	A

```

120      130      140      150      160
Hsa_MB   : LKK-KG--HHEA EIKPLAQ SWATKHKI PVKYLEFISECITQV LQSKHPGDFG-AD
Mmu_MB   : LKK-KG--QHAA EIQPLAQ SWATKHKI PVKYLEFISEIIIEV LKKRHSGDFG-AD
Dre_MB   : LK---AKGDHAA LLKPLAN TRANIHKV ALNFRLITEVLVK MAEKAGLDA A---
Ola_MB   : LK---ARGNHGA ILKPLAN SWATKHKI PINNFRLITEVIGK MAEKAGLDA A---
Tni_MB   : LK---AKGNHAA ILQPLAN SWATXXXXXXXXXXFKLIAEVIGK MAEKAGLDT A---
Hsa_CYGB : VENLHDPDKVSS VLALVGKAAALKHKVEPVYFFKILSGVILEVVAAEFASDFP-PE
Mmu_Cygb : VENLHDPDKVSS VLALVGKAAALKHKVEPMYFFKILSGVILEVVIAEEFANDFP-VE
Gga_Cygb : VENLDDPEKVSSVLALVGKAAALKHKVEPVYFFKKLTGVMLEVVIAEAYGNDFT-PE
Xtr_Cygb : VENLGDPEKITTVLSIVGKAAALKHKVDPVYFFKILTGVMLEVVIAEEYAKDFT-PD
Dre_Cygb_1 : VENLRDADKLNTIFNQMGKSWALRHKVDPVYFFKILAGVILEVLVLEAFPQCFSPAE
Tni_Cygb_1 : VESLDNSSDRVASSVLKSVGRAAALKHNVDPKYFFKILSGVILEVVLGEAFTEITI-AE
Tru_Cygb_1 : VENLDDADAMASSALKSVGRAAALRHKVDPKYFFKILSGVILEVVLGEAFTEITI-AE
Ola_Cygb_1 : VESLDNSSDKVSSVLNAVGKAAAIRHKVDPVYFFKILSGVILEVVLGEAYPQVMTI-AE
Omy_Cygb_1 : VENLHDDGDMVSVLKLVGKAAALRHNVEPVYFFKILSGVILEVVLVADFPDYI-PE
Cca_Cygb_1 : VENLRDGDKLNSVFQQMGKSWALKHKVDPVYFFKILAGVILEVLVLEAFPQCFSPAS
Gac_Cygb_1 : VESLGSADKVASSVLRLVGKAAALRHKVDPVYFFKILSGVILEVLVLEAFPQCFSPE
Psp_Cygb_1 : VENLDNSSDKMASSVLKLVAKAAALQHKVEPVYFFKILSGVILEVLVLEAFPQCFSPE
Ppr_Cygb_1 : VENLRDADKLNTIFRQMGKSWALRHKVDPVYFFKILAGVILEVLVLEAFPQCFSPAS
Ssa_Cygb_2 : VENLHDEDKMVSVLKLLGKAAALRHKVEPVYFFKNLCGVILEVLVLEAFPQCFSPE
Dre_Cygb_2 : VENLHDPDKVSS VLVLVGKAAAFKHKVEPIYFFKILSGVILEVLVLEAFPQCFSPE
Tni_Cygb_2 : VENLHDPDKVSS VLAVVGRAAAVKHKVEPMYFFKILSGVILEVLVLEAFPQCFSPE
Tru_Cygb_2 : VENLHDPDKVSS VLALVGKAAAIKHKVEPMYFFKILSGVILEVLVLEAFPQCFSPE
Ola_Cygb_2 : VENLQDPEKVSSVLALVGKAAAVKHKVEPIYFFKIXSGVMLSLVLEAFPQCFSPE
Gac_Cygb_2 : VENLHDPDKVSS VLALVGTAAIKHKVEPMYFFKILSGVILEVLVLEAFPQCFSPE
Hsa_HBA  : LSDLHAHKLRVD PVNFKLLSWCLLVTLAAHLPAEFTTPA-VHASLDKFFLASVSTVL
Hsa_HBB  : LSELHCDKLHVD PENFRLLSWVLVCVLAHHFGKEFTPP-VQAYQKVVAGVANAL

```

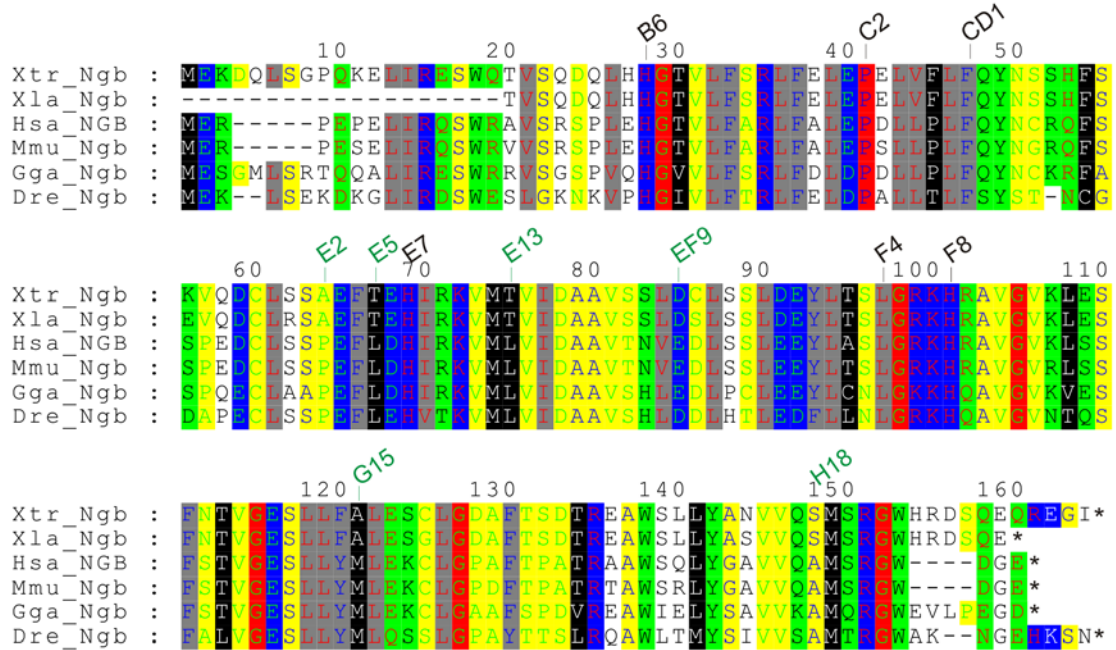
```

170      180      190      200
Hsa_MB   : AQQAMNKALELFRKDMASNYKELLFQG*
Mmu_MB   : AQQAMSKALELFRNDIAAKYKELLFQG*
Dre_MB   : QQGALRRVMDAVIDGIDGYKEILFAG*
Ola_MB   : GQXALRSVMAGIIAEIEADYXELLFAG*
Tni_MB   : GQQALRNIMATTIADIDATYKELLFS*
Hsa_CYGB : TQRAWAKLRGLIYSHVTAAYKELLVWVQVNPATTPPATLPSSSS*
Mmu_Cygb : TQKAWAKLRGLIYSHVTAAYKELLVWVQVNPNTTPPATLPSSSS*
Gga_Cygb : AHGAWTKMRTLIIYTHVTAAYKELLVWVSYPSATL*
Xtr_Cygb : VQLAWNXLRSHLIYSHVLSAYKELLVWVQVNPNSV*
Dre_Cygb_1 : VQSSWSKLMGILYWQMNRYAELLVWVWENSKK*
Tni_Cygb_1 : VASAWTKLLANMCCGIAAVYKELLVWVTELSSSVE*
Tru_Cygb_1 : VASAWTKLLANMCCAVAAVYEELLVWVTELSSSAE*
Ola_Cygb_1 : VASAWTNLLAILCCSIKAVYEELLVWVPHLSNSSTS*
Omy_Cygb_1 : VAVAWTKLLDAIYWHVKGVEELLVWVWA--SSSAV*
Cca_Cygb_1 : VQSAWSKLLGVLYWQMNKVYAELLVWVWESIKN*
Gac_Cygb_1 : VGAAWTKEFFAMVCRSITAVYEELLVWVWTELSTPTERSSSSSECV*
Psp_Cygb_1 : -----
Ppr_Cygb_1 : VQGAWSKLMGVLYWQMNKVYAELLVWVEPIKTSPK*
Ssa_Cygb_2 : -----
Dre_Cygb_2 : VQTSWSKLLMAALYWHITGAYTELLVWVWKLSSSAV*
Tni_Cygb_2 : VQLVWSKLLMATVYWHVITGAYTELLVWVWKLQVSSSAV*
Tru_Cygb_2 : VRMVWAKLLMAAVYWHVITGAYTELLVWVWKLQVSSSAV*
Ola_Cygb_2 : VQLVWTKLLMAAVYWHVITGAYTELLVWVWKLQVSSSAV*
Gac_Cygb_2 : VQMVWTKLLGAVYWHVITGAYTELLVWVWKLQVSSSAV*
Hsa_HBA  : TSKYR*
Hsa_HBB  : AHKYH*

```

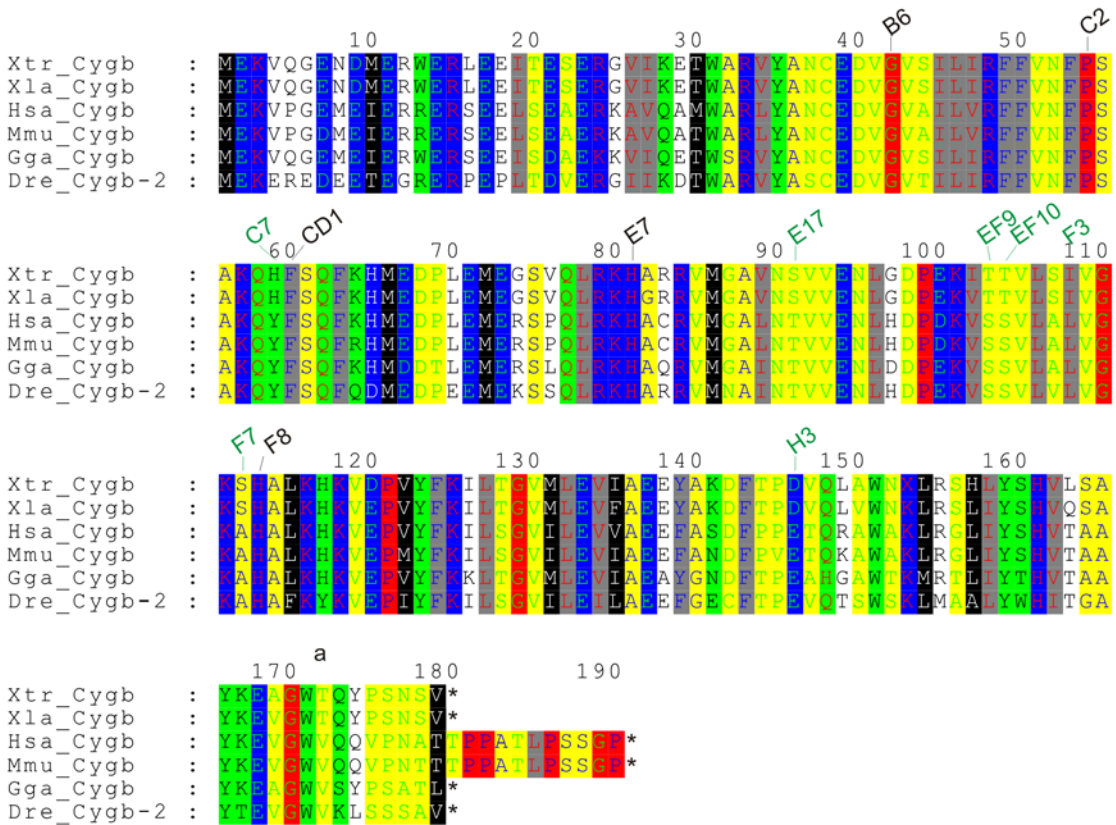
7.8.5. AS-Alignment von Neuroglobin

In das Alignment sind die Sequenzen des Neuroglobins von *Xenopus tropicalis* (Xtr), *Xenopus laevis* (Xla), *Homo sapiens* (Hsa), *Mus musculus* (Mmu), *Gallus gallus* (Gga) und *Danio rerio* (Der) eingeflossen. Die Accession-Nummern der Sequenzen sind unter 7.7. aufgeschlüsselt.



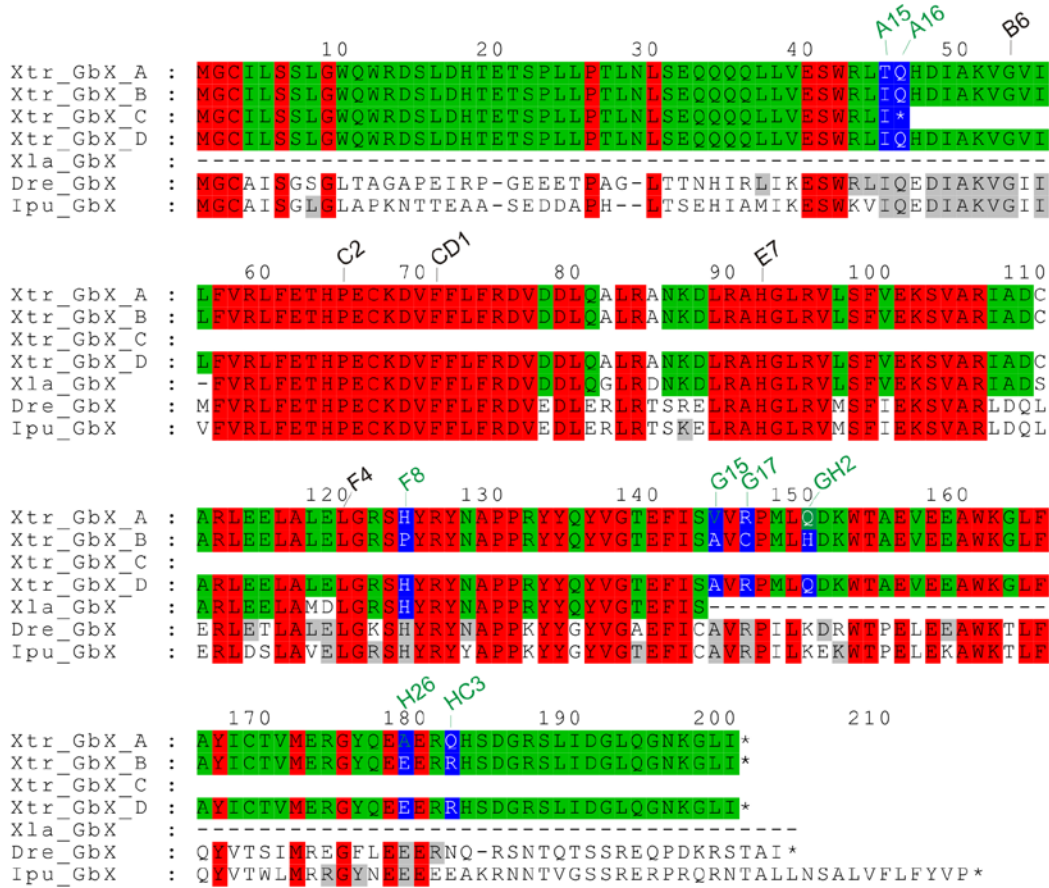
7.8.6. AS-Alignment von Cytoglobin

Zu Speziesnamen und Accession-Nummern der Sequenzen: vgl. 7.7.



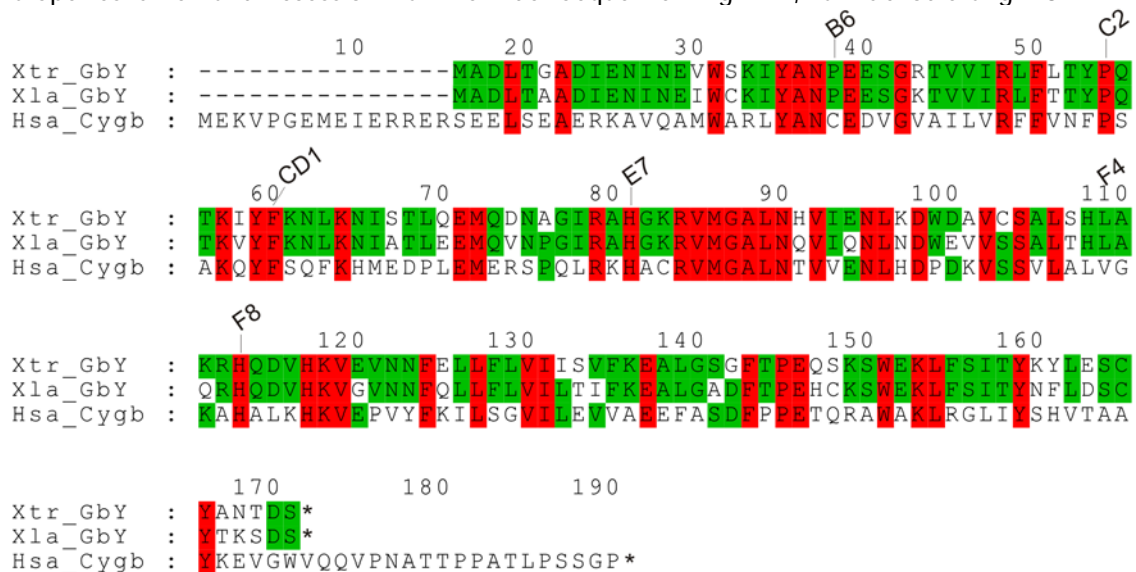
7.8.7. AS-Alignment von GlobinX

In das Algnment wurden die verschiedenen Versionen des GlobinX in *Xenopus tropicalis* (Xtr) ebenso eingefügt wie die von *Xenopus laevis* (Xla), *Danio rerio* (Dre) und *Ictalurus punctatus* (Ipu). In allen Spezies konservierte Aminosäuren sind rot gekennzeichnet, Xenopus-spezifische Aminosäuren grün. Austausche innerhalb der verschiedenen Versionen von GlobinX des tropischen Krallenfrosches sind blau gekennzeichnet.



7.8.8. AS-Alignment von GlobinY und Cytoglobin

Zu Speziesnamen und Accession-Nummern der Sequenzen: vgl. 7.7, zur Fabkodierung 7.8.7.



7.8.9. Zu 3.2.6.1: *Danio rerio* Cygb-1

Alignment der Nukleotide (A) bzw. der abgeleiteten Aminosäuren (B) der Sequenzierung des zur Expression einzusetzenden Amplifikates und der in der Datenbank unter der Accession-Nummer AJ320232 verzeichneten kodierenden Sequenz des *Cygb-1*-Gens von *Danio rerio*.

Das Alignment verdeutlicht neben den gelb symbolisierten identischen Nukleotiden drei grün symbolisierte, stille Basenaustausche, weitere drei Nukleotidaustausche, die zum Einbau einer histochemisch ähnlichen Aminosäure führen (orange unterlegt) und eines Basenaustausches, der zum Einbau einer anderen Aminosäure führt (rot dargestellt). Die ausgetauschten Aminosäuren sind in (B) farblich entsprechend gekennzeichnet. „*“ repräsentiert ein Stopp, ein „?“ symbolisiert eine aufgrund eines unvollständigen Kodons unklare Aminosäure.

A

	NdeI	
	10 20 30 40 50 60 70	
Dre_Cygb-1_Seq :	ATGACCAT	ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCTGACGGAGGAGGACGT
AJ320232 :		ATGGAGGGAGACGGAGGAGTGCAGCTCACACAGAGTCCTGACTCTCTGACGGAGGAGGACGT
	80 90 100 110 120 130 140	
Dre_Cygb-1_Seq :		GTGTGTGATCCAGGACACGTGGAACCGGTGTACGCCGAGCGAGATGATGCTGGAGTGGCTGTGCTGGTC
AJ320232 :		GTGTGTGATCCAGGACACGTGGAACCGGTGTACGCCGAGCGAGATGATGCTGGAGTGGCTGTGCTGGTC
	150 160 170 180 190 200 210	
Dre_Cygb-1_Seq :		AGGTTTTTCACAAACTTCCCATCGGCGAAGCAGTACTTCGAGCATTTCCTGTGAGCTGCAGGACCCGGCGG
AJ320232 :		AGGTTTTTCACAAACTTCCCATCGGCGAAGCAGTACTTCGAGCATTTCCTGTGAGCTGCAGGACCCGGCGG
	220 230 240 250 260 270 280	
Dre_Cygb-1_Seq :		AGACGCAGCAGAACGCGCAGCTGAAGAAACACGGACAGCGAGTCTTGAACGCTCTCAACACACTGGTGGAA
AJ320232 :		AGATGCAGCAGAACGCGCAGCTGAAGAAACACGGACAGCGAGTCTTGAACGCTCTCAACACACTGGTGGAA
	290 300 310 320 330 340 350	
Dre_Cygb-1_Seq :		AAACCTGCGGGAAGCTGACAAACTCAACACCATCTTCAACCAGATGGGCAAATCACACGCGCTGCGCCAC
AJ320232 :		AAACCTGCGGGAAGCTGACAAACTCAACACCATCTTCAACCAGATGGGCAAATCACACGCGCTGCGCCAC
	360 370 380 390 400 410 420	
Dre_Cygb-1_Seq :		AAGGTGGACCCTGTTTACTTCAAATTTCTGGCCGGAGTGATCCTGGAGGTGCTGGTGGAGGCTTTCCAC
AJ320232 :		AAGGTGGACCCTGTTTACTTCAAATTTCTGGCCGGAGTGATCCTGGAGGTGCTGGTGGAGGCTTTCCAC
	430 440 450 460 470 480 490	
Dre_Cygb-1_Seq :		AATGCTTCAGTCCAGCAGAAGTGCAGAGCTCCTGGTCGAAGCTGATGGGGATCCTGTACTGGCAGATGAA
AJ320232 :		AATGCTTCAGTCCAGCAGAAGTGCAGAGCTCCTGGTCGAAGCTGATGGGGATCCTGTACTGGCAGATGAA
	500 510 520 530 540	
Dre_Cygb-1_Seq :		CCGTGTGTACGCTGAGGAGCTGCTGGGAGAACAGCAAAAAGTGTGATCAGCGAT
AJ320232 :		CCGTGTGTACGCTGAGGAGCTGCTGGGAGAACAGCAAAAAGTGA
		BclI

B

	10 20 30 40 50 60 70	
Dre_Cygb-1_Seq :	DH	MEGDGGVQLTQSPDSLTEEDVVCVIQDTWKPVYAERDAGVAVLVRFFTNFPSAKQYFEHFRELQDPAE
AJ320232 :	-	MEGDGGVQLTQSPDSLTEEDVVCVIQDTWKPVYAERDAGVAVLVRFFTNFPSAKQYFEHFRELQDPAE
	80 90 100 110 120 130 140	
Dre_Cygb-1_Seq :		TQONAQLKKHGQRVLNALNTLVENLRDADKLNITFNQMGKSHALRHKVDVYFKILAGVILEVLVEAFPQ
AJ320232 :		MQONAQLKKHGQRVLNALNTLVENLRDADKLNITFNQMGKSHALRHKVDVYFKILAGVILEVLVEAFPQ
	150 160 170 180	
Dre_Cygb-1_Seq :		CFSPAQVQSSWSKLMGILYQMNRVYAEQWENSKK*SA?
AJ320232 :		CFSPAQVQSSWSKLMGILYQMNRVYAEQWENSKK* -

7.9. EST-Einträge ausgewählter Globine in *Xenopus*

		Accession-Nummer	Gewebe
Ngb	<i>Xenopus laevis</i>	---	---
	<i>Xenopus tropicalis</i>	CX971917 (v), CX971918 (p)	Darm (adult)
		CN078343 (p), CN081804 (p) N072263 (p), CX882147 (p) N073324 (p), CX810049 (p), CX882146 (p), CN081803 (p) N078342 (p)	Gehirn & Rückenmark (larval/adult)
		CX397044 (p), CX397043 (p)	Larve (NF 36-41)
Cymb	<i>Xenopus laevis</i>	CD360300 (v), CD253383 (p) D325343 (p)	Auge (adult)
	<i>Xenopus tropicalis</i>	CF238220 (v)	Embryonen (NF 14-19)
		DT543460 (p)	Milz (adult)
GbX	<i>Xenopus laevis</i>	---	---
	<i>Xenopus tropicalis</i>	---	---
GbY	<i>Xenopus laevis</i>	BP713304 (v), BP675910 (v)	Neuroektoderm (NF 12,5)
		BX848720 (v)	Embryonen (NF 14)
		EB733190 (v)	Haut
	<i>Xenopus tropicalis</i>	BJ052904 (p), BJ038309 (p) BG016381(p), BG016324 (p) AW767977 (p), AJ031167 (p) AI031166 (p), AW764916 (p) AW765240 (p), AW147661 (p) AW147558 (p)	Embryonen (NF 10-24)
		CX400940 (v), CX366443 (v), CX400941 (v), CX321573 (p)	Larval (NF 36-41)
		DR866450 (v), DR866451 (v) DR857145 (p), DR857146 (p)	Magen (adult)
		CN117928, CN117929	Gehirn & Retina (NF 25-35)

7.10. Materialien zur quantitativen Real-Time RT-PCR in *Xenopus*

7.10.1. Quantifizierung der Gesamt-RNAs von *Xenopus laevis*

Probe Stadium bzw. Gewebe	Konzentration (ng / μ l)	Reinheit ($E_{260/280}$)
6-10	273,5	2,12
9-13	198,9	2,12
15-19	210,3	2,13
20-25	313,9	2,13
37-38	364,5	2,17
45-46	71,3	2,17
47	173,4	2,21
48	139,2	2,22
49	44,4	2,26
50	114,1	2,20
51	138,5	2,22
54	284,4	2,21
>54	177,5	2,23
>60	164,5	2,20
Muskel	132,1	2,21
Herz	154,0	2,23
Darm	105,0	2,17
Leber	294,9	2,19
Lunge	77,0	2,23
Auge	34,1	2,35
Hirn	63,8	2,21

7.10.2. Eingesetzte Oligonukleotide

	Quantitative RT-PCR		Qualitative RT-PCR	
	Oligonukleotide	Amplifikat [bp]	Oligonukleotide	Amplifikat [bp]
Ngb	Xla Ngb 0F Xla ngb QPCR 1R	175	Xla Ngb 1F Xla Ngb 2R	220
Cygb	Xla Cygb 0F Xla Cygb QPCR 1R	135	Xla Cygb 2F2 Xla Cygb 2R2	353
GbX	Xla gbX 0F Xla gbX QPCR 1R	160	Xla GbX 0F Xla GbX 0R	210
GbY	Xla QPCR GbY 4F Xla QPCR GbY 3R	142	Xla GbY 0F Xla GbY 0R	391
β-actin			Xla β -actin F2 Xla β -actin R2	350

7.10.3. R^2 -Werte, Steigung und PCR-Effizienz der Real-Time PCR von *Xenopus*.

Grundlage bildet die Berechnung der Ausgangskopienzahl, anhand derer fünf serielle Verdünnungen erstellt wurde und die Software daraus die Standard-Eichgerade für jedes Gen ermittelte. R^2 spiegelt die Pipettiergenauigkeit der Standardproben, die Steigung weist auf die erreichte PCR-Effizienz hin. Die Berechnung der prozentualen PCR-Effizienz erfolgte nach der in 2.4.4. angegebenen Formel.

	Ausgangskopienzahl (ng / 2µl)	R^2	Steigung	PCR-Effizienz
Cygb	$5,2013 \times 10^{10}$	0,9974	-4,02	77,3%
Ngb	$3,9 \times 10^{10}$	0,997	-4,55	65,5%
GbX	$9,2486 \times 10^{10}$	0,9976	-3,80	83,2%
GbY	$6,5092 \times 10^{10}$	0,999	-3,94	79%

7.10.4. Real-Time PCR-Ergebnisse für Ngb, Cygb, GbX und GbY von *Xenopus*.

Die Berechnung der relativen Expression wurde auf das Stadium mit der höchsten Expression (grau hervorgehoben) bezogen. „---“ bedeutet 0 bzw. nicht zu berechnen; „undet.“ deutet ein aufgrund der zu geringen Ausgangskopienzahl nicht zu detektierendes Signal hin und in Klammer gesetzte Werte konnten nur einmal in einem Triplikat nachgewiesen werden.

Stadium/ Gewebe	Ausgangs- kopienzahl	Standard- abweichung	Relative Kopienzahl	Standard- abweichung (%)
Neuroglobin				
6-10	undet.	---	---	---
9-13	undet.	---	---	---
15-19	undet.	---	---	---
20-25	(136,77)	---	0,37	---
37-38	304,19	65,697	0,82	0,18
45-46	372,38	176,929	1,01	0,48
47	undet.	---	0,00	---
48	977,71	440,059	2,65	1,19
49	1674,13	292,832	4,53	0,79
50	1426,14	197,287	3,86	0,53
51	16097,9	3289,884	43,55	8,90
54	8917,57	3900,942	24,13	10,55
> 54	2150,6	118,354	5,82	0,32
> 60	1239,87	248,457	3,35	0,67
Muskel	100,69	8,964	0,27	0,02
Herz	316,05	109,236	0,86	0,30
Darm	5836,65	1086,436	15,79	2,94
Leber	2544,43	436,869	6,88	1,18
Lunge	2389,74	662,656	6,47	1,79
Gehirn	36962,9	5216,689	100,00	14,11

Anhang

Cytoglobin				
6-10	undet.	---	---	---
9-13	undet.	---	---	---
15-19	undet.	---	---	---
20-25	undet.	---	---	---
37-38	226,09	38,793	1,28	0,22
45-46	409,2	82,786	2,32	0,47
47	24,79	6,929	0,14	0,04
48	717,6	123,686	4,07	0,70
49	695,2	111,311	3,95	0,63
50	1150,97	283,277	6,53	1,61
51	4843,9	390,195	27,50	2,22
54	3939,8	374,002	22,37	2,12
> 54	2191,22	83,398	12,44	0,47
> 60	1213,3	97,398	6,89	0,55
Muskel	1288,19	240,028	7,31	1,36
Herz	8268,6	662,814	46,94	3,76
Darm	1463,76	81,597	8,31	0,46
Leber	6620,73	63,055	37,59	0,36
Lunge	6066,55	317,342	34,44	1,80
Gehirn	17614,09	3637,275	100,00	20,65
GlobinX				
6-10	undet.	---	---	---
9-13	undet.	---	---	---
15-19	undet.	---	---	---
20-25	(3,18)	---	(0,11)	---
37-38	5,5	6,87E-01	0,19	0,02
45-46	45,63	8,475	1,54	0,29
47	undet.	---	---	---
48	36,13	14,755	1,22	0,50
49	46,23	5,571	1,56	0,19
50	39,06	8,832	1,31	0,30
51	126,12	30,604	4,24	1,03
54	59,16	9,422	1,99	0,32
> 54	50,94	23,753	1,71	0,80
> 60	34,44	4,977	1,16	0,17
Muskel	(5,81)	---	(0,20)	---
Herz	2,57	5,52E-01	0,09	0,02
Darm	77,19	17,916	2,60	0,60
Leber	10,04	2,807	0,34	0,09
Lunge	32,79	7,304	1,10	0,25
Gehirn	2972,59	894,631	100,00	30,10
GlobinY				
6-10	undet.	---	---	---
9-13	undet.	---	---	---
15-19	61631,75	8879,173	100,00	14,41
20-25	55484,01	2707,859	90,03	4,39
37-38	20927,41	138,141	33,96	0,22
45-46	1488,51	270,214	2,42	0,44
47	120,87	13,229	0,20	0,02
48	3512,4	419,516	5,70	0,68
49	875,18	190,916	1,42	0,31
50	3005,26	461,75	4,88	0,75

51	23666,01	1862,286	38,40	3,02
54	54977,05	7372,397	89,20	11,96
> 54	12361,17	759,625	20,06	1,23
> 60	3456,31	491,138	5,61	0,80
Muskel	301,49	27,211	0,49	0,04
Herz	630,25	36,546	1,02	0,06
Darm	16613,84	1357,006	26,96	2,20
Leber	9563,26	1039,29	15,52	1,69
Lunge	56916,82	6278,764	92,35	10,19
Gehirn	360,05	70,805	0,58	0,11

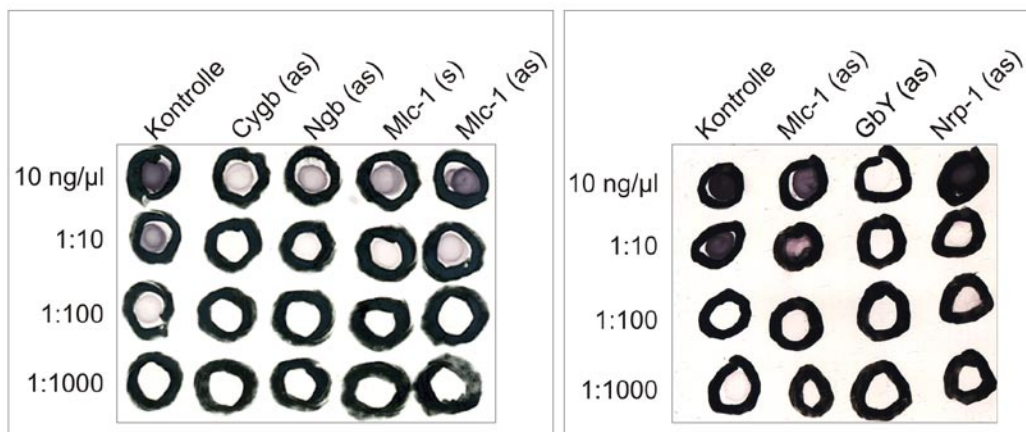
7.11. Materialien zur Whole Mount *in situ*-Hybridisierung in *Xenopus*

7.11.1. Oligonukleotide zur Generierung der Sonden und deren Länge

RNA-Sonde	Größe (bp)	Oligonukleotide
bakt. „antisense“ Neo RNA	760	
<i>MLC</i> -„sense“	479	Xla MLC OR / Xla MLC T7F
<i>MLC</i> -„antisense“	479	Xla MLC OF / Xla MLC T7R
<i>Ct-1</i> -„antisense“	464	Xla Ct-1 OF / Xla Ct-1 T7R
<i>Nrp-1</i> -„antisense“	357	Xla Nrp-1 OF / Xla Nrp-1 T7R
<i>Cygb</i> -„antisense“	459	Xla Cygb OF / Xla Cygb T7R
<i>Ngb</i> -„antisense“	450	Xla Ngb OF / Xla Ngb T7R
<i>GbX</i> -„antisense“	237	Xla GbX OF / Xla GbX T7R
<i>GbY</i> -„antisense“	442	Xla GbY OF / Xla GbY T7R

7.11.2. „Dot-Blot“-Analyse der in die WMHIS eingesetzten Sonden.

Darstellung der jeweils als Tropfen aufgetragenen Verdünnungen von antisense (as) bzw. sense (s)-Sonden, als Kontrolle dient eine vom Hersteller markierte, bakterielle „Neo-RNA (as)-Sonde. Das schwache Signal von GbY ist aufgrund der Digitalisierung nicht mehr zu erkennen.



7.11.3. Sondenmenge in der WMHIS

Die Sondenmenge resultiert aus der gemessenen Konzentration und einem anhand des erstellten Dot-Blots abgeschätzten „Dot-Blot-Faktors“, welcher der unterschiedlich starken Markierungseffizienz Rechnung trägt.

Sonde	Konzentration (ng/µl)	Reinheit (E _{260/280})	Dot-Blot-Faktor	Menge in WMHIS (ng)
MLC-„sense“ (alt)	19,2	1,66	2x	200
MLC-„sense“ (neu)	127,5	1,96	10x	1000
MLC-„antisense“ (alt)	79,1	1,64	Referenz (alt)	100
MLC-„antisense“ (neu)	77,4	1,76	3x	300
ct-1-„antisense“ (neu)	232,22	2,02	8x	800
nrp-1-„antisense“ (neu)	90,0	2,00	Referenz (neu)	100
cygb-„antisense“ (alt)	231,5	1,74	3,5x	350
ngb-„antisense“ (alt)	24,6	1,56	2,5x	250
ngb-„antisense“ (neu)	270,6	1,97	10x	1000
gbX-„antisense“ (neu)	82,11	1,98	8x	800
gbY-„antisense“ (neu)	84,75	1,66	12x	1200

7.12. Alignments zur rekombinanten Globin-Expression in *Xenopus*

Die Alignments zeigen die im Vergleich zu den Datenbank-Sequenzen ausgetauschten Aminosäuren der rekombinant exprimierten Globine von *Xenopus tropicalis*

```

Cygb  Xtr_Cygb      : MEKVQGENDMERWERLEEITESERGVIKETWA13RVYANCED
      Xtr_CygbMini : MEITESERGVIKETWA13RVYANCED

      Xtr_Cygb      : VGVSILIRFFVNFPSAKQHFSQFKHMEDPLEMEGSVQLRK
      Xtr_CygbMini : VGVSILIRFFVNFPSAKQHFSQFKHMEDPLEMEGSVQLRK

      Xtr_Cygb      : HARRVMGAVNSVVENLGDPEKITTVLSIVGKSHALKHKVD
      Xtr_CygbMini : HARRVMGAVNSVVENLGDPEKITTVLSIVGKSHALKHKVD

      Xtr_Cygb      : PVYFKILTGVMLEVIAEEYAKDFTPDVQLAWNKLRSHLYS
      Xtr_CygbMini : PVYFKILTGVMLEVIAEEYAKDFTPDVQLAWNKLRSHLYS

      Xtr_Cygb      : HVLSAYKEAGWTQYPSNSV*
      Xtr_CygbMini : HVLSAYK*

```

Anhang

GbX

10 20 30 40
Xtr_GbX_AJ634915 : MGCILSSLGWQWRDSDLHTETSPLLPTLNLSQQQQLLVE
Xtr_GbX : MGCILSSLGWQWRDSDLHTETSPLLPTLNLSQQQQLLVE

50 60 70 80
Xtr_GbX_AJ634915 : SWRL^{A15}QHDIAKVGVILFVRLFETHPECKDVFFLFRDVDDL
Xtr_GbX : SWRL^{A15}QHDIAKVGVILFVRLFETHPECKDVFFLFRDVDDL

90 100 110 120
Xtr_GbX_AJ634915 : QALRANKDLRAHGLRVLSFVEKSVARIADCARLEELALEL
Xtr_GbX : QALRANKDLRAHGLRVLSFVEKSVARIADCARLEELALEL

130 140 150 160
Xtr_GbX_AJ634915 : GRS^{F8}YRYNAPPRYYQYVGTEFIS^{G15}AV^{G17}CPML^{GH2}HDKWTAEVEEA
Xtr_GbX : GRS^{F8}YRYNAPPRYYQYVGTEFIS^{G15}AV^{G17}CPML^{GH2}HDKWTAEVEEA

170 180 190 200
Xtr_GbX_AJ634915 : WKGLFAYICTVMERGYQE^{H26}ER^{HC3}SHSDGRSLIDGLQGKGLI*
Xtr_GbX : WKGLFAYICTVMERGYQE^{H26}ER^{HC3}SHSDGRSLIDGLQGKGLI*

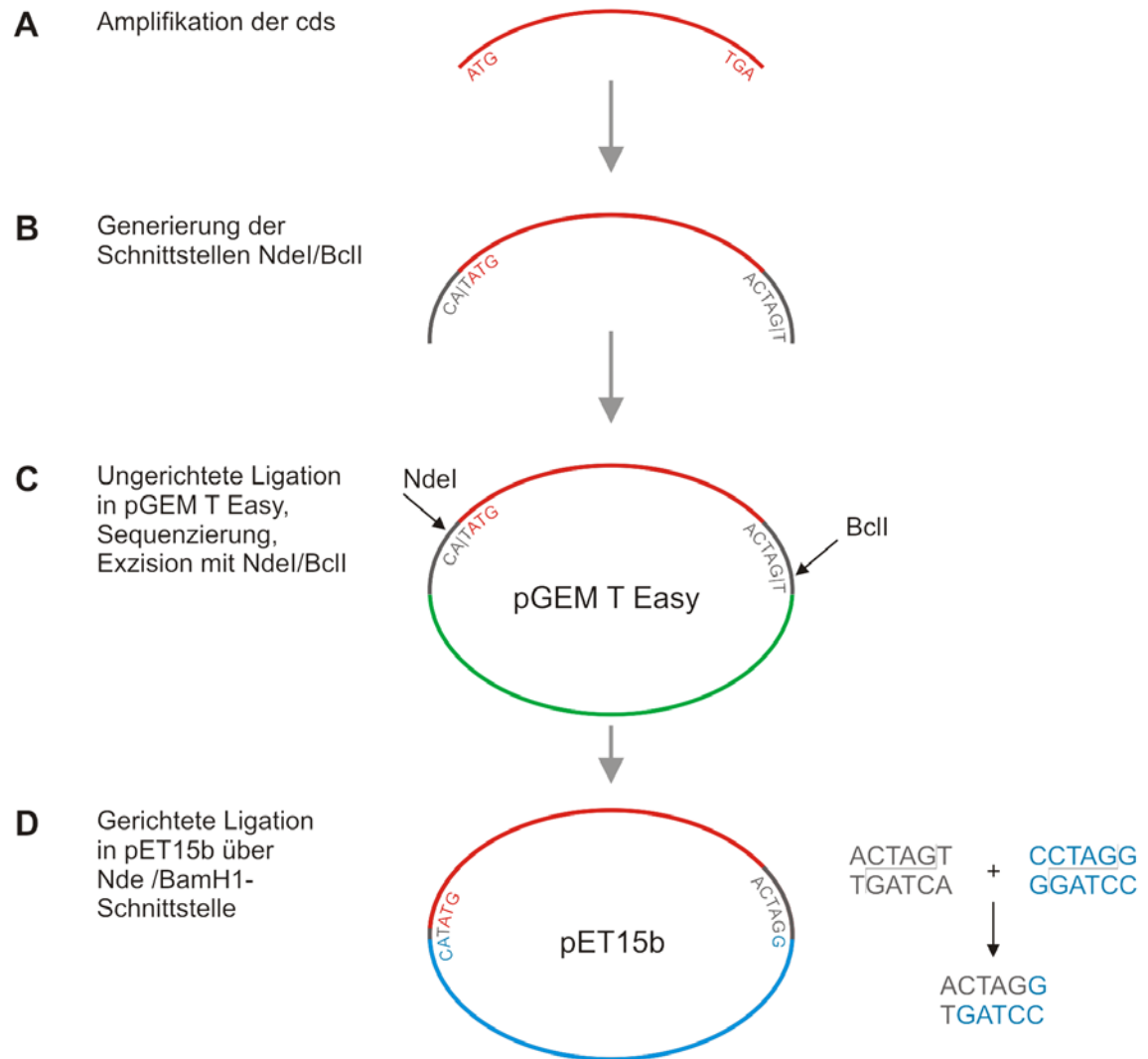
GbY

10 20 30 40
Xtr_GbY_CX400941 : MADLTGADIENINEVWSKIYANPEESGRTVVIRLF^{B15}ITYPQ
Xtr_GbY : MADLTGADIENINEVWSKIYANPEESGRTVVIRLF^{B15}ITYPQ

50 60 70 80
Xtr_GbY_CX400941 : TKIYFKNLKNISTLQEMQDNAGIRAHGKRVMGALNHVIEN
Xtr_GbY : TKIYFKNLKNISTLQEMQDNAGIRAHGKRVMGALNHVIEN

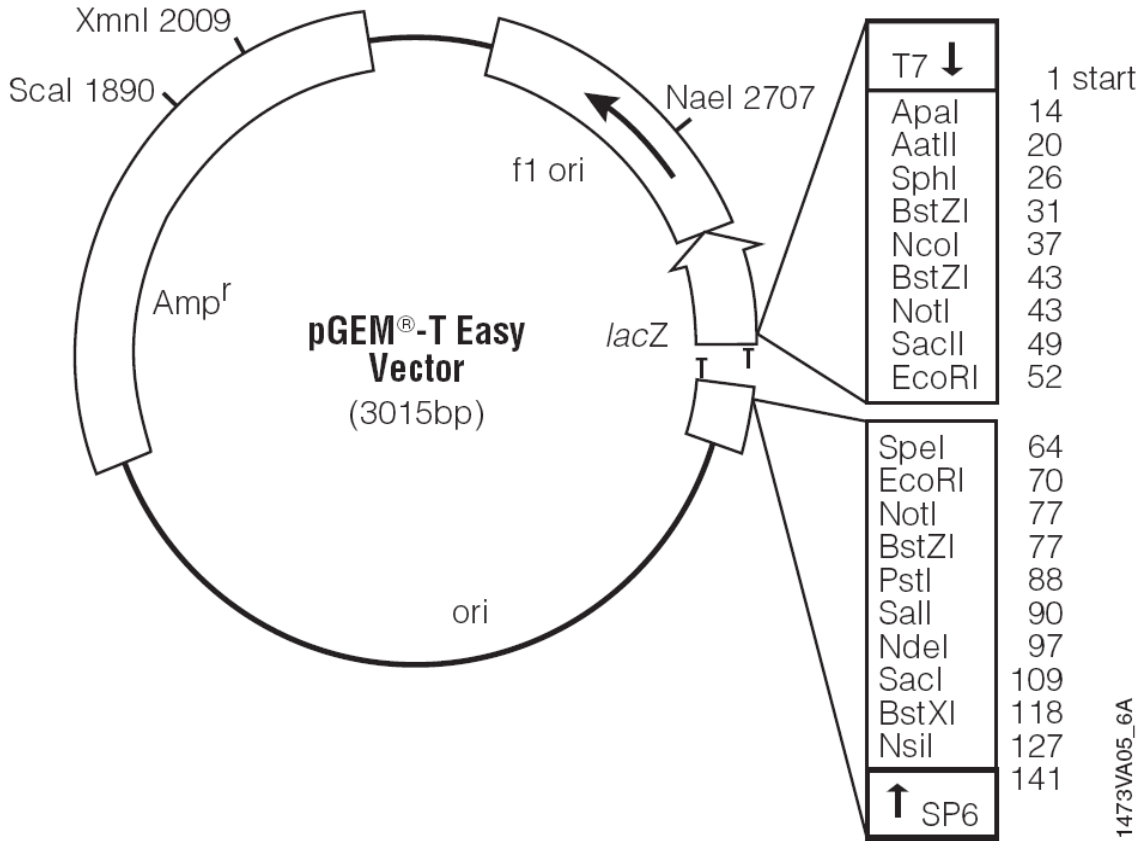
90 100 110 120
Xtr_GbY_CX400941 : LKDWDAVCSALSHLAKRHQDVHKVEVNNFELLFLVVISVF
Xtr_GbY : LKDWDAVCSALSHLAKRHQDVHKVEVNNFELLFLVVISVF

130 140 150
Xtr_GbY_CX400941 : KEALGSGFTPEQSKSWEKLF^{B15}SITYKYLESCYANTDS*
Xtr_GbY : KEALGSGFTPEQSKSWEKLF^{B15}SITYKYLESCYANTDS*

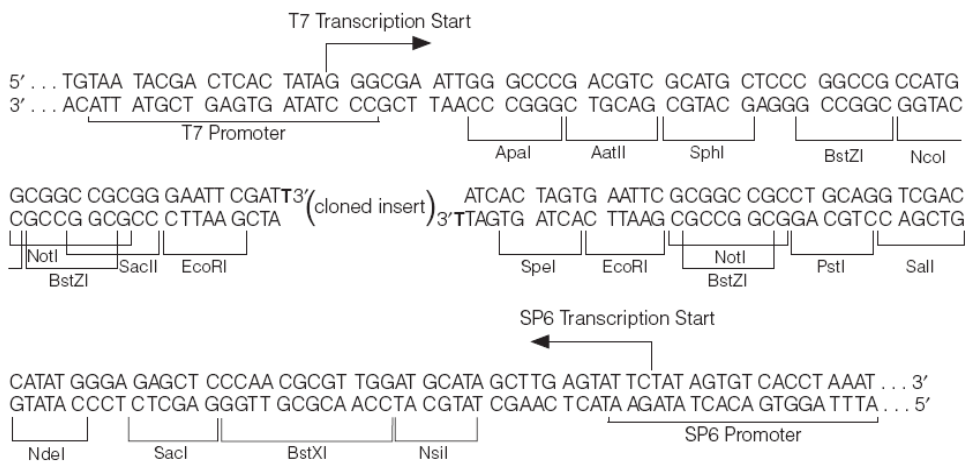
7.13. Klonierungsstrategie zur rekombinanten Expression von Globinen

7.14. Eingesetzte Vektoren

pGEM T Easy (Promega)









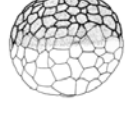
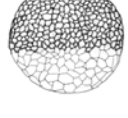

pGEM[®]-T Easy Vector


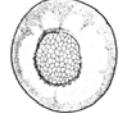
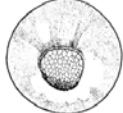












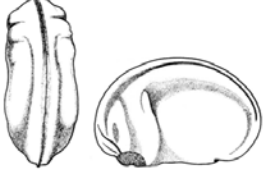








Quelle: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>












7.15. Entwicklungsstadien von *Xenopus laevis*

Alle Abbildungen stammen von <http://www.xenbase.org/anatomy/alldev.do?>, die letzten drei Stadien von <http://www.bio.davidson.edu> ((Nieuwkoop und Faber, 1975)).

Entwicklungsstadium, Ausrichtung, Zeit PF (Post- Fertilisation) bei 23°C	Schematische Ansicht	
NF1 animaler Pol 1 h 30 min PF		Ei
NF 2 animaler Pol 1 h 30 min PF		2 Zellen
NF 3 animaler Pol 2 h PF		4 Zellen
NF 4 dorso-lateral 2 h 15 min PF		8 Zellen
NF 5 dorsal 2 h 45 min PF		16 Zellen
NF 6.5 dorsal 3 h 30 min PF		Blastula
NF 7 dorsal 4 h PF		
NF 8 dorsal 5 h PF		
NF 9 vegetaler Pol 7 h PF		

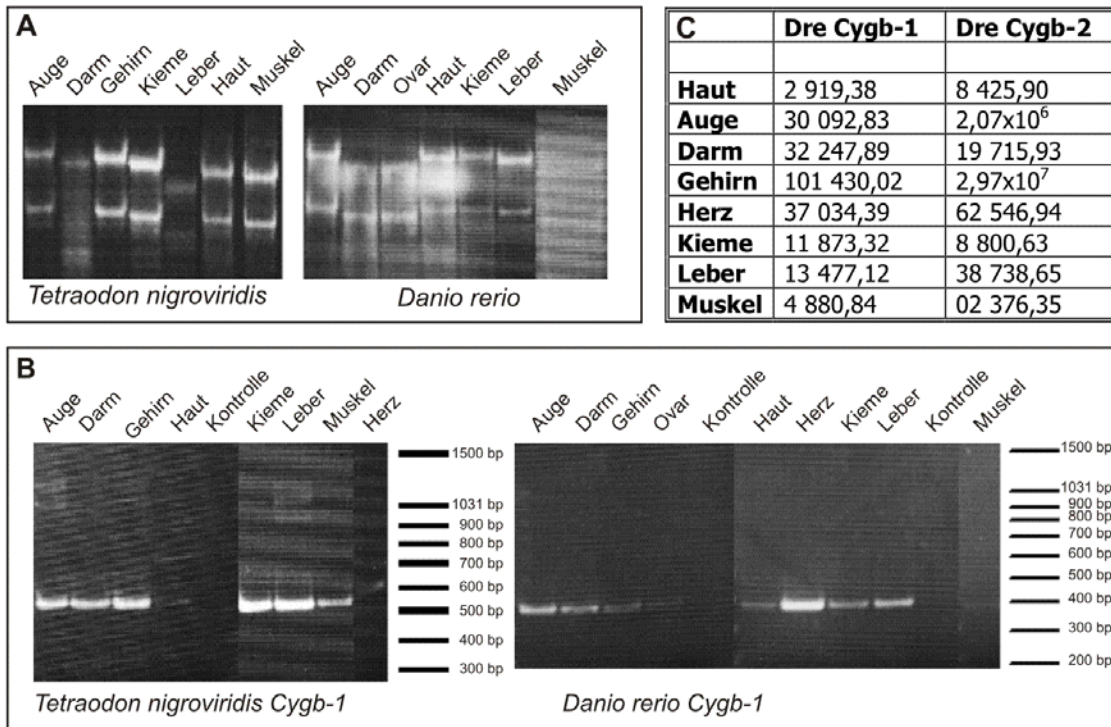
<p>NF 10 vegetaler Pol 9 h PF</p>		<p>Frühe Gastrula</p>
<p>NF 11 vegetaler Pol 11 h 45 min PF</p>		
<p>NF 11.5 vegetaler Pol 12 h 30 min PF</p>		
<p>NF 12 vegetaler Pol 13 h 15 min PF</p>		
<p>NF 12.5 posterior-dorsal 14 h 15 min PF</p>		
<p>NF 13 posterior-dorsal 14 h 45 min PF</p>		
<p>NF 14 posterior-dorsal 16 h 15 min PF</p>		
<p>NF 15 posterior-dorsal 17 h 30 min PF</p>		
<p>NF 16 posterior-dorsal view 18 h 15 min PF</p>		
<p>NF 17 posterior-dorsal view 18 h 45 min PF</p>		<p>Neurula</p>
<p>NF 19 dorsal 20 h 45 min PF</p>		

<p>NF 20 dorsal 21 h 45 min PF</p>		
<p>NF 21 dorsal 22 h 30 min PF</p>		
<p>NF 22 dorsal & lateral 24 h PF</p>		
<p>NF 23 dorsal & lateral 24h 45 min PF</p>		
<p>NF 24 dorsal 26 h 15 min PF</p>		
<p>NF 25 lateral 27 h 30 min PF</p>		<p>Embryo</p>
<p>NF 26 lateral 29 h 30 min PF</p>		
<p>NF 27 lateral 31 h 15 min PF</p>		
<p>NF 28 lateral 32 h 30 min PF</p>		
<p>NF 29-30 lateral 35 h PF</p>		
<p>NF 31, lateral 37 h 30 min PF</p>		

<p>NF 33-34 lateral 44 h 30 min PF</p>		
<p>NF 35-36 lateral 50 h PF</p>		
<p>NF 37-38 lateral 53 h 30 min PF</p>		
<p>NF 39 lateral 56 h 30 min PF</p>		
<p>NF 40 lateral 66 h PF</p>		
<p>NF 41 lateral 76 h PF</p>		
<p>NF 42 lateral 80 h PF</p>		
<p>NF43 lateral 87 h PF</p>		
<p>NF 45 lateral 98 h PF</p>		
<p>NF 46 lateral 106 h PF</p>		
<p>NF 47 lateral</p>		

7.17. Materialien zur Real-Time RT-PCR von *Cygb* in Teleostiern

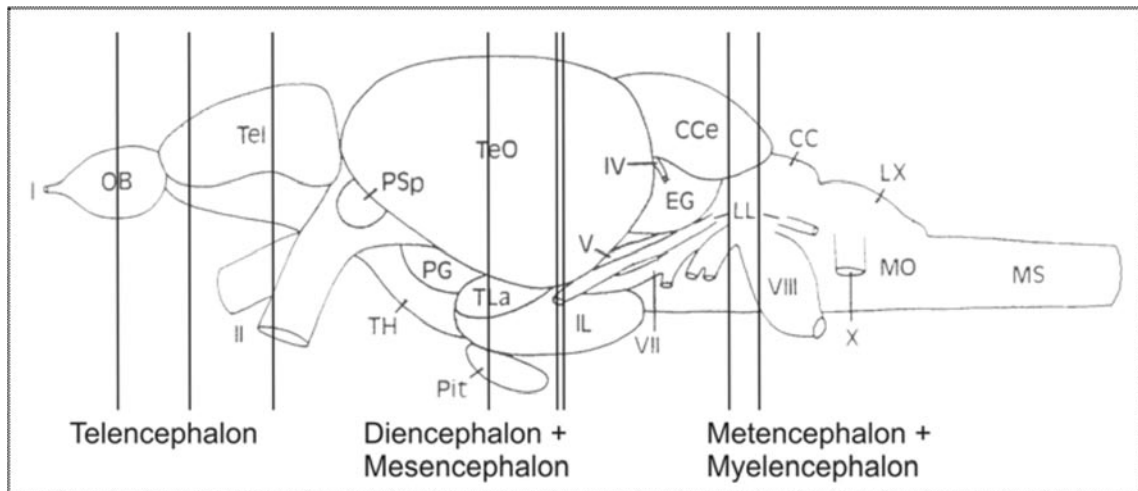
(A) visualisiert die zur Real-Time RT-PCR der Teleostier-Cytoglobine eingesetzte RNA, (B) zeigt die Spezifität der PCR-Amplifikate und (C) gibt die absoluten Kopienzahlen von *Cygb*-1 und -2 in den Geweben von *Danio rerio* wieder. Die Tabelle benennt die verwendeten Oligonukleotide und Amplifikatlängen.



			Oligonukleotide	Länge des Amplifikates [bp]	Effizienz der Q-PCR [%]
RT-PCR	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Cygb</i> -1	Tni <i>Cygb</i> 1 0F/ Tni <i>Cygb</i> V1 Ex3 R	539	
		<i>Cygb</i> -2	Tni <i>Cygb</i> 2F/ Tni <i>Cygb</i> 2 R	397	
		β -actin	Tni β -actin F/ Tni β -actin R & Tni <i>Cygb</i> 2 Ex23 F/ Tni <i>Cygb</i> 2 R	359 180	
		<i>Cygb</i> -1	CGBzeb12/ CGBzeb15	374	
	<i>Danio rerio</i>	<i>Cygb</i> -2	Dre <i>Cygb</i> 2 Ex23 F/ Dre <i>Cygb</i> V2 int R & Dre <i>Cygb</i> V2 int F/ Dre <i>Cygb</i> V2 int R	180 360	
		β -actin	Dre β -actin F/ Dre β -actin R	363	
Real-Time PCR	<i>Danio rerio</i>	<i>Cygb</i> -1	CGBzeb12/ CGBzeb23	150	115,9
		<i>Cygb</i> -2	Dre <i>Cygb</i> 2 ISHOF/ Dre <i>Cygb</i> V2 int R	136	106,2
		β -actin	Dre β -actin F/ Dre β -actin R	363	80,9

7.18. Übersicht über das Gehirn von *Danio rerio* in einer lateralen Aufsicht

Die Schnittebenen der frontal durchgeführten Kryosektionen sind durch die Striche symbolisiert. (nach Wullimann et al., 1996, verändert)



7.19. Liste der in dieser Arbeit aufgeführten Gene

Die Abkürzungen der Gene beziehen sich, ebenso wie die Namensbezeichnungen, auf die Schreibweise im menschlichen Genom. Außerdem sind in der Tabelle die Gen- bzw. Protein-Identifikationsnummer (GenID bzw. Prot-ID) und die Lage auf den verschiedenen Chromosomen bzw. Scaffolds (Scaf_) angegeben. In *Tetraodon nigroviridis* erfolgte die Genidentifizierung entsprechend der von der Datenbank gegebenen GSTENT-Nummer. Die Identifikation dupliziert vorliegender Gene erfolgte durch Blast-Suchen mit allen hier aufgeführten Genen von *Homo sapiens* (Hsa) in den Genomen von *Gallus gallus* (Gga), *Xenopus tropicalis* (Xtr), *Takifugu rubripes* (Tru) und *Tetraodon nigroviridis* (Tni). Wurde zu einem Gen kein Homolog gefunden, wird dies durch einen vertikalen Strich in der entsprechenden Zelle gekennzeichnet. Grau unterlegt sind die Gene, die in den Abbildungen zur Darstellung syntäner Genombereiche erscheinen.

Abkürzung (orientiert an <i>Homo sapiens</i>)	Bezeichnung (orientiert an <i>Homo sapiens</i>)	Hsa	Gga	Xtr	Tru	Tni
		GenID Chr.	GenID Chr.	ProtID Scaf_	ProtID Scaf_	GSTENT000... Chr.
AANAT	arylalkylamine N-acetyltransferase	15	396066	200910	745089	32513001
		17q25	18	178	2391	?
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	51	417366	458737	585325	32511001
		17q24-q25; 17q25.1	18	545	9308	?
AHSA1	activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	10598	423378	457445	585150	23322001
		14q23.3-31	5	416	237	10
AKT1	v-akt murine thy- moma viral oncogene homolog 1	207	395928	212338	750592	32408001
		14q32.32	5	662	188	10

Anhang

ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	4329	423345	457089	736591	32299001
		14q24.3	5	389	193	10
					601390	20302001
ANKRD28	ankyrin repeat domain 28	23243	424055	144297	573735	34134001
		3p24.3	7	37	48	8
					16	14
ANKRD50	ankyrin repeat domain 50	57182	422663	460647	133764	24494001
		4q28.1	4	890		
				120471	23	20
				1023		
BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	701	378922	463432	610601	7581001
		15q15	5	37	23	?
BMF	Bcl2 modifying factor	90427	426588	314934		
		15q14	?	37		
C14orf4	chromosome 14 open reading frame 4	64207	428894	282126	132143	30864001
		14q24.3	5	416	459	17
C16orf33	chromosome 16 open reading frame 33	79622	(425933)	367624	562319	34409001
		16p13.3	?	357	15	3
C14orf44	chromosome 14 open reading frame 44	145483	423341	370924	736587	05071001
		14q24.3	5	389	193	?
C14orf45	chromosome 14 open reading frame 45	80127	423344	203155	553223	32298001
		14q24.3	5	389	193	10
C14orf103	chromosome 14 open reading frame 103	55102	423441	200979	553165	32303001
		14q32.2	5	185		
				174284	193	10
				296		
C14orf133	chromosome 14 open reading frame 133	63894	423377	373390	622131	08419001
		14q24.3-q31	5	416	120	?
C14orf148	chromosome 14 open reading frame 148	122945		282137		
		14q24.3		416		
C14orf174	chromosome 14 open reading frame 174	161394	423376			
		14q24.3	5			
COQ6	coenzyme Q6 homolog, monooxygenase (S. cerevisiae)	51004	423342	151146	553152	32295001
		14q24.3	5	389	193	10
CYGB	cytoglobin	114757	427802	344608	Cygb-1/ Cygb-2	Cygb-1/ Cygb-2
		17q25.3	18	178		
Cygb-1	cytoglobin-1				712480	21844001
					112	?
Cygb-2	cytoglobin-2				575005	32516001
					2329	?
ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	957	423343	468693	553158	32296001
		14q24	5	389	193	10
					601212	20303001
				16	14	

Anhang

EPN2	epsin 2	<u>22905</u>	<u>416524</u>	<u>456748</u>	<u>195835</u>	<u>21850001</u>
		17p11.2	14	356	112	?
ET	hypothetical protein ET	<u>79157</u>	<u>417352</u>	<u>454071</u>	<u>743144</u>	<u>34430001</u>
		17q25	18	178	514	3
					<u>562242</u>	<u>21304001</u>
					15	3
EVPL	envoplakin	<u>2125</u>	<u>427805</u>	<u>385221</u>	<u>553691</u>	<u>32510001</u>
		17q25	18	545	650	?
					<u>621108</u>	<u>7251001</u>
					65	?
FAM62A	family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member A	<u>23344</u>	<u>424271</u>	<u>169090</u>	<u>179273</u>	<u>27218001</u>
		12q13.2	7	178	66	11
					<u>556304</u>	<u>28064001</u>
					258	9
FAM83F	family with sequence similarity 83, member F	<u>113828</u>		<u>163057</u>	<u>574845</u>	<u>21848001</u>
		22q13.1		88	112	?
					<u>299608</u>	
					206	<u>08085001</u>
					<u>595829</u>	18
FBF1	Fas (TNFRSF6) binding factor 1	<u>85302</u>		<u>181810</u>	<u>575914</u>	<u>21845001</u>
		17q25.1		545	112	?
GbX	GlobinX			<u>158498</u>	<u>610929</u>	<u>32411001</u>
				37	23	10
GbY	globin Y			<u>399874</u>		
				733		
GRAP	GRB2-related adaptor protein	<u>10750</u>	<u>416523</u>		<u>712479</u>	<u>21849001</u>
		17p11.2	14		112	?
GSTZ1	glutathione transferase zeta 1 (maleylaceto-acetate isomerase)	<u>2954</u>	<u>423374</u>	<u>300025</u>	<u>553196</u>	<u>32300001</u>
		14q24.3	5	416	193	10
GTF3C1	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	<u>2975</u>	<u>416646</u>	<u>456759</u>	<u>614535</u>	<u>15704001</u>
		16p12	14	357	40	18
Hb 01	haemoglobin α, larval			<u>367746</u>		
				357		
Hb 02	haemoglobin α, larval			<u>456769</u>		
				357		
Hb 03	haemoglobin α, larval			<u>176462</u>		
				357		
Hb 04	haemoglobin α, larval			<u>294501</u>		
				357		
Hb 05	haemoglobin α, adult			<u>299768</u>		
				357		
Hb 06	haemoglobin β, adult			<u>456762</u>		
				357		

Anhang

Hb 07	haemoglobin β , larval			<u>152628</u> 733		
Hb 08	haemoglobin β , larval			<u>152629</u> 733		
Hb 09	haemoglobin β , larval			<u>478564</u> 733		
Hb 11	haemoglobin β , larval			<u>287141</u> 733		
Hb 12	haemoglobin α , larval (ψ)			<u>367736</u> 357		
Hb 13	haemoglobin α , larval			<u>176470</u> 357		
Hb 14	haemoglobin α , larval			<u>456770</u> 357		
Hb 15	haemoglobin α , larval			<u>294503</u> 357		
KCTD18	potassium channel tetramerisation domain containing 18	<u>130535</u> 2q33.1	<u>424069</u> 7	<u>399839</u> 733		
KIAA0284	hypothetical protein LOC283638	<u>283638</u> 14q32.33	<u>423494</u> 5	<u>427831</u> 1509	<u>619892</u> 23 <u>129509</u> 268	<u>32408001</u> 10
KIAA1737	KIAA1737	<u>85457</u> 14q24.3		<u>151328</u> 416	<u>129509</u> 268	<u>20305001</u> 14
LOC124512	hypothetical protein LOC124512	<u>124512</u> 17q25.2	<u>417354</u> 18	<u>293576</u> 178	<u>716329</u> 519	<u>12350001</u> ?
LOC417351	hypothetical protein LOC417351		<u>417351</u> 18			
LOC417356	LOC417356		<u>417356</u> 18			
LOC417357	hypothetical protein XP_429502		<u>417357</u> 18			
LOC649391	hypothetical protein LOC649391	<u>649391</u> 14			<u>553198</u> 193	<u>32297001</u> 10
MGAT5B	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B	<u>146664</u> 17q25.2	<u>427801</u> 18	<u>169074/3</u> <u>44522</u> 178 <u>402828</u> 774	<u>712483</u> 112 <u>601984</u> 189 <u>557338</u> 64 <u>607848</u> 3	<u>21837001/</u> <u>21838001</u> ? <u>36864001</u> ? <u>24027001</u> 2

Anhang

MYH10	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	<u>4628</u> 17p13	<u>396465</u> 18	454087	603093	32517001
				178	65	?
				<u>355115</u>	<u>621098</u>	<u>07249001</u>
				255	65	?
				<u>452468</u>	<u>623019</u>	<u>26351001</u>
				109	194	18
				<u>367565</u>	<u>138607</u>	<u>15384001</u>
				356 etc	288	8
MXRA7	matrix-remodelling associated 7	<u>439921</u> 17q25.1-q25.2		<u>169083</u>	<u>741016</u>	
				178	339	
NGB	neuroglobin	<u>58157</u> 14q24	<u>428896</u> 5	<u>203394</u>	<u>553216</u>	<u>32294001</u>
				416	193	10
PAK6	p21(CDKN1A)-activated kinase 6	<u>56924</u> 15q14	<u>428837</u> 5	<u>197972</u>	610824/ 610651/ 610943	
				37	23	
PID 176466	unknown			<u>176466</u>		
				357		
PID 367703	unknown			<u>367703</u>		
				357		
PLA2G4B	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	<u>8681</u> 15q11.2-q21.3	<u>423223</u> 5	<u>314937</u>	<u>583784</u> 136	<u>03606001</u> ?
				37		
				<u>322936</u>		
				68		
PLCB2	phospholipase C, beta 2	<u>5330</u> 15q15	<u>423014</u> 5	<u>391210</u>	<u>610942</u>	<u>32419001</u> 10
				627	23	
					<u>708872</u>	
					16	
PLD4	phospholipase D family, member 4	<u>122618</u> 14q32.33	<u>423496</u> 5	<u>457346</u>	<u>610821</u>	<u>32409001</u>
				409	23	10
PLEKHG1	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1	<u>57480</u> 6q25.1	<u>421632</u> 3	<u>329729</u> 98	<u>610863</u>	<u>32413001</u>
					23	10
					<u>623692</u>	<u>23112001</u>
					268	14
					<u>610110</u>	<u>08414001</u>
	211	?				
PLEKHG3	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 3	<u>26030</u> 14q23.3		<u>314931</u>	<u>610955</u>	<u>32412001</u>
				37	23	10
POLG2	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit	<u>11232</u> 17q	<u>417418</u> 18	<u>460912</u>		<u>32508001</u>
				980		?
POLR3K	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa	<u>51728</u> 16p13.3	<u>426289</u> ?	<u>456760</u>	<u>562609</u>	<u>34408001</u>
				357	15	3

Anhang

POMT2	protein-O-mannosyltransferase 2	29954	423373	457442	610852	32350001
		14q24	5	416	23	10
PPP1R14B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B	26472	421630	295283	722574	24374001
		11q13	3	585	23	20
					570994	16
PRPSAP1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1	5635	417360	344780	712481	21842001
		17q24-q25	18	178	112	?
PTDSR	phosphatidylserine recepto	23210	417355	275781	624711	12351001
		17q25	18	178	519	?
RABEPK	Rab9 effector protein with kelch motifs	10244		373369	553222	32301001
		9q33.3		416	193	10
				460315	591543	34700001
RASD2	RASD family, member 2	23551	417349	200901	712482	21841001
		22q13.1	18	178	112	?
RHBDF1	rhomboid 5 homolog 1	64285	417358	287147	708790	34404001
		16p13.3	18	733	15	3
				460315	707946	24204001
RHBDF2	rhomboid 5 homolog 2	79651	417358	275760	609615	32512001
		17q25.1	18	178	88	?
					603129	07823001
RTL1	retrotransposon-like 1	388015		185404	613351	
		14q32.31		733	3335	
SEC23A	Sec23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	10484	423335	449998	754226	3594001
		14q21.1	5	37	136	?
SEC14L1	SEC14-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	6397	417350	169070	712484	21836001
		17q25.1-17q25.2	18	178	112	?
					750215	12496001
				184906	302394	?
SFRS2	splicing factor, arginine/serine-rich 2	6427	417353	344788	624690	
		17q25.2	18	178	514	?
					600427	
SIP1	survival of motor neuron protein interacting protein 1	8487	423336	147405	742382	31315001
		14q13	5	37	429	10
SIVA	CD27-binding (Siva) protein	10572	423493	295459	610599	32404001
		14q32.33	5	662	23	10

Anhang

SPHK1	sphingosine kinase 1	<u>8877</u>	<u>427803</u>	<u>476704</u>	<u>574924</u>	<u>32515001</u>
		17q25.2	18	178	112	?
SPHK2	sphingosine kinase 2	<u>56848</u>		<u>367533</u>	<u>574924</u>	<u>21847001</u>
		19q13.2		356	112	?
SPINT1	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1	<u>6692</u>	<u>423206</u>	<u>283649</u>	<u>752311</u>	<u>23954001</u>
		15q15.1	5	501	23	10
SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2			<u>151334</u>	<u>297987</u>	<u>10271001</u>
		<u>9517</u>	<u>423379</u>	416	136	10
		14q24.3-q31	5	<u>304952</u>	<u>736161</u>	<u>30833001</u>
				8	<u>623637</u>	<u>18415001</u>
				259	14	
SRP14	signal recognition particle 14kDa	<u>6727</u>	<u>423284</u>	<u>158496</u>	<u>610731</u>	<u>32410001</u>
		15q22	5	37	23	10
SRP68	signal recognition particle 68kDa	<u>6730</u>	<u>417363</u>	<u>385312</u>	<u>587657</u>	<u>32509001</u>
		17q25.1	18	545	3130	?
ST6GALNAC1	ST6 (alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	<u>55808</u>	<u>396168</u>	<u>344534</u>		
		17q25.1	18	178		
ST6GALNAC2	ST6 (alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2			<u>200908</u>	<u>746040</u>	
		<u>10610</u>	<u>396159</u>	178	3218	
		17q25.1	18	<u>386452</u>	<u>555629</u>	<u>22328001</u>
				460	130	2
				<u>608699</u>		
				295		
THSD3	thrombospondin, type I, domain containing 3	<u>145501</u>	<u>428897</u>	<u>373339</u>		
		14q24.3	5	416		
TMED8	transmembrane emp24 protein transport domain containing 8	<u>283578</u>	<u>423375</u>	<u>185194</u>	<u>553226</u>	<u>32302001</u>
		14q24.3	5	719	193	10
TMEM63C	transmembrane protein 63C	<u>57156</u>	<u>423372</u>	<u>373343</u>	<u>553160</u>	<u>32293001</u>
		14q24.3	5	416	193	10
UBE2O	ubiquitin-conjugating enzyme E2O	<u>63893</u>	<u>417359</u>	<u>15145</u>	<u>130262</u>	<u>32514001</u>
		17q25.1	18	178	2764	?
ZBED4	zinc finger, BED-type containing 4	<u>9889</u>	<u>417734</u>	<u>86206</u>		<u>12991001</u>
		22q13.33	1	357		19
				<u>342563</u>		
				166		
ZDHC22	zinc finger, DHHC-type containing 22	<u>283576</u>	<u>428895</u>	<u>153102</u>	<u>553151/553134</u>	<u>32292001</u>
		14q24.3	5	989	193	10

Anhang

ZFYVE19	zinc finger, FYVE domain containing 19	<u>84936</u>	<u>423204</u>	<u>469623</u>	<u>709279</u>	<u>32418001</u>
		15q15.1	5	501	23	10
ZNF238	zinc finger protein 238	<u>10472</u>	<u>428580</u>	<u>453895</u>	<u>610744</u>	<u>32405001</u>
		1q44-qter	3	173	23	10

8. Publikationen

Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements.

Wystub, S., Ebner, B., Fuchs, C., Weich, B., Burmester, T., Hankeln, T. (2004): Cytogenet Genome Res. 105(1):65-78.

Neuroglobin and cytoglobin are two novel members of the vertebrate globin family. Their physiological role is poorly understood, although both proteins bind oxygen reversibly and may be involved in cellular oxygen homeostasis. Here we investigate the selective constraints on coding and non-coding sequences of the neuroglobin and cytoglobin genes in human, mouse, rat and fish. Neuroglobin and cytoglobin are highly conserved, displaying very low levels of non-synonymous nucleotide substitutions. An oxygen supply function predicts distinct modes of gene regulation, involving hypoxia-responsive transcription factors. To detect conserved candidate regulatory elements, we compared the neuroglobin and cytoglobin genes in mammals and fish. The myoglobin gene was included to test if it also contains hypoxia-responsive regulatory elements. Long conserved non-coding sequences, indicative of gene-regulatory elements, were found in the cytoglobin and myoglobin, but not in the neuroglobin gene. Sequence comparison and experimental data allowed us to delimit upstream regions of the neuroglobin and cytoglobin genes that contain the putative promoters, defining candidate regulatory regions for functional tests. The neuroglobin and the myoglobin genes both lack conserved hypoxia-responsive elements (HREs) for transcriptional activation, but contain conserved hypoxia-inducible mRNA stabilization signals in their 3' untranslated regions. The cytoglobin gene, in contrast, harbors both conserved HREs and mRNA stabilization sites, strongly suggestive of an oxygen-dependent regulation.

Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding.

Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, M., Hamdane, D., Marden, M.C., Hankeln, T., Burmester, T. (2004): J Biol Chem. 279(23):24116-22.

Neuroglobin has been identified as a respiratory protein that is primarily expressed in the mammalian nervous system. Here we present the first detailed analysis of neuroglobin from a non-mammalian vertebrate, the zebrafish *Danio rerio*. The zebrafish neuroglobin gene reveals a mammalian-type exon-intron pattern in the coding region (B12.2, E11.0, and G7.0), plus an additional 5'-non-coding exon. Similar to the mammalian neuroglobin, the zebrafish protein displays a hexacoordinate deoxy-binding scheme. Flash photolysis kinetics show the competitive binding on the millisecond timescale of external ligands and the distal histidine, resulting in an oxygen affinity of 1 torr. Western blotting, immune staining, and mRNA *in situ* hybridization demonstrate neuroglobin expression in the fish central nervous system and the retina but also in the gills. Neurons containing neuroglobin have a widespread distribution in the brain but are also present in the olfactory system. In the fish retina, neuroglobin is mainly present in the inner segments of the photoreceptor cells. In the gills, the chloride cells were identified to express neuroglobin. Neuroglobin appears to be associated with mitochondria-rich cell types and thus oxygen consumption rates, suggesting a myoglobin-like function of this protein in facilitated oxygen diffusion.

Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution.

Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., Schmidt, M., Ebner, B., Gerlach, F., Fuchs, C., Hankeln, T. (2004):
IUBMB Life. 56(11-12):703-7.

Hemoglobin and myoglobin are oxygen transport and storage proteins of most vertebrates. Neuroglobin (Ngb) and cytoglobin (Cygb)--two recent additions to the vertebrate globin superfamily--have still disputed functions. Combining the data from all available resources, we investigate the evolution of these novel globins. Both Ngb and Cygb show little sequence variation in vertebrate evolution, suggesting conserved structures and functions, and an important role in the animal's metabolism. Exon-intron patterns remained unchanged in Ngb and Cygb, with the exception of the addition of a 3' exon to Cygb early in mammalian evolution. In phylogenetic analyses, Ngb forms a common branch with GlobinX, another recently identified globin with undefined function in lower vertebrates, and with some invertebrate nerve globins. This shows an early divergence of this branch in animal evolution. Cygb is related to myoglobin, and associated with an eye-specific globin from birds. The pattern of globin evolution shows that proteins with clear respiratory roles evolved independently from intracellular globins with uncertain functions. This result suggests either multiple independent functional changes or a yet undefined respiratory role of tissue globins like Ngb and Cygb.

A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals.

Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., Burmester, T. (2005)
Mol Biol Evol. 22(1):12-20.

Hemoglobin, myoglobin, neuroglobin, and cytoglobin are four types of vertebrate globins with distinct tissue distributions and functions. Here, we report the identification of a fifth and novel globin gene from fish and amphibians, which has apparently been lost in the evolution of higher vertebrates (Amniota). Because its function is presently unknown, we tentatively call it GlobinX (GbX). GlobinX sequences were obtained from three fish species, the zebrafish *Danio rerio*, the goldfish *Carassius auratus*, and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*, and the clawed frog *Silurana tropicalis*. GlobinX sequences are distinct from vertebrate hemoglobins, myoglobins, neuroglobins, and cytoglobins. GlobinX displays the highest identity scores with neuroglobin (approximately 26% to 35%), although it is not a neuronal protein, as revealed by RT-PCR experiments on goldfish RNA from various tissues. The distal ligand-binding and the proximal heme-binding histidines (E7 and F8), as well as the conserved phenylalanine CD1 are present in the GlobinX sequences, but because of extensions at the N-terminal and C-terminal, the GlobinX proteins are longer than the typical eight alpha-helical globins and comprise about 200 amino acids. In addition to the conserved globin introns at helix positions B12.2 and G7.0, the GlobinX genes contain two introns in E10.2 and H10.0. The intron in E10.2 is shifted by 1 bp in respect to the vertebrate neuroglobin gene (E11.0), providing possible evidence for an intron sliding event. Phylogenetic analyses confirm an ancient evolutionary relationship of GlobinX with neuroglobin and suggest the existence of two distinct globin types in the last common ancestor of Protostomia and Deuterostomia.

Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family.

Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T.L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M.C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R.E., Fago, A., Burmester, T. (2005)
J Inorg Biochem. 99(1):110-9.

Neuroglobin and cytoglobin are two recent additions to the family of heme-containing respiratory proteins of man and other vertebrates. Here, we review the present state of knowledge of the structures, ligand binding kinetics, evolution and expression patterns of these two proteins. These data provide a first glimpse into the possible physiological roles of these globins in the animal's metabolism. Both, neuroglobin and cytoglobin are structurally similar to myoglobin, although they contain distinct cavities that may be instrumental in ligand binding. Kinetic and structural studies show that neuroglobin and cytoglobin belong to the class of hexa-coordinated globins with a bi-phasic ligand-binding kinetics. Nevertheless, their oxygen affinities resemble that of myoglobin. While neuroglobin is evolutionarily related to the invertebrate nerve-globins, cytoglobin shares a more recent common ancestry with myoglobin. Neuroglobin expression is confined mainly to brain and a few other tissues, with the highest expression observed in the retina. Present evidence points to an important role of neuroglobin in neuronal oxygen homeostasis and hypoxia protection, though other functions are still conceivable. Cytoglobin is predominantly expressed in fibroblasts and related cell types, but also in distinct nerve cell populations. Much less is known about its function, although in fibroblasts it might be involved in collagen synthesis.

Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes.

Fuchs, C., Luckhardt, A., Gerlach, F., Burmester, T., Hankeln, T.
Biochem Biophys Res Commun. 337(1):216-23.

Cytoglobin is a recently discovered myoglobin-related O₂-binding protein of vertebrates with uncertain function. It occurs as single-copy gene in mammals. Here, we demonstrate the presence of two paralogous cytoglobin genes (Cygb-1 and Cygb-2) in the teleost fishes *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Tetraodon nigroviridis*, and *Takifugu rubripes*. The globin-typical introns at positions B12.2 and G7.0 are conserved in both genes, whereas the C-terminal exon found in mammalian cytoglobin is absent in the fish genes. Phylogenetic analyses show that the two cytoglobin genes diverged early in teleost evolution. This is confirmed by gene synteny analyses, which suggest a large-scale duplication event. Although both cytoglobin genes are highly conserved and have evolved under purifying selection, substitution rates are significantly higher in Cygb-1 than in Cygb-2. Similar to their mammalian ortholog, both fish cytoglobins are expressed in a broad range of tissues. However, Cygb-2 is more than 250-fold stronger expressed in neuronal tissues, suggesting a subfunctionalization of the two cytoglobin paralogs after gene duplication.

The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome.

Fuchs, C., Burmester, T., Hankeln, T. (2006)
Cytogenet Genome Res. 112(3-4):296-306.

The draft genome sequence of the Western clawed frog *Xenopus (Silurana) tropicalis* facilitates the identification, expression analysis and phylogenetic classification of the amphibian globin gene repertoire. Frog and mammalian neuroglobin display about 67% protein sequence identity, with the expected predominant expression in frog brain and eye. Frog and mammalian cytoglobins share about 69% of their amino acids, but the frog protein lacks the mammalian-type extension at the C-terminus. Like in mammals, *X. tropicalis* cytoglobin is expressed in many organs including neural tissue. Neuroglobin and cytoglobin genomic regions are syntenically conserved in all vertebrate classes. Frog and fish GlobinX show only 57% amino acid identity, but gene synteny analysis confirms orthology. The expression pattern of *X. laevis* GlobinX differs from that in fish, with a prominent expression in the eye and weak expression in most other examined tissues. GlobinX is possibly present as two paralogous copies in *X. tropicalis*, with one copy showing transition stages of non-functionalization. The amphibian genome contains a previously unknown globin type (tentatively named 'globin Y') which is expressed in a broad range of tissues and is distantly related to the cytoglobin lineage. The globin Y gene is linked to a cluster of larval and adult hemoglobin alpha and beta genes which contains substantially more paralogous hemoglobin gene copies than previously published. Database and gene synteny analyses confirm the absence of a myoglobin gene in *X. tropicalis*.

Tagungsabstracts

Haberkamp, M., Schmidt, M., Heib, V., Mitz, S., Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003):

Analyses of neuroglobin genes and expression patterns in the fishes. *XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Mainz*. Abstract map. p. 117.

Fuchs, C., Burmester, T. and Hankeln, T. (2003):

Duplicated cytoglobin genes in fishes and amphibians. *XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Mainz*. Abstract map, p. 120.

Haberkamp, M., Fuchs, C., Schmidt, M., Heib, V., Mitz, S., Roesner, A., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003):

Danio neuroglobin: Differences and conservation of mammalian and fish neuroglobins. *3rd Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*.

Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004):

A neuroglobin-like gene from lower vertebrates expressed in non-neuronal tissues. *97. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock*. Abstract map, p. 36.

Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004):

A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: Evidence for two distinct globin families in animals. *Proteins in Adaptation and Evolution (International Symposium on Animal Physiology Physiology)*, Greifswald. Abstract map, p. 35.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, im Juli 2007

Christine Fuchs