

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Institut für Molekulargenetik

**Untersuchungen zur Lokalisation und Expression des
respiratorischen Proteins Neuroglobin bei Säugetieren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

Angefertigt am Institut für Molekulargenetik

Fachbereich der Biologie

Vorgelegt von

Andrej Fabrizius

geb.: 23.11.1982 in Tawritschanka

Mainz, 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

“Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen”

(Albert Einstein)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung.....	1
1.1 Atmungsproteine bei Säugetieren	1
1.2 Neuroglobin: ein phylogenetisch altes Globin der Tiere	5
1.2.1 Mögliche Funktionen von Neuroglobin in Säugern	6
1.2.2 Neuroglobin in der Retina	9
1.2.3 Neuroglobin im Zentralnervensystem	10
1.3 Transgene und Knockout Mausmodelle	12
1.3.1 Das Tet-on / Tet-off System	12
1.3.2 Neuroglobin im transgenen, überexprimierenden Mausmodell.....	14
1.3.3 Das Eucomm Knockout-First System.....	14
1.3.4 Neuroglobin im Knockout-Mausmodell.....	18
1.4 Transkriptomanalysen.....	19
1.5 Zielsetzung.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Haltung und Zucht von Mäusen	22
2.1.1 Generierung von transgenen und Knockout Mäusen.....	23
2.1.2 Genotypisierung von transgenen Mäusen.....	23
2.1.3 Modulation des Tet-Systems.....	24
2.1.4 Aktivierung der CRE ^{ERT} Rekombinase.....	24
2.1.5 Präparation von murinen Organen und Geweben	24

2.1.6	Herstellung von Gefrierschnitten.....	25
2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.2.1	Herstellung primärer Hepatozyten Zellkultur	25
2.2.2	Zellviabilität-Assays an primären Hepatozyten.....	25
2.2.3	Caspase Aktivitäts-Assays.....	26
2.2.4	Gesamtproteinextraktion aus Mausgeweben	26
2.2.5	Proteinkonzentrationsbestimmung	26
2.2.5.1	Bradford-Assay	27
2.2.5.2	BCA-Assay	27
2.2.6	Verwendete Antikörper	27
2.2.7	Diskontinuierliche Glycin SDS-PAGE.....	28
2.2.8	Western Blot	29
2.2.8.1	Stripping von Nitrozellulose-Membranen.....	30
2.2.8.2	Ponceau S-Färbung.....	30
2.2.9	ECL-Detektion.....	31
2.3	Immunhistologische Methoden	31
2.3.1	Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten.....	31
2.3.2	X-Gal Färbung von Kryoschnitten.....	32
2.4	Molekulargenetische Methoden.....	32
2.4.1	Gesamt-RNA Präparation	32
2.4.2	Gesamt-RNA Quantifizierung	33
2.4.3	cDNA-Synthese	33
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.4.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	34
2.4.6	Analytische DNA-Gelelektrophorese	34

2.4.7	Fällung von Nukleinsäuren	35
2.4.7.1	Primerdesign	35
2.4.7.2	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	36
2.4.8	TA-Klonierung mittels pGEM-T Easy System.....	37
2.4.9	Transformation, Blau-Weiß-Selektion und Plasmidpräparation.....	37
2.4.10	Southern Blot	38
2.4.10.1	Generierung einer Ngb-Knockout spezifischen Sonde	39
2.4.10.2	Radioaktive Markierung der DNA	40
2.4.10.3	Isolierung genomischer Maus-DNA aus embryonalen Stammzellen...	41
2.4.10.4	Restriktion und Gelelektrophorese genomischer DNA.....	42
2.4.10.5	Southern-Transfer der DNA.....	42
2.4.10.6	Hybridisierung und Exposition	43
2.4.11	Probenvorbereitung für die RNA-Seq Analyse.....	44
2.5	Bioinformatische Methoden	44
2.5.1	Qualitätsprüfung und Bereinigung der generierten RNA-Seq Daten	44
2.5.2	Mapping von RNA-Seq-Datensätzen mittels CLC-Workbench.....	45
2.5.3	Statistische Auswertung der Mappings der RNA-Seq-Datensätze.....	47
2.5.4	Statistische Transkriptom- und Expressionsprofilanalysen	48
2.5.5	Ingenuity Pathway Analyse - IPA.....	49
2.5.6	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – Kegg-Datenbank.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Ektopische Neuroglobin-Überexpression in der Leber mit Hilfe des Ngb x R26 Mausmodells	50
3.1.1	Vergleichende Transkriptom-Analyse Ngb-transgener Mausleber mittels Affymetrix-Microarrays	52

3.1.2	Untersuchung der regulierten Gene mittels „Ingenuity Pathway Analysis“	55
3.1.3	Statistische Anreicherung der regulierten Gene und Stoffwechselwege	57
3.1.4	Hepatotoxin-Behandlung Ngb-transgener Tiere <i>in vivo</i>	60
3.1.5	Analyse möglicher Zellprotektion in Ngb-transgenen primären Hepatozyten...	61
3.2	Ektopische Neuroglobin-Überexpression in Gehirnregionen der Maus mit Hilfe des Ngb x Camk2 Mausmodells	66
3.2.1	Ngb-Überexpression im Cortex von Ngb x Camk2 transgenen Mäusen.....	66
3.2.2	Ngb-Überexpression im Hippocampus der Ngb x Camk2 transgenen Mäuse....	67
3.2.3	Transkriptomanalyse von Ngb-transgenen und Doxycyclin behandelten Gehirnregionen im Ngb x Camk2 Mausmodell mittels RNA-Seq.....	68
3.2.4	Vergleich der modulierten Pathways in Ngb-überexprimierenden versus Doxycyclin behandelten Geweben.....	73
3.3	Generierung einer transkriptionellen und genetischen Neuroglobin Knockout Maus ..	76
3.3.1	Validierung der Insertion des Eucomm-Vektors im Ngb-Lokus mittels Southern Blot	77
3.3.2	Mauszucht und Cre-vermittelte Rekombination des Ngb-Gens.....	81
3.3.3	Validierung des transkriptionellen Ngb-Knockouts via qRT-PCR	81
3.3.4	Untersuchung des murinen Neuroglobin-Promotors mittels X-Gal-Färbung und β-Gal-Immunhistochemie	84
3.3.5	Phänotypisierung des transkriptionellen und genetischen Ngb-Knockouts.....	86
3.4	RNA-Seq Expressionsprofile von Neuroglobin	87
3.4.1	Analyse der Ngb-Expression in embryonalen RNA-Seq-Datensätzen der Maus	88
3.4.2	Das Ngb-Expressionsmuster im adulten Mausgehirn: eine quantitative Analyse mittels RNA-Seq, qRT-PCR und Western Blot	89
3.4.3	Die Ngb-Expression im endokrinen und retinalen Mausgewebe	92
3.4.4	Ngb Korrelationsanalyse in RNA-Seq Transkriptomdatensätzen der Maus	93

3.4.5	Ngb-Expression in weiteren Modellorganismen: Zebrafisch und Ratte	95
4	Diskussion.....	96
4.1	Funktionshypothesen für Ngf: Lehren aus Mausmodellen.....	96
4.1.1	Die anti-apoptotische Wirkung von Ngf: Effekt versus Funktion.....	99
4.1.2	Ektopische Expression von Ngf in der Leber und ihre Auswirkung auf das hepatische Transkriptom	102
4.1.3	Modulation der neuronalen Ngf-Expression im transgenen Maussystem	104
4.2	Neubewertung der regionalen Ngf-Expression im ZNS und Implikation für die Ngf- Funktion.....	107
4.2.1	Beitrag der Ngf-KO Maus zur Funktionsanalyse.....	111
5	Zusammenfassung	115
6	Literaturverzeichnis	117
7	Anhang	130
7.1	Elektronischer Anhang	131
8	Danksagung	133
9	Eidesstattliche Erklärung.....	135
10	Lebenslauf	137

Abkürzungsverzeichnis

abs.	Absolut
Adgb	Androglobin
AKT	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninic acid
BL/6	Black 6
Blast	Basic local alignment search tool
BSA	Bovines Serum Albumin
Camk2a	Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Alpha
CCl ₄	Tetrachlormethan
C-FLIP	CASP8 And FADD-Like Apoptosis Regulator
CMV	Cytomegalovirus
CRE ERT	Cre fusioniert mit humanem estrogen receptor
Cygb	Cytoglobin
Cyp17A1	Cytochrome P450, Family 17, Subfamily A, Polypeptide 1
Cyt-C	Cytochrom-C
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Dox	Doxycyclin
DRA	DDBJ Sequence Read Archive
EBI	European Bioinformatics Institute
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ENA	European Nucleotide Archive
ESC	Embryonale Stammzellen
EST	Expressed Sequence Tags
Eucomm	European Conditional Mouse Mutagenesis Program
Fas	Fas Cell Surface Death Receptor
FLP	Flippase
FRT	Flippase recognition target
GbE	Globin E
GbX	Globin X
GbY	Globin Y
GCL	Ganglion cell layer
GDP	Guanosindiphosphat
GO	Gene Ontology
H&E	Hämatoxylin und Eosin Färbung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDMA	High Density Microarray
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
INL	Inner nuclear layer
IPA	Ingenuity Pathway Analysis

IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	Internal ribosome entry site
ISH	In-situ Hybridisierung
Jo2	Anti-Fas Antikörper, Klon Jo2
Kegg	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KI	KnockIn
KO	Knockout
LB	lysogeny broth, Nährmedium
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mb	Myoglobin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ngb	Neuroglobin
NGS	Next generation Sequencing
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
ORF	Open Reading Frame
P ₅₀	Halbsättigungsdruck
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Paired End
PI3K/AKT	Phosphoinositid-3-Kinase/Protein Kinase B – Signalweg
PNS	Peripheres Nervensystem
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR
RIN	RNA Integrity Number
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Ribonuclease Protection Assay
RPKM	<u>R</u> eads <u>p</u> er <u>k</u> ilobase of exon model per <u>m</u> illion mapped Reads
Rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
RT	Raumtemperatur
SAGE	Serial analysis of gene expression
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SRA	Sequence Read Archive
Tac1	Tachykinin, Precursor 1
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris buffered saline
TET	Tetracycline-controlled transcriptional activation
TRIS	Tromethamin
tTA/rtTA	Tetracycline transactivator / reverse Tetracycline transactivator
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U	Units
ÜN	Über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
VE-H ₂ O	Vollentmineralisiertes Wasser
w/v	Weight/Volumen
WT	Wildtyp
x g	x Fache der Erdbeschleunigung (g)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Dreidimensionale Struktur penta - und hexakoordinierter Globine	2
Abbildung 1-2: Phylogenie, biochemische Eigenschaften sowie Expressionsorte der Vertebraten-Globine	3
Abbildung 1-3: Potentielle Funktionen von Neuroglobin	7
Abbildung 1-4: Retinale Lokalisation von Neuroglobin – widersprüchliche Daten.....	10
Abbildung 1-5: Das Tet-on / Tet-off-System	13
Abbildung 1-6: Das Cre/LoxP-System	16
Abbildung 1-7: Das Eucomm Knockout-First konditionale Vektor-System.....	17
Abbildung 2-1: Lage der Ngb-Knockout-spezifischen Sonde für den Southern-Nachweis	39
Abbildung 2-2: Blotaufbau: unidirektionaler Blot	43
Abbildung 2-3: Berechnung des Rj-Wertes	48
Abbildung 3-1: Proteinnachweis der ektopischen Ngb-Überexpression in der Leber der Ngb x R26-Transgenen	51
Abbildung 3-2: Nachweis der ektopisch exprimierten Ngb-mRNA in Leberproben der Ngb x R26 Linie	52
Abbildung 3-3: In IPA annotierte zelluläre Lokalisation der Genprodukte regulierter Gene.....	55
Abbildung 3-4: In IPA annotierte zelluläre Lokalisation der Genprodukte runter regulierter Gene.....	56
Abbildung 3-5: In IPA annotierte zelluläre Lokalisation der Genprodukte hoch regulierter Gene.....	56
Abbildung 3-6: In der IPA-Datenbank annotierte Funktion der Genprodukte der regulierten Gene...	57
Abbildung 3-7: Gewebsspezifität der hochregulierten Gene.....	58
Abbildung 3-8: ALT Blutplasmawerte in CCl ₄ -gestressten Mäusen.....	60
Abbildung 3-9: AST Blutplasmawerte in CCl ₄ -gestressten Mäusen	61
Abbildung 3-10: Apoptoserate nach einer Jo2-Behandlung von primären Hepatozyten.....	62
Abbildung 3-11: TUNEL-Assay in Jo2-behandelten primären Hepatozyten.....	63
Abbildung 3-12: Casp-3/7 Aktivitätsmessung nach Jo2-Behandlung von primären Hepatozyten	64
Abbildung 3-13: Casp-9 Aktivität nach Jo2-Behandlung bei unterschiedlichen O ₂ -Konzentrationen ..	65
Abbildung 3-14: IHC und WB-Analysen der ektopischen Ngb-Überexpression im Cortex von Ngb x Camk2 transgenen Mäusen.....	67
Abbildung 3-15: Ektopische Ngb-Überexpression im Hippocampus von Ngb x Camk2 transgenen Mäusen	68
Abbildung 3-16: Southern Blot-Nachweis des Ngb-KO Locus in embryonalen Stammzellen der Maus78	
Abbildung 3-17: Genetische Konstitution im murinen Ngb-Lokus und Lage der Southern Blot Sonde	79

Abbildung 3-18: Zucht-Diagramm vom transkriptionellen bis zum genetischen Ngf-Knockout und LacZ-KnockIn	80
Abbildung 3-19: Ngf-mRNA Kopienzahl in Gehirnproben der Ngf-Eucomm Mauslinie	82
Abbildung 3-20: Ngf und LacZ mRNA Expression in der Retina der Ngf-Eucomm Mauslinie.....	83
Abbildung 3-21: Ngf und LacZ mRNA-Expression in Testes der Ngf-Eucomm Mauslinie.....	83
Abbildung 3-22: Nachweis der β -Gal-Expression und Aktivität in Testes von Ngf-KO – LacZ-KnockIn Mäusen	85
Abbildung 3-23: Nachweis der LacZ-Reportergen-Expression im murinen Gehirn mittels X-Gal-Färbung	86
Abbildung 3-24: Ngf, Cygf und β -Aktin mRNA-Expression in embryonalen und adulten Mausegeweben	89
Abbildung 3-25: Ngf, Cygf und β -Aktin mRNA-Expression in murinen Gehirnregionen	90
Abbildung 3-26: Ngf-mRNA Expression in wildtypischen murinen Gehirnregionen via qRT-PCR.....	91
Abbildung 3-27: Ngf Proteinkonzentration in wildtypischen murinen Gehirnregionen	92
Abbildung 3-28: Ngf Expressions-Analyse in endokrinen und retinalen Geweben der Maus	93
Abbildung 3-29: Ngf RNA-Seq Analyse in neuronalen Geweben von Zebrafisch und Ratte	95
Abbildung 4-1: Putative Beteiligung von Ngf an der Aktivierung von Tetrachlormethan.....	99
Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der extrinsischen Apoptose und der möglichen Ngf-Wirkung.....	101
Abbildung 7-1: Vektorkarte des pBI-eGFP-Ngf Plasmids.....	130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Zusammenstellung der verwendeten gentechnisch veränderten Mauslinien	22
Tabelle 2-2: In der Arbeit verwendete primär Antikörper	28
Tabelle 2-3: Primer für die Sondengenerierung	40
Tabelle 2-4: Für das Mapping mittels CLC-Workbench verwendete Parameter.....	46
Tabelle 3-1: Regulierte Gene in transgener Leber nach statistischer Auswertung und Annotation	53
Tabelle 3-2: Die Top 10 der hoch und runter regulierten Gene in der Ngb-transgenen Mausleber	54
Tabelle 3-3: Kegg-Pathway Annotation der regulierten Gene	59
Tabelle 3-4: Anzahl spezifischer Reads für Ngb und eGFP in RNA-Seq-Datensätzen.....	71
Tabelle 3-5: Mapping-Statistiken der Ngb x Camk2 RNA-Seq Analyse	72
Tabelle 3-6: Anzahl an regulierten Genen in den Hippocampus und Cortex Transkriptomen	72
Tabelle 3-7: Die Top 10 der hoch und runter regulierten Gene im Hippocampus RNA-Seq-Datensatz	73
Tabelle 3-8: Die Top 10 der hoch und runter regulierten Gene im Cortex RNA-Seq-Datensatz.....	73
Tabelle 3-9: Kegg Pathways in neuronalen und hepatischen Ngb-transgenen Geweben	74
Tabelle 3-10: Top 10 statistisch angereicherte Kegg-Pathways im Hippocampus-Transkriptom.....	75
Tabelle 3-11: Top 10 statistisch angereicherte Kegg-Pathways im Cortex-Transkriptom	76
Tabelle 3-12: Angereicherte Kegg-Pathways im hepatischen Ngb-Transkriptom	76
Tabelle 3-13: Ngb Pearson-Korrelationsanalyse in Gehirnregionen der adulten Maus	94
Tabelle 4-1: Expression von Ngb in der Literatur	109
Tabelle 7-1: Für die Korrelationsanalyse verwendete RNA-Seq-Datensätze	131

1 Einleitung

1.1 Atmungsproteine bei Säugetieren

Die Entstehung mehrzelliger Organismen und die damit notwendig gewordene Sauerstoffversorgung der Gewebe führte während der Evolution zur Entstehung unterschiedlicher Typen von respiratorischen Proteinen wie Hämoglobin, Hämocyanin und Hämerythrin, welche für den Transport von Sauerstoff zu den Geweben verantwortlich sind (Decker und Van Holde 2011). Die Globine stellen die am weitesten verbreitete Familie der respiratorischen Proteine in Archaeen, Bakterien und Eukaryoten dar (Wehner et al. 1991, Vinogradov et al. 2006). Trotz enormer Unterschiede in ihren Aminosäure-Sequenzen weisen die Tertiärstrukturen verschiedener Globine einen hohen Grad an Konservierung auf. Den Globinen gemein ist damit die typische Globin-Faltung, bestehend aus acht α -Helices (üblicherweise bezeichnet durch Helix A-H) und fünf nicht helikalen Bereichen, welche eine drei über drei α -helikale Sandwichstruktur einnehmen (siehe Abbildung 1-1) (Holm und Sander 1993). Diese Helices formen eine hydrophobe Tasche für die nicht kovalent gebundene prosthetische Häm-Gruppe. Die Häm-Gruppe befähigt die Globine zur reversiblen Bindung gasförmiger Liganden wie Sauerstoff (O_2), Stickstoffmonoxid (NO) oder Kohlenstoffmonoxid (CO) (Kendrew et al. 1958, Storz et al. 2013). Das zentrale Fe^{2+} -Ion der Häm-Gruppe ist über vier Stickstoffatome des Tetrapyrrolrings (Protoporphyrin IX) koordiniert. Die fünfte Koordinationsstelle im Zentrum der Häm-Gruppe wird stets von einem senkrecht zur Häm-Ebene stehenden proximalen Histidin F8 (der achte AS-Rest der F-Helix) besetzt. Die Belegung der sechsten Koordinationsstelle ist in der oxygenierten Form stets ein O_2 -Molekül. In der deoxygenierten Form pentakoordinierter Globine nimmt ein Wassermolekül die sechste Koordinationsstelle ein. Bei hexakoordinierten Globinen besetzt im deoxygenierten Zustand das distale Histidin E7 die sechste Koordinationsstelle (Pesce et al. 2002). Die Bindung von Liganden setzt in hexakoordinierten Globinen demnach die Verdrängung des distalen Histidins E7 voraus (Abbildung 1-1). Die Hexakoordination stellt zumindest in der Vertebraten-Evolution wohl die ursprüngliche Form dar (Brunori und Vallone 2007) (Kakar et al. 2010). Die Unterschiede dieser Form liegen in einer stabileren Bindung des Liganden in der Hexakoordination in Abhängigkeit zu externen Faktoren wie der Temperatur sowie einer verstärkten Abhängigkeit der Bindungskinetik vom pH-Wert und der

dadurch möglichen Regulation der Liganden-Bindung (Uzan et al. 2004). Durch die Verdrängung des distalen Histidins bei Liganden-Bindung kommt es zu einer kleinen Konformationsänderung des Proteins, was für eine Signalfunktion von Bedeutung sein könnte (Hankeln et al. 2005). Die physiologischen Vorteile dieser Koordination sind bislang unklar da *in vivo* Daten fehlen.

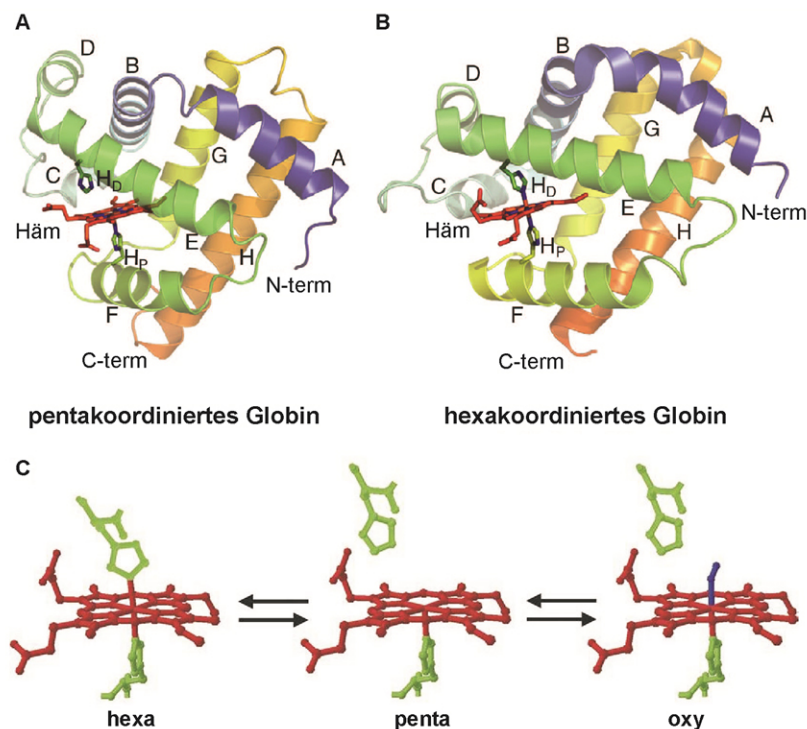


Abbildung 1-1: Dreidimensionale Struktur penta - und hexakoordinierter Globine

A und **B**: Dargestellt ist die dreidimensionale Struktur pentakoordinierter und hexakoordinierter Globine. Die Helices A, E und F (im Vordergrund) bilden mit den Helices B, G und H (im Hintergrund) die „3-über-3“- α -helikale Sandwichstruktur. **A**: Das Eisen-Ion des pentakoordinierten Myoglobins des Pottwals liegt in Koordination mit dem proximalen Histidin (H_p) vor. **B**: Das Eisen-Ion des hexakoordinierten Neuroglobins der Maus ist im Deoxy-Zustand durch das proximale (H_p) und distale Histidin (H_d) koordiniert. **C**: Die schematische Darstellung des Gleichgewichts der Bindung von O_2 durch hexakoordinierte Globine. Rot: Häm-Gruppe, Grün: beteiligte Histidine, Bildquellen: (Hankeln et al. 2005, Kakar et al. 2010)

Zu den am besten untersuchten Vertretern der Globin Superfamilie gehören die Globine der Vertebraten mit einer durchschnittlichen Länge von 150 Aminosäuren. Die Liste der Vertebraten-Globine wird von den bekanntesten Vertretern, dem Hämoglobin und Myoglobin angeführt. Das **Hämoglobin (Hb)** ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei α - und zwei β -Proteinketten. Es ist in den Erythrozyten der Vertebraten lokalisiert und übt eine

O₂/CO₂-Transportfunktion zur Aufrechterhaltung der Zellatmung aus (Millikan 1933, Perutz 1979). Das **Myoglobin (Mb)** ist ein Monomer und hat die klassische Aufgabe der O₂-Versorgung in den Zellen der Herz- und Skelettmuskulatur sowie der glatten Muskulatur verschiedener Organe. Hier dient es der O₂-Speicherung sowie dem intrazellulären O₂-Transport von der Zellmembran zu den Mitochondrien (Wittenberg 1970, Wittenberg und Wittenberg 2003). Neben diesen klassischen Funktionen als Speicher und Transporter von Sauerstoff wurde für beide Proteine in ihrer oxygenierten Form eine Nitrit-Oxidase-Aktivität und eine Dioxygenase-Aktivität zur Detoxifizierung von schädlichem Nitrit (NO₂⁻) und Stickstoffmonoxid (NO) nachgewiesen (Flogel et al. 2001, Jensen 2009). Außerdem sind beide Globine unter hypoxischen Bedingungen in deoxygeniertem Zustand in der Lage NO₂⁻ zu NO zu reduzieren. Bei Hb führt die NO-Produktion letztendlich zur Gefäßerweiterung und dadurch zu einer Verbesserung der Durchblutung, wohingegen Mb durch die NO-Erzeugung temporär die Atmungskette der Mitochondrien inhibiert, so die Entstehung von ROS minimiert und damit Schädigungen der Zellen und Organe vermindert (Cossins und Berenbrink 2008, Hendgen-Cotta et al. 2010).

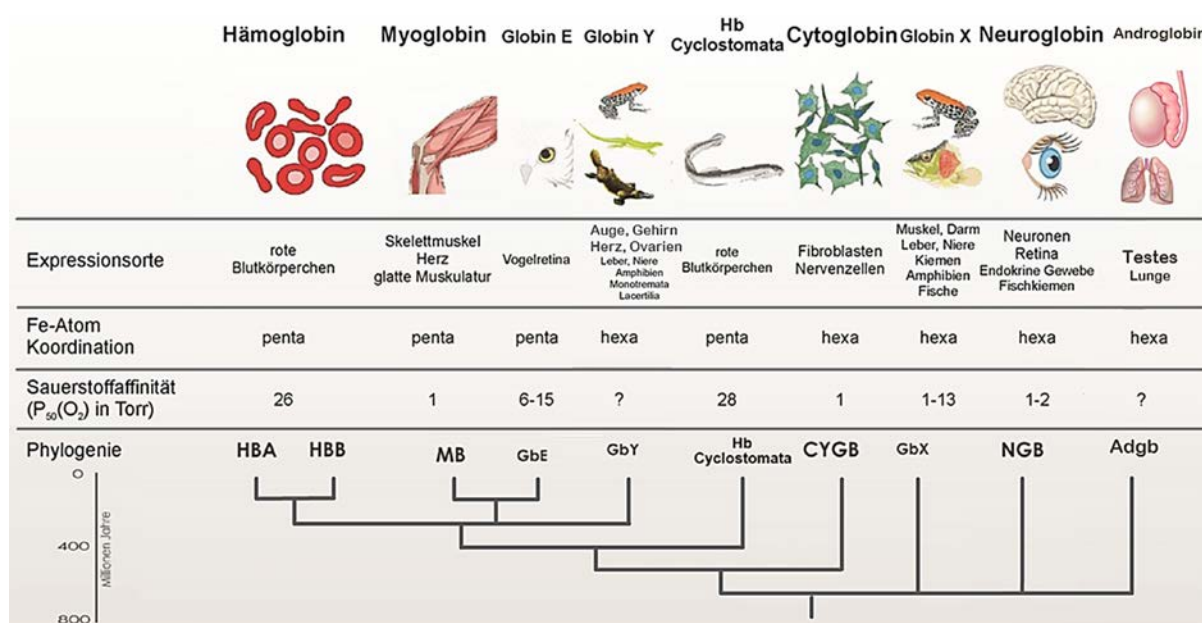


Abbildung 1-2: Phylogenie, biochemische Eigenschaften sowie Expressionsorte der Vertebraten-Globine

Dargestellt ist die phylogenetische Beziehung der Globine sowie deren Sauerstoffaffinität, Eisen-Atom Koordination und in der Literatur beschriebene Expressionsorte (Bildquellen: Hankeln et al. 2005, Hoffmann et al. 2010, Laufs 2010, Blank und Burmester 2012, Ebner 2012, Hoogewijs et al. 2012).

Weitere, in zahlreichen Publikationen untersuchte Globine sind Cytoglobin und Neuroglobin. Bis zur Entdeckung dieser beiden Globine vor nahezu 15 Jahren waren hexakoordinierte Globine nur in Pflanzen, Cyanobakterien und Protisten bekannt (Burmester et al. 2000, Hunt et al. 2001, Burmester et al. 2002, Trent und Hargrove 2002, Storz et al. 2013). **Neuroglobin (Ngb)** wurde durch Suchen in Expressed Sequence Tag (EST) Datenbanken entdeckt und zählt zu den phylogenetisch ältesten Globinen, da verwandte Globine schon vor der Trennung von Proto- und Deuterostomiern existierten (Burmester et al. 2000, Dröge et al. 2012). Der Hauptexpressionsort bei Vertebraten ist, wie der Name schon vermuten lässt, das zentrale Nervensystem (ZNS). Ngb wird jedoch auch in endokrinen Geweben exprimiert (Burmester und Hankeln 2009). **Cytoglobin (Cygb)** hingegen ist ein Vertebraten-spezifisches Protein, welches in Säugern in einer großen Bandbreite an Geweben und Zellen vorkommt (Kawada et al. 2001, Burmester et al. 2002, Trent und Hargrove 2002, Fago et al. 2004b, Nakatani et al. 2004). Als Hauptexpressionsorte von Cytoglobin gelten Fibroblasten in Bindegeweben sowie Fibroblasten-verwandte Zellspezies und bestimmte Neuronen-Typen, jedoch kommt Cygb anderen Arbeiten zufolge auch in Muskelzellen und Makrophagen vor (Review: Oleksiewicz et al. 2011).

Weitere, vor allem durch Genomdaten entdeckte Globin-Typen wie Globin X, Globin Y und Globin E sind in nur wenigen Vertebraten-Taxa zu finden. **Globin X (GbX)** wurde innerhalb der Wirbeltiere bisher nur in Amphibien und Fischen beschrieben, ist jedoch phylogenetisch eine sehr alte Globinlinie in Tieren (Roesner et al. 2005, Fuchs et al. 2006, Blank und Burmester 2012). Dieses durch N- und C-terminale Extensionen verlängerte Globin ist durch eine Acetylierung am N-Terminus an der Zellmembran verankert. Es ist somit das einzige Globin, welches nicht frei im Zytoplasma diffundieren kann, wodurch eine respiratorische Funktion als unwahrscheinlich gilt (Roesner et al. 2005, Fuchs et al. 2006, Blank et al. 2011b). **Globin Y (GbY)** ist ein im Krallenfrosch (*Xenopus*) entdecktes und dort in mehreren Organen vorkommendes Protein. Die Expression wurde bisher nur in Kloakentieren und Echsen nachgewiesen, und die Funktion ist bisher nicht bekannt (Fuchs et al. 2006, Hoffmann et al. 2011). Die Lokalisation von **Globin E (GbE)** wurde zunächst nur in der Retina von Vögeln beschrieben. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass GbE auch in weiteren Sauropsida wie der Schildkröte exprimiert wird (Schwarze und Burmester 2013). Das Protein ist hier in hohen Konzentrationen (~10 µM im Gesamtauge) nachgewiesen worden. Kombiniert mit der sehr

hohen O₂-Affinität deutet dies auf eine respiratorische Funktion in der Retina hin (Kugelstadt et al. 2004, Blank et al. 2011a).

Das neueste Mitglied der Globin-Superfamilie ist **Androglobin (Adgb)** (Hoogewijs et al. 2012). Dieses 180 kDa große chimäre Protein mit einer N-terminalen Calpain-domäne, einer internen Globin-domäne und einem IQ-Bindemotiv wurde erst kürzlich in vielen Metazoa-Taxa nachgewiesen und wird bei Säugetieren vor allem in Testes exprimiert. Trotz permutierter Globin-domäne scheint das Protein eine typische Globin-Tertiärstruktur ausbilden zu können (Hoogewijs et al. 2012). Die Funktion ist bisher unklar, jedoch deuten erste Untersuchungen an Knockout-Mäusen (KO) auf eine Funktion bei der Spermienreifung und somit einen Einfluss auf die Fruchtbarkeit bei Männchen hin (pers. Kommunikation, David Hoogewijs, Zürich).

1.2 Neuroglobin: ein phylogenetisch altes Globin der Tiere

Im Jahr 2000 wurde durch Datenbanksuchen ein neues Globin entdeckt, das aufgrund der vorwiegenden Expression im Nervensystem Neuroglobin (Ngb) genannt wurde (Burmester et al. 2000). Strukturanalysen haben gezeigt, dass Ngb die klassische Globinfaltung aufweist und als monomeres, hexakoordiniertes Globin mit einer Größe von 17 kDa und einer Länge von 151 Aminosäuren vorliegt (Pesce et al. 2002, Trent und Hargrove 2002). Ngb weist zu den paralogen Globinen Hb und Mb lediglich eine Identität von unter 25% auf, die essentiellen Aminosäuren zur Koordination der Häm-Gruppe sind in Ngb jedoch konserviert. Gene für Ngb wurden zunächst in Säugern, Vögeln, Reptilien, Amphibien sowie Fischen beschrieben (Burmester et al. 2004) kommen aber auch in Cephalochordaten, Protostomiern sowie Placozoen vor (Burmester et al. 2000, Ebner et al. 2010, Dröge et al. 2012). Die Sauerstoffaffinität [$P_{50}(O_2)$] von Säuger-Ngb beträgt *in vitro* 1-2 Torr und ist damit ähnlich hoch wie die von Mb und Cygb (Abb. 1-2) (Burmester et al. 2000, Dewilde et al. 2001). Unter physiologischen Bedingungen jedoch (pH 7,0 und 37°C) wurde die Affinität von Ngb zu O₂ mit 7,5 Torr jedoch als deutlich geringer ermittelt (Fago et al. 2004a). Die Affinität von Ngb kann außerdem vom Reduktionszustand der Cysteine, welche Disulfidbrücken ausbilden, verändert werden. Durch die Reduktion der Disulfidbrücken wird die O₂-Affinität drastisch reduziert, was z. B. durch einen zellulären Elektronendonator katalysiert werden könnte (Hamdane et al. 2003). Eine Funktion dieser Redox-abhängigen Änderung der O₂-Affinität bei

Ngb ist wegen des Fehlens von O₂-Sättigungsdaten einzelner Zellen oder distinkter Regionen *in vivo* bislang nicht bewiesen.

Bei der Erstbeschreibung von Ngb im Jahr 2000 wurde mittels mRNA *in-situ*-Hybridisierung und RNA-Northern Blot zunächst die Lokalisation und Expression der Ngb-mRNA in neuronalen und einigen weiteren Geweben bei Mensch und Maus untersucht (Burmester et al. 2000). In den seit der Entdeckung vergangenen nunmehr 14 Jahren Forschung ist eine stetig wachsende Anzahl an Untersuchungen der Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erschienen, die jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse enthielten. In den nächsten Abschnitten werden **(i)** die aktuell in der Literatur diskutierten potentiellen Funktionen und **(ii)** die Expressionsmuster von Ngb dargestellt.

1.2.1 Mögliche Funktionen von Neuroglobin in Säugern

Obwohl Neuroglobin Gegenstand intensiver Forschung ist und mit 421 Zitaten in PubMed¹ das wohl am besten untersuchte „neue“ Globin darstellt, ist seine molekulare Funktion bis heute unklar. Die sehr langsame Evolutionsrate auf Aminosäure-Sequenzebene, die etwa 3 mal langsamer als bei Mb und Hb ist, lässt indessen bereits eine sehr wichtige konservierte Funktion vermuten (Wystub et al. 2004). In Abbildung 1-3 sind die derzeit in der Literatur am häufigsten diskutierten potentiellen Funktionen von Ngb dargestellt. So könnte Ngb z. B. eine klassische O₂-Versorgungs-Funktion der Mitochondrien in den metabolisch aktiven Neuronen einnehmen (siehe A, Burmester und Hankeln 2009). Ebenfalls ist eine Funktion in der Entgiftung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) denkbar, welche bei einer Hypoxie in der Atmungskette entstehen können (siehe B, Herold et al. 2004). Ngb könnte weiterhin analog zu Mb unter Normoxie als NO-Dioxygenase überschüssiges Stickstoffmonoxid (NO) zu Nitrat umwandeln (NO₃⁻) oder alternativ als Nitritreduktase unter Hypoxie aus Nitrit (NO₂⁻) NO generieren und somit die Signalfunktion dieses Moleküls beispielsweise zur Regulierung des Blutdrucks einsetzen oder die Atmungskette kurzzeitig inhibieren (siehe C, Brunori et al. 2005, Tiso et al. 2011). Die zellschützende ROS-Entgiftungsfunktion, welche für Ngb postuliert wurde (Abbildung 1-3, B), impliziert eine mögliche Modulation der Ngb-Expression

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=neuroglobin> (27.08.2014)

bei sich verändernden Sauerstoffbedingungen (z. B. Hypoxie-Stress und Hyperoxie-Stress) (Burmester et al. 2007, Burmester und Hankeln 2009). Eine Genregulation von Ngb nach Hypoxie-Induktion konnte jedoch *in vivo* bisher nicht überzeugend gezeigt werden (Mammen et al. 2002, Hundahl et al. 2005, Schmidt-Kastner et al. 2006, Burmester et al. 2007, Hundahl et al. 2011). In Zellkultur-Experimenten wurde hingegen eine eher schwache Hochregulation von Ngb unter Hypoxie beschrieben (Sun et al. 2001, Rayner et al. 2006, Schmidt-Kastner et al. 2006).

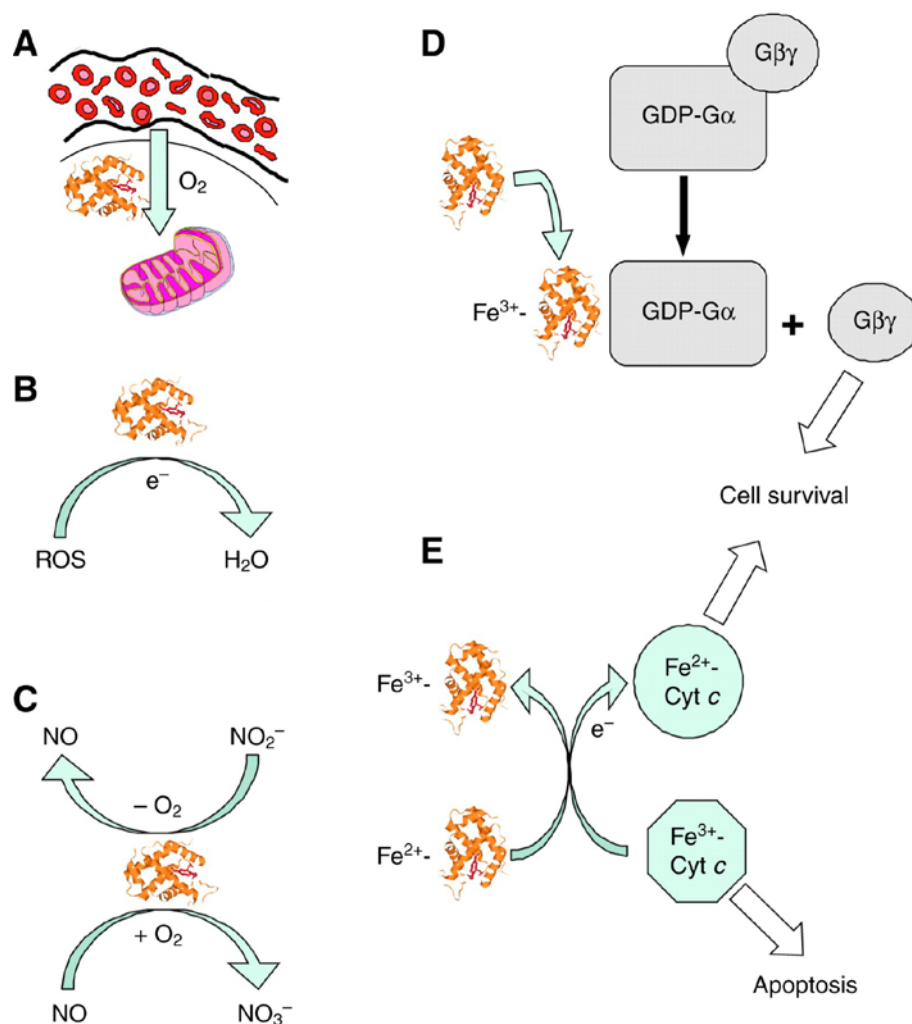


Abbildung 1-3: Potentielle Funktionen von Neuroglobin

Dargestellt sind die in der Literatur zumeist diskutierten putativen Funktionen von Neuroglobin. A: Die klassische O₂-Transportfunktion zur Versorgung der Mitochondrien. B: Die Entgiftungsfunktion von ROS durch Reduktion. C: Die Entgiftung von NO zu NO₃⁻ unter Normoxie oder alternativ die Produktion von NO (als Signalmolekül) unter Hypoxie aus Nitrit. D: Funktion von Ngb als Signalprotein durch die Interaktion mit GDP-Gα. E: Elektronen-Übertragung durch Ngb, dadurch die Reduktion von freigesetztem Cytochrom-C und somit eine Verhinderung des mitochondrialen apoptotischen Weges (Abbildung aus: Burmester und Hankeln 2009).

Die Beteiligung an zellulären Prozessen der Signaltransduktion ist eine mögliche Funktion von Ngb, die untersucht wird. So soll Met-Ngb (autooxidierte Fe^{3+} -Form) mit der GDP-gebundenen Form der α -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine interagieren und hier die Dissoziation des Guanin verhindern, wodurch die Zelle vor Apoptose geschützt wird (siehe D, Wakasugi et al. 2003). Dieser Prozess ist bisher nur *in vitro* beschrieben und zudem erstaunlicherweise in Zebrafischarten, die als Vertebraten natürlich auch Ngb exprimieren, nicht konserviert (Burmester et al. 2004, Hankeln et al. 2005, Wakasugi et al. 2005, Watanabe et al. 2012).

In einer Reihe von Publikationen aus der Gruppe von Tom Brittain wurde die Interaktion von Ngb mit Cyt-C untersucht. Demnach kann Ngb das aus Mitochondrien freigesetzte Cyt-C *in vitro* und in Zellkulturexperimenten reduzieren (siehe E, Fago et al. 2006). Die Freisetzung von oxidiertem Cyt-C spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Apoptosoms in der mitochondrialen Apoptose. Eine Reduktion von Cyt-C durch Ngb würde die Zelle demnach vor einem zumindest milden apoptotischen Stimulus schützen (Brittain et al. 2010, Raychaudhuri et al. 2010, Brittain 2012).

Aufgrund seiner Hexakoordination und der stark konservierten Aminosäuresequenz wurden zudem zahlreiche weitere Protein-Protein-Interaktionen von Ngb als Funktionshinweise vorgeschlagen. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Ngb mit dem Prion-Protein und Plaque-assoziierten Tau-Protein, welche im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung entstehen, interagiert (Lechauve et al. 2009, Ferrer et al. 2011, Palladino et al. 2011, Chen et al. 2012). Außerdem wurde eine Interaktion von Ngb mit der β 2-Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase, dem Lipidraft-Protein Flotillin1 und dem Protease-Inhibitor Cystatin C beschrieben (Xu et al. 2003, Wakasugi et al. 2004a, Wakasugi et al. 2004b, Khan et al. 2008).

Festzuhalten ist, dass alle aufgeführten Funktionen aufgrund von *in vitro* Daten postuliert wurden. Unklar bleibt meist, inwiefern die Funktionen spezifische, evolutionär selektierte Fähigkeiten von Ngb darstellen. So ist z. B. klar, dass mehr oder weniger jedes Globin (mit einem Häm-Zentrum) mit NO reagieren und dieses umsetzen kann (Smaggha et al. 2008). Wir sind also von einem Verständnis der Ngb-Funktion im physiologischen Kontext der Zellen und Organe noch weit entfernt. Möglich ist sicher, dass Ngb auch mehr als eine Funktion erfüllt und dass Funktionen je nach Ngb-exprimierendem Zelltyp und betrachteter Spezies durchaus unterschiedlich sein können. Daher ist eine Betrachtung potentieller Funktionen

von Ngb immer nur im Zusammenhang mit dem natürlichen Expressionsmuster des Proteins sinnvoll.

1.2.2 Neuroglobin in der Retina

Das Auge bzw. die Retina gilt als das Gewebe mit der höchsten Ngb-Expression in Maus und Mensch (Schmidt et al. 2003, Bentmann et al. 2005). Die Ngb-Proteinkonzentration in der Retina der Maus liegt Western Blot Analysen zufolge bei 50-100 μM und ist somit rund 100-mal so hoch wie im Gesamtgehirn ($\approx 1 \mu\text{M}$, Burmester et al. 2000, Schmidt et al. 2003). Damit wäre die retinale Ngb-Konzentration sogar mit der von Myoglobin (100-300 μM) im Herz und Skelettmuskel vergleichbar (Wittenberg und Wittenberg 2003). Das Protein ist dabei immunhistologischen Daten zufolge innerhalb der Retina in den gleichen Segmenten lokalisiert wie die Cyt-C Oxidase und die Mitochondrien. Ngb wäre somit in den Regionen mit dem höchsten Energiekonsum am stärksten vertreten und könnte daher an der Versorgung der Mitochondrien durch O_2 beteiligt sein und die passive Diffusion von Sauerstoff unterstützen, womit eine Funktion als Sauerstofftransporter wahrscheinlich wäre (Bentmann et al. 2005) (Abbildung 1-3 A). Neuere Untersuchungen an Ngb-KO Mäusen zeigen hingegen ein etwas anderes Bild der Ngb-Verteilung in der Retina. So hat die Arbeitsgruppe um Christian Hundahl (2012) die Ngb-Lokalisation in der murinen Retina erneut untersucht und dabei nur eine sehr beschränkte Verteilung des Proteins in einzelnen Neuronen der Ganglion- und inneren nukleären Zellschichten (GCL und INL) beschrieben (siehe Abbildung 1-4, Hundahl et al. (2012b)). Diese Daten würden einer O_2 -Versorgungsfunktion eher widersprechen. Die unterschiedlichen Ergebnisse, die vermutlich auf unterschiedlichen Spezifitäten der jeweils verwendeten Antikörper beruhen, zeigen, dass weitere Experimente notwendig sind, um die physiologische Bedeutung von Ngb richtig einzuordnen.

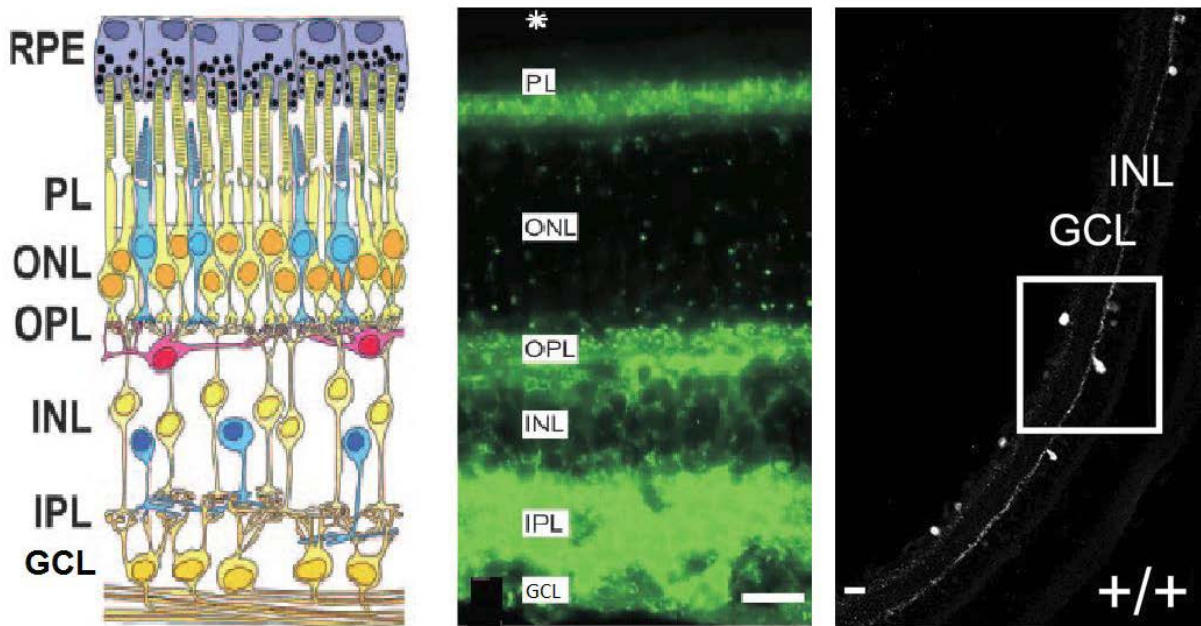


Abbildung 1-4: Retinale Lokalisation von Neuroglobin – widersprüchliche Daten

Dargestellt sind die verschiedenen zellulären Schichten der Retina **Links:** RPE: Retinales Pigmentepithel; PL: Äußere -und innere Segmente der Photorezeptoren; ONL: Äußere nukleäre Schicht; OPL: Äußere plexiforme Schicht; INL: Innere nukleäre Schicht; IPL: Innere plexiforme Schicht; GCL: Ganglion Zellschicht. **Mitte:** Immunhistochemische Detektion von NgB (IHC aus Schmidt et al. 2003), starkes NgB-Signal in GCL, IPL, OPL und PL. **Rechts:** IHC-Detektion von NgB aus Hundahl et al. (2012b), NgB Lokalisation beschränkt sich auf einzelne Neuronen in der GCL und INL.

1.2.3 Neuroglobin im Zentralnervensystem

Die allgemein-neuroprotektiven Eigenschaften von NgB sind aktuell in der Literatur vielfach und oft auch überzeugend dokumentiert (siehe Burmester und Hankeln 2009, Dietz 2011, Fiocchetti et al. 2013 zum Überblick). Sowohl in Zellkultur-Experimenten als auch in transgenen NgB-überexprimierenden Mäusen konnte ein Schutz vor Apoptose durch eine erhöhte NgB-Expression gezeigt werden (Sun et al. 2001, Sun et al. 2003, Khan et al. 2006). Bis heute ist jedoch weder der genaue Mechanismus dieses Effektes bekannt noch wurde seine Relevanz im natürlichen, nicht genetisch veränderten Organismus gezeigt. Klar ist indessen, dass eine evolutiv selektierte NgB-Funktion am besten in engem Zusammenhang mit seiner regionalen Expression betrachtet werden muss.

Die stärkste NgB-Expression im ZNS des Menschen findet sich Northern Blot-Analysen zufolge in den Regionen Nucleus subthalamicus, Stirnlappen, Thalamus, Okzipital-Pol sowie

in der Medulla oblongata (Burmester et al. 2000). In den nachfolgenden Jahren wurden diese Ngb-Expressionsorte mittels diverser Methoden wie der radioaktiven und nicht-radioaktiven mRNA-In-Situ-Hybridisierung (NR-ISH bzw. R-ISH) sowie der Immunhistochemie (IHC) sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nicht nur im Menschen, sondern auch in Maus und Ratte weitestgehend bestätigt (Mammen et al. 2002, Reuss et al. 2002, Zhang et al. 2002, Geuens et al. 2003, Wystub et al. 2003, Hundahl et al. 2008a, 2008b, 2010a, 2010b, 2012b, 2013).

Der Ngb-Protein-Gehalt des murinen Gesamtgehirns ist mit einer Konzentration von $\sim 1 \mu\text{M}$ im Vergleich zum Mb-Protein-Gehalt des Muskels $\sim 100 \mu\text{M}$ eher gering (Burmester et al. 2000, Wittenberg und Wittenberg 2003). Die Ngb-Expression im gesunden Gehirn der Maus und Ratte beschränkt sich jedoch auf Neuronen. Gliazellen, welche (je nach Gehirnregion) mehr als 70% des Gehirnvolumens ausmachen können, exprimieren kein oder extrem wenig Ngb (Herculano-Houzel et al. 2006, Azevedo et al. 2009). Bei hypoxietoleranten Säugern wie dem Seehund (*Phoca*) und der Blindmaus (*Spalax*) wird Ngb hingegen auch in Astrozyten exprimiert, wobei der Gesamt-Ngb-Gehalt zumeist ähnlich dem in Maus und Mensch bleibt (Mitz et al. 2009, Avivi et al. 2010, Schneuer et al. 2012).

Bezüglich der regionalen Expression von Ngb im murinen und humanen ZNS außerhalb des Stammhirns gibt es in der Literatur jedoch durchaus auch unterschiedliche, zum Teil sehr widersprüchliche Beschreibungen. Während einige Autoren eine ubiquitäre Ngb-Expression der mRNA und des Proteins in Neuronen des gesamten Gehirns der Maus bzw. der Ratte postulieren (Reuss et al. 2002, Zhang et al. 2002, Wystub et al. 2003), beschreiben andere Autoren eine auf diskrete Neuronen-Populationen im Stammhirn und wenige ausgewählte weitere Regionen beschränkte Ngb-Expression (Mammen et al. 2002, Geuens et al. 2003, Hundahl et al. 2008a, 2008b, 2010a, 2010b, 2013).

Um diese Widersprüche aufzuklären soll im Rahmen dieser Arbeit unter anderem ein System verwendet werden, bei dem ein Reporter gen unter der Kontrolle des authentischen Ngb-Promotors exprimiert wird. Hierzu soll das Eucomm Knockout-First System eingesetzt werden, welches die Möglichkeit eröffnet die Zellspezifität des Ngb-Promotors durch das eingebrachte LacZ-Reporter gen zu analysieren.

1.3 Transgene und Knockout Mausmodelle

Die Erforschung von Genfunktionen kann nur zu einem geringen Teil direkt am Menschen durchgeführt werden. Modellorganismen wie die Maus, die Fruchtfliege oder der Zebrafisch sind aus der heutigen Wissenschaft deshalb nicht mehr wegzudenken. Das gezielte Verändern der Geninformation durch Mutation oder das Einfügen von Geninformation durch stabile Integration in das Genom sind gängige Werkzeuge in der heutigen Molekulargenetik. Seit den ersten genetisch veränderten Mäusen wächst die Zahl der für Wissenschaftler verfügbaren transgenen und Knockout-Mäuse kontinuierlich. So sind weit über 6000 gentechnisch veränderte Mausstämme im Jackson Labor (Bar Harbor, USA) für wissenschaftliche Zwecke verfügbar und internationale Projekte haben es sich zum Ziel gesetzt, durch homologe Rekombination eine Knockout Maus für jedes bekannte Gen herzustellen (Bradley et al. 2012).

1.3.1 Das Tet-on / Tet-off System

Das wohl bekannteste und am weitesten verbreitete System zur genetischen Modifikation in Mäusen ist das Tet-on bzw. Tet-off System von Gossen und Bujard (Gossen und Bujard 1992). Dieses binäre System ermöglicht es, die Expression eines Ziel-Gens (Responder) durch die Anwesenheit eines zweiten Gens (Effektor) sowie mittels des Antibiotikums Tetracyclin zu regulieren. Die Forscher fusionierten hierzu den Tetracyclin-Repressor (TetR) aus *E. coli* mit dem Virion-Protein 16 (VP16) aus dem *Herpes simplex* Virus und erhielten dadurch den Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (tTA). Dieses Fusionsprotein kann an einen minimalen Promotor aus dem humanen Cytomegalovirus (CMV) binden, welcher mit einer Tetracyclin Operator Sequenz (tetO) aus dem Tetracyclin-Resistenz-Operon des Transposons 10 (Tn10) von *E. coli* fusioniert wurde. Auf diese Weise konnte nun die Transkription von DNA-Abschnitten (Genen) initiiert werden, die 3'-Abwärts dieser Minimalpromotorsequenz lagen. Die Bindung von Tetracyclin an den tTA verursacht eine Konformationsänderung des Transaktivators und verhindert dadurch dessen Bindung an die Operatorsequenz, wodurch die Transkription inhibiert wird. Man spricht in diesem Fall vom „Tet-off“-System, da die Expression des Transgens durch den exogenen Stimulus (Gabe von Tetracyclin) eingestellt wird (Gossen und Bujard 1995, Gossen et al. 1995, Baron und Bujard 2000).

Durch die Generierung eines reversen tetracyclinabhängigen Transaktivators (rtTA) über den Austausch von nur vier Aminosäuren des tTA gelang eine Weiterentwicklung dieses Systems. Das rtTA-Molekül hat die dem tTA genau entgegengesetzte Eigenschaft: es leitet nach der Bindung von Tetracyclin die Transkription ein. Außerdem wurde die Kinetik der Transgenexpression dadurch erheblich gesteigert, wobei eine Aktivierung der Transgenexpression je nach Gewebe (und damit Zugänglichkeit für das Tetracyclin) bereits nach nur einer Stunde erfolgen kann. Die volle Transgenexpression durch den ursprünglichen tTA hingegen konnte erst nach einer Woche voll anlaufen (nach Entzug von Tetracyclin). Diese Neuentwicklung wird als „Tet-on“-System bezeichnet, da die Expression des Transgens durch den exogenen Stimulus eingeleitet wird (Kistner et al. 1996, Baron und Bujard 2000, Bockamp et al. 2002).

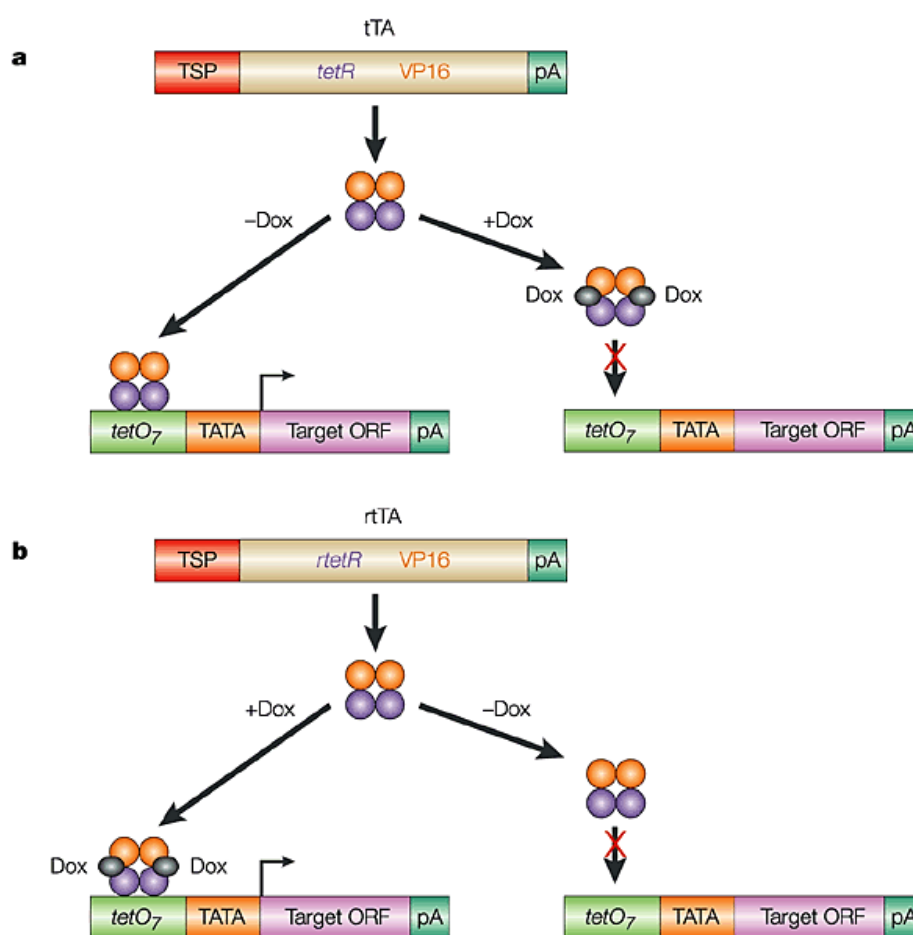


Abbildung 1-5: Das Tet-on / Tet-off-System

Gezeigt ist das Tet-off System (**a**) bei dem in Anwesenheit von Doxycyclin (Dox, ein Tetracyclinderivat) tTA nicht an den Promotor binden kann und somit die Expression des Transgens (Target ORF) gestoppt wird. Alternativ wird beim Tet-on System (**b**) durch die Gabe von Dox die Expression des Transgens durch die Bindung von rtTA an den Promotor induziert. TSP: Gewebsspezifischer Promotor. Abbildung verändert nach (Lewandoski 2001).

1.3.2 Neuroglobin im transgenen, überexprimierenden Mausmodell

Die Ngb-Funktion konnte bisher an einfach-transgenen Mausmodellen, in denen die Expression des Ngb-Gens über einen ubiquitären β -Aktin Promotor oder einen CMV-Promotor gesteuert wurde, untersucht werden (Khan et al. 2006, Greenberg et al. 2008, Khan et al. 2008, Wang et al. 2008b, Raida et al. 2013, Van Leuven et al. 2013). Hierbei fehlte bei den Arbeiten jedoch die quantitative Charakterisierung der Ngb-Überexpression auf Proteinebene, wodurch keine klare Aussage über die Stärke und Effizienz dieser Transgen-Systeme getroffen werden kann. So wurde bei den Ngb-transgenen Mäusen zwar ein Schutz vor den Folgen des experimentellen Schlaganfalls und sogar des Herzinfarkts durch die Ngb-Überexpression ermittelt (Khan et al. 2006, Wang et al. 2008b), jedoch ist unklar, wie stark die ektopische Ngb-Protein-Expression im jeweils gestressten Gewebe tatsächlich war. Die Verhaltensuntersuchung der Ngb-transgenen Mäuse lieferte keine nennenswerten Unterschiede im Phänotyp zu wildtypischen Kontrollen (Van Leuven et al. 2013). Auch hier fehlt jedoch die Beschreibung der regionalen Ngb-Protein-Expression zwischen den Versuchsgruppen.

Außerhalb des Gehirns soll Ngb ebenfalls vor zellulärem Schaden, verursacht durch eine Sauerstoffarmut, schützen. Vor allem die Ergebnisse der myokardialen Protektion durch Ngb, im Umfeld einer vergleichsweise zu Ngb sehr starken Mb-Expression im Herzmuskel suggerieren eine sehr wirksame gewebsunabhängige antiapoptotische Ngb-Funktion (Khan et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit soll dieser Ngb-Effekt in weiteren Ngb-überexprimierenden Organen analysiert werden. Durch eine ektopische Ngb-Überexpression im transgenen Mausmodell und den Vergleich der Ngb-transgenen Gewebe mit wildtypischen soll die regionale Ngb-Funktion auch außerhalb des Gehirns analysiert werden.

1.3.3 Das Eucomm Knockout-First System

Im Jahr 2006 wurde ein unter anderem von der Europäischen Union gefördertes internationales wissenschaftliches Konsortium – Eucomm: The European Conditional Mouse Mutagenesis Program - ins Leben gerufen. Das Eucomm Konsortium hatte zum Ziel, innerhalb weniger Jahre alle bekannten Mausgene (bis zu 20.000) durch zufällige oder

gezielte konditionale Mutationen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu inaktivieren und diese der Wissenschaftsgemeinschaft zur Verfügung zu stellen. Weitere Ziele sind u. a. die Sammlung existierender Cre-exprimierender (Rekombinationssystem zur gezielten genetischen Modifikation) Mauslinien für die Archivierung und Verteilung sowie die Etablierung einer Online-Datenbank, um das Eucomm-Material weltweit zugänglich zu machen (Auwerx et al. 2004, EUCOMM 2007).

Da die Mutagenese von Genen, welche für die Entwicklung eines Organismus verantwortlich sind, oftmals zu einem embryonal letalen Phänotyp führt, ist eine weiterführende Untersuchung der Mutationen in einem adulten Tier nicht mehr möglich. Um die Phänotyp-Untersuchung auch zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung zu ermöglichen, werden die in Eucomm verwendeten, konditionalen Vektoren so konstruiert, dass eine Vielzahl genetischer Veränderungen im Zielgen möglich ist (Schnutgen et al. 2005). Beim klassischen Knockout-System wird das zu charakterisierende Gen bereits stabil in der Keimbahn deaktiviert und bleibt somit während der gesamten Ontogenese inaktiv. Im Zuge der Entwicklung kann es außerdem zu einer Unterdrückung des Knockout-Phänotyps durch die Ausbildung kompensatorischer Mechanismen kommen, wie es für die Myoglobin-Knockout Maus bekannt ist (Galli-Taliadoros et al. 1995, Garry et al. 1998, Godecke et al. 1999, Godecke und Schrader 2000). Der konditionelle Knockout stellt indessen eine Möglichkeit dar, die beschriebenen Problematiken zu umgehen. Auf Grundlage des Cre/loxP-Systems erfolgt ein genetischer Knockout erst durch Verpaarung mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Maus und der Cre-vermittelten Rekombination des Genabschnitts (siehe Abbildung 1-6) (Sauer 1998). Durch die Verwendung einer spezifischen Cre-Maus (mittlerweile sind über 300 verschiedene Cre-exprimierende Stämme bei Jackson Lab¹ erhältlich) kann sowohl der Zeitpunkt als auch der Ort der Rekombination: z. B. während eines bestimmten Entwicklungsabschnitts oder nur im Gehirn des adulten Tieres durch eine zunächst inaktive, durch Hormonzugabe (Tamoxifen) induzierbare, Cre-Rekombinase kann der Zeitpunkt und durch die Verwendung eines Gewebe-/ Zellspezifischen Promotors auch der Ort der Rekombination bestimmt werden (Utomo et al. 1999, Nagy 2000).

¹ <http://cre.jax.org/strainlist.html> (21.09.2014)

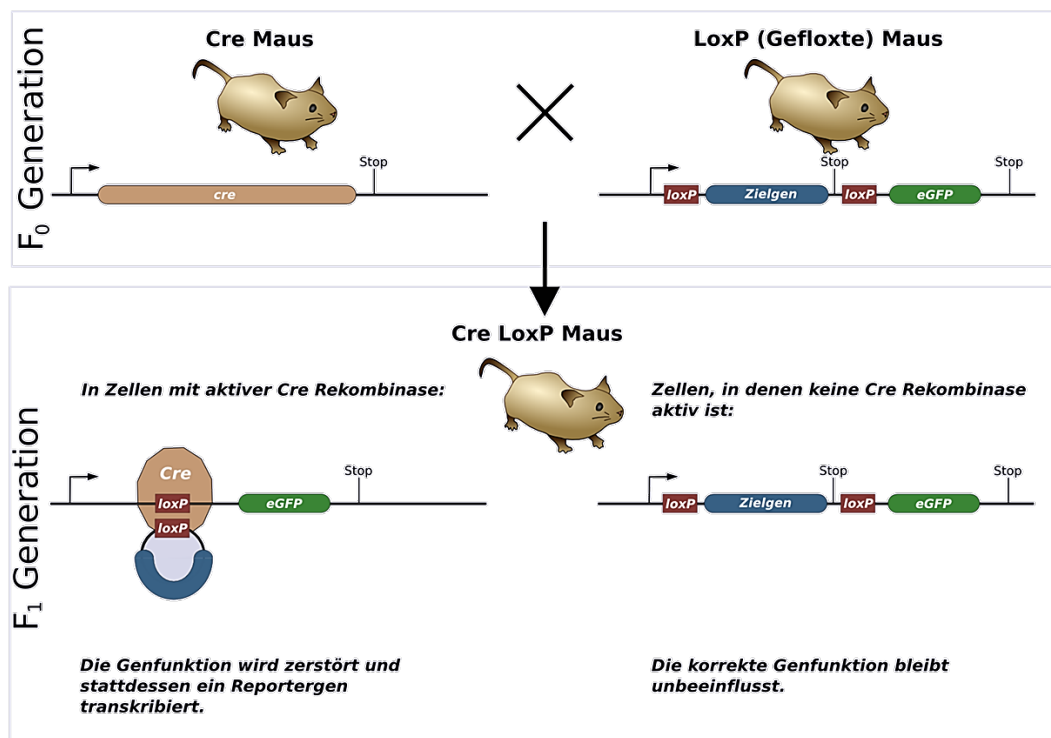


Abbildung 1-6: Das Cre/LoxP-System

Vereinfachte Darstellung des in den 1980er Jahren entwickelten Rekombinationssystems, welches sich der Cre-Rekombinase, Zielgen flankierender Erkennungssequenzen (LoxP-Sites) und einem leicht nachweisbaren Reporter gen (eGFP - enhanced green fluorescent protein) bedient. Bei einer Verpaarung der geflochtenen Maus mit einer Cre-Maus kann in der F₁-Generation das Zielgen in Zellen mit aktiver Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden. (Abbildung: Wikipedia¹)

Dem Knockout-System gegenüber steht das KnockIn-Mausmodell, welches neben der Erforschung autosomal-dominanter Erbkrankheiten auch zur Expressionsmuster-Analyse von Genen eingesetzt wird (Schmidt et al. 1998). Durch die sequenzspezifische Insertion eines Reporter gens mittels homologer Rekombination wird, im einfachsten Fall, der Leserahmen des Zielgens, in welches das Reporter gen inseriert wird, zerstört und es kann kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet werden. Durch das Einfügen des Reporter gens kann außerdem die Aktivität des authentischen Promoters analysiert werden. Außerdem wird diese Technik verwendet um transgene Organismen herzustellen. Hierbei wird z. B. ein Locus für die Rekombination ausgewählt, bei dem durch das Einfügen eines Reporter gens keine negative Auswirkung auf die Genexpression anderer Gene entsteht und der somit für die

¹ http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b7/CreLoxP_Modellversuch.png (27.08.2014)

Expression von Fremd-DNA verwendet werden kann (Soriano 1999). Das Eucomm Knockout-First-System vereint alle diese Anwendungen in einem einzigen Vektor-Konstrukt (Testa et al. 2004, Skarnes et al. 2011).

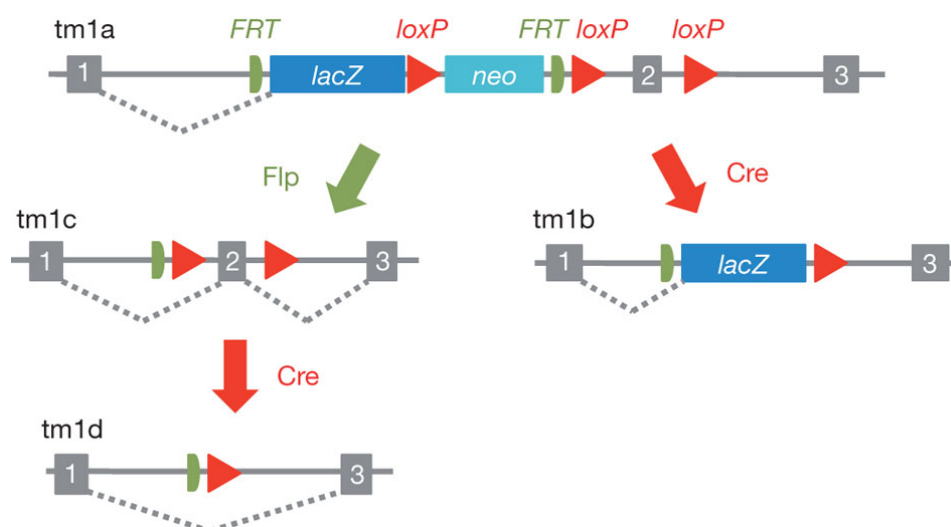


Abbildung 1-7: Das Eucomm Knockout-First konditionale Vektor-System

Schematische Darstellung des im Eucomm-Konsortium verwendeten Systems zur Generierung konditionaler Knockout-Mäuse. 1-3: Exons des Zielgens, wobei das Exon 2 bei Rekombination mit der Cre-Rekombinase herausgeschnitten wird (tm1b und tm1d). Der transkriptionelle Knockout-Ansatz tm1a ist durch die gestrichelte Linie angedeutet, welche das Spleißen der Exons repräsentiert. Durch die Rekombination mit der Flp-Rekombinase (durch eine *in vitro* Behandlung der ES mit rek. Flp-Rekombinase) kann ein eventuell letaler Phänotyp gerettet werden, da die LacZ-Reporterkassette entfernt wird (tm1c) (Aus: Skarnes et al. 2011).

Neben dem reinen konditionalen Knockout wird in diesem System ein Vektor zur homologen Rekombination eingesetzt, welcher eine LacZ-Gene-Trap-Kassette beinhaltet (siehe Abbildung 1-7) (Schnutgen et al. 2005, Osterwalder et al. 2010). Diese Kassette enthält vor einem bakteriellen LacZ-Reporter gen eine Spleiß-Akzeptor-Sequenz aus dem Engrailed 2 Gen der Maus (Gossler et al. 1989), gefolgt von einer sogenannten Internal-Ribosomal-Entry-Site (IRES), welche eine effiziente Translation des Gens am Ribosom ermöglichen soll (Kim et al. 1992). Am 3'-Ende der Kassette befindet sich die SV40-PolyA-Sequenz zur Termination des Transkriptes. Diese in ihrer Gesamtheit als transkriptionelle Gene-Trap Kassette bezeichnete Sequenzfolge ist von FRT-Sites flankiert und kann durch eine Flp/Frt-vermittelte Rekombination aus dem Genom der Maus entfernt werden, so dass nur noch die Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (loxP-sites) erhalten bleiben (siehe Abbildung 1-6 und Abbildung 1-7). Nach erfolgreicher Integration des Vektors in das Genom

einer embryonalen Stammzelle (ESC) via homologer Rekombination erfolgt ein transkriptioneller Knockout durch alternatives Spleißen der Kasette an das 5' liegende Exon des Zielgens, wobei das LacZ-Reportergen nun unter der Kontrolle des nativen Promotors des untersuchten Gens exprimiert wird. Durch Verpaarung dieser Mäuse mit einem transgenen, die FLP- oder Cre-Rekombinase exprimierenden Mausstamm kann ein Reporter-Knockout (Verpaarung mit Cre-Deleter-Stamm), ein konditioneller Knockout (Verpaarung mit FLP-Deleter-Stamm) bzw. ein klassischer Knockout erzeugt werden (Verpaarung mit FLP- und Cre-Deleter-Stamm siehe Abbildung 1-7) (Schnutgen et al. 2005, Skarnes et al. 2011).

1.3.4 Neuroglobin im Knockout-Mausmodell

Parallel zur Durchführung der praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurde eine Ngb-Knockout Maus von der Arbeitsgruppe um Christian Hundahl generiert (Hundahl et al. 2011). Im Unterschied zur weiter oben (1.3.3) beschriebenen Knockout Maus, welche auf dem Eucomm Knockout-First System basiert, ist die in der AG Hundahl generierte, Ngb-Knockout Maus ein klassischer konditionaler Knockout. Die Vorteile der frühen transkriptionellen Ngb-mRNA Abschaltung und die Integration des β -Galactosidase-Reportergens unter der Kontrolle des nativen Ngb-Promotors fehlen bei dieser Maus. Die bislang publizierten Untersuchungen der AG Hundahl am Ngb-KO Mausmodell zeigen einen kryptischen Phänotyp. So reagieren kortikale Neuronen der Ngb-KO Maus auf hypoxischen Stress zwar etwas stärker in ihrer Stress-Antwort (erhöhte cFos- und Hif1 α -Expression) als Wildtyp-Neuronen. Die Ngb-KO Neuronen zeigen jedoch keinen erhöhten Schaden nach dem Hypoxie-Stress *in vivo* (Hundahl et al. 2011). Erstaunlicherweise soll der Ngb-KO jedoch im experimentellen Schlaganfallmodell einen geringeren Schaden im Cortex im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Raida et al. 2012). Es wurde zudem in der KO-Maus eine geringe lichtinduzierte Phasenverschiebung der zirkadianen Rhythmik gezeigt, wobei die biologische Signifikanz dieses Befundes unklar bleibt (Hundahl et al. 2011, 2012a). Weiterhin wurde eine Microarray-Transkriptomanalyse von Ngb-KO und WT-Neuronen durchgeführt. Hierbei ist jedoch nicht genau aufgeführt, welche neuronale Region für die Untersuchung verwendet wurde und das Ergebnis der signifikant regulierten Gene zwischen dem KO und WT-Transkriptom wurde nicht eingehend diskutiert (Hundahl et al. 2011). Die offensichtlichen phänotypischen Merkmale wie die Fortpflanzung und Entwicklung der Ngb-KO Mäuse waren

unauffällig. Offene Fragen nach der quantitativen und qualitativen Ngb-Expression in den Regionen des ZNS sowie die Eingrenzung der putativen Ngb-Funktionen bleiben so unbeantwortet und sollen im Rahmen dieser Arbeit am Ngb-KO und transgenen Ngb-überexprimierenden Mausmodell bearbeitet werden.

1.4 Transkriptomanalysen

Transkriptomanalysen haben im einfachsten Ansatz die Bestimmung von Unterschieden in der Genexpression wie den Vergleich zwischen verschiedenen Stämmen (z. B. Wildtyp und Knockout) oder verschiedenen Wachstumsbedingungen (z. B. unterschiedliche Temperatur) zum Ziel. Als Maß für die Genexpression wird die Kopienzahl einzelner Transkripte bestimmt. Die ersten quantifizierbaren genomweiten Expressionsanalysen wurden mit der Microarray-Technologie ermöglicht (Schena et al. 1995, Lipshutz et al. 1999), welche auf Sonden-Hybridisierung und Miniaturisierung beruht. Hierbei müssen, anders als bei der SAGE- oder EST-Methode, die Zielsequenzen bekannt sein. Eine Quantifizierung ist im Gegensatz zur qRT-PCR allenfalls relativ, jedoch nicht absolut möglich. Nach Jahren der Entwicklung und Verfeinerung sind Microarrays ein etabliertes Werkzeug der Molekularbiologie und Diagnostik geworden (Reimers 2010). Es gibt zahlreiche Beispiele für den Nutzen von Transkriptomanalysen zur Ableitung neuer Erkenntnisse zur Funktion von Genen. Durch die Analyse von Transkriptomen mittels Affymetrix Microarrays konnten z. B. die Auswirkungen auf das adulte Mausgehirn im konditionalen Dicer¹ KO-Mausmodell ermittelt werden. Das Dicer-Gen spielt bei der Reifung von microRNAs eine wichtige Rolle. Durch die Transkriptomanalyse wurden zum einen vorhergehende *in vitro* Untersuchungen bestätigt, zum anderen wurden Stoffwechselwege welche mit neurologischen Erkrankungen, zellulärer Organisation und dem zellulären Haushalt assoziiert sind, als reguliert ermittelt (Dorval et al. 2012). Eine vergleichende Transkriptomanalyse verschiedener LRRK2²-KO Mausmodelle mit dem WT (das Gen LRRK2 – „leucine-rich repeat kinase 2“ kodiert für ein Protein welches im Krankheitsverlauf der Parkinson-Krankheit beim Menschen eine Rolle spielt) lieferte ebenfalls neue, bis dato unbekannte, regulierte Stoffwechselwege, welche durch das

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/192119> (27.08.2014)

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/66725> (27.08.2014)

Ausschalten dieses Genes verursacht werden. Die Annotation der regulierten Stoffwechselwege führte zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Funktion von LRRK2 in Säugetieren, zeigte jedoch auch Unterschiede in der ermittelten Genexpression zwischen mehreren untersuchten LRRK2-KO-Mauslinien (Dorval et al. 2014).

In großen Bereichen der Diagnostik und Wirkstoffforschung, bei denen bekannte Genome der Analyse zugrunde liegen und viele Zustände (z. B. durch unterschiedliche Behandlung) zu testen sind, ist diese Technologie zur Zeit noch die günstigste Methode der vergleichenden Transkriptomanalyse (Malone und Oliver 2011). Mit der Markteinführung der zweiten Generation der Sequenziertechnologien (Hochdurchsatzsequenzierung oder Next Generation Sequencing, NGS) stehen seit einigen Jahren neue Verfahren für Transkriptomanalysen zur Verfügung, die zum einen eine schnelle und kostengünstige Alternative bieten, zum anderen eine absolute Quantifizierung in bisher nicht vorstellbarer Genauigkeit ermöglichen (Liu et al. 2012). RNA-Seq ist eine moderne Form der Transkriptomanalyse, welche auf Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren (Next Generation Sequencing, NGS) basiert (Morin et al. 2008). Mit RNA-Seq wird das komplette Transkriptom des zu untersuchenden Gewebes im Shotgun-Verfahren sequenziert und im einfachsten Falle gegen das annotierte Genom des Organismus gemappt (Mortazavi et al. 2008, Wang et al. 2009). Im direkten Vergleich der beiden Plattformen wird deutlich, dass RNA-Seq eine deutlich höhere Genauigkeit in der Erfassung schwach exprimierter Transkripte aufweist (Zhao et al. 2014). Weiterhin weist die RNA-Seq Technik einen höheren Detektionsbereich auf, wodurch mehr differentiell exprimierte Gene detektiert werden können (Zhao et al. 2014). Im Gegensatz zu den etablierten Microarrays liefert die Sequenzierung auch qualitative Informationen, z. B. über die Gensequenz und die Ausdehnung der Transkripte. So lassen sich zum Beispiel Transkriptionsstartstellen (TSS) identifizieren und somit auch die ungefähre Position des Promotors eines Gens abschätzen. Da die RNA-Seq-Technik auf der direkten Sequenzierung von cDNA beruht lassen sich auch neue, vorher unbekannte Splicevarianten beschreiben, was bei der Microarray Technik nicht möglich ist. Durch ein einziges Experiment ist es möglich, potentielle neue Exons und Spliceformen zu beschreiben sowie Fusionstranskripte, allel-spezifische Expression, nichtkodierende und microRNAs zu untersuchen. Hierdurch ist RNA-Seq auch zu einem wichtigen Werkzeug bei der Untersuchung von komplexen Krankheiten geworden (Costa et al. 2013).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Expressionsmuster und die Funktion von Neuroglobin an einem transgenen Ngb-überexprimierendem Maus-Modell sowie einem Ngb-Knockout-Mausmodell untersucht werden.

1. Mit dem Tet-System, welches die ektopische Ngb-Expression *in vivo* ermöglicht, soll geklärt werden, ob Ngb wie in der Literatur beschrieben im transgenen Organismus eine gewebsunabhängige protektive Funktion ausübt. Hierzu soll Ngb im natürlicherweise Ngb-freien Gewebe der Mausleber überexprimiert werden.
 - a. *In vivo* und *in vitro* soll dann die Wirkung der Ngb-Überexpression in Kombination mit oxidativem Stress beschrieben werden.
 - b. Mittels Affymetrix-Transkriptomanalysen soll die Auswirkung der Ngb-Überexpression auf die Genexpression im Lebergewebe untersucht werden.
 - c. RNA-Seq-Expressionsanalysen von Ngb-transgenen Gehirnarealen der Maus sollen die transkriptionelle Antwort im Gehirn zeigen.
 - d. Durch einen Vergleich von Ngb-transgenen mit WT-Transkriptomen in Leber und Gehirn sollen Signal- und Stoffwechselwege ermittelt werden, die möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion und/oder molekulare Interaktionspartner von Ngb erlauben.
2. Die Herstellung einer Ngb-Knockout-Maus als ein weiteres großes Ziel der Arbeit bietet die Möglichkeit, die Funktion von Ngb *in vivo* zu untersuchen. Es soll das Eucomm Knockout-First System eingesetzt werden, um zunächst eine transkriptionale Ngb-Knockout und anschließend eine LacZ-KnockIn Mauslinie zu etablieren. Mit diesem System besteht dann die Möglichkeit, die Aktivität des nativen Ngb-Promoters der Maus mittels indirekter X-Gal Färbung zu untersuchen und die Ngb-Expressionsmuster ohne die Verwendung von Antikörpern zu beschreiben.
3. Als drittes Teilprojekt soll die wachsende Anzahl an öffentlich zugänglichen RNA-Seq Daten für eine verbesserte quantitative Charakterisierung der nativen Ngb-Expression in murinen Geweben genutzt werden. Mittels qRT-PCR und Western Blot sollen die aus diesen Analysen gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Haltung und Zucht von Mäusen

Die in dieser Arbeit verwendeten Tierstämme der Art *Mus musculus* wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz gehalten. Die Zucht und Haltung wurde unter der Aufsicht von Prof. Dr. Thomas Hankeln und Dr. med. vet. Kurt Reifenberg als S1-Projektleiter durchgeführt. In Tabelle 2-1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten und generierten Tierstämme zusammengetragen.

Tabelle 2-1: Zusammenstellung der verwendeten gentechnisch veränderten Mauslinien

Angegeben sind die Bezeichnung der Mauslinie, die genetische Modifikation (Stamm), die Inzuchtlinie (Inzuchtstamm), die Anzahl an Zuchtgenerationen (Generation) und, falls vorhanden, die erstbeschreibende Literatur (Referenz). Bei Linien ohne Generationsangabe ist diese Information nicht verfügbar oder irrelevant da diese Mauslinie nur einmal eingekreuzt/verpaart wurde.

Mauslinie	Stamm	Inzuchtstamm	Generation	Referenz
Ngb-Tet-Responder	pBI-Egfp-Ngb	FVB	12	diese Arbeit
Camk2-Tet-Effektor	CamK2a-tTA-1Mmay/j	C57Bl6/N	7	Mayford et al. 1996
R26-Tet-Effektor	KI-R26-1D rtTA	C57Bl6/J	9	Wortge et al. 2010
Ngb x Camk2	pBI-Egfp-Ngb x CamK2a-tTA	FVB x C57Bl6/N	-	diese Arbeit
Ngb x R26	pBI-Egfp-Ngb x KI-R26-1D-rtTA	FVB x C57Bl6/J	-	diese Arbeit
Ngb-Eucomm	Ngb ^{tm1a} -EUCOMM-Wtsi	BALB/c x C57Bl6/N	3	diese Arbeit
CAG-CRE ^{ERT}	Tg-CAG-CRE ^{ERT2}	C57Bl6/J	-	Hayashi and McMahon 2002
Flp-Del	Tg-hACTB-FLPe	C57Bl6/J	-	Rodriguez et al. 2000
Ella-Cre	Ella-Cre	C57Bl6/J	-	Lakso et al. 1996
Ngb-Del-LacZ	Ngb ^{tm1a} (EUCOMM)Wtsi x Tg-CAG-CRE ^{ERT2}	BALB/c x C57Bl6/NJ	3	diese Arbeit
Ngb-Del	Ngb ^{tm1a} (EUCOMM)Wtsi x Tg-CAG-CRE ^{ERT2} x Tg-hACTB-FLPe	BALB/c x C57Bl6/NJ	2	diese Arbeit

2.1.1 Generierung von transgenen und Knockout Mäusen

Die transgenen Ngb-Tet-Respondermäuse wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung in Mainz generiert. Hierzu wurde das von Dr. Sylvia Wystub hergestellte und modifizierte pINS-pBI-Plasmid verwendet (Wystub 2007). Die Injektionen des Vektors und die Zucht der Ngb-transgenen Mauslinien erfolgte in der AG Ernesto Bockamp. Zur Generierung von doppelt-transgenen Mäusen wurden transgene KI-R26-1D-rtTA-Effektor bzw. Camk2-Tet-Effektormäuse mit transgenen Ngb-Tet-Responder-Mäusen verkreuzt.

Die Mikroinjektionen zur Generierung der Ngb-Eucomm-Mauslinie der Ngb-defizienten Eucomm-Stammzellen wurden in der AG Waisman durchgeführt. Hierbei wurden die BL/6 derivierten Eucomm-ESCs (Klonnummer: EPD0339_6_F01, EPD0339_6_D02) mit intaktem Agouti-Allel in BALB/C derivierte Blastocysten injiziert und anschließend chimäre Tiere (mit einem Chimäranteil von 75 % bzw. 90 %) mit wildtypischen BL/6 Tieren verpaart. Die Zucht der Tiere und die anschließende Verpaarung mit Cre- und Flp-Rekombinase transgenen Mäusen erfolgte in der ZVTE (siehe auch Mauszucht elektronischer Anhang).

2.1.2 Genotypisierung von transgenen Mäusen

Zur Ermittlung des Genotyps der transgenen und knockout Mäuse wurde das HotSHOT Protokoll nach Truett et al. (2000) verwendet. Das benötigte Material wurde von den Tierpflegern durch Markieren der Ohren bzw. Biopsieren von Schwanzspitzen entnommen.

HotSHOT-Reagenzien:

Lysis-Reagenz: 25 mM NaOH, 0,2mM EDTA, pH 12

Neutralisierungs-Reagenz: 40 mM Tris-HCL, pH 5

Die DNA-Extraktion erfolgte für 30-60 min bei 95°C in 75 µl Lysis-Lösung. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 4°C abgekühlt und durch die Zugabe von 75 µl Neutralisierungs-Lösung auf einen pH-Wert von 7,5 neutralisiert. Jeweils 2,5 µl der DNA-haltigen Lösung wurden für einen PCR Ansatz von 25 µl verwendet.

Multiplex PCR-Ansatz:

12,5 µl Maxima Hot Start Master Mix (Thermo Fisher Scientific)

1-4 µl Primer (1 bis 3 Paare)

6-9 µl H₂O

2,5 µl Template-DNA

25 µl Gesamtansatz

Die PCR-Reaktionen wurden nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf 1,5%igen nativen Agarosegelen. Details aller Genotypisierungsansätze sind dem elektronischen Anhang (siehe 7.1) zu entnehmen.

2.1.3 Modulation des Tet-Systems

Die Modulation des Tet-Systems bei transgenen Mäusen erfolgte durch die orale Aufnahme von in Trinkwasser gelöstem Doxycyclin, welches mittels einer dunklen Trinkflasche *ad libitum* verabreicht wurde. Die Abschaltung der Ngb-Überexpression im Tet-off System der Ngb x CamK2 Mauslinie erfolgte mit einer 20 µg/ml haltigen Doxycyclin Lösung mit 1% (w/v) Saccharose über einen Zeitraum von bis zu fünf Wochen (Krestel et al. 2001). Zur Aktivierung der ektopischen Ngb-Überexpression im Tet-on System der Ngb x R26 Mauslinie wurde den Versuchstieren eine 7,5 mg/ml Doxycyclin-haltige Lösung mit 1% (w/v) Saccharose über einen Zeitraum von zwei Wochen verabreicht (Wortge et al. 2010).

2.1.4 Aktivierung der CRE^{ERT} Rekombinase

Zur Induktion der CRE^{ERT}-vermittelten Rekombination wurde den geflochten Tieren (Abbildung 3-18) ein kommerziell erhältliches Tamoxifen-haltiges (400 mg/kg TAM) Futter verabreicht (CreActive TAM400, Fa. Lasvendi). Die Induktion erfolgte über einen Zeitraum von ca. 4 Wochen wodurch die vollständige Rekombination gewährleistet werden sollte (Kiermayer et al. 2007).

2.1.5 Präparation von murinen Organen und Geweben

Zur Entnahme der Organe wurden die Mäuse, nach einer kurzen Betäubung mit CO₂, mittels überstrecken der Halswirbelsäule getötet. Die entnommenen Organe und Gewebe wurden in Eppendorfgefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.6 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde das Gewebe auf Trockeneis auf einem Objekthalter (MEV Kryostat - Slee Medical, Mainz) mit Einbettmedium (GSV1, Slee Medical) fixiert. Anschließend wurde das Gewebe bei -20-24°C in 12 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträgern (Super Frost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific) über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Herstellung primärer Hepatozyten Zellkultur

Primäre Hepatozyten wurden jeweils von einer Ngb-transgenen (Ngb x R26) und einer einfach transgenen „wildtypischen“ Maus (Wurfgeschwister) nach einer zwei wöchigen Doxycyclin Behandlung (siehe 2.1.3) isoliert. Hierzu wurden die Mäuse mit einer 0,05% Collagenase-Lösung perfundiert und die Lebern anschließend mechanisch zerkleinert. Jeweils ca. 30 g Hepatozyten wurden in Dulbecco's Medium mit 10% fetalem Kälberserum aufgenommen in 6-Well Platten ausplattiert. Nach 24h wurde das Medium gewechselt (0,2% fetales Kälberserum) und die Induzierung der Apoptose erfolgte durch Zugabe von Jo2 (50 ng/ml – 500 ng/ml) ins Medium. Nach 18,5h erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate durch Messung der Caspase-Aktivität (2.2.3) und TUNEL-Assay (2.2.2).

2.2.2 Zellviabilität-Assays an primären Hepatozyten

Zur Ermittlung des Apoptose-Rate wurde 18,5h nach der Jo2-Behandlung das „DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System“ (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Ermittlung der allgemeinen Zellviabilität (ATP-Gehalt der Zellen) wurde das Celltiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3 Caspase Aktivitäts-Assays

Die Aktivität der Caspasen als Maß für die Aktivierung der Apoptose wurde mit Caspase-Glo Assays (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Gesamtproteinextraktion aus Mausgeweben

Die Proteinextraktion aus Geweben erfolgte mit modifiziertem Ripa-Puffer.

Ripa-Puffer - modifiziert (für Western Blot-Extrakte):
10 mM Tris, 1 mM CaCl₂, 0,5% NP-40, 0,5% Desoxycholsäure,
0,1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 25 mM β -Glycerophosphat, pH 7,4
aliquotieren und bei -20 °C lagern

Hierbei wurden pro mg Gewebe (gesamt ca. 30-40 mg) 5 μ l 100°C heißer Ripa-Puffer zugegeben, die Probe wurde anschließend auf Eis gestellt. Zur Inhibierung von Proteasen erfolgte die sofortige Zugabe eines Protease Inhibitors (cOmplete ULTRA Tablets, Roche) nach Angaben des Herstellers. Der Zellaufschluss und die Degradierung der Nukleinsäuren erfolgten durch Ultraschallbehandlung mit einem Sonifikator (Branson Sonifier Cell Disruptor B15) in kurzen 5x 3 Sekunden-Intervallen, wobei die Proben auf Eis gekühlt wurden. Die Zelltrümmer aus den Proteinproben wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt. In einer kühlbaren Zentrifuge (Himac CT15RE, Hitachi) bei 4°C und 14.0000 g wurden die Proben 2 bis 3 mal jeweils 30 min lang zentrifugiert. Nach jedem Intervall wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und das Pellet verworfen, bis ein klarer Überstand überführt werden konnte. Nach erneuter Zugabe von Protease Inhibitor wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die so hergestellten Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit unterschiedlichen Methoden. Zum einen wurde die Konzentration der Gesamtproteinextrakte mit dem Bradford-Assay (Bradford 1976) zum anderen mit dem alternativen BCA-Assay (Smith et al. 1985) ermittelt.

2.2.5.1 Bradford-Assay

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte mit dem Farbstoff Roti-Quant (Roth) nach Angaben des Herstellers. Die Messungen wurden in Mikrotiterplatten in Doppelbestimmung durchgeführt und auf eine BSA-Verdünnungsreihe (Bovine Serum Albumin) von 20-100 µg/ml normiert. Die Detektion erfolgte im µQuant-Spektrophotometer (BioTek Instruments). Die Auswertung der Daten wurde in Excel (Office-Paket, Microsoft) durchgeführt.

2.2.5.2 BCA-Assay

Die Konzentrationsbestimmung mit dem BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Analog zum Bradford Assay wurden die Proben in Doppelbestimmung pipettiert und die Konzentration im Photometer (µQuant-Spektrophotometer, BioTek Instruments) ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel (Office-Paket, Microsoft).

2.2.6 Verwendete Antikörper

In der nachfolgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper aufgeführt. Als sekundäre Antikörper wurden für die jeweilige Anwendung zum Wirt passende sekundäre Antikörper mit der jeweils nötigen Konjugation (Fluoreszenz-Farbstoff für IHC, HRP für WB) verwendet.

Tabelle 2-2: In der Arbeit verwendete primär Antikörper

Neben dem Hersteller des primären Antikörpers ist das zur Immunisierung verwendete Immunogen und die jeweilige Wirtsspezies angegeben.

Antikörper	Hersteller	Immunogen	Wirt
anti-Ngb	Sigma Aldrich N7162	Humanes Ngb-Peptid 55-70 KLH	Kaninchen, polyklonal
anti-Ngb Serum	S. Mitz SA 4758	Humane Ngb-Peptide 138-151 EPO und 55-70 EPO	Kaninchen, polyklonal
anti-Ngb	Santa Cruz (E16) SC-22001	Humanes internes Peptid	Ziege, polyklonal
anti-β Aktin	Sigma Aldrich A2066	C-Terminal Aktin Fragment (C11)	Kaninchen, polyklonal
anti-β Galactosidase	Abcam ab616	Rec. E.coli β-Galactosidase	Kaninchen, polyklonal

2.2.7 Diskontinuierliche Glycin SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli 1970) wurde für die Auftrennung der Gesamtproteinextrakte verwendet. Als kommerzielles System kam das Mini-PROTEAN® 3 Cell-System (Biorad) zum Einsatz.

Es wurden zunächst 1 mm dicke Polyacrylamidgele hergestellt. Vor dem Gießen der Gele wurden die beiden Glasplatten der Gekassetten mit 70%igem Ethanol gereinigt und nach Angaben des Herstellers zusammengebaut. Gele für eine diskontinuierliche SDS-PAGE bestanden aus einem Trenngel (12% Acrylamid) und einem Sammelgel (6% Acrylamid).

TG=Trenngel; SG=Sammelgel	12% TG	6% SG
30% Acrylamid mit BIS (0,8%) (Rotiphorese, Roth)	3200 µl	800 µl
4x Trenngelpuffer	2000 µl	-----
4x Sammelgelpuffer	-----	1000 µl
VE-H ₂ O	2754 µl	2177 µl
TEMED	6 µl	3 µl
APS	40 µ	20 µl

Menge ausreichend für zwei Gele.

4x SDS-Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8

4x SDS-Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8

Die Gellösungen wurden in einem 50 ml Falcongefäß angesetzt und die radikalische Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet. Das Trenngel wurde während der Polymerisation (ca. 30 min) mit 60%igem Isopropanol überschichtet. Anschließend konnte das Sammelgel über das Trenngel gegossen und der Kamm für die Geltaschen eingesetzt werden. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Sammelgels wurde es entweder direkt beladen oder zur Lagerung bei 4°C in ein feuchtes Tuch eingewickelt.

Vor der Beladung des Gels wurden die Proben 1:1 mit Lämmli-Puffer versetzt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Das Gel wurde nach Anleitung des Herstellers in die Kammer eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 110 V gestartet. Sobald die Lauffront der Proteine die Grenze zum Trenngel überschritten hatte, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Als Molekulargewichtsmarker wurde stets eine Spur des Gels mit 2 µl der PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific) beladen.

10x Elektrophoresepuffer: 250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS, pH 8,4
2x Lämmli-Puffer: 125 mM Tris, 4% SDS, 20% Glycerol, 10% β-Mercaptoethanol,
2 mM EDTA, 0,04% Bromphenolblau, pH 6,8 mit HCl einstellen.

2.2.8 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE (siehe 2.2.3) wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Dazu wurde das Gel ca. 15 min, die Nitrocellulose Membran 5 min in Tank-Blotting Puffer äquilibriert. Der Blotaufbau erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Vor dem Zusammensetzen wurden auch die Fiber-Pads und das Filterpapier jeweils mit Tank-Blotting Puffer getränkt und der Blotaufbau mit dem Eisblock in die Kammer eingesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 100 V und 350 mA für 60 min. Eine anschließende Prüfung des Proteintransfers wurde durch eine Ponceau S-Färbung der Membran (siehe 2.2.8.2) ermöglicht.

Die Membran wurde anschließend für eine Stunde in 5% (w/v) NFDM in PBST inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und anschließend in selbiger Lösung mit primärem Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 2x kurz mit PBST gespült, es folgten ein 30-minütiger sowie drei 10-minütige Waschschr

PBST. Danach wurde die Membran für 60 min bei RT mit sekundärem Antikörper (ECL anti-rabbit, HPR-linked) in PBST inkubiert. Darauf folgend wurde wieder wie oben beschrieben gewaschen. Es folgte die ECL-Detektion in der Dunkelkammer (siehe 2.2.9).

Tank-Blotting Puffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3

PBS: 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7,5

PBST: PBS + 0,2% Tween 20

2.2.8.1 Stripping von Nitrozellulose-Membranen

Zur wiederholten Inkubation einer Membran mit Antikörpern wurde ein Stripping der Membran durchgeführt, wobei gebundene Antikörper der vorhergehenden Inkubationen entfernt werden (Kaufmann et al. 1987). Zum Strippen wurde die Membran mit Stripping Puffer bedeckt und bei RT auf einem Schüttler (VXR basic IKA-Vibrax, IKA) für 2x 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2x 10 min mit PBS und 2x 5 min mit PBST gewaschen. Nach dem Stripping konnte die Membran wieder mit primärem Antikörper inkubiert werden (siehe 2.2.8).

Das Stripping wurde bis zu 6 mal wiederholt. Da die Behandlung mit Stripping Puffer auch immer einen Verlust der direkt an der Membran gebundenen Proteine zur Folge hat, wurde nach mehr als 6 Wiederholungen keine Detektion mehr durchgeführt.

Milder Stripping-Puffer (Abcam): 200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 8 mM Tween20, pH 2,2

2.2.8.2 Ponceau S-Färbung

Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose Membran per Western Blot wurde durch eine Ponceau S-Färbung (Salinovich und Montelaro 1986) überprüft. Bei der Färbung werden alle Proteinbanden ab einer Konzentration von 200 ng pro Bande reversibel angefärbt (Harper und Speicher 2001). Die Membran wurde mit der Ponceau S-Lösung bedeckt und 15 min bei RT auf einem Schüttler (VXR basic IKA-Vibrax, IKA) inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit VE-H₂O solange abgewaschen bis die Membran wieder entfärbt war und nur die Proteinspuren erkennbar blieben. Die Dokumentation erfolgte mit einem Scanner (Epson Perfection 2400 Photo). Die vollständige Entfärbung der Proteinbanden geschah während der Inkubation mit primärem Antikörper.

Ponceau S-Färbelösung: 0,2% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure bei 4°C lichtgeschützt lagern.

2.2.9 ECL-Detektion

Die ECL-Detektion des Antikörpersignals erfolgte in der Dunkelkammer.

ECL-Reagenzien:

Lösung A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1M Tris, pH 8,6, lagern bei 4°C.

Lösung B: 11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO, dunkel lagern bei RT.

ECL-Lösung: 4 ml Lösung A, 1 µl H₂O₂-37%, 400 µl Lösung B.

Nach 2minütiger Inkubation der abgetrockneten Membran in der ECL-Lösung wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Expositions-kammer mit einem Film (BioMax Light Film Kodak) geeigneter Größe eingelegt. Nach abgeschlossener Filmexposition wurde der Blot in PBS überführt. Wenn nötig wurde die Membran trocken bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3 Immunhistologische Methoden

2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Die Gefrierschnitte wurden vor der Färbung eine Stunde lang aufgetaut um Gewebsartefakte durch Kondenswasser zu vermeiden. Die Fixierung der Schnitte erfolgte auf den Objektträgern für 10 min bei RT mit 4%igem [v/v] Paraformaldehyd oder in Küvetten mit -20°C kaltem Aceton:Methanol [1:1] Gemisch. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) für jeweils 10 min wurde mit PBS/FCS 10% [v/v] (Fetales Kälberserum) für 20 min geblockt und anschließend der in der Blockierungslösung verdünnte Primärantikörper aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei 10 minütige Waschschriffe in 1x PBS. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur in einer feuchten, dunklen Kammer für eine Stunde mit einem Fluoreszenz-markierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten drei 10 minütige Waschschriffe in 1x PBS und eine Färbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid-Hydrat).

DAPI-Lösung: 0,5 µg/ml DAPI in 1x PBS/FCS 10%.

Zur Kernfärbung wurde die DAPI-Lösung direkt auf den Schnitt gegeben und 10 min in der feuchten, dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Präparate dreimal für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen und in Einbettmedium eingedeckelt.

Einbettmedium: Tris-HCl 1 M pH 8,0: 200 µl, H₂O: 800 µl, Glycerin: 86% 9 ml und DABCO (1,4-diazobicyclo(2,2,2)octane) 0,233 g

2.3.2 X-Gal Färbung von Kryoschnitten

Zum immunhistologischen Nachweis der β-Galactosidase Aktivität in LacZ-KnockIn-Geweben wurden Färbungen mit dem β-Galactosidase Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) durchgeführt. Die Schnitte wurden in einer 0,5%igen Glutaraldehyd-Lösung (1x PBS und 2 mM MgCl₂) für 15 min fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 3x 5 min in 1x PBS mit 2 mM MgCl₂ gewaschen und über Nacht (ca. 16h) bei 37°C mit 1 mg/ml X-Gal in Reaktionspuffer gefärbt.

X-Gal Reaktionspuffer: 1xPBS, 35 mM K₄Fe(CN)₆, 35 mM K₃Fe(CN)₆, 2 mM MgCl₂, 0,02% Nonidet P-40

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit 1xPBS gewaschen 5x 5 min und die Zellkerne mit Neutralrot (Roth) für 10 min gegengefärbt. Abschließend wurde 2x 5 min mit 1x PBS gewaschen und in 70% Glycerin eingedeckelt.

10x PBS (pH 7,4): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Gesamt-RNA Präparation

Die Gesamt-RNA aus Mausgewebe wurde mit dem RNeasy oder RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) extrahiert. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers inklusive des optionalen DNase-Verdau.

2.4.2 Gesamt-RNA Quantifizierung

Die Qualität und Konzentration der Gesamt-RNA wurde photometrisch mit dem NanoDrop (ND 1000, Thermo Scientific) oder mittels RNA-spezifischer Farbstoffe mit dem Qubit (Qubit 1.0, Life Technologies) bzw. dem Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) überprüft. Direkt nach der Extraktion wurde die RNA Konzentration zunächst mit dem NanoDrop bestimmt. Das Verhältnis der Absorptionen 260/280 nm liefert eine Aussage über die Verunreinigung der RNA mit Proteinen und organischen Stoffen. Ein Wert von $\sim 2,0$ entspricht reiner RNA, die wenig mit Proteinen und z. B. Phenolen verunreinigt ist. Das Absorptionsverhältnis bei den Wellenlängen 260/230 nm liegt bei reiner RNA im Bereich von $\sim 1,8-2,2$. Ein bedeutend kleinerer Wert deutet hier auf eine Verunreinigung der Probe mit Ethanol oder ähnlichen Stoffen hin (Wilfinger et al. 1997).

Für eine Quantifizierung mittels Bioanalyzer wurde eine Verdünnung der Gesamt-RNA Extrakte auf ca. 300 ng/ μ l hergestellt. Zur Qualitätsbeurteilung der Gesamt-RNA wurden die verdünnten Extrakte mittels des RNA 6000 Nano Kit nach Anleitung des Herstellers quantifiziert. Neben den Konzentrationen wurde somit auch ein Qualitätswert (RIN - RNA Integrity Number) für die untersuchten Nukleinsäuren ermittelt. Dieser ermöglicht die Beurteilung der Integrität der RNA auf einer Skala von 1= vollständig degradiert bis 10=keine Degradierung Messbar (Schroeder et al. 2006). Ausgehend von diesen Konzentrationswerten wurde die cDNA-Synthese angesetzt. Bei geringen Konzentrationen (<5 ng/ μ l) der RNA und zur Überprüfung der Messergebnisse wurde auch eine Quantifizierung mit dem Qubit RNA Assay-Kit (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.3 cDNA-Synthese

Die Erststrang cDNA-Synthese wurde mit der „SuperScript III“ (Life Technologies) reversen Transkriptase durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde jeweils 1 μ g Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Erststrang-Synthese wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und bei -20°C gelagert.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR, ein von Kary Mullis (Mullis et al. 1986) entwickeltes Verfahren zur selektiven Amplifizierung von Nukleinsäuren, wurde mit der TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten sind den jeweiligen Primern beigefügt (siehe 7.1). Es wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt wobei die Template-DNA durch HPLC-H₂O ersetzt wurde.

Standard PCR-Ansatz:

5 µl 10xTaq-Puffer

4 µl MgCl₂ (25 mM)

1 µl dNTPs (10 mM)

Je 1 µl Primer

0,25 µl TrueStart Taq (5 U/µl)

variabel - H₂O

variabel - Template-DNA

50 µl Gesamtansatz

2.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) oder dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden abweichend der Anleitung in 30-50 µl HPLC-H₂O eluiert.

Bei PCR-Produkten für eine Direktsequenzierung wurde mit der ExoSAP-Methode (Exo-Exonuklease I, SAP- Shrimp Alkaline Phosphatase) aufgereinigt (Hanke und Wink 1994). Pro PCR-Reaktion (Vol. 25 µl) wurden hierfür 6 µl der ExoSAP-Lösung (2,25 µl Exonuklease I (NEB, 20 U/µl), 9 µl SAP (Roche, 1 U/µl), 48,75 µl HPLC-H₂O) eingesetzt und die Proben im Thermocycler für 25 min bei 37°C, anschließend für 15 min bei 72°C inkubiert.

2.4.6 Analytische DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese der Proben wurde in vertikalen GENTERphorese-Gelkammern (GENTERprise, Mainz) durchgeführt. Als Spannungsgerät wurde das CONSORT E844

(CONSORT, Tornhout, Belgien) verwendet. Der Agaroseanteil der Gele betrug 0,8-2,5% in 1x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA Puffer = 1x TBE: 90 mmol/l Tris, 90 mmol/l Borsäure, 1,25 mmol/l Na₂EDTA). Vor dem Beladen wurden die Proben mit 1/6 Volumen Loading Dye Solution (Fermentas) versetzt, als Größenmarker diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Der Gellauf erfolgte bei 150 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele ca. 2 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml in 1x E-Puffer: 36 mmol/l TRIS, 30 mmol/l NaH₂PO₄ x 2 H₂O, 10 mmol/l Na₂EDTA) gefärbt und anschließend kurz in Wasser gewaschen. Die fotografische Dokumentation erfolgte unter Verwendung eines Transluminators (312 nm, IL-200-M, H. SAUR Laborbedarf, Reutlingen), einem „Image Documentation System CS1“ (Cybertech, Berlin) und einer Digitalkamera (Olympus Camedia, C-785 Ultra Zoom).

2.4.7 Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung von DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (absolut) und 0,1 Volumen 10x Dialysepuffer. Die DNA wurde 45 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 70%igem Ethanol 15 min bei 14.000 rpm und RT gewaschen und in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) getrocknet. Die so gefällte DNA wurde in ein gewünschtes Volumen HPLC-Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Dialysepuffer (10x): 3 M NaCl, 0,25 M Tris, 0,1 M Na₂EDTA,
ad 1000 ml H₂O, pH 7,6, autoklavieren

2.4.7.1 Primerdesign

Für eine spezifische PCR mit einer hohen Effizienz wurden beim Primerdesign, wenn möglich, folgende Kriterien eingehalten:

- Schmelzpunkt der Primer etwa 60°C
- Länge der Primer etwa 20 Nukleotide
- AT-Gehalt der Primersequenz etwa 50%

Homopolymere und Palindrome innerhalb der Primersequenzen wurden vermieden um die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren (Cut off Delta G ≥ -10kcal/mol) zu vermeiden. Die

Kriterien des Primerdesigns wurden mit den Online Tools Oligocalc¹ und Oligoanalyzer² überprüft. Die Spezifität wurde durch eine Blast-Suche gewährleistet.

2.4.7.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine modifizierte Form der von Kary Mullis entwickelten PCR, bei der die entstehenden Amplifikate in jedem PCR-Zyklus detektiert werden. Als Matrize dienen cDNAs, welche durch eine reverse Transkription gleicher Mengen Gesamt-RNA aus den zu vergleichenden Geweben generiert wurden (siehe 2.4.3). Am Ende eines jeden Zyklus wird die proportional zur DNA-Menge ansteigende Fluoreszenz detektiert und kann anschließend über eine Grafik und anhand von parallel mitgeführten Verdünnungsstandards, also bekannter DNA-Mengen, quantifiziert werden. Die Detektion der Amplifikate in der vorliegenden Arbeit wurde durch den DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green ermöglicht, welcher sich im verwendeten qPCR-MasterMix befindet. Als Detektionssystem wurde das 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Life Technologies) verwendet. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde stets mit einem Mastermix (Alle PCR-Reagenzien ohne Template) und Duplikaten bzw. Triplikaten einer Probe gearbeitet.

Standard qRT-PCR-Ansatz:

5 µl 2x Master Mix

Je 0,3 µl Primer

variabel - H₂O

variabel - Template-DNA

10 µl Gesamtansatz

Die Auswertung und Normalisierung der absoluten Kopienzahlen auf ein ausgewähltes Referenzgen erfolgten in Excel (Microsoft). Die Normalisierung der absoluten Kopienzahlen

¹ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> (27.08.2014)

² <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> (27.08.2014)

auf 1 µg Gesamt-RNA und auf das jeweils mitgemessene Referenzgen wurde nach Anleitung des geNorm¹ VBA applets durchgeführt (Vandesompele et al. 2002).

2.4.8 TA-Klonierung mittels pGEM-T Easy System

Die TA-Klonierung nutzt die Tatsache aus dass die Taq-Polymerase eine Template unabhängige Syntheseaktivität aufweist wodurch der Großteil aller PCR-Produkte ein Adenin am 3'Ende aufweisen. Durch die Verwendung von linearisierten Plasmiden mit Thymin-Nukleotidüberhängen kann ohne eine vorhergehende Restriktion ein PCR-Produkt ligiert werden (Holton und Graham 1991).

Die Ligation aufgereinigter PCR-Produkte erfolgte ausschließlich in das pGEM-T Easy-Vektorsystem (Promega) nach Angaben des Herstellers. Pro Ligationsansatz (Gesamtvolumen 10 µl) wurden 10 ng (1 µl) pGEM-T Easy Vektor eingesetzt. Es wurde 1 µl 10x Ligationspuffer und 5 Weiss Units (1 µl) T4 DNA-Ligase (Fermentas) eingesetzt. Das restliche Reaktionsvolumen(7 µl) bestand aus aufgereinigtem PCR-Produkt. Der Ligationsansatz wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.4.9 Transformation, Blau-Weiß-Selektion und Plasmidpräparation

Die Transformation der Ligationsansätze erfolgte mittels Elektroporation. Zunächst wurde eine Transformationsküvette für ½ h mit UV-Licht sterilisiert, um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden. Es wurden jeweils 1-2 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl kompetenter *E.coli* Bakterien gemischt und in gekühlte Küvette gegeben. Nach etwa 1 Minute wurde die Küvette in das Elektroporationsgerät überführt und die Transformation durch einen 2500 Volt starken Elektroschock durchgeführt. Die Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Ruhephase konnten die transformierten Bakterien (ca. 100-200 µl) auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen werden.

¹ <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/> (27.08.2014)

LB-Medium:

Trypton: 10 g, Hefeextrakt: 5 g, NaCl: 5 g, H₂O: 1 l,
lösen, abfüllen, autoklavieren

Das zur Klonierung von PCR-Produkten verwendete pGEM-T Easy-System ermöglicht eine Identifizierung rekombinanter Konstrukte über α -Komplementation. Diese Methode ist erstmals 1967 beschrieben worden (Ullmann et al. 1967). Hierzu wurden X-Gal- und IPTG-enthaltende Agarplatten verwendet und ausplattierte Klone, die kein Insert trugen, und somit über ein intaktes β -Galaktosidase-Gen verfügen konnten X-Gal zu Galaktose und einem blauen Indigo Farbstoff umsetzen. Bei Klonen mit Insert war der ORF des Gens sehr wahrscheinlich zerstört oder so weit auseinandergeschoben, dass X-Gal nicht umgesetzt werden konnte und diese durch ihre weiße Färbung klar zu identifizieren waren (Sambrook und Russell 2001).

Zur Isolierung der Plasmide wurde zunächst eine Übernach-Kultur hergestellt. Je nach Resistenzgen des verwendeten Plasmids wurde das entsprechende Antibiotikum in 5 ml LB-Medium gegeben. Dann wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und 12-16 Stunden lang bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Antibiotikakonzentrationen für Ü.N-Kulturen:

Ampicillin 100 μ g/ml

Tetracyclin 15 μ g/ml

Chloramphenicol 100 μ g/ml

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen beruht auf dem Prinzip der schnellen alkalinen Lyse der Bakterienzellen und anschließender DNA-Bindung an Silikasäulchen (Sambrook und Russell 2001). Hierzu wurden kommerzielle Kits verwendet und die Plasmid-DNA nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.4.10 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine von Southern (1975) entwickelte Methode zur Detektion eines DNA-Restriktionsfragmentes, welches über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einem Blot immobilisiert wird. Mit dieser Technik kann eine spezifische DNA-Sequenz ohne

vorhergehende Amplifizierung durch die Hybridisierung mit einer markierten Sonde im Genom nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Southern Blot-Technik zur Verifizierung der homologen Rekombination im *Ngb* Locus jener embryonalen Stammzellen eingesetzt, welche zur Generierung des *Ngb*-KO Mausstammes verwendet werden sollten.

2.4.10.1 Generierung einer *Ngb*-Knockout spezifischen Sonde

Die Lage der *Ngb*-KO-Sonde wurde so gewählt, dass nach Behandlung des Mausgenoms mit dem BamHI Restriktionsenzym anhand der Größe des betreffenden Restriktionsfragments eindeutig zwischen der wildtypischen und der gewünschten rekombinanten Situation des *Ngb*-Locus im Mausgenom (Chr.12 87.097.531 - 87.102.539) unterschieden werden konnte (siehe Tabelle 2-3). Um ein Template für die Sondenmarkierung zu gewinnen, wurde aus dem Genom der putativ mittels Eucomm-Vektorsequenzen modifizierten embryonalen Stammzellen heraus ein Bereich zwischen Intron 1 von *Ngb* und einer Sequenz des integrierten *En2* (*Engrailed2*)-Gens mittels PCR (Tabelle 2-2) amplifiziert (Abbildung 2-1).

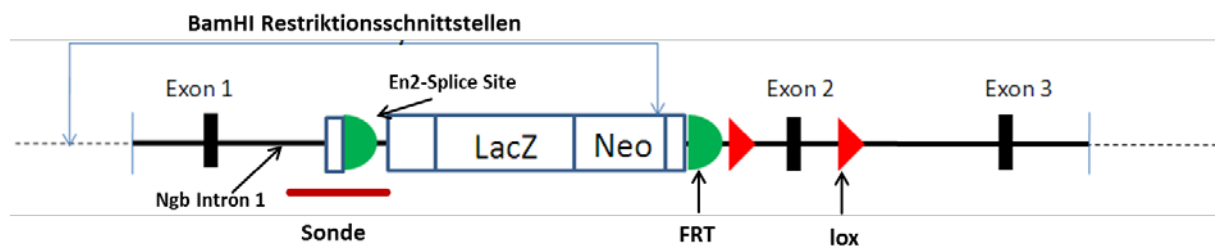


Abbildung 2-1: Lage der *Ngb*-Knockout-spezifischen Sonde für den Southern-Nachweis

Dargestellt ist die Lage der Sonde (740 bp) im *Ngb*-KO Locus im Bezug zu den BamHI-Restriktionsschnittstellen. Da durch den Vektor eine zusätzliche BamHI-Erkennungssequenz eingebracht wurde, kann durch die Hybridisierung mit dieser Sonde zwischen dem wildtypischen (Abstand BamHI Erkennungssequenzen: 14.490 bp) und dem rekombinierten Locus (Abstand: 8.371 bp) unterschieden werden. Details siehe Abbildung 3-17.

Tabelle 2-3: Primer für die Sondengenerierung

Für die beiden Primer zur Sondengenerierung sind Sequenz, Schmelztemperatur, Länge und Lage im von Eucomm bereitgestellten Ngb-KO Vektor angegeben (Vektorsequenz im elektronischen Anhang).

Primername	Sequenz	Temp °C	Lage im Vektor	Amplikon
5_Sonde_KO_for	GCC TGC TGG TTT TCA GCT TC	60°	14804-14823	740bp
5_Sonde_KO_rev	GGC AGT AGA GTT CCC AGG A	60°	15524-15542	

Das so generierte Amplifikat wurde anschließend über TA-Klonierung in das pGEM-T Easy Vektorsystem eingebracht (Klon: ES-KO-5'-Sonde-pp3, siehe 2.4.8). Nach Bestätigung der Sequenz von Plasmid und inkloniertem Amplifikat (Insert) wurde dieses Konstrukt als PCR-Template für die Sondengenerierung verwendet (siehe 2.4.9, 2.4.4). Durch die Klonierung und die damit einhergehenden Reinigungsschritte wird eine Kontamination des PCR-Template durch murine DNA (vor allem repetitive) verhindert. Nach Amplifikation des Inserts mittels PCR wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und als Template für die folgende radioaktive Markierung der Sonde (siehe 2.4.10.2) verwendet.

2.4.10.2 Radioaktive Markierung der DNA

Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgte im Isotopenlabor unter Einhaltung der vorgegebenen Sicherheitsrichtlinien. Als Template für die Markierung mit dem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche) dienten 11 µl aufgereinigte Sonde aus Schritt 2.4.10.1, welche 10 min bei 95°C denaturiert wurde. Es wurden jeweils 1 µl dGTP, dCTP und dTTP, 2 µl Reaktionspuffer mit Hexamerprimern, 3 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 µCi/µl) und 1 µl Klenow-Enzym zugegeben. Die Reaktion wurde 2 h bei RT inkubiert und anschließend durch Fällung aufgereinigt (Feinberg und Vogelstein 1983).

Die Fällung der nun radioaktiv markierten Sonde erfolgte durch Zugabe von 160 µl H₂O, 20 µl Dialysepuffer (10x) und 400 µl EtOH abs. für 30 min bei -20°C und anschließender Zentrifugation bei 5000 rpm für 30 min. Das Pellet wurde anschließend mit 70% EtOH gewaschen und die Radioaktivität des Pellets und der beiden Überstände überprüft. Das radioaktiv markierte Pellet wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und mit 100 µl Carrier-DNA (*E. coli* 50 µg) bei 95°C für 10 min denaturiert. Anschließend wurde die markierte Sonde in

15 ml 1x Präinkubationsmedium (3xSSC, nach (Denhardt, 1966)) mit 0,5% SDS aufgenommen und auf den Blot in die Hybridisierungsröhre gegeben (siehe 2.4.10.6).

2.4.10.3 Isolierung genomischer Maus-DNA aus embryonalen Stammzellen

Die DNA-Isolierung erfolgte klassisch in folgenden Schritten: Kernlyse, Extraktion der Proteine, Ethanol-Fällung der DNA und Lösen der DNA, nach einem Protokoll erstmals beschrieben von Stafford und Kollegen (Blin und Stafford 1976). Da die Isolation aus Zellkultur-Zellpellets erfolgte, konnten der mechanische Gewebeaufschluss und die Kernisolation entfallen.

Die Zellpellets wurden in 3 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer vorsichtig mit der Pipette resuspendiert und im 15 ml Falcon abzentrifugiert (3500 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgehoben und verworfen, das Pellet wurde erneut 2 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer resuspendiert. Für die Zell- und Kernlyse wurde eine Spatelspitze Proteinase K (Roth) sowie 1/10 Vol. 10% SDS und 1/10 Vol. 10x Dialysepuffer hinzugegeben. Die Lösung wurde durch Invertieren vorsichtig gemischt. Nach ca. 2 h Proteinase K-Verdau bei 60°C wurde der pH-Wert durch die Zugabe von 0,1 Vol. gesättigtem Tris eingestellt. Nach der Zugabe von 0,25 Vol. 5 M NaClO₄ und gleichem Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) wurde die Probe 10 min bei 5000 rpm und RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange mit dem Überstand wiederholt bis die obere, wässrige Phase klar war (in der Regel 2-3 Mal). Zuletzt wurde die wässrige, DNA-enhaltende Phase mit einer Mischung aus Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt, um die Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen. Die enthaltene DNA wurde anschließend mit 1/10 Vol. 10x Dialysepuffer versetzt und dann mit 2,5 Vol. kaltem Ethanol abs. bei -20°C gefällt (5000 rpm, 30 min, -20°C). Um überschüssige Salze zu entfernen wurde das DNA-Pellet mehrmals mit einer 70%igen Ethanol-Lösung gewaschen und schließlich in HPLC-H₂O gelöst.

Puffer zur DNA Extraktion:

Homogenisierungspuffer: 58 g Saccharose; 10 ml 0,1 M Na₂-EDTA pH 7,4;
2,5 ml 0,1 M Na₂-EGTA pH 7,4; 50 ml Puffer A (10x); auf 500 ml auffüllen mit H₂O
Puffer A (10x Stock): 150 ml 2 M KCl; 37,5 ml 2 M NaCl; 7,5 ml 0,1 M Spermin;
25 ml 0,1 M Spermidin; 75 ml 1,0 M Tris HCl; auf 500 ml mit H₂O auffüllen;
pH auf 7,4 (mit HCl) einstellen.

Gesättigte Tris-Lösung, pH 8.5: in 50 ml H₂O solange Tris unter Rühren zugeben bis sich ungelöstes Tris absetzt; dann mit konz. HCl pH 8,5 einstellen und Lösung filtrieren.

2.4.10.4 Restriktion und Gelelektrophorese genomischer DNA

Die isolierte genomische Maus DNA wurde mit dem BamHI Restriktionsenzym (Fermentas) in 70 µl-Ansätzen verdaut. Die Ansätze bestanden hierbei aus 60 µl in Wasser gelöster DNA, 7 µl 10x Restriktionspuffer und 3 µl BamHI (5 U/µl). Der Verdau erfolgte im Wasserbad bei 37°C über 24 h. Um eine ausreichende Menge (ca. 30 µg) restringierter DNA zu erhalten wurden 50 µg genomische DNA für die Restriktion eingesetzt.

Anschließend wurden die Restriktionsansätze gefällt (siehe 2.4.7) und auf einem 0,8%igen Agarosegel („Midi-Gel“: 10 cm x 8 cm, 0,5 cm Dicke) in 1x TBE Puffer aufgetrennt. Die Laufzeit bis zur vollständigen Auftrennung betrug ca. 2-3 h.

1x TBE: 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 1,2 mM Na₂EDTA

2.4.10.5 Southern-Transfer der DNA

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel denaturiert (20 min in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und anschließend in einer Neutralisierungslösung (3 M NaCl; 0,5 M Tris, pH 7,5) für 30 min inkubiert. Anschließend fand ein passiver Transfer auf eine Nitrocellulose Membran (Blot) über Nacht statt (Abbildung 2-2). Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen. Unter UV-Licht wurden die Probenaschen, starke DNA-Banden, Markerbanden und die Gelumrisse mit Fettstift markiert. Der Blot wurde anschließend im Ofen bei 80°C für XX min gebacken und bis zur Präinkubation/Hybridisierung bei 4°C aufbewahrt.

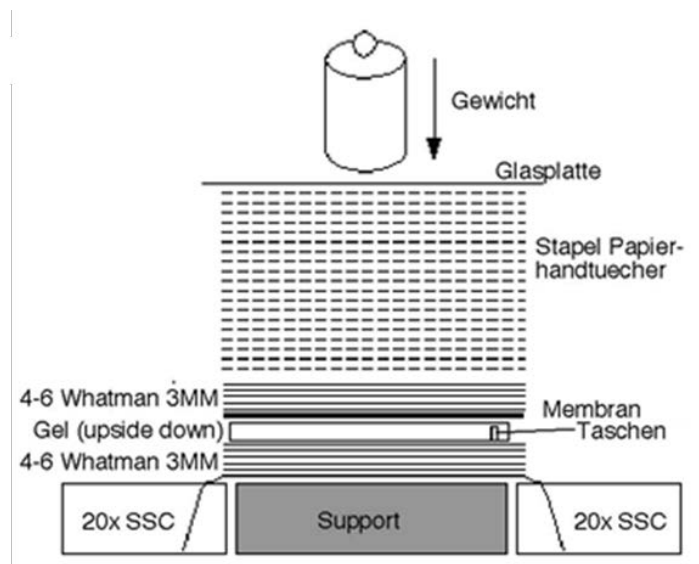


Abbildung 2-2: Blotaufbau: unidirektionaler Blot

Die schematische Darstellung zeigt wie das denaturierte Gel und die Membran aufgebaut werden um die DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Membran zu transferieren (blotten).

2.4.10.6 Hybridisierung und Exposition

Nach dem Southern Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran in 2x Präinkubationsmedium (6x SSC (Denhardt 1966)) mit 1% SDS 2-3 h bei 63°C inkubiert um die freien unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die radioaktiv markierte Sonde aus 2.4.10.2 wurde auf den Blot gegeben und in der Hybridisierungsröhre bei 63°C für 16 h inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Lösung abgenommen und der Blot zweimal mit 2x SSC für je 25 min und einmal mit 0,1x SSC für 15 min gewaschen. Der letzte Waschschrift wurde bei Bedarf so lange wiederholt, bis der Waschpuffer eine Strahlung von unter 1 Becquerel (Bq) aufwies. Anschließend wurde der Blot in eine Expositions-kassette (Kodak) mit einem Röntgenfilm (Kodak) und einer Verstärkerfolie (Cronex) eingelegt und bei -80°C für 4 Tage exponiert.

Hybridisierungspuffer: 3x SSC; 1x PM (nach Denhardt)

Stock: 20x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat

2x Prähybridisierungspuffer/ 6x SSC

Hybridisierungsmedium nach Denhardt: 600 ml 20x SSC; 1400 ml H₂O;

0,8 g Ficoll 400; 0,8 g Polyvinylpyrrolidon (PVP); 0,8 g Rinderserumalbumin (BSA)

2.4.11 Probenvorbereitung für die RNA-Seq Analyse

Für die RNA-Seq Analyse wurde aus den Hippocampus (Hip) und Cortex (Cox) Geweben von Ngb x Camk2 doppelt-transgenen (Ngb+) und Doxycyclin-Behandelten (Doxy) Mäusen Gesamt-RNA isoliert (2.4.1). Nach der Quantifizierung und Qualitätskontrolle (2.4.2) wurden aus der Gesamt-RNA der einzelnen Proben zu gleichen Anteilen jeweils Pools aus drei Präparationen gebildet. Für die Erstellung der mRNA Sequenzier-Libraries wurde das TrueSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die cDNA-Fragmentgröße für die 100 bp Paired-End Sequenzierung betrug im Mittel ca. 300bp. Nachfolgend sind die Mengen an Gesamt-RNA pro Pool die jeweils für die Librabry-Prep eingesetzt wurden angegeben. Ebenso sind die jeweiligen Gewebe und Tiernummern inklusive Geschlecht und Dauer der Doxycyclin-Behandlung angegeben.

Hip 18.1 _m	Pool 1: Ngb+ 1,5µg Gesamt-RNA
Hip 18.2 _m	
Hip 19.1 _w	
Hip 47.1 _{m +5wDox}	Pool 2: Doxy 1,5µg Gesamt-RNA
Hip 49.2 _{w +5wDox}	
Hip 49.3 _{w +5wDox}	

Cox 18.1 _m	Pool 1: Ngb+ 2,5µg Gesamt-RNA
Cox 18.2 _m	
Cox 19.1 _w	
Cox 47.1 _{m +5wDox}	Pool 2: Doxy 2,5µg Gesamt-RNA
Cox 49.2 _{w +5wDox}	
Cox 49.3 _{w +5wDox}	

2.5 Bioinformatische Methoden

2.5.1 Qualitätsprüfung und Bereinigung der generierten RNA-Seq Daten

Die auf dem HiSeq 2000 (Illumina) generierten Sequenzierdaten im Format FastQ wurden zunächst auf ihre Qualität hin überprüft. Diese Überprüfung erfolgte mit Hilfe des Programms FastQC¹, es wurde besonderes Augenmerk auf die Ergebnisse bezüglich der Qualität der Basen der einzelnen Reads in Bezug auf die Länge (per base sequence quality) sowie der Sequenzduplikate und Anzahl überrepräsentierter Sequenzen (z. B.

¹ <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/> (27.08.2014)

Homopolymere) gelegt. Um Sequenzierartefakte zu entfernen wurde das FastX Tool Kit¹ verwendet. Hierbei wurden üblicherweise die ersten 15 Basen am 5'-Ende aller Reads entfernt (`fastx_trimmer`) und, falls vorhanden, auch der Sequenziertag (`fastx_clipper`). Im Anschluss an dieses Trimming der Reads wurden Sequenzen, welche eine Länge <20 Basen aufwiesen, entfernt (`fastx_clipper`), da hier die Spezifität beim nachfolgenden Mapping (siehe 2.5.2) nicht mehr gewährleistet wäre. Ebenso wurden Reads mit mittleren Phred-Qualitätswerten <20 (Max Qualitätswert einer jeden Base: 40) aus dem Datensatz gefiltert (`fastq_quality_filter`), da diese ebenfalls zu falsch-positiven Ergebnissen im anschließenden Mapping führen könnten.

Um am Ende der Bereinigung die Integrität der Paired-End Datensätze zu bewahren, wurden die zwei Sequenzdateien (Forward und Reverse) abgeglichen. Nur solche Reads, deren Forward und Reverse-Sequenzierung die Qualitätsfilter passiert haben, wurden beibehalten. Verwaiste Sequenzen ohne Partner wurden in einer extra Datei abgelegt und können als Single Reads ebenfalls für das Mapping verwendet werden (Perlskript: `fastq_pese_sort` von Dipl. Biol. Mathias Weber). Der Anteil der Verwaisten Sequenzen war jedoch jeweils so gering das diese für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

2.5.2 Mapping von RNA-Seq-Datensätzen mittels CLC-Workbench

Getrimmte Sequenzierdaten (siehe 2.5.1) wurden mit dem Programm CLC-Workbench (Version 5.51 CLC bio) analysiert. Die Daten wurden mit Hilfe der RNA-Seq-Analyse gegen das gesamte Referenz-Genom der Maus (NCBI Build 37²) gemappt. Für Paired-End Sequenzen wurden stringente Parameter festgelegt: 95% eines Reads mussten zu 95% mit der Referenzsequenz des Genoms übereinstimmen, um in das Mapping aufgenommen zu werden. Weiterhin wurde die Information des Abstandes der gegenläufigen Reads (Paired-End Information) genutzt: nur Reads, welche in einem Abstand zwischen 10 und maximal 400 Basen relativ zueinander einen Treffer im Genom ergaben, wurden gezählt. Zudem wurde maximal ein Treffer pro Read erlaubt. Weitere Parameter auch für die Mapping-

¹ http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/ (27.08.2014)

² ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/M_musculus/ARCHIVE/BUILD.37.2/ (27.08.2014)

Einstellungen für die öffentlich zugänglichen RNA-Seq-Vergleichsdaten sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Für das Mapping mittels CLC-Workbench verwendete Parameter

In der Tabelle sind alle Parameter angegeben, welche für die RNA-Seq Analyse (Mapping) verwendet wurden. Bei den Paired-End Datensätzen wurde ein Abstand zwischen 10 und 400 Basen zwischen den Reads erlaubt (Paired-End Information).

Parameter	Wert
Maximum number of mismatches (Single-End Reads)	2
Maximum number of hits for a read	1
Minimum length fraction (Paired-End Reads)	0,95
Minimum similarity fraction (Paired-End Reads)	0,95
Exon discovery	Yes
Minimum read count fusion gene table	5 (default)
Minimum length of putative exons	50 (default)
Minimum number of reads	10 (default)
Use annotations for gene and transcript identification	Yes (default)
Use strand specific assembly	No (default)
Additional downstream bases:	2000 (default)
Minimum exon coverage fraction	No (default)

Neben den selbst hergestellten RNA-Seq-Datensätzen wurden zum Vergleich auch öffentlich zugängliche Datensätze verwendet. Geeignete Rohdaten wurden im Sequence Read Archive (SRA) des National Center for Biotechnology Information (NCBI)¹, im European Nucleotide Archive (ENA) des European Bioinformatics Institute (EBI)² oder im Sequence Read Archive (DRA) der DNA Data Bank of Japan (DDBJ)³ bezogen. Falls die Daten nicht im FastQ Format verfügbar waren, wurden diese im SRA-Format heruntergeladen. Mit dem fastq-dump Programm des SRA Toolkits⁴ erfolgte dann eine Umwandlung in das FastQ-Format.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/> (27.08.2014)

² <http://www.ebi.ac.uk/ena/> (27.08.2014)

³ <http://trace.ddbj.nig.ac.jp/DRAsearch/> (27.08.2014)

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/?view=software> (27.08.2014)

2.5.3 Statistische Auswertung der Mappings der RNA-Seq-Datensätze

Die statistische Auswertung der gemappten Reads zum Vergleich mehrerer Gewebe erfolgte zunächst in der CLC-Workbench. Hierzu wurden die von der CLC-Workbench errechneten RPKM-Werte „reads per kilobase of exon model per million mapped reads“ verwendet. Die RPKM-Methode nach Mortazavi et al. wird verwendet, um Transkripte unterschiedlicher Längen und/oder aus unterschiedlich großen Datensätzen miteinander vergleichen zu können (Mortazavi et al. 2008).

$$RPKM = \frac{\text{Gesamtzahl der Exon – Reads}}{\text{Gemappte Reads (in Millionen)} \times \text{Exonlänge (Kb)}}$$

Der RPKM-Wert eines Transkripts gibt also Auskunft über die relative Menge desselben in der Ausgangsprobe, wobei auf die Sequenziertiefe (Anzahl gemappte Reads) und die Länge des Transkripts (Exonlänge) normalisiert wird (Mortazavi et al. 2008).

Zum Auffinden regulierter Gene wurden die RPKM-Werte aller Gene zwischen den betreffenden Datensätzen verglichen. Unterschied sich der RPKM-Wert eines Transkripts (FC, „Fold Change“) zwischen zwei Datensätzen um mehr als den Faktor 2, so wurde dieses Gen als reguliert definiert. Zur einfacheren graphischen Darstellung wurde der FC-Wert logarithmisch (\log_2) aufgetragen. Als Mindestbetrag für regulierte Gene ergibt sich demnach ein $FC_{\log_2} \geq 1$.

Um die Anzahl der irrtümlich als reguliert detektierten Gene (= Falsch-Positive) zwischen verschiedenen Datensätzen zu ermitteln, wurde eine Rj-Statistik nach Stekel et al. (2000) durchgeführt. Hierbei wird für jedes als reguliert detektierte Gen durch den Rj-Wert die Wahrscheinlichkeit angegeben, dass es sich um ein Falsch-Positives handelt. Die Berechnung basiert auf der Log-Likelihood-Ratio-Statistik für ein Gen „j“ (Abbildung 2-3). Die Variable „m“ entspricht hierbei der Anzahl der Datensätze, „ $X_{i,j}$ “ bezeichnet die Anzahl der für das Gen „j“ spezifischen Reads (Unique Gene Reads) in der i-ten Library. Der Wert „ N_j “ steht für die Gesamtzahl der gemappten Reads (Sequenziertiefe) der i-ten Library und „ f_j “ gibt die Frequenz der „unique Gene Reads“ des Gens „j“ in allen Libraries an. Der Rj-Wert bezieht also neben der Größe der zu vergleichenden Datensätze auch die Expressionsstärke des Gens innerhalb der Datensätze (stark vs. schwach) ein und stellt somit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Streuung der Genexpressionswerte zwischen den

Datensätzen dar. Transkripte mit einem Rj-Wert >8 können als reguliert angesehen werden (Stekel et al. 2000).

$$R_j = \sum_{i=1}^m x_{i,j} \log \left[\frac{x_{i,j}}{N_i \int_j} \right]$$

$$\int_j = \frac{\sum_{i=1}^m x_{i,j}}{\sum_{i=1}^m N_i}$$

Abbildung 2-3: Berechnung des Rj-Wertes

Formel zur Berechnung des Rj-Wertes, Erläuterungen zu den einzelnen Variablen siehe Text (Stekel et al. 2000).

2.5.4 Statistische Transkriptom- und Expressionsprofilanalysen

Die Gene Ontology (GO) Annotation erfolgte mit dem Online-Tool DAVID¹ 6.7 (Huang da et al. 2009b, a). Als Eingabe dienten die GeneIDs der jeweiligen regulierten Gene, die GO-Annotation erfolgte in der Kategorie "Molecular Function". Gene ohne passende GO-Annotation wurden in der Kategorie "Other" zusammengefasst. Zur statistischen Berechnung der Anreicherung regulierter Gene musste der jeweilige Hintergrund (Background), also die Anzahl aller messbaren Punkte, gewählt werden. Bei der Analyse der Affymetrix Microarray-Daten wurde hier der Verwendete Gene Chip (Mouse Genome 430 2 Array) ausgewählt. Hierdurch kann die statistische Signifikanz einer Anreicherung der regulierten Gene in einem bestimmten Stoffwechselweg ermittelt werden. Zur Ermittlung der statistischen Anreicherung der Kegg-Pathways wurde das Online-Tool WebGestalt² („WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit“) verwendet. Hierzu wurde die Liste der jeweiligen regulierten Gene (Alle / nur hoch / nur runter -regulierten Gene) in das Tool geladen und der jeweils verwendete Organismus (Maus) und die verwendete GeneID (Affy-mouse430-2 oder Gene Symbol) ausgewählt. Als Parameter für die statistische Analyse wurde Kegg-Analyse und als Background das Affy-mouse430-2-IDSet oder das Maus-Genom gewählt. Die Top 10 angereicherten Kegg-Pathways wurden ausgegeben. Zur statistischen Absicherung für multiples Testen wurde eine Benjamini & Hochberg (1995) Korrektur des p-Wertes (BH)

¹ <http://david.abcc.ncifcrf.gov/> (27.08.2014)

² <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/analysis.php> (27.08.2014)

verwendet. Pathways mit einem p-Wert von kleiner als 0,05 wurden als signifikant Angereichert angesehen.

2.5.5 Ingenuity Pathway Analyse - IPA

Die IPA Software, Ingenuity® Systems¹, ist eine kommerzielle Software welche zur Analyse, Interpretation und Beschreibung von Genexpressionsdaten eingesetzt werden kann. Mit der Software ist es möglich die Beziehungen zwischen Genen, Proteinen, Zellen, Chemikalien und ganzen Geweben zu annotieren und zu visualisieren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IPA-Software verwendet, um die regulierten Gene der transgenen Ngb x R26 Mausleber zu annotieren. Hierzu wurde die Liste der als reguliert ermittelten Gene im AffyId Format in die Software hochgeladen (siehe 7.1). Anschließend wurde der Organismus (*Mus musculus*) gewählt und die Annotation der Gene gestartet. Die Ergebnisse wurden als Text Datei exportiert und in Excel (Microsoft) weiterbearbeitet.

2.5.6 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – Kegg-Datenbank

Die Kegg-Datenbank ist eine frei zugängliche Datenbank, welche u. a. die Informationen zu Genen, Stoffwechselwegen und Biomolekülen enthält (Kanehisa et al. 2004). Zur Annotation der als reguliert ermittelten Gene wurde die entsprechende Liste mit RefSeq-IDs unter Angabe des verwendeten Organismus (*Mus musculus*) in den Kegg-Mapper² hochgeladen. Die Ausgabe wurde in Excel (Microsoft) weiterbearbeitet.

¹ www.ingenuity.com (27.08.2014)

² http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html (27.08.2014)

3 Ergebnisse

3.1 Ektopische Neuroglobin-Überexpression in der Leber mit Hilfe des Ngb x R26 Mausmodells

Am Institut für Molekulargenetik der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Hankeln der Johannes Gutenberg Universität Mainz wurden Mausmodelle zur konditionalen Überexpression von Ngb etabliert. Im Unterschied zu den oben erwähnten (1.3.2) einfach-transgenen Ngb-Mausmodellen kann hier die Expression durch die gezielte Auswahl der Tet-Treiberlinie auf eine bestimmte Region (z. B. nur das ZNS) beschränkt werden. Außerdem kann mit diesem System die ektopische Expression gezielt nur im adulten Tier induziert werden, um potentielle kompensatorische Effekte der Maus auf eine Ngb-Überexpression während der Entwicklung zu vermeiden. In dieser Arbeit wurde sowohl das Tet-on als auch das Tet-off-System für eine Regulation der ektopischen Ngb-Expression verwendet. Als Responderkonstrukt in den doppelt-transgenen Mäusen diente ein Vektor mit einem bidirektionalen Promotor, welcher die gleichzeitige Transkription sowohl des Transgens (Ngb) als auch eines Reportergens (eGFP: Grün fluoreszierendes Protein) ermöglicht, sobald der Transaktivator bindet (Kistner et al. 1996, Baron und Bujard 2000, Wystub 2007). Als Effektor zur zielgerichteten Überexpression von Ngb wurden zum einen KI-R26-1D-rtTA Effektormäuse (Tet-on), welche den rtTA unter dem Einfluss eines ubiquitär aktiven ROSA26-Promotors exprimieren, zum anderen CamkII α -tTA Effektormäuse (Tet-off) mit dem Promotor der Vorderhirn spezifischen Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase CamkII α verwendet (Mayford et al. 1996, Soriano 1999, Mansuy und Bujard 2000, Krestel et al. 2001, Wortge et al. 2010).

Die transgene Mauslinie zur ektopischen Ngb-Überexpression wurde im Vorfeld zu dieser Arbeit von Dr. Sylvia Wystub im Rahmen einer Dissertation (Wystub 2007) und in der AG Ernesto Bockamp angefertigt (siehe 2.1.1). Die Funktionalität des transgenen Systems wurde im Vorfeld zur vorliegenden Arbeit von Dominic Docter (Diplomarbeit, 2008) und Tina Altenhein charakterisiert.

Die Überprüfung der Ngb-Überexpression mittels Western Blot und IHC (Docter 2008; Abbildung 3-1) zeigte, dass die ektopische Ngb-Überexpression in der Leber im Ngb x R26 System (A) in den Hepatozyten lokalisiert ist. Eindeutig zu sehen ist der An/Aus-Effekt der

Ngb-Expression in der transgenen Leber nach der Induktion mittels Doxycyclin (siehe 2.1.3). Der Nachweis von überexprimiertem Ngb-Protein in der Leber der Maus erfolgte mit zwei unterschiedlichen anti-Ngb Antikörpern (Docter, 2008).

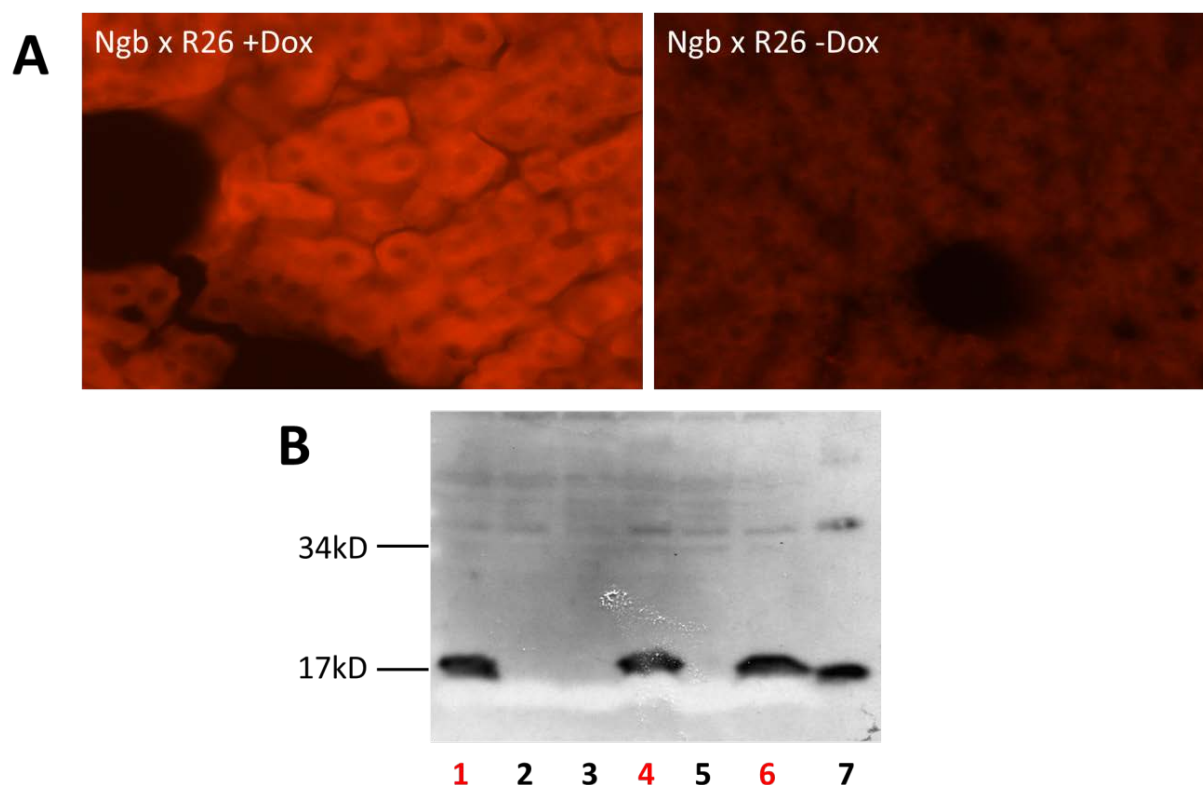


Abbildung 3-1: Proteinnachweis der ectopischen Ngb-Überexpression in der Leber der Ngb x R26-Transgenen

A: IHC-Nachweis des Ngb-Proteins in Induzierter- (+dox) vs. Kontroll- (-dox) Mausleber (anti-Ngb, Sigma). **B:** WB-Nachweis der ectopischen Ngb-Expression (anti-Ngb, Santa Cruz); Spuren: 1,4,6 Ngb x R26 +dox; 2,3,5 Ngb x R26 -dox; 7: rec. Ngb Prot. (aus: Docter, 2008).

Die Auswahl der Versuchstiere (n=3), die Präparation der Gewebe sowie die anschließende Extraktion, Aufreinigung und Qualitätskontrolle der RNA für die Microarray Transkriptom-Analyse (2.5.5, 2.5.6) wurde von Tina Altenhein (Mainz, 2008) durchgeführt. Die Leber-mRNA wurde mittels qRT-PCR (siehe 2.4.7.2) auf eine vorhandene Ngb-Überexpression hin untersucht. Die analysierten Gewebeextrakte zeigten eine in Relation zur Expression von *Cygb*, das hier als nicht reguliertes Referenzgen verwendet wurde, eine starke ectopische Ngb-Expression in den Doxycyclin behandelten (+dox) im Vergleich zu den unbehandelten (-dox) Tieren (Abbildung 3-2). Letztere verfügten über keine native Ngb-Expression und

werden im weiteren Verlauf als Kontroll-Proben bezeichnet. Die schwache relative Ngb-Expression in Tier Nr. 1.75.1 deutet auf eine bereits in der Literatur berichtete „leaky expression“ des R26 Treibers hin (Zhu et al. 2001, Zhu et al. 2002). Aufgrund der bestätigten ektopischen Ngb-Überexpression wurden die sechs RNA-Proben an die High Density Microarray (HDMA) Core Facility (Zentrale Serviceeinheit) der Universitätsklinik Mainz zur Generierung der Genexpressionsdaten per Affymetrix-Technologie übergeben.

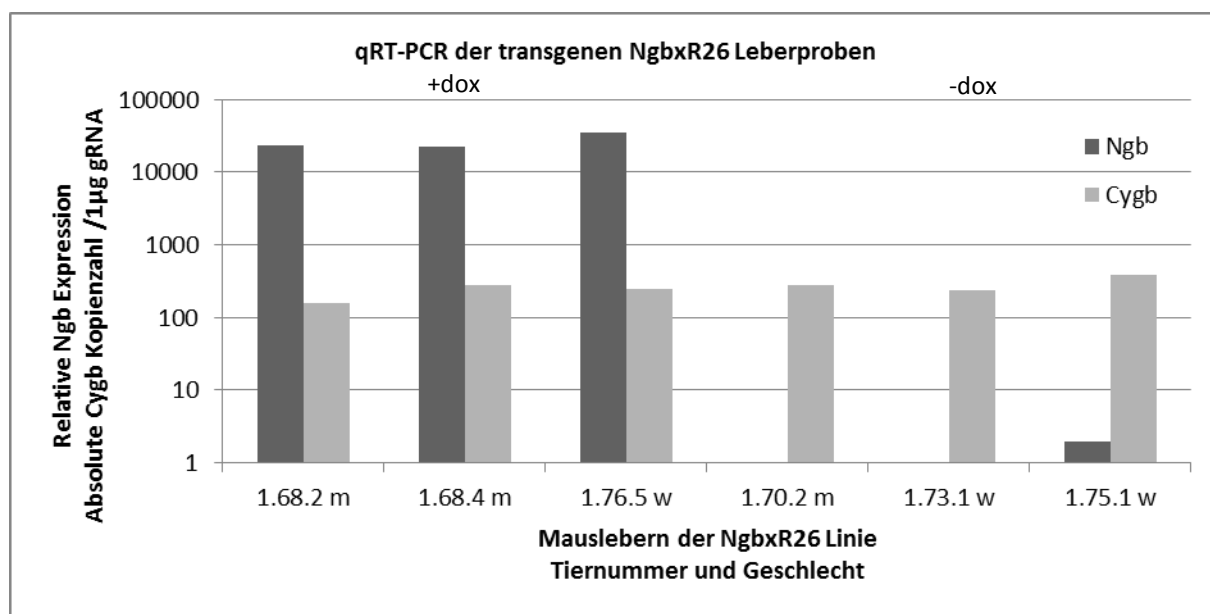


Abbildung 3-2: Nachweis der ektopisch exprimierten Ngb-mRNA in Leberproben der Ngb x R26 Linie

Dargestellt ist die absolute Kopienzahl des Cygb-Gens pro 1µg Gesamt-RNA (gRNA) (grau) und die darauf normalisierte relative Kopienzahl des Ngb-Gens (ebenfalls pro 1µg gRNA). Neben den Tiernummern sind jeweils die Geschlechter der Tiere angegeben (m=männlich; w=weiblich). Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Organentnahme etwa 3 Monate alt.

3.1.1 Vergleichende Transkriptom-Analyse Ngb-transgener Mausleber mittels Affymetrix-Microarrays

Die von der HDMA Core Facility der Universitätsklinik Mainz gelieferten Genexpressionsdaten wurden mittels Excel (Microsoft) bearbeitet und statistisch ausgewertet. Für weitere Analysen wurden nur Gene berücksichtigt, deren Expressionsstärke sich im Vergleich der induzierten versus Kontroll-Leberproben mindestens um den Faktor („Fold Change“, FC) zwei bzw. den logarithmierten Betrag $FC_{\log_2} \geq 1$

unterschieden. Weiterhin wurden alle Gene verworfen, die nicht auf mindestens einem der Affymetrix-Chips pro Gruppe detektiert wurden. Nur Gene mit einem Fehler erster Ordnung (α) von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) wurden in die weitere Analysen mit einbezogen. In der nachfolgenden Tabelle 3-1 sind die annotierten Einträge pro Datenbank aufgeführt. Die gesamte Anzahl der als reguliert ermittelten Gene mit einem $FC_{\log_2} \geq \pm 1$ und der statistischen Sicherheit (Student t-Test) von $p \leq 0,05$ betrug somit 349 (siehe Tabelle 3-1). Hiervon waren in den Dox-behandelten Leberproben 204 stärker exprimiert ($FC_{\log_2} \geq +1$) und 145 schwächer exprimiert ($FC_{\log_2} \leq -1$) als in den Kontrollproben.

Tabelle 3-1: Regulierte Gene in transgener Leber nach statistischer Auswertung und Annotation

Die Tabelle zeigt die Anzahl der regulierten Gene im Vergleich der induzierten- vs. Kontroll-Proben ($n = 3$). Die Tabelle umfasst die Anzahl der als reguliert (hoch oder runter) gemessenen Sonden und die daraus resultierende Anzahl an annotierten Maus-Genen. (Affymetrix: auf dem GeneChip zugeordnete Sonden-IDs; NetAffx: Affymetrix-Datenbank mit Annotation der Sonden-IDs; IPA: Ingenuity Datenbank; DAVID: Online Tool zur Genannotation; siehe 2.5.4; FC = "Fold Change").

Datenbank	Gesamt	Funktion eindeutig Annotiert	
		$FC_{\log_2} \geq +1$	$FC_{\log_2} \leq -1$
Affymetrix	349	204	145
NetAffx	306	175	131
IPA	308	178	130
DAVID	311	180	131

Die Sequenzinformation zur Generierung der Sonden im verwendeten Affymetrix GeneChip Mouse Genome 2.0 Microarray basiert auf Daten der UniGene Datenbank des Jahres 2002¹. Hierdurch sind diese Information teilweise veraltet und es konnten nicht alle als reguliert ermittelten Affymetrix-Sonden-IDs einem in den aktuellen Datenbanken annotierten Gen zugeordnet werden. In Tabelle 3-1 sind in den letzten beiden Spalten jeweils die mehrdeutigen bzw. in den jeweiligen verwendeten Datenbanken nicht mehr vorhandenen

¹ <http://www.affymetrix.com/catalog/131477/AFFY/Mouse-Genome-430-2.0-Array> (27.08.2014)

Affymetrix-IDs angegeben. Somit reduzierte sich der untersuchte Gesamtdatensatz der nach einer Ngb-Überexpression in der Mausleber als statistisch signifikant regulierten Gene auf 311 Gene in der DAVID-Datenbank (2.5.4) und 308 bzw. 306 Einträge in den IPA und NetAffx-Datenbanken.

In Tabelle 3-2 sind die zehn am stärksten regulierten Gene im Vergleich des transgenen und des Kontroll-Gewebes zusammengefasst dargestellt. Zu den am stärksten positiv regulierten Genen gehörte das transgene Ngb (FC = 1.312) selbst sowie das Enzym Lipoproteinlipase (LPL; FC = 10). Am stärksten negativ reguliert in der transgenen Ngb-Leber waren Gene der Cytochrom-Familie (u. a. Cyp17a1; FC = -20) und das MMD2-Gen (monocyte to macrophage differentiation-associated 2; FC = -12).

Tabelle 3-2: Die Top 10 der hoch und runter regulierten Gene in der Ngb-transgenen Mausleber

Die Tabelle zeigt die zehn am stärksten hoch bzw. runter regulierten Gene nach ektopischer Ngb-Expression in der murinen Leber im Vergleich zur Kontrolle. Zu beachten ist der extrem hohe Wert von Ngb (FC = 1312): da in der Kontroll-Leber eine Hintergrund (leaky expression) Ngb-Expression nachgewiesen wurde, stellt dieser Wert eine rein technische Regulation dar.

Hoch		Annotation	Runter		Annotation
Gen	FC _{Log2}		Gen	FC _{Log2}	
NGB	1312,3	neuroglobin	CYP17A1	-20,7	cytochrome P450, family
LPL	10,0	lipoprotein lipase	MMD2	-12,7	monocyte to macrophage differentiation-associated 2
HIST2H3C	7,1	histone cluster 2, H3c	SERPINA12	-12,5	serine peptidase inhibitor
RSAD2	6,2	radical s-adenosyl methionine domain containing 2	CYP2B6	-9,7	cytochrome P450, family
Tgtp1	5,7	T cell specific GTPase 1	SLCO1A2	-8,1	solute carrier organic anion transporter family
BC023105	5,0	pseudogene	CYP2B6	-8,0	cytochrome P450, family
SLC5A3	5,0	solute carrier family 5	DCT	-7,1	dopachrome tautomerase
PEG3	4,5	paternally expressed 3	NTRK2	-5,9	neurotrophic tyrosine kinase
SRR	4,4	serine racemase	C15orf60	-5,2	meiotic recombination protein
Gbp6	4,3	guanylate binding protein 6	Slco1a1	-4,7	solute carrier organic anion transporter family

3.1.2 Untersuchung der regulierten Gene mittels „Ingenuity Pathway Analysis“

Eine Annotation der zellulären Lokalisation der Produkte der insgesamt 308 regulierten Gene der transgenen Leber sollte Hinweise auf die Art der transkriptionellen Antwort des Lebergewebes auf die Ngb-Überexpression liefern. Die Abbildung 3-3 zeigt ein Diagramm mit der in IPA annotierten zellulären Lokalisation der Genprodukte. Die Annotierten Genprodukte verteilten sich auf die zellulären Kompartimente: Plasmamembran (37 Gene), Nucleus (79 Gene) und Cytoplasma (114 Gene). Weiterhin waren 15 der regulierten Gene als kodierend für extrazelluläre Proteine annotiert. Für 63 der insgesamt 308 in der IPA-Datenbank annotierten und in der Ngb-transgenen Mausleber regulierten Gene war die zelluläre Lokalisation der Genprodukte nicht bekannt. Auffällig ist der unterschiedliche Anteil der Zellkern lokalisierten Genprodukte in den Listen der hoch und regulierten Gene. Literaturwerte von murinen Lebertranskriptomen zeigen einen Anteil von ca. 36% im Zytoplasma und 32% im Zellkern lokalisierter Genprodukte (Ghazalpour et al. 2011).

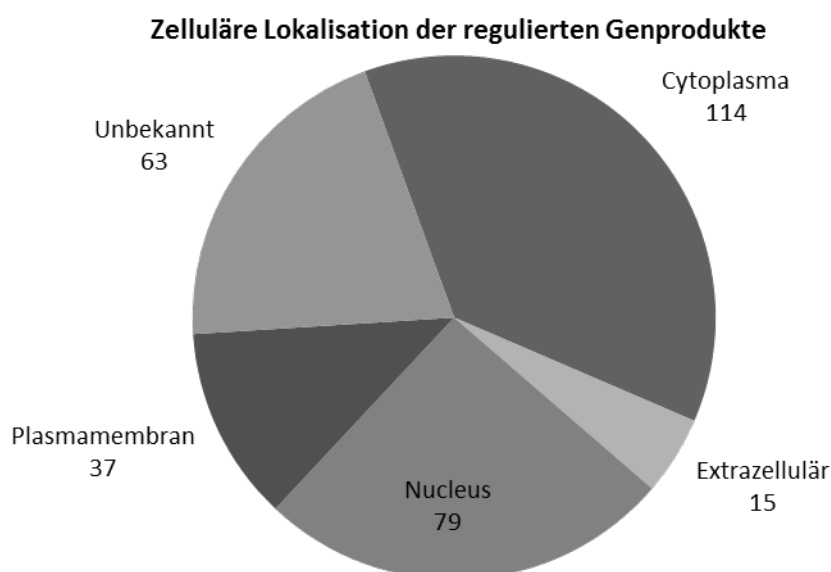


Abbildung 3-3: In IPA annotierte zelluläre Lokalisation der Genprodukte regulierter Gene

Dargestellt ist die Verteilung der in der IPA-Datenbank hinterlegten zellulären Lokalisationen der Proteine der 308 in IPA annotierten und in der Ngb-transgenen Mausleber regulierten Genen. Die hinter den Gruppen angegebenen Zahlen geben die Anzahl der Gene mit dieser Annotation an.

Zelluläre Lokalisation der runter regulierten Genprodukte

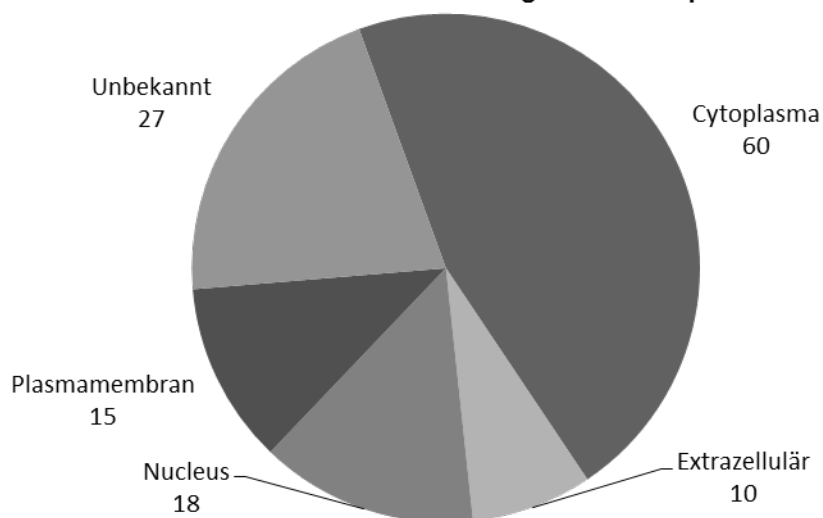


Abbildung 3-4: In IPA annotierte zelluläre Lokalisation der Genprodukte runter regulierter Gene

Dargestellt ist die Verteilung der in der IPA-Datenbank hinterlegten zellulären Lokalisationen der Proteine der 130 in IPA annotierten und in der Ngb-transgenen Mausleber herunter regulierten Gene. Die hinter den Gruppen angegebenen Zahlen geben die Anzahl der Gene mit dieser Annotation an.

Zelluläre Lokalisation der hoch regulierten Genprodukte

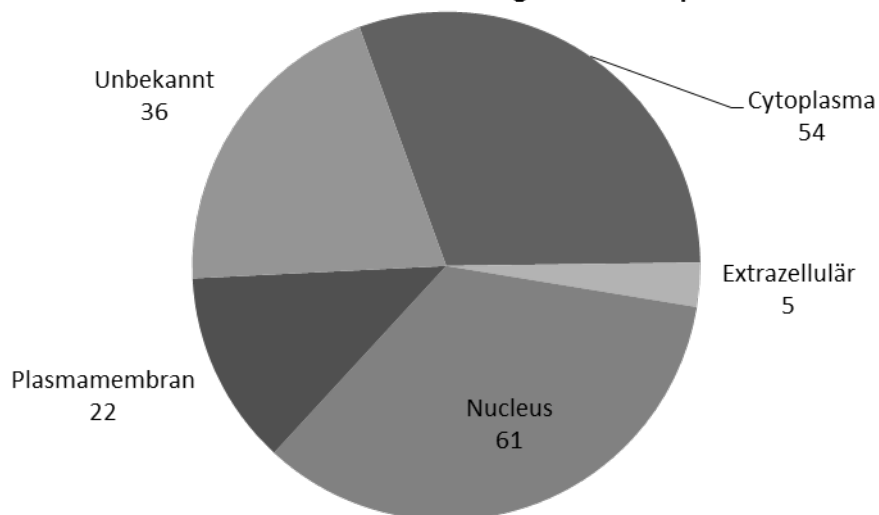


Abbildung 3-5: In IPA annotierte zelluläre Lokalisation der Genprodukte hoch regulierter Gene

Dargestellt ist die Verteilung der in der IPA-Datenbank hinterlegten zellulären Lokalisationen der Proteine der 178 in IPA annotierten und in der Ngb-transgenen Mausleber heraufregulierten Gene. Die hinter den Gruppen angegebenen Zahlen geben die Anzahl der Gene mit dieser Annotation an.

Neben der Lokalisation der Genprodukte wurden auch die annotierten Funktionen selbiger untersucht (Abbildung 3-6).

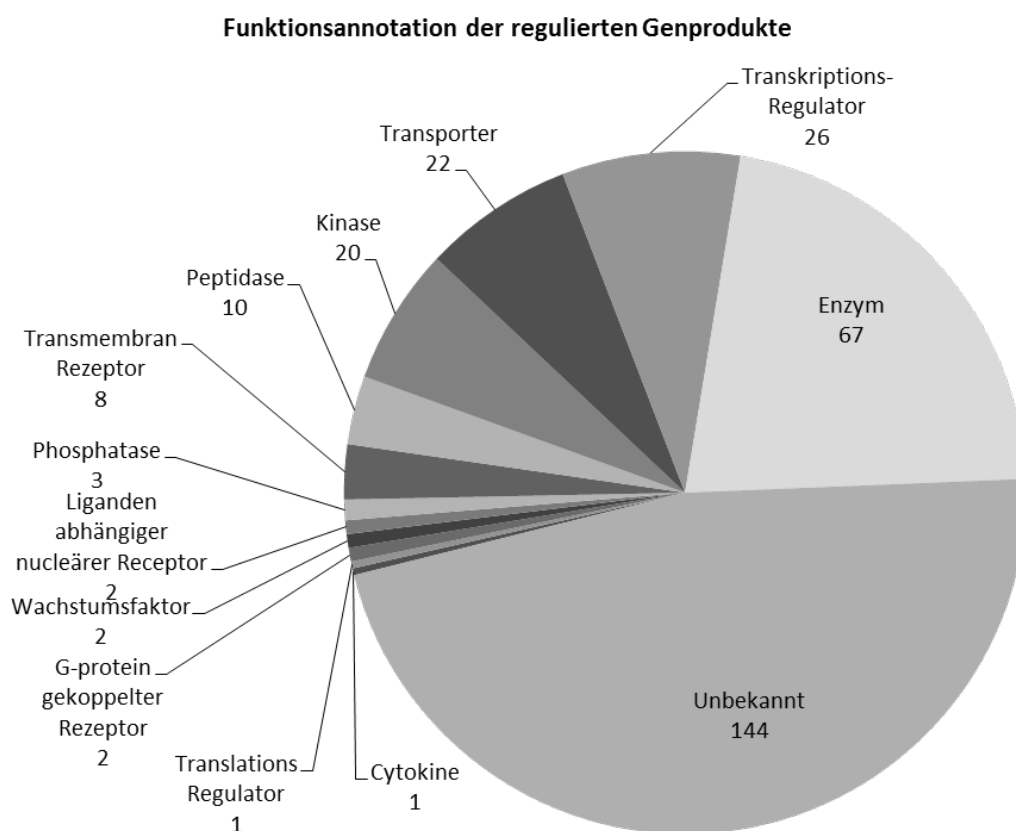


Abbildung 3-6: In der IPA-Datenbank annotierte Funktion der Genprodukte der regulierten Gene

Dargestellt sind die per „Gene Ontology“ annotierten Funktionen der Genprodukte der 308 regulierten Gene in IPA. Die Zahlen geben die Summe der regulierten Gene in dieser Gruppe an.

3.1.3 Statistische Anreicherung der regulierten Gene und Stoffwechselwege

Durch die Untersuchung der mit den regulierten Genen assoziierten Expressionsorte und Stoffwechselwege und der statistischen Auswertung selbiger sollten Hinweise auf einen möglichen phänotypischen Effekt einer ektopischen Ngb-Expression auf das Transkriptom der murinen Leber ermittelt werden.

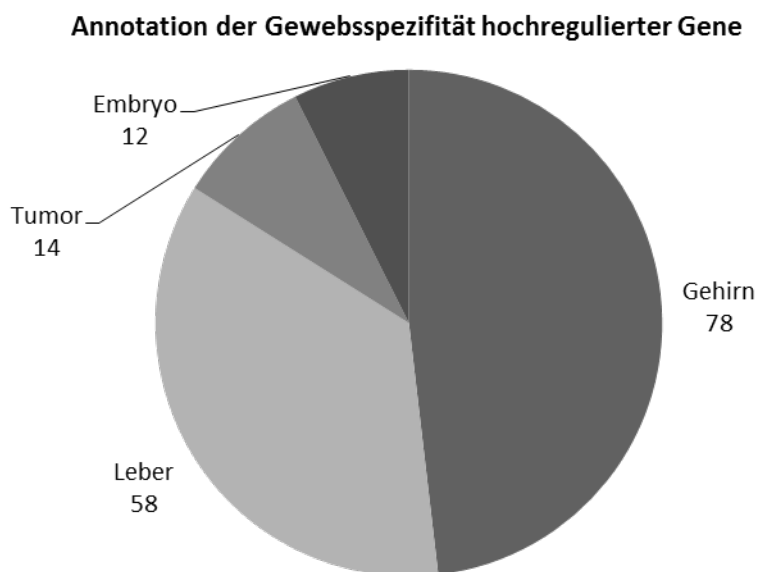


Abbildung 3-7: Gewebsspezifität der hochregulierten Gene

Dargestellt sind die in der UniProt-Datenbank annotierten Hauptexpressionsorte der hochregulierten Gene. Von insgesamt 163 Genen sind für 78 Gene das Gehirn als Hauptexpressionsort annotiert. (EASE: 0,01; Background: Mouse Genome 430 2 Array)

In Abbildung 3-7 sind die in der UniProt¹-Datenbank annotierten Expressionsorte der hochregulierten Gene dargestellt. Von den insgesamt 163 in der Datenbank annotierten Genen war für 78 Gene das Gehirn als Hauptexpressionsort annotiert. Dies stellt jedoch keine signifikante Anreicherung (p-Wert nach Bonferroni: 0,168) gehirnspezifischer Gene dar da der Anteil an Datenbankeinträgen mit gehirnspezifischen Genen Anteilsmäßig höher als der übrigen Expressionsorte ist. Der zweithäufigste Hauptexpressionsort war die Leber mit 58 annotierten Genen (p-Wert nach Bonferroni: 0,013) was eine signifikante Anreicherung leberspezifischer Gene in diesem Datensatz anzeigt gefolgt von Tumor- (p-Wert: 2×10^{-4}) und embryonalem Gewebe (p-Wert: 0,66) (Abbildung 3-7). Eine Untersuchung der 121 runter regulierten Gene lieferte lediglich eine einzige Kategorie: Leber mit 46 Genen, signifikant angereichert (p-Wert: 2×10^{-4}) im Datensatz.

¹ <http://www.uniprot.org/> (27.08.2014)

Die Untersuchung auf Anreicherung regulierter Gene in bekannten Stoffwechselwegen erfolgte mithilfe der Kegg-Datenbank (siehe 2.5.6). In Tabelle 3-3 sind die Stoffwechselwege (Kegg-Pathways) aufgeführt, in denen die als reguliert ermittelten Gene annotiert waren. Auffällig ist die Assoziation der Pathways mit Krankheiten (Influenza, Hepatitis) oder einer generell schadhaften Konstitution (Krebs, Alkoholismus). Insgesamt konnten 161 von 349 regulierten Genen einem Kegg-Pathway zugeordnet werden (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Kegg-Pathway Annotation der regulierten Gene

Dargestellt sind die zehn am häufigsten vorkommenden Pathways, in denen die regulierten Gene annotiert sind. In Klammern ist die Anzahl der Gene pro Pathway angegeben.

Kegg Pathways
Alcoholism (36)
Systemic lupus erythematosus (35)
Metabolic pathways (29)
Transcriptional misregulation in cancer (10)
Influenza A (10)
Herpes simplex infection (10)
Lysosome (9)
Epstein-Barr virus infection (8)
Hepatitis C (7)
Tuberculosis (7)

Eine statistische Anreicherung der Kegg Pathways wurde mit dem Online-Tool WegGestalt¹ „WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit“ durchgeführt. Hierbei wurden von den 145 runter regulierten Genen 23 in drei Kegg Pathways als signifikant angereichert (p-Wert: <0,05) annotiert. Zu diesen drei Pathways zählen: „Metabolic pathways“ (18 Gene), „Steroid hormone biosynthesis“ (3 Gene), „Other glycan degradation“ (2 Gene). Für die 204 hoch regulierten Gene und die 349 insgesamt regulierten Gene konnten keine signifikant angereicherten Kegg Pathways ermittelt werden.

¹ <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/> (27.08.2014)

3.1.4 Hepatotoxin-Behandlung Ngb-transgener Tiere *in vivo*

Die Behandlung der Ngb-überexprimierenden Mäuse mit dem leberspezifischen Toxin Tetrachlormethan (CCl₄) sollte zeigen, ob ein protektiver Effekt einer ektoptischen Ngb-Expression, also eine gesteigerte Vitalität der transgenen Leber im Vergleich zur wildtypischen nach Toxin-Behandlung, nachzuweisen ist. Durch das Einbeziehen von weiteren Kontrollgruppen konnte auch der Effekt der Doxycyclin-Behandlung selbst auf die Mausleber in Kombination mit der Hepatotoxin-Behandlung untersucht werden. Die Behandlung der Mäuse mit dem Hepatotoxin CCl₄ erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Jan G. Hengstler am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund. Auch die Ermittlung der Blutplasmawerte der behandelten Mäuse und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) der Leberschnitte erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Hengstler.

Die Untersuchung von Biomarkern als Anzeiger für einen Leberschaden im Blutplasma der behandelten Tiere zeigte dabei eine deutlich höhere Konzentration der Hepatozyten-spezifischen Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotrasferase (AST) in CCl₄-behandelten Ngb-transgenen Tieren (siehe Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9).

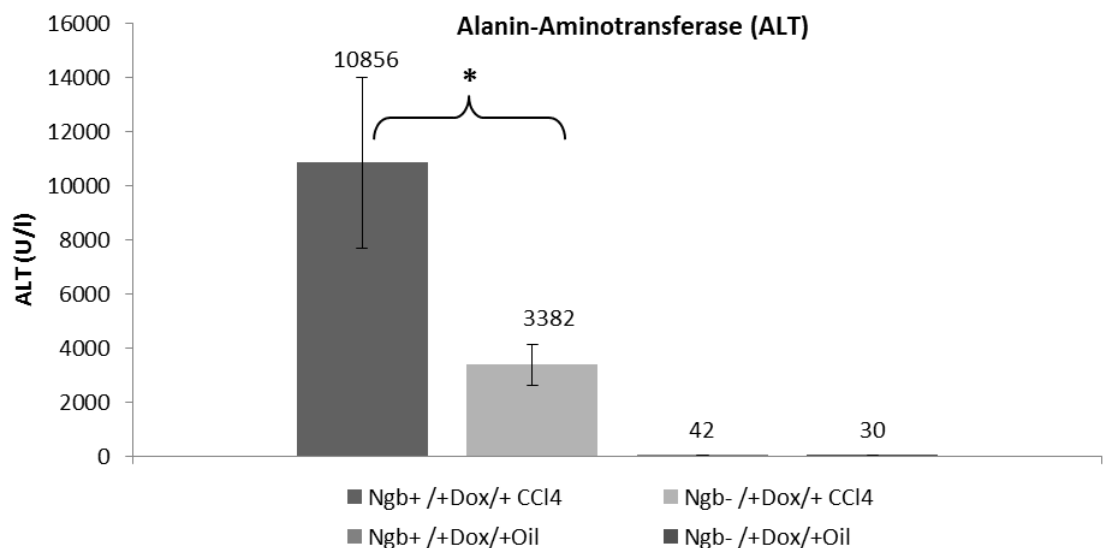


Abbildung 3-8: ALT Blutplasmawerte in CCl₄-gestressten Mäusen

Dargestellt sind die 48 Stunden nach der CCl₄-Behandlung gemessenen Mengen (Units/Liter) eines Hepatozyten-spezifischen Enzyms (Alanin-Aminotransferase, ALT) im Blutplasma der behandelten Mäuse. Die Mengen des Markers im Plasma der Ngb-überexprimierenden Mäuse (Ngb+ /+Dox/+CCl₄; n = 3) sind signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (* = p ≤ 0,05 im einseitigen Students t-Test, unabhängige Stichproben, gleiche Varianz; n = 3).

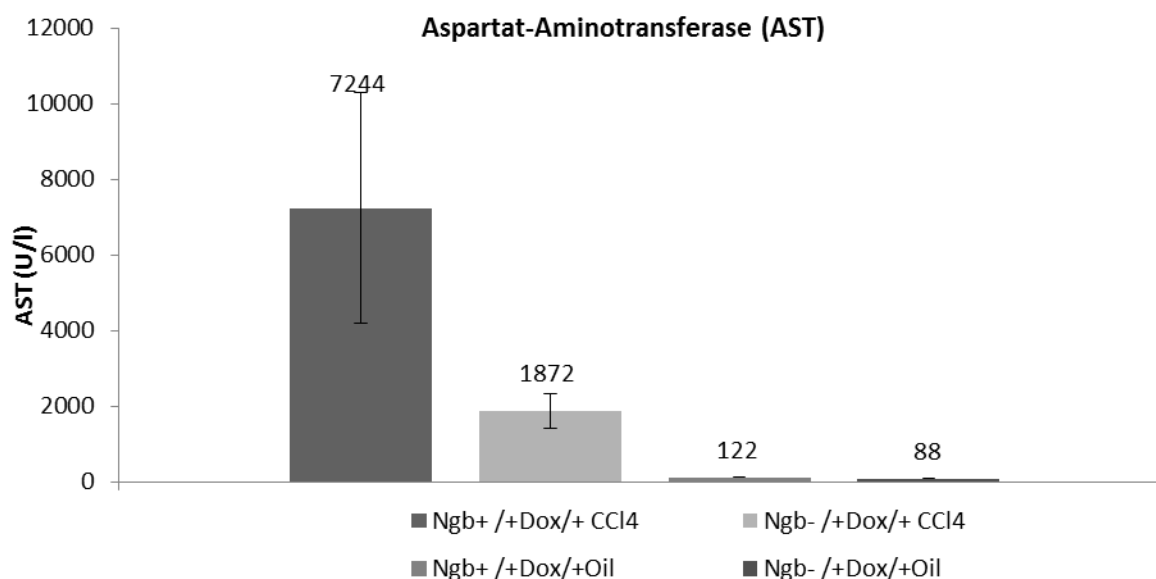


Abbildung 3-9: AST Blutplasmawerte in CCl₄-gestressten Mäusen

Dargestellt sind die 48 Stunden nach der CCl₄-Behandlung gemessenen Mengen (Units/Liter) eines Hepatozyten-spezifischen Enzyms (Aspartat-Aminotransferase, AST) im Blutplasma der behandelten Mäuse. Die Menge des Enzyms im Plasma der Ngb-überexprimierenden Mäuse (Ngb+/+Dox/+CCl₄; n = 3) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ngb-/+Dox/+CCl₄; n = 3) stark, jedoch nicht signifikant ($p \leq 0,08$ im einseitigen Students t-Test, unabhängige Stichproben, gleiche Varianz), erhöht.

Bei der Gruppe der Ngb-überexprimierenden und CCl₄-behandelten Mäuse (n = 3) war die Konzentration des ALT-Markers (10856 U/l) im Blutplasma 3,2-mal höher als in der Gruppe der wildtypischen CCl₄-behandelten Mäuse (3382 U/l; n = 3) und 250-mal höher als in den beiden Gruppen der scheinbehandelten Mäuse (42 und 30 U/l; n = 3) (Abbildung 3-8). Ein sehr ähnliches Bild wurde auch für das Enzym AST ermittelt (Abbildung 3-9).

3.1.5 Analyse möglicher Zellprotektion in Ngb-transgenen primären Hepatozyten

Das *in vivo* ermittelte Schadensbild der CCl₄ Behandlung Ngb-transgener Mäuse sollte *in vitro* durch eine spezifische Aktivierung der Apoptose reproduziert werden. Damit sollte geprüft werden ob hier die generelle anti-apoptotische Wirkung von Ngb wie sie in der Literatur für Neuronen beschrieben wird auch in primären Hepatozyten auftritt oder wie in den vorhergehenden Versuchen ein erhöhter Schaden durch die Ngb-Überexpression auftritt.

Die Untersuchung der primären Ngb-transgenen und WT Hepatozyten wurde in Kooperation mit der AG von Prof. Dr. Susanne Strand an der I. Medizinischen Klinik der Universität Mainz durchgeführt. Hierzu wurden primäre Hepatozyten von Ngb-transgenen und mit Doxycyclin behandelten Ngb x R26 Mäusen und ihren einfach-transgenen, somit auf die Ngb-Expression hin, wildtypischen Geschwistern isoliert. Die primären Hepatozyten wurden anschließend mit einem Apoptose-induzierenden Antikörper (anti-Fas Rezeptor-Klon Jo2 - Antikörper) behandelt und das Ausmaß der Apoptose wurde quantifiziert (Strand et al. 1996, Strand et al. 1998).

In Abbildung 3-10 ist die Apoptoserate der Ngb-transgenen gegenüber den wildtypischen primären Hepatozyten (pmHep) in Abhängigkeit zur Jo2-Konzentration dargestellt. Die Apoptoserate war in allen untersuchten Konzentrationen des Apoptose-induzierenden Antikörpers in den Ngb-transgenen Hepatozyten um den Faktor zwei geringer als in den wildtypischen Hepatozyten (siehe Abbildung 3-10).

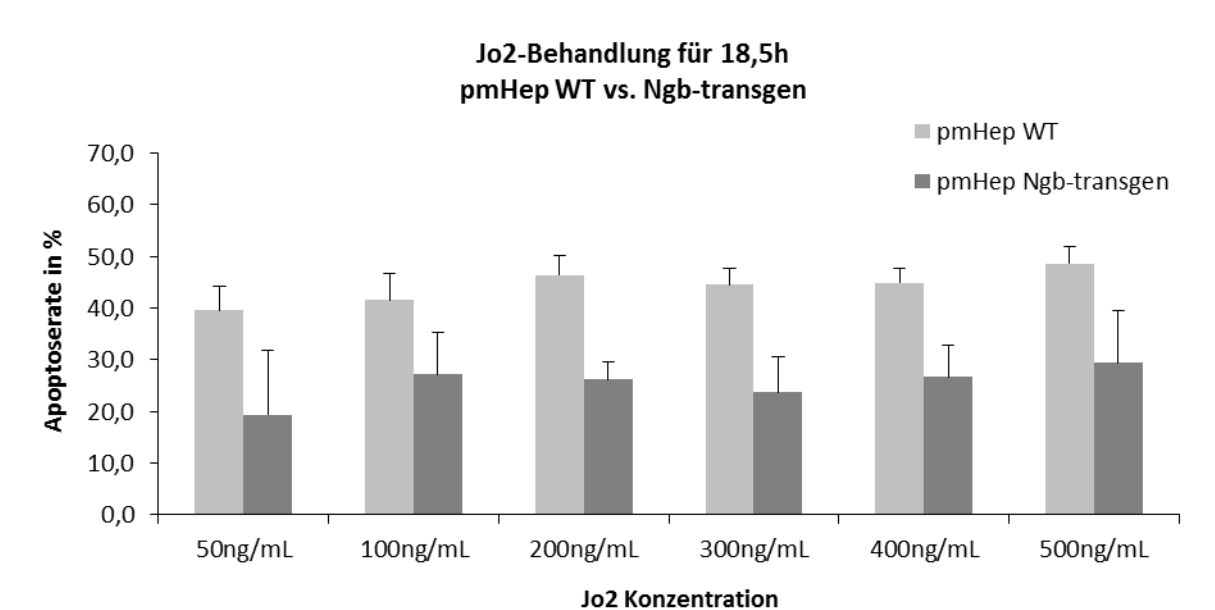


Abbildung 3-10: Apoptoserate nach einer Jo2-Behandlung von primären Hepatozyten

Konzentrationsabhängige Versuchsreihe der Jo2-Behandlung Ngb-transgener versus wildtypischer primärer Hepatozyten und die Bestimmung der Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Zellen (nicht dargestellt = 0). Gezeigt ist die Apoptoserate in Prozent in Bezug zur steigenden Jo2-Konzentration (50-500 ng/ml). Die Apoptoserate wurde mit dem Celltiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)

ermittelt, hierbei wird der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen in einer Luziferase-Reaktion als Maß für die Zahl lebender Zellen bestimmt¹.

Zur weiteren Auswertung des Jo2-induzierten Schadens wurde die Anzahl der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) positiven Zellen nach einer Behandlung der primären Hepatozyten mit 400 ng/ml Jo2-Antikörper ermittelt. Hierdurch kann auf die Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Zellen nach einem applizierten Stress geschlossen werden (Gavrieli et al. 1992, Labat-Moleur et al. 1998). In Jo2-behandelten Ngb-transgenen primären Hepatozyten wurden 3% TUNEL positive Zellen ermittelt während in wildtypischen primären Hepatozyten der Anteil an nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen 16% betrug (siehe Abbildung 3-11).

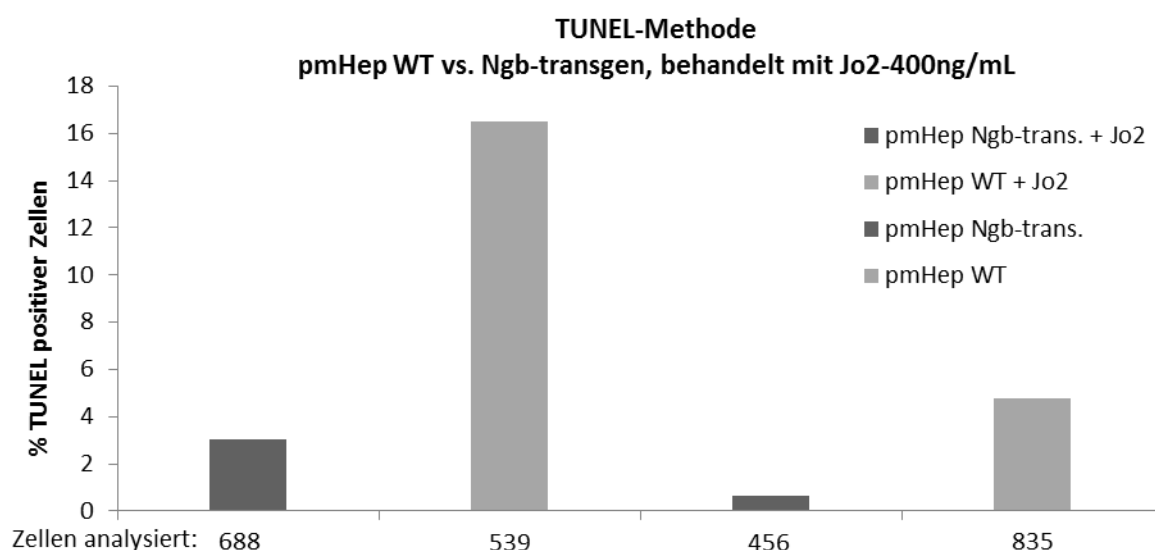


Abbildung 3-11: TUNEL-Assay in Jo2-behandelten primären Hepatozyten

Dargestellt ist die Anzahl der TUNEL positiven Zellen in Prozent (y-Achse) im Vergleich von Jo2-behandelten und unbehandelten Ngb-transgenen und wildtypischen primären Hepatozyten.

Als ein weiteres Maß für die Aktivierung des programmierten Zelltodes in den Jo2-behandelten Hepatozyten wurde die Aktivität der Initiator- und Effektor-Caspasen, welche

¹http://www.promega.de/products/cell-health-and-metabolism/cell-viability-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/ (27.08.2014)

zu den wichtigsten Enzymen der Apoptose zählen, gemessen. In Abbildung 3-12 ist die Aktivität der Effektor-Caspase 3 in Abhängigkeit zur Dauer der Jo2-Behandlung dargestellt. Nach 6 Stunden war die Caspase-Aktivität in Ngb-transgenen primären Hepatozyten im Vergleich zu wildtypischen primären Hepatozyten um den Faktor 3,5 höher bezogen auf die unbehandelten Kontrollen. Dieser Effekt war unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (5% vs. 21%), bei welcher die Hepatozyten inkubiert wurden, reproduzierbar (siehe Abbildung 3-13 und 7.1 für weitere Daten).

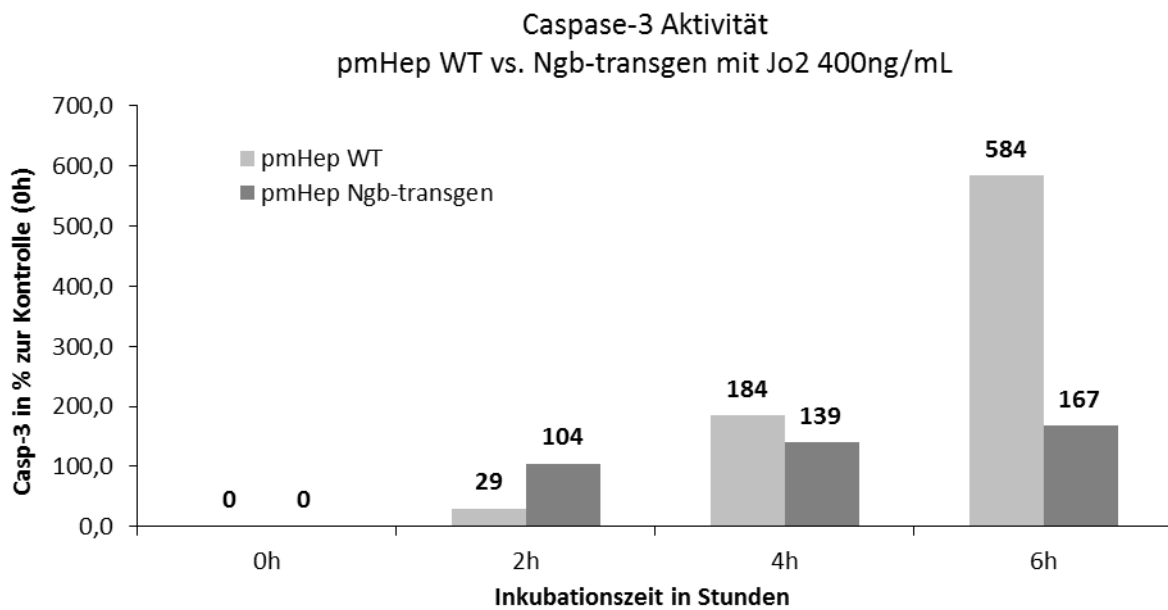


Abbildung 3-12: Casp-3/7 Aktivitätsmessung nach Jo2-Behandlung von primären Hepatozyten

Dargestellt ist die Caspase-3/7 Aktivität in Ngb-transgenen und wildtypischen primären Hepatozyten nach einer Jo2-Behandlung (400 ng/ml) im Verlauf von 6h bei 21% O₂ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

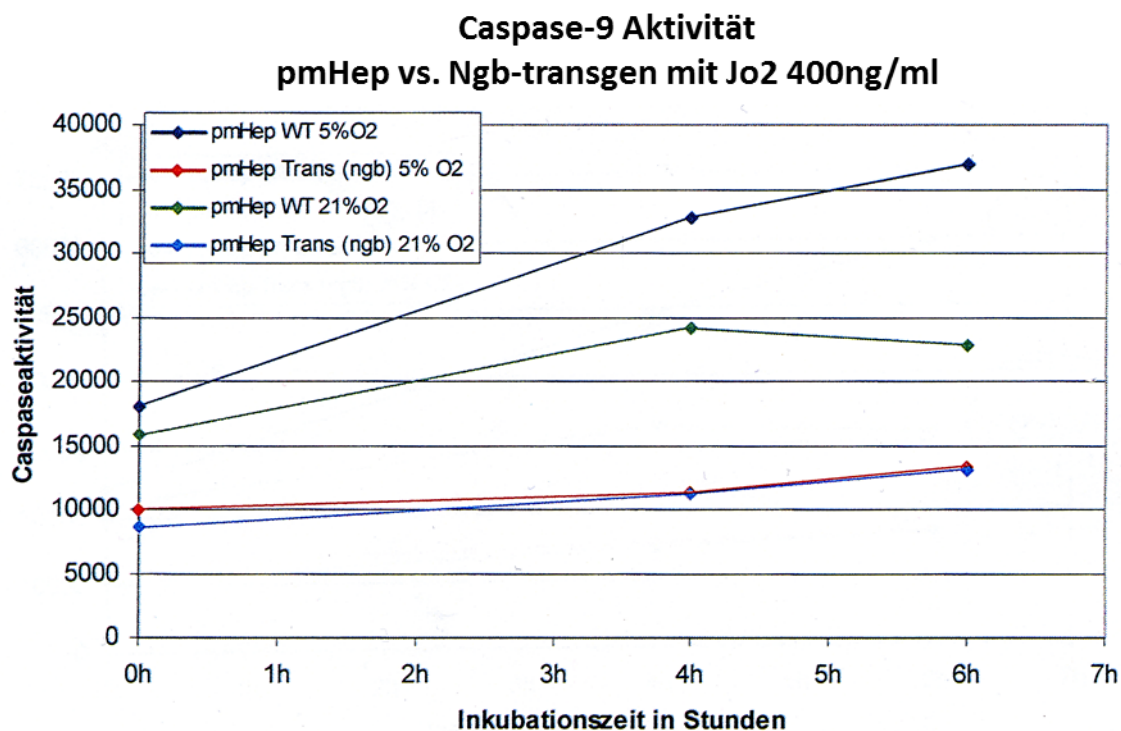


Abbildung 3-13: Casp-9 Aktivität nach Jo2-Behandlung bei unterschiedlichen O₂-Konzentrationen

Dargestellt ist die Caspase-9 Aktivität als relative Substratumsetzung in Ngb-transgenen und wildtypischen primären Hepatozyten nach einer Jo2-Behandlung (400 ng/ml) im zeitlichen Verlauf und bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (21% O₂ und 5% O₂).

Die Ergebnisse der *in vitro* Analyse primärer Hepatozyten nach einer Induktion der intrinsischen Apoptose zeigen einen von der Sauerstoffkonzentration unabhängigen protektiven Effekt von Ngb auf das Überleben der primären Hepatozyten. Diese Ergebnisse zeigen das der in der Literatur für Neuronen beschriebene Protektion durch Ngb auch in primären Hepatozyten gezeigt werden kann.

3.2 Ektopische Neuroglobin-Überexpression in Gehirnregionen der Maus mit Hilfe des Ngb x Camk2 Mausmodells

Die ektopische Ngb-Überexpression in dem Vorderhirn-spezifischen Ngb x Camk2 Mausmodell wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Kai-Uwe Best (2010) mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene sowie mittels Western Blot und IHC auf Proteinebene untersucht. Ähnlich der nativen Camk2a-mRNA Verteilung im Mausgehirn wurde hierbei eine starke ektopische Expression von Ngb im Cortex und Hippocampus der transgenen Tiere nachgewiesen (Best, 2010).

Das duale Tet-On System welches im Ngb x Camk2 Modell zur ektopischen Überexpression von Ngb verwendet wurde kann durch die Gabe von Doxycyclin moduliert werden. Hierdurch wird ein quantitativer Vergleich der Ngb-Expression zwischen dem Wildtyp (auch einfach transgene Tiere als Wurfgeschwister), dem Abgeschalteten Transgen (durch die Gabe von Doxycyclin über das Trinkwasser) und der vollen ektopischen Ngb-Expression mittels des Tet-On Systems ermöglicht. In den nachfolgenden Kapiteln wird zwischen einfach-transgenen (nur Ngb oder nur Camk2) und wildtypischen Wurfgeschwistern als Kontrollen nicht unterschieden, jedoch zwischen Doxycyclin behandelten und somit doppelt-transgenen Ngb x Camk2 Tieren

3.2.1 Ngb-Überexpression im Cortex von Ngb x Camk2 transgenen Mäusen

Die ektopische Ngb-Expression im Cortex der transgenen im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern ist in Abbildung 3-14 dargestellt. Die Untersuchung mittels IHC zeigte eine zytoplasmatische Lokalisation von Ngb in Neuronen des Cortex sowohl in wildtypischen als auch in Ngb-transgenen Tieren. Die Überexpression wurde mittels Western Blot (Abbildung 3-14) und qRT-PCR quantifiziert und entsprach der fünf- bis sechsfachen Ngb-Konzentration im Cortex der transgenen im Vergleich zu den wildtypischen Tieren (Best, 2010).

Weiterhin wurden in Wurfgeschwistern Stabilität und Funktionalität des Tet-Off Systems anhand der Transgen-Expression analysiert. Durch die Gabe von Doxycyclin (20 µg/ml) über einen Zeitraum von fünf Wochen konnte die transgene Expression abgeschaltet werden.

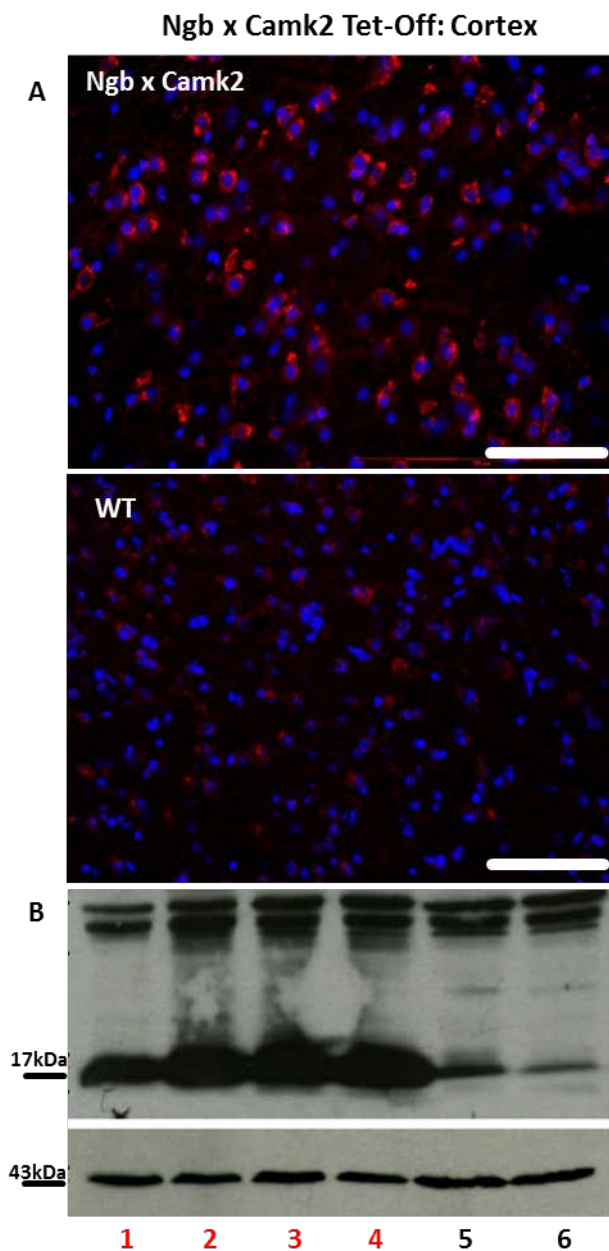


Abbildung 3-14: IHC und WB-Analysen der ektopischen Ngb-Überexpression im Cortex von Ngb x Camk2 transgenen Mäusen

A: Immunhistochemischer (IHC) Nachweis des Ngb-Proteins in Gehirnschnitten von Ngb x Camk2 doppelt transgenen und wildtypischen Wurfgeschwistern. Die Abbildungen zeigen coronale Kryoschnitte bei 200-facher Vergrößerung. Zur Detektion wurde als primärer Antikörper ein anti-Ngb Antikörper aus Kaninchen (Sigma) in einer 1:500 Verdünnung eingesetzt. Zur besseren Orientierung wurden die Zellkerne mittels DAPI gegengefärbt. Belichtungszeiten: TRITC: 1 Sek; DAPI: 0,2 Sek. Balken = 100 μ m. (Best, 2010)

B: Western Blot Nachweis des Ngb- (17 kDa) und β -Aktin (43 kDa) Proteins in Gesamt-Proteinextrakten aus dem Cortex von Ngb x Camk2 transgenen (1-4) und wildtypischen (5,6) Wurfgeschwistern. Zur Detektion wurde ein anti-Ngb Gesamtserum („Mitz-Serum“) aus Kaninchen 1:500 verdünnt verwendet. Der Nachweis von β -Aktin erfolgte mit einem anti- β -Aktin Antikörper aus Kaninchen (Sigma) in einer 1:800 Verdünnung. (Best, 2010)

3.2.2 Ngb-Überexpression im Hippocampus der Ngb x Camk2 transgenen Mäuse

Analog zur Untersuchung der Ngb-Überexpression im Cortex der Ngb-transgenen Versuchstiere wurde auch die Ngb-Expression im Hippocampus mittels IHC und Western Blot analysiert. Die Abschaltung der Transgen-Expression im Tet-Off System ist in Abbildung 3-15 dargestellt. Durch die Gabe von Doxycyclin über das Trinkwasser über einen Zeitraum von drei, vier und fünf Wochen wurde die Ngb-Überexpression im Hippocampus der transgenen

Tiere soweit abgeschaltet, dass sie mittels Western Blot nicht mehr detektiert werden konnte (siehe Abbildung 3-15 B).

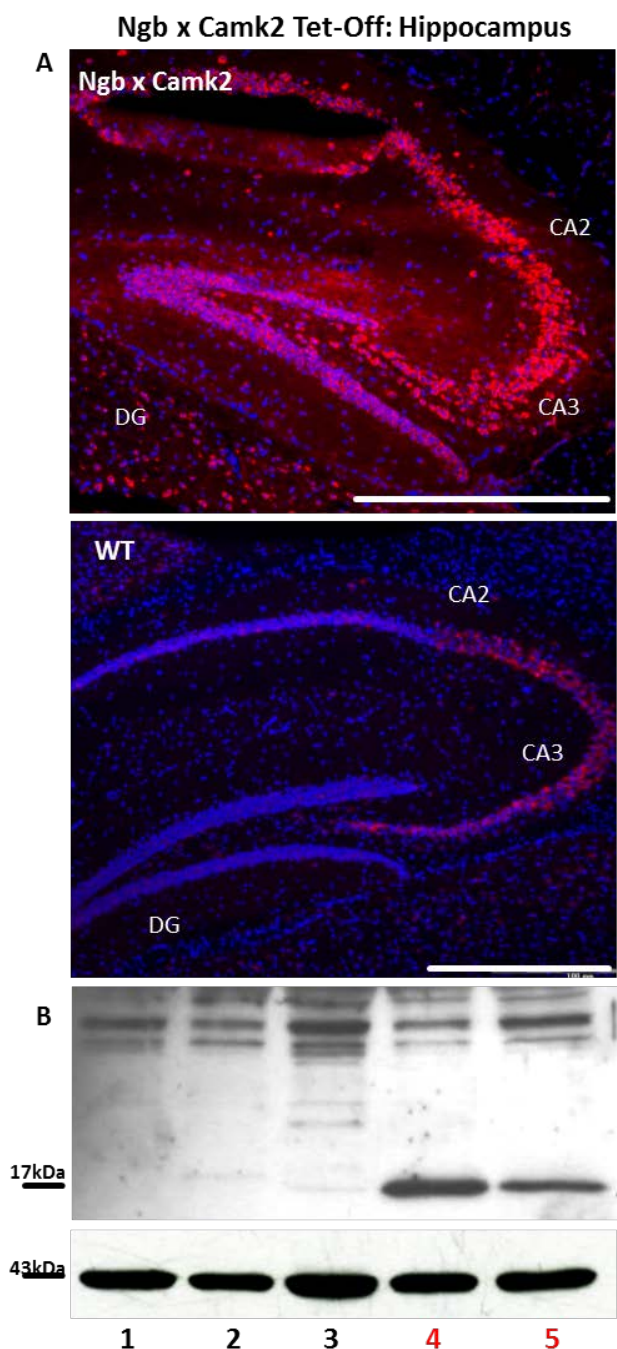


Abbildung 3-15: Ektopische Ngb-Überexpression im Hippocampus von Ngb x Camk2 transgenen Mäusen

A: Immunhistochemischer (IHC) Nachweis des Ngb-Proteins in Gehirnschnitten von Ngb x Camk2 transgenen und wildtypischen Mäusen. Die Abbildungen zeigen coronale Kryoschnitte bei 200-facher Vergrößerung. Zur Detektion wurde als primärer Antikörper ein anti-Ngb Antikörper aus Kaninchen (Sigma) in einer 1:500 Verdünnung eingesetzt. Zur besseren Orientierung wurden die Zellkerne mittels DAPI gegengefärbt. Belichtungszeiten: TRITC: 1 Sek; DAPI: 0,2 Sek. Balken = 100 μ m. (Best, 2010)

B: Western Blot Nachweis des Ngb (17 kDa) und β -Aktin (43 kDa) Proteins in Gesamt-Proteinextrakten aus dem Hippocampus von Ngb x Camk2 transgenen (4,5), Doxycyclin behandelten (2: 5 Wochen Dox, 3: 4 Wochen Dox) und wildtypischen (1) Mäusen. Zur Detektion wurde ein anti-Ngb Gesamtserum („Mitz-Serum“) aus Kaninchen 1:500 verdünnt eingesetzt. Der Nachweis von β -Aktin erfolgte mit einem anti- β -Aktin Antikörper aus Kaninchen (Sigma) in einer 1:800 Verdünnung.

3.2.3 Transkriptomanalyse von Ngb-transgenen und Doxycyclin behandelten Gehirnregionen im Ngb x Camk2 Mausmodell mittels RNA-Seq

Durch das Aufkommen von Sequenziertechnologien der zweiten Generation (NGS) bot sich die Möglichkeit einer „digitalen“ Transkriptomanalyse durch Auszählen von Sequenzschnipseln („Reads“), welche sich zum annotierten Genom alignieren lassen

(„Mapping“). Die Untersuchung der Ngb-transgenen vs. Doxycyclin behandelten Gehirnregionen als Kontrollen ermöglichte es, die Auswirkungen der Ngb-Überexpression auf diese Regionen zu ermitteln und hierdurch indirekt auf eine mögliche Funktion von Neuroglobin in diesen Regionen zu schließen. Weiterhin sollte ein Vergleich der neuronalen Ngb x Camk2 Transkriptomdaten mit dem hepatischen Datensatz der Ngb x R26 Mauslinie (siehe 3.1) die Aufdeckung eines potentiellen gewebsunabhängigen Ngb-Effektes auf das Transkriptom ermöglichen.

Die Herstellung der RNA-Seq Libraries wurde durch die Firma GENTERprise Genomics (2.4.11) in Mainz durchgeführt. Die Generierung der Sequenzdaten am HiSeq2000 (Illumina) wurde am Institut für Molekulargenetik in Mainz durchgeführt. Die Analyse der Rohdaten und das Mapping an das Mausgenom wurde wie beschrieben durchgeführt (siehe 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3). Die detaillierte Analyse der neuronalen Ngb-transgenen Transkriptome, auch im Vergleich zu den mittels Affymetrix-Microarray untersuchten Ngb-transgenen Leber-Transkriptomen, wurde u. a. im Rahmen der Diplomarbeit von Nadia Dünnes (Mainz, 2011) durchgeführt.

Zur Untersuchung der Transkriptome der Ngb-überexprimierenden Ngb x Camk2 Gehirnregionen („Ngb+“: Pool aus je 3 Tieren, siehe 2.4.11) wurden als Kontrollen Doxycyclin-behandelte und daher in ihrer Ngb-Expression native Ngb x Camk2 Wurfgeschwister („Doxy“: Pool aus je 3 Tieren, siehe 2.4.11) verwendet. In den Transkriptomen der Ngb x Camk2 transgenen Tiere wird nicht nur die wildtypische Ngb-mRNA sondern auch die transgene Ngb-CDS exprimiert. Um zwischen diesen beiden Ngb-Transkripten zu unterscheiden wurde für die RNA-Seq Analyse mittels CLC-Workbench (siehe 2.5.2) neben dem wildtypischen Mausgenom auch die pBI-eGFP-Ngb Vektorsequenz als Teil des transgenen Genoms eingesetzt (siehe Abbildung 7-1 und Tabelle 3-4).

Durch das Hinzufügen der pBI-eGFP-Ngb-Vektorsequenz (siehe 7.1) zum annotierten Mausgenom konnte beim Mapping der Reads zwischen der nativen Ngb-mRNA und der transgenen Ngb-CDS-Expression unterschieden werden. Da die Sequenzunterschiede zwischen der nativen Ngb-mRNA und der transgenen Ngb-CDS lediglich aus den 5' UTR und 3'UTR-Sequenzen bestehen können lediglich Reads die in nativen Ngb-mRNA 5'UTR und 3' UTR-Regionen alignieren gezählt werden. Mit den stringenten Mapping-Parametern (siehe 2.5.2) wurden somit alle Reads die auch vom pBI-eGFP-Ngb-Vektor stammen und Reads welche nicht eindeutig zugeordnet werden konnten verworfen. Zur Beurteilung der

Regulation der transgenen Ngb-Expression durch die Doxycyclin-Behandlung wurden eGFP-CDS spezifische Reads quantifiziert welche ausgehend vom dualen Promoter (pMin-CMV) des pBI-eGFP-Ngb Vektors in den Ngb x Camk2 Geweben exprimiert werden.

In der nachfolgenden Tabelle 3-4 sind die spezifischen wildtypischen Ngb-mRNA und transgenen eGFP-CDS Reads in den Hippocampus- und Cortex-Datensätzen sowohl der Ngb-überexprimierenden (Ngb+) als auch der Doxycyclin-behandelten (Doxy) Datensätze zusammengefasst. Ebenfalls sind im Vergleich die „Unique Gene Reads“ welche beim Mapping an das alleinige wildtypische murine Genom (untere Zeile) gezählt wurden angegeben. Da hierbei nur gegen den nativen Ngb-Lokus des murinen Genoms gemappt wurde kann zwischen Reads ausgehend vom transgenen pBI-eGFP-Ngb Vektor und der nativen Ngb-mRNA nicht unterschieden werden. Die großen Unterschiede in den Readzahlen: Ngb-mRNA 376 Reads beim Mapping gegen Genom und pBi-eGFP-Ngb Vektor vs. 22926 Reads bei Mapping gegen das alleinige Mausgenom, beruhen auf den Mapping-Parametern (2.5.2). Nur Reads welche einmal im Genom alignieren wurden gezählt. Da beim Mapping gegen das Genom und den pBI-eGFP-Ngb Vektor (das simulierte „transgene Genom“) für die Ngb-CDS zwei Loci vorliegen werden Reads welche nicht eindeutig zugeordnet werden können automatisch verworfen (siehe Tabelle 3-4).

Über die Anzahl der spezifischen eGFP-Reads konnte das Ausmaß der Doxycyclin-Behandlung und somit die Effizienz der Abschaltung der Transgen-Expression ermittelt werden. Durch die fünfwöchige Gabe der 20 µg/ml Doxycyclin-Lösung kann die eGFP-mRNA Expression sowohl im Cortex (Faktor 2,16) als auch Hippocampus (Faktor 2,23) halbiert werden. Die kombinierte Ngb-Expression, also sowohl transgene als auch wildtypische Ngb-Expression konnte um den Faktor 3 im Hippocampus und Faktor 1,6 im Cortex reduziert werden.

Tabelle 3-4: Anzahl spezifischer Reads für Ngb und eGFP in RNA-Seq-Datensätzen

Dargestellt ist die Anzahl an spezifisch gemappten Reads (Unique Gene Reads) im Ngb und eGFP-Lokus. Gemappt wurde an das Mausgenom ohne (untere Zeile) oder mit (obere Zeilen) der pBI-eGFP-Ngb Vektorsequenz (simuliertes „transgenes Genom“). Neben den Reads ist der Faktor der Regulation im Vergleich Doxy vs. Ngb+ angegeben. Zu beachten ist vor allem der Unterschied der spezifischen Ngb-Reads bei Verwendung der Genomsequenz mit pBI-eGFP-Ngb Vektor im Vergleich zum alleinigen wildtypischen Mausgenom (untere Zeile).

Mapping	Reads	Hippocampus			Cortex		
		Doxy	Ngb+	Faktor	Doxy	Ngb+	Faktor
pBI-eGFP-Ngb + Mmu-Genom	Ngb - mRNA	239	376	1,57	133	220	1,65
	EGFP - CDS	2296	5110	2,23	2380	5135	2,16
Mmu-Genom	Ngb - mRNA + pBI-Ngb- CDS	7543	22926	3,04	15491	24647	1,59

Insgesamt konnten im Hippocampus mit 14025 bzw. 13714 mehr Gene mittels RNA-Seq als exprimiert detektiert werden ($RPKM \geq 0,5$) als in den Cortex-Datensätzen mit 12705 bzw. 12674 Genen. Dies ist vor allem der insgesamt größeren Datensätze der Hippocampus-RNA-Sequenzierungen geschuldet welche mit bis zu 82 Millionen Reads etwa 30% größer ausfiel als die Cortex Datensätze mit bis zu 58 Millionen Reads (Tabelle 3-5). Überraschenderweise sind im Cortex, mit 2058 Genen, deutlich mehr Gene als reguliert ermittelt worden als im Hippocampus mit lediglich 216 regulierten Genen (Tabelle 3-6). Auch sind im Cortex mit einem maximalen FC_{\log_2} von 8,7 bzw. -13,3 die stärkeren absoluten Änderungen zwischen dem Ngb-überexprimierenden (Ngb+) und den Doxycyclin-behandelten (Doxy) Datensatz ermittelt worden (Tabelle 3-6).

Tabelle 3-5: Mapping-Statistiken der Ngb x Camk2 RNA-Seq Analyse

Zusammenfassend dargestellt sind die Mapping-Statistiken mit der CLC-Workbench in der RNA-Seq Analyse. Unspezifisch gemappt: die Anzahl an Reads mit mehr als einem spezifischen Treffer im Genom. Anzahl an Reads bei welchen die Paare eines Fragmentes nicht in korrektem Abstand gemappt werden konnten sind in der vorletzten Zeile (Reads ohne „Paired End“ (PE) Information) angegeben. In der letzten Zeile ist die Anzahl an Genen mit einem RPKM-Wert von $\geq 0,5$ im jeweiligen Datensatz angegeben.

Gewebe Datensatz	Hippocampus		Cortex	
	Doxy	Ngb+	Doxy	Ngb+
Gesamtzahl an Reads	72.509.018	82.639.164	58.657.356	57.803.736
Gemappte Reads	65.773.879	75.004.045	46.974.996	55.079.690
spezifisch gemappt	51.662.965	59.448.259	45.935.942	42.234.532
unspezifisch gemappt	14.110.914	15.555.786	1.039.054	12.845.158
ungemappte Reads	6.746.228	7.647.385	12.721.414	3.728.394
Reads mit PE Inf.	64.046.704	73.190.142	44.896.888	53.035.702
Reads ohne PE Inf.	1.716.086	1.801.637	1.039.054	1.035.640
Gene mit RPKM $\geq 0,5$	13714	14025	12705	12674

Tabelle 3-6: Anzahl an regulierten Genen in den Hippocampus und Cortex Transkriptomen

Zusammenfassend ist die Anzahl an regulierten Genen im Hippocampus und Cortex von Ngb x Camk2 transgenen (Ngb+) vs. Doxycyclin-behandelten (Doxy) Datensätzen. Alle Gene mit einem logarithmierten RPKM-Fold Change von ≥ 1 und einem Rj-Wert ≥ 8 (siehe 2.5.4) wurden als reguliert angesehen. Außerdem ist die ermittelte Regulation von Ngb und die jeweils höchsten Werte der Expressionsänderung (max FC) angegeben.

Anzahl der Gene ($FC_{\log_2} \geq 1$; $R_j \geq 8$)	Hippocampus		Cortex	
	Doxy vs. Ngb+	max FC_{\log_2}	Doxy vs. Ngb+	max FC_{\log_2}
Hochreguliert	156	5,5	1038	8,7
Runterreguliert	60	-3,0	1020	-13,3
Gesamt	216		2058	
Neuroglobin FC	1,41		0,65	

In den nachfolgenden Tabellen sind jeweils die am stärksten regulierten Gene im Hippocampus-Gewebe (Tabelle 3-7) und Cortex-Gewebe (Tabelle 3-8) wie sie mittels der RNA-Seq Analyse ermittelt wurden angegeben. Neben dem Gennamen ist die Regulation als Fold Change (FC_{\log_2}) des RPKM-Wertes dargestellt. Keine der bisher in der Literatur

diskutierten potentiellen Interaktionspartner von Ngb sind unter den am stärksten regulierten Genen vorhanden.

Tabelle 3-7: Die Top 10 der hoch und runter regulierten Gene im Hippocampus RNA-Seq-Datensatz

Die Tabelle zeigt die zehn am stärksten hoch bzw. runter regulierten Gene nach ektoptischer Ngb-Expression im Hippocampus von Ngb x Camk2 transgenen Proben (Pool aus n=3) im Vergleich zu Doxycyclin-behandelten Kontrollen (Pool aus n=3). Neben der offiziellen GeneID sind der Genname (wenn vorhanden) und der Fold Change (FC_{log2}) angegeben.

Hoch			Runter		
Gen	FC_{log2}	Annotation	Gen	FC_{log2}	Annotation
Pcp2	5,5	Purkinje cell protein 2	Nap115	-3,0	nucleosome assembly protein 1-like 5
Cbln3	5,2	cerebellin 3 precursor protein	Fos	-2,7	FBJ osteosarcoma oncogene
Gabra6	5,0	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor	Cabp7	-2,2	calcium binding protein 7
Gpr151	5,0	G protein-coupled receptor 151	Tshz2	-2,1	teashirt zinc finger family member 2
Ppp1r17	5,0	protein phosphatase 1, regulatory subunit 17	Arc	-2,1	activity regulated cytoskeletal-associated protein
Crtam	4,9	cytotoxic and regulatory T cell molecule	Klk8	-1,9	kallikrein related-peptidase 8
Fat2	4,9	FAT tumor suppressor homolog 2	Lmo1	-1,8	LIM domain only 1
Adora2a	4,5	adenosine A2a receptor	Spink8	-1,7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 8
LOC100503710	4,4	-	Tcf7l2	-1,7	transcription factor 7 like 2, T cell specific, HMG box
Gpr88	4,1	G-protein coupled receptor 88	Epha6	-1,7	Eph receptor A6

Tabelle 3-8: Die Top 10 der hoch und runter regulierten Gene im Cortex RNA-Seq-Datensatz

Die Tabelle zeigt die zehn am stärksten hoch bzw. runter regulierten Gene nach ektoptischer Ngb-Expression im Cortex von Ngb x Camk2 transgenen Proben (Pool aus n=3) im Vergleich zu Doxycyclin-behandelten Kontrollen (Pool aus n=3). Neben der offiziellen GeneID sind der Genname (wenn vorhanden) und der Fold Change (FC_{log2}) angegeben.

Hoch			Runter		
Gen	FC_{log2}	Annotation	Gen	FC_{log2}	Annotation
Ren2	8,7	renin 2	Sybu	-13,3	syntabulin
Car3	7,7	carbonic anhydrase 3	LOC100503185	-5,9	-
Ifitm1	7,5	interferon induced transmembrane protein 1	BC022960	-5,4	-
1810020005Rik	6,9	-	Adap2	-5,2	ArfGAP with dual PH domains 2
LOC100504707	6,8	-	Kcna3	-5,0	potassium voltage-gated channel
Bdh2	6,2	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	Gpr63	-4,6	G protein-coupled receptor 63
LOC100503361	6,2	-	Klh33	-4,5	kelch-like 33
Lyl1	6,2	lymphoblastic leukemia 1	4930447C04Rik	-4,5	-
Sctr	5,9	secretin receptor	Gm10409	-4,4	-
Cdkn2c	5,8	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	Ccdc176	-4,2	coiled-coil domain containing 176

3.2.4 Vergleich der modulierten Pathways in Ngb-überexprimierenden versus Doxycyclin behandelten Geweben

Die detaillierte Untersuchung der Ngb-spezifischen Reads in den transgenen und Doxycyclin-behandelten Ngb x Camk2 Datensätzen zeigte eine deutliche Modulation der Ngb-Expression (Tabelle 3-4). Die anschließende statistische Auswertung der regulierten Gene (2.5.3) und die

Analyse der angereicherten Pathways (2.5.4) im Vergleich der unterschiedlichen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gewebe ist in Tabelle 3-9 zusammenfassend dargestellt.

Auffällig war die mit negativen physiologischen Konsequenzen behaftete Natur der zehn häufigsten Kegg-Pathways in allen drei untersuchten Ngb-transgenen (Ngb+) Geweben im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Ngb-). Im Vergleich der beiden neuronalen Gewebe und der bereits beschriebenen transgenen Mausleber sind sowohl gemeinsame (Alcoholism, Metabolic Pathways, Pathways in cancer) als auch gewebsspezifische Stoffwechselwege (Cortex: MAPK-signaling, Hippocampus: Dopaminergic-pathway, Leber: Hepatitis C; siehe Tabelle 3-9) zu finden.

Tabelle 3-9: Kegg Pathways in neuronalen und hepatischen Ngb-transgenen Geweben

Vergleichend dargestellt sind die Top 10 am häufigsten vertretenen Pathways, welche durch die regulierten Gene nach einer Ngb-Überexpression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle repräsentiert werden. Für die Analyse wurden jeweils alle als reguliert ermittelten Gene ($FC_{\log_2} \geq 1$, $p \leq 0,05$, sowohl hoch als auch runterreguliert) verwendet. Die Zahl in Klammern gibt jeweils die Anzahl an Genen innerhalb des jeweiligen Datensatzes wieder, welche mit einer Funktion in diesem Pathway annotiert sind.

Annotation der Top 10 exprimierten Kegg-Pathways

Cortex	Hippocampus	Leber
Metabolic pathways (151)	Neuroactive ligand-receptor interaction (12)	Alcoholism (36)
Alcoholism (45)	Calcium signaling pathway (10)	Systemic lupus erythematosus (35)
Viral carcinogenesis (42)	Morphine addiction (9)	Metabolic pathways (29)
Ribosome (26)	Alcoholism (9)	Transcriptional misregulation in cancer (10)
MAPK signaling pathway (38)	Dopaminergic synapse (8)	Influenza A (10)
PI3K-Akt signaling pathway (36)	PI3K-Akt signaling pathway (8)	Herpes simplex infection (10)
Pathways in cancer (36)	Amphetamine addiction (7)	Lysosome (9)
HTLV-I infection (36)	Retrograde endocannabinoid signaling	Epstein-Barr virus infection (8)
Systemic lupus erythematosus (35)	Pathways in cancer (7)	Hepatitis C (7)
Transcriptional misregulation in cancer	Cholinergic synapse (7)	Tuberculosis (7)

Eine weitergehende Untersuchung der statistischen Anreicherung der Kegg-Pathways (siehe 2.5.4) welche durch die als reguliert ermittelten Gene in den neuronalen Geweben, dem Cortex und Hippocampus der Ngb x Camk2 Tiere, als auch in der Leber der Ngb xR26 Tiere repräsentiert werden zeigte ein differenziertes Bild der Kegg-Pathway Anreicherung. In den nachfolgenden Tabellen sind die signifikant angereicherten Kegg-Pathways für Hippocampus (Tabelle 3-10) und Cortex (Tabelle 3-11) dargestellt, wobei für die Annotation der Kegg-Pathways sowohl alle regulierten Gene eines Gewebes als auch nur die Liste mit den hoch

bzw. runter regulierten Genen verwendet wurden. So sollen mögliche Antworten des Transkriptoms auf die Modulation der Ngb-Expression durch z. B. eine verstärkte Expression von Genen in bestimmten Pathways (hoch regulierte Gene) oder das gezielte Abschalten von anderen Pathways (runter regulierte Gene) beschrieben werden. Auffällig ist die hohe Anzahl an signifikant angereicherten Kegg-Pathways in den neuronalen Transkriptomen im Vergleich zu dem untersuchten Leber-Transkriptom mit lediglich drei angereicherten Kegg-Pathways (Tabelle 3-12).

Tabelle 3-10: Top 10 statistisch angereicherte Kegg-Pathways im Hippocampus-Transkriptom

Dargestellt sind die Top 10 signifikant angereicherte Pathways ($p\text{-Wert} \leq 0,0036$), welche durch die regulierten Gene nach einer Ngb-Überexpression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Doxy) repräsentiert werden. Für die Analyse wurden alle in der WebGestalt Datenbank annotierten Gene verwendet; Alle reg. Gene: 207 von 216; nur runter reg. 59 von 60; nur hoch reg. 148 von 156. Die Zahl in Klammern gibt jeweils die Anzahl an Genen innerhalb der jeweiligen Liste wieder, welche mit einer Funktion in diesem Pathway annotiert sind.

Top 10 der angereicherten Kegg-Pathways im Hippocampus

Alle regulierten gene	Runter regulierte Gene	Hoch regulierte Gene
Neuroactive ligand-receptor interaction (12)	Neuroactive ligand-receptor interaction (4)	Neuroactive ligand-receptor interaction (8)
Calcium signaling pathway (9)	ECM-receptor interaction (3)	Vascular smooth muscle contraction (6)
Pathways in cancer (7)	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) (3)	Calcium signaling pathway (6)
Vascular smooth muscle contraction (7)	Colorectal cancer (3)	Tight junction (5)
Melanogenesis (5)	Osteoclast differentiation (3)	Protein digestion and absorption (4)
Protein digestion and absorption (5)	Wnt signaling pathway (3)	Gap junction (4)
Tight junction (5)	Calcium signaling pathway (3)	Purine metabolism (4)
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) (4)	Thyroid cancer (2)	Hedgehog signaling pathway (3)
Gastric acid secretion (4)	Endometrial cancer (2)	Bile secretion (3)
Salivary secretion (4)	Acute myeloid leukemia (2)	Gastric acid secretion (3)

Tabelle 3-11: Top 10 statistisch angereicherte Kegg-Pathways im Cortex-Transkriptom

Dargestellt sind die Top 10 signifikant angereicherte Pathways ($p\text{-Wert} \leq 4,85 \times 10^{-5}$), welche durch die regulierten Gene nach einer Ngb-Überexpression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Doxy) repräsentiert werden. Für die Analyse wurden alle in der WebGestalt Datenbank verfügbaren Gene der Listen: alle Gene: 1936 von 2058; nur runter: 969 von 1020; nur hoch: 967 von 1038 verwendet. Die Zahl in Klammern gibt jeweils die Anzahl an Genen innerhalb der jeweiligen Liste wieder, welche mit einer Funktion in diesem Kegg-Pathway annotiert sind.

Top 10 der angereicherten Kegg-Pathways im Cortex		
Alle regulierten gene	Runter regulierte Gene	Hoch regulierte Gene
Metabolic pathways (135)	Metabolic pathways (48)	Metabolic pathways (87)
MAPK signaling pathway (37)	Pathways in cancer (24)	Ribosome (19)
Pathways in cancer (34)	MAPK signaling pathway (23)	Pyrimidine metabolism (16)
Huntington's disease (28)	Focal adhesion (21)	Purine metabolism (20)
Purine metabolism (25)	Axon guidance (14)	Huntington's disease (19)
Alzheimer's disease (25)	Chemokine signaling pathway (14)	Parkinson's disease (15)
Ribosome (21)	ErbB signaling pathway (13)	Oxidative phosphorylation (14)
Insulin signaling pathway (21)	Insulin signaling pathway (12)	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (8)
Pyrimidine metabolism (20)	Chronic myeloid leukemia (10)	Alzheimer's disease (14)
Cell cycle (20)	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate (6)	Selenocompound metabolism (5)

Tabelle 3-12: Angereicherte Kegg-Pathways im hepatischen Ngb-Transkriptom

Dargestellt sind signifikant angereicherte Pathways ($p\text{-Wert} \leq 0,048$), welche durch die herunter regulierten Gene nach einer Ngb-Überexpression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Ngb-) repräsentiert werden. Für die Analyse wurden alle in der WebGestalt Datenbank verfügbaren Gene; alle Gene: 282 von 349; nur runter: 122 von 145; nur hoch: 160 von 204 verwendet. Die Zahl in Klammern gibt jeweils die Anzahl an Genen innerhalb der jeweiligen Liste wieder, welche mit einer Funktion in diesem Pathway annotiert sind.

Angereicherte Kegg-Pathways in der Leber

Runter regulierte Gene
Metabolic pathways (18)
Steroid hormone biosynthesis (3)
Other glycan degradation (2)

3.3 Generierung einer transkriptionellen und genetischen Neuroglobin Knockout Maus

Durch die Herstellung einer Ngb-Knockout Maus kann die Funktion des Gens/Proteins im Verlauf der gesamten Ontogenese der Maus untersucht werden. Hierdurch können auch Rückschlüsse auf die Funktion von Ngb beim Menschen gezogen werden. Die Etablierung der

Ngb-KO Maus bietet weiterhin das Potential, für den Menschen krankheitsrelevante potentielle Ngb-Funktionen am Mausmodell zu untersuchen. Ebenfalls können technische Aspekte wie die Validierung von Ngb-Antikörpern mithilfe von KO-Modellen angegangen werden da mit dem Auslöschen des funktionalen Proteins auch ein Verlust des spezifischen Signals einhergeht.

Für die Generierung der Ngb-KO Mauslinie wurden murine embryonale Stammzellen (ESCs) vom Eucomm-Konsortium¹ bezogen, welche über homologe Rekombination eine Integration einer Knock-Out-First Selektionskassette am Ngb-Lokus auf Chromosom 12 tragen (siehe Abbildung 3-17). Die ESCs wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Ari Waisman am Institut für Molekulare Medizin der Universitätsmedizin Mainz in Blastozysten injiziert und pseudoschwangeren Mäusen implantiert. In Kooperation mit Prof. Dr. Kurt Reifenberg der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz wurden die heterozygoten Nachkommen der chimären Mäuse miteinander verpaart und die Zucht bis zur konditionalen Ngb-KO Mauslinie durchgeführt (siehe Abbildung 3-18).

3.3.1 Validierung der Insertion des Eucomm-Vektors im Ngb-Lokus mittels Southern Blot

Der Nachweis der korrekten Insertion des Eucomm-Vektors (Design: PGRS0002_B_B11) am Ngb-Lokus wurde mittels Southern Blot durchgeführt. Hierzu wurde die DNA aus den ESCs extrahiert, mit BamHI restringiert und auf einer Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (siehe 2.4.10). Die Sonde war gegen das erste Intron von Ngb sowie einen Teil des Eucomm-Vektors gerichtet (siehe Abbildung 3-17).

In Abbildung 3-16 ist das Agarosegel mit der restringierten DNA (links) und das daraus resultierende Southern-Autoradiogramm (rechts) dargestellt. Die DNA aus beiden verwendeten ESC-Klonen (A: F01 und B: D02) konnte erfolgreich mit BamHI restringiert werden. Mit der radioaktiv markierten Sonde wurden anschließend zwei BamHI-Fragmente der Größe $\sim 5,5$ kb und $\sim 3,2$ kb in beiden DNA-Extraktionen auf dem Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 3-16). Ein wildtypisches BamHI-Restriktionsfragment der Größe 14.496 bp

¹ http://www.mousephenotype.org/martsearch_ikmc_project/martsearch/ikmc_project/35589 (27.08.2014)

ist sehr schwach in beiden untersuchten ESC-Klonen zu erkennen (siehe Pfeil). Beide verwendeten ESC-Klone (A: F01 und B: D02) konnten erfolgreich zur Herstellung von chimären Mäusen verwendet werden.

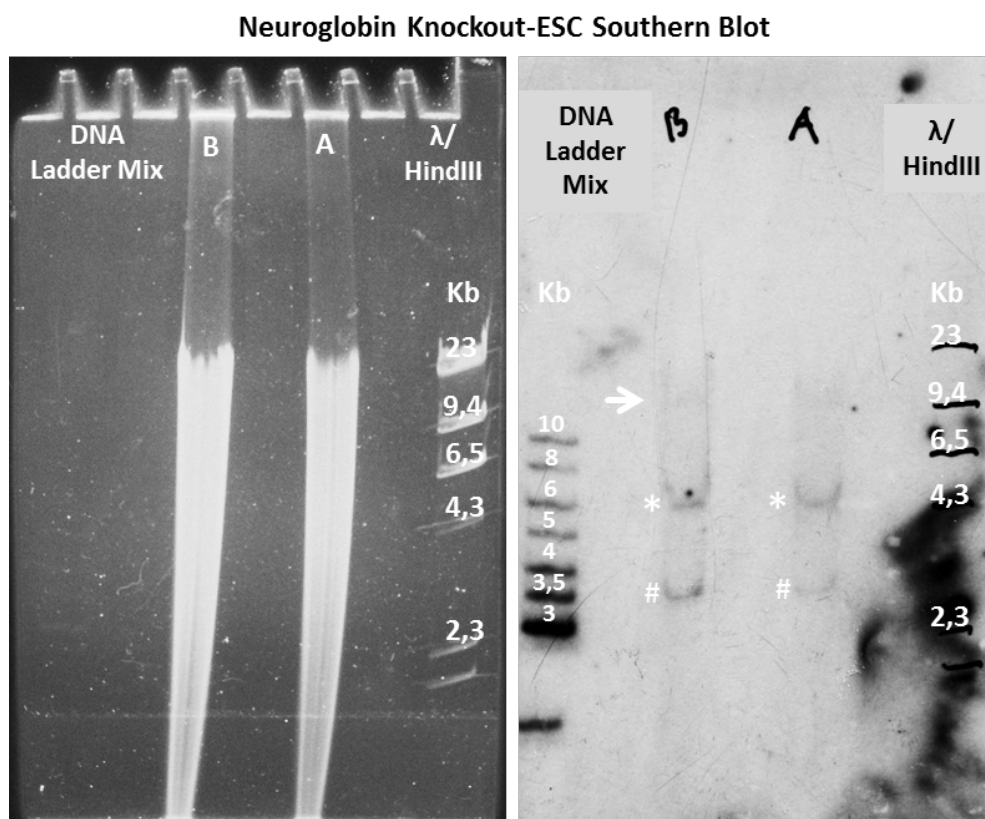


Abbildung 3-16: Southern Blot-Nachweis des Ngb-KO Locus in embryonalen Stammzellen der Maus

Die mit BamHI restringierte genomische DNA (30 µg) wurde auf einem Agarosegel (links) aufgetrennt (A: F01 und B: D02) und mit einer 740 bp langen, radioaktiv markierten Sonde auf der Membran hybridisiert. Nach einer Expositionszeit von 4 Tagen waren drei Banden auf dem Film (rechts) zu sehen. Die Bande bei 5.698 bp * repräsentiert das rekombinierte Ngb-KO Fragment in beiden Klonen. Das wildtypische BamHI-Restriktionsfragment bei 14 kb ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die kleinere Bande bei 3.298 bp # stellt ein BamHI-Restriktionsfragment im Locus des Engrailed 2-Genes (Chromosom 5), welches Teil des transkriptionellen Eucomm-Vektor Systems ist, dar (siehe Abbildung 3-17).

Die beiden detektierten Restriktionsfragmente sind einerseits durch das rekombinante Ngb-KO Fragment (* 5.698 bp) zu erklären und andererseits durch das Engrailed 2-Intron auf Chromosom 5 (# 3.298 bp), an welches ein Teil der Sonde hybridisiert. Die genaue Lage der Sonde und der BamHI Restriktionsschnittstellen ist der Abbildung 3-17 zu entnehmen.

Genetische Konstitution der Ngb Eucomm ESCs

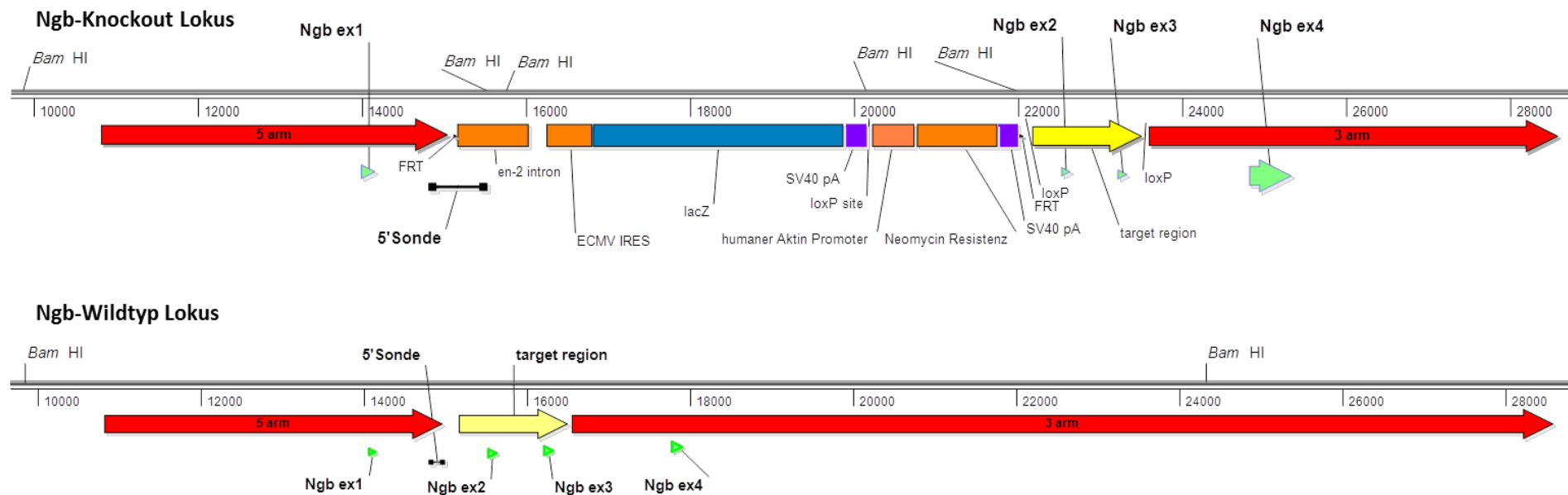


Abbildung 3-17: Genetische Konstitution im murinen Ngb-Lokus und Lage der Southern Blot Sonde

Dargestellt ist die Lage der 5' Sonde (740 bp) im Ngb-Lokus, sowie die Positionen der BamHI Restriktionsschnittstellen. Da durch die Rekombination eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle eingebracht wurde (Abstand zur ersten Schnittstelle: 5.698 bp), kann durch die Hybridisierung mit dieser Sonde zwischen dem wildtypischen (BamHI Restriktionsfragment: 14.496bp) und dem rekombinanten Locus (BamHI Restriktionsfragment: 5.698 bp) unterschieden werden. Zu beachten ist die Überlappung der Sonde mit der Sequenz des Engrailed 2-Introns (en-2), welches als Splice-Akzeptor für das erste Ngb-Exon dient und somit zum transkriptionellen Ngb-KO führt. Durch die Überlappung der Sonde mit dieser Sequenz wird ein weiteres BamHI-Restriktionsfragment (3.298 bp) am Wildtyp Engrailed 2-Lokus (nicht dargestellt) auf dem Southern Blot detektiert. (FRT und loxP deuten die Lage der Erkennungssequenzen der Flp und Cre-Rekombinasen; ECMV-IRES: Internal Ribosomal Entry Site (IRES) des Encephalomyocarditis Virus; SV40-pA ist das Polyadenylierungssignal des SV40 Virus; lacZ ist das Gen der β -Galactosidase)

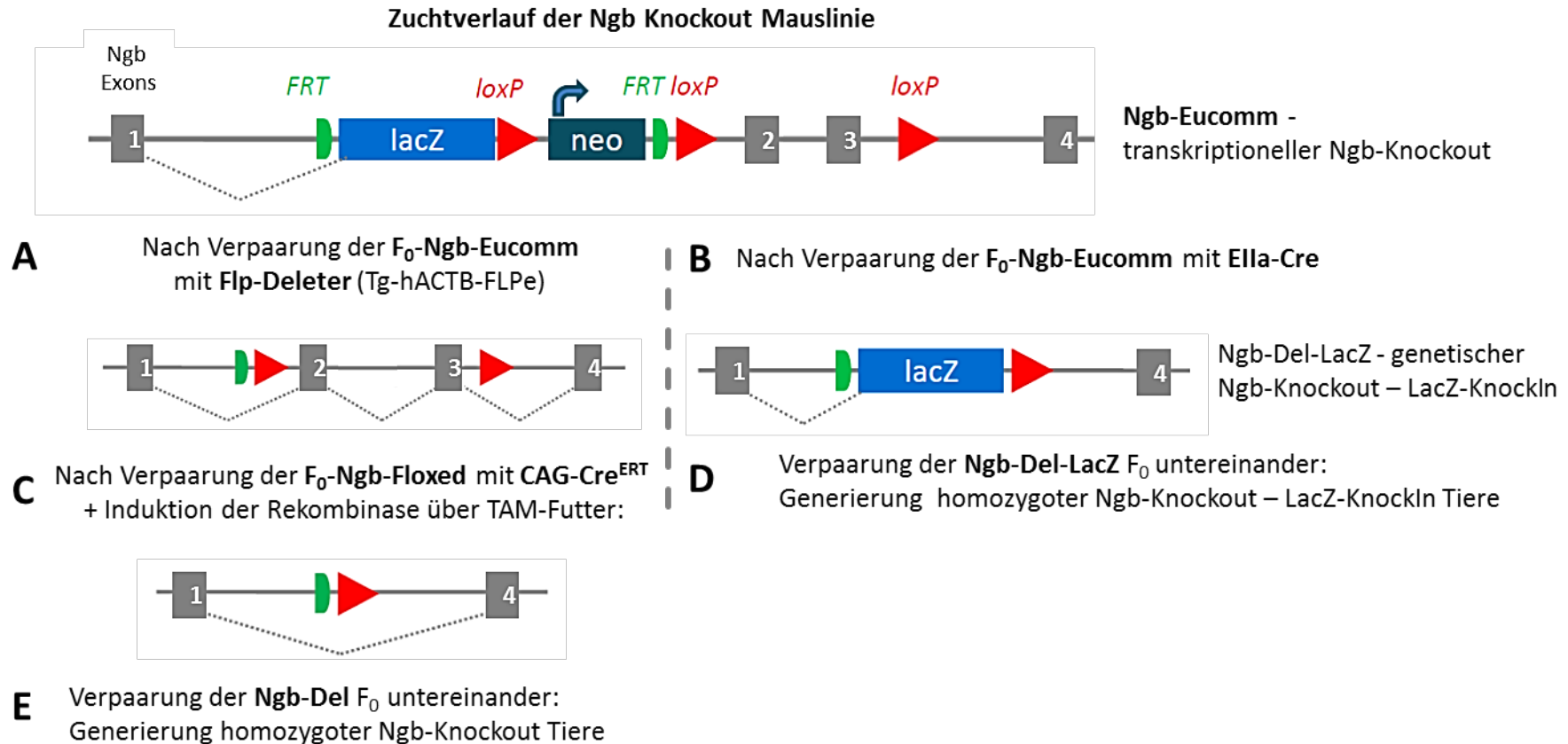


Abbildung 3-18: Zucht-Diagramm vom transkriptionellen bis zum genetischen Ngb-Knockout und LacZ-KnockIn

Die schematische Darstellung des Ngb-Lokus ausgehend vom Knockout-First Eucomm-Vektor bis zum genetischen Ngb-KO. Die homozygoten transkriptionellen Ngb-KO Mäuse wurden parallel mit einem (A) Flp-Deleter Stamm (Flp-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen β -Aktin Promoters) und einem (B) Ella-Cre Stamm verpaart. Hierdurch konnte eine homozygote Ngb-gefloxe Maus generiert werden, welche in einem weiteren Schritt (C) durch die Verpaarung mit der CAG-Cre^{ERT} transgenen Mauslinie zur Generierung der (E) homozygoten Ngb-KO Tiere führte. Durch die Verpaarung der transkriptionellen Ngb-KO Mauslinie mit der Ella-Cre transgenen Linie wurde eine (D) genetische Ngb-KO - LacZ KnockIn Mauslinie generiert, welche die indirekte Untersuchung des Ngb-Promoters ermöglicht (siehe auch Tabelle 2-1).

3.3.2 Mauszucht und Cre-vermittelte Rekombination des Ngb-Gens

Zur Generierung der konditionalen Ngb-KO Mauslinie musste zunächst die Knockout-First Selektionskassette der Ngb-Eucomm Mauslinie entfernt werden (1.3.3). Hierzu wurde ein Flp-Rekombinase exprimierender Mausstamm (FLP-Deleter; siehe Tabelle 2-1) mit der Ngb-Eucomm Linie verpaart (siehe Tabelle 2-1 und Abbildung 3-18). Die so entstandene gefloxtete Mauslinie weist bis auf die die Ngb-Exons 2 und 3 flankierenden Lox-P-Rekombinationsstellen einen wildtypischen Genotyp auf (Abbildung 3-18 A). Zur Deletion des Ngb-Proteins wurde anschließend eine CRE^{ERT} exprimierende Mauslinie mit der F₀-Ngb-Floxed Generation verpaart (siehe Abbildung 3-18 C). Nach einer Aktivierung der induzierbaren CRE^{ERT} durch die Gabe von Tamoxifen-haltigem Futter konnten heterozygote Ngb-KO Mäuse hergestellt werden. Durch Verpaarung dieser Tiere untereinander wurden schließlich homozygote Ngb-KO Tiere generiert (Abbildung 3-18 E). Die Generierung der Ngb-Del-LacZ Tiere erfolgte zeitlich parallel zur oben beschriebenen konditionalen Ngb-KO Mauslinie durch die Verpaarung der Ngb-Eucomm Linie mit einer anderen Cre-exprimierenden Mauslinie (Ela-Cre, Abbildung 3-18 B). Die Ela-Cre exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Adenovirus Ela-Promotors bereits im Zygotenstadium des frühen Embryos und wird seit einem Jahrzehnt als Cre-Deleter verwendet (Lakso et al. 1996). Die so generierten Mäuse wurden zur Homozygotisierung untereinander verpaart und somit wurde der Ngb-KO - LacZ-KnockIn Mausstamm generiert (siehe Abbildung 3-18 D). Die so generierten Mauslinien wurden auf mRNA und Proteinebene im Hinblick auf ihre Ngb-Expression untersucht. Eine detaillierte Analyse des transkriptionellen Ngb-KO Mausstammes wurde unter anderem im Rahmen der Diplomarbeit von Daniel Andre (Mainz, 2013) durchgeführt.

3.3.3 Validierung des transkriptionellen Ngb-Knockouts via qRT-PCR

Die Bestätigung des transkriptionellen Ngb-KOs auf der Ebene der mRNA erfolgte zunächst mittels qRT-PCR (siehe 2.4.7.2). Hierzu wurden die ersten Nachkommen der homozygoten Ngb-Eucomm Mauslinie, welche nicht für die weitere Zucht benötigt wurden, untersucht. Die Ngb-Expression wurde im Gehirn (Abbildung 3-19), der Retina (Abbildung 3-20) und den Testes (Abbildung 3-21) im Vergleich mit wildtypischen (Bl/6) Geweben ermittelt.

Sowohl im Gehirn als auch in der Retina wurde eine deutlich geringere Kopienzahl von Ngb in den Ngb-Eucomm im Vergleich zu den wildtypischen Proben gemessen (siehe Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20). Demnach betrug die normalisierte absolute (norm. abs.) Kopienzahl der Ngb-mRNA im wildtypischen Gehirn etwa 170 Tausend Kopien, wobei in den Gehirnextrakten des transkriptionellen Ngb-KO maximal 6.800 Kopien ermittelt wurden. Der Unterschied in der Ngb-mRNA Kopienzahl war in den untersuchten Retina-Proben ebenfalls sehr deutlich. So betrug die mittlere Ngb-Kopienzahl in den wildtypischen Proben 13.500 bzw. 7.000 Kopien, während in den untersuchten transkriptionellen Ngb-Eucomm Retinaextrakten etwa 600 Kopien Ngb pro 1 µg Gesamt-RNA gemessen wurden (siehe Abbildung 3-20). Dies zeigt eine teilweise Abschaltung der Ngb-Expression durch das alternative Splicing des Ngb-Exon1 an das LacZ-Gen durch die Knockout-First Kasette.

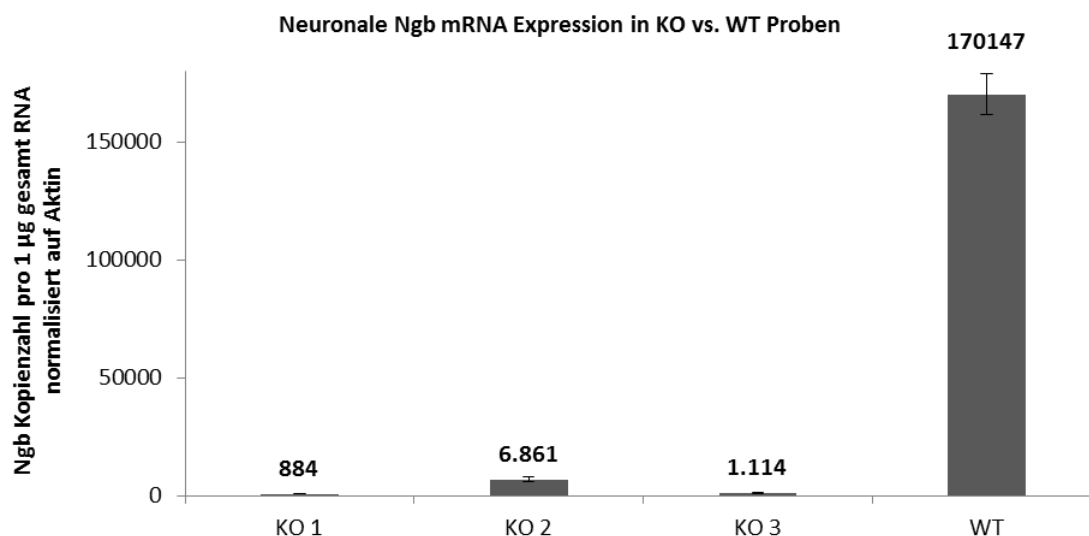


Abbildung 3-19: Ngb-mRNA Kopienzahl in Gehirnprouben der Ngb-Eucomm Mauslinie

Dargestellt sind die normalisierten absoluten Kopienzahlen von Ngb (Assay: Ex3-Ex4 überlappendes Amplikon) in drei Gehirnprouben (Cortex Gesamt-RNA) der Ngb-Eucomm Mauslinie (KO1 - KO3) im Vergleich zu einem wildtypischen Gehirn (WT). Die absoluten Kopienzahlen wurden auf β-Aktin als Referenzgen normalisiert, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der technischen Replikate (n = 2) an. Für die cDNA-Synthese wurde je 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Neben der Ngb-Kopienzahl konnte in den Retina- und Testes-Extrakten der Ngb-Eucomm Tiere auch die Kopienzahl des LacZ-Gens bestimmt werden. Hierbei sollte geprüft werden wie Effizient das alternative Spleißen des LacZ-Gens an das Ngb-Exon1 in den verschiedenen Geweben erfolgt. In den retinalen KO-Proben konnten lediglich geringe Kopienzahlen (2000 Kopien pro 1 µg Gesamt-RNA) des LacZ-Gens im Vergleich zu Testes KO-Proben (über 500

Tausend Kopien pro 1 µg Gesamt-RNA) detektiert werden (siehe Abbildung 3-20 und Abbildung 3-21). Die LacZ mRNA Expression ist somit in Testes höher als in Retina und Gehirn.

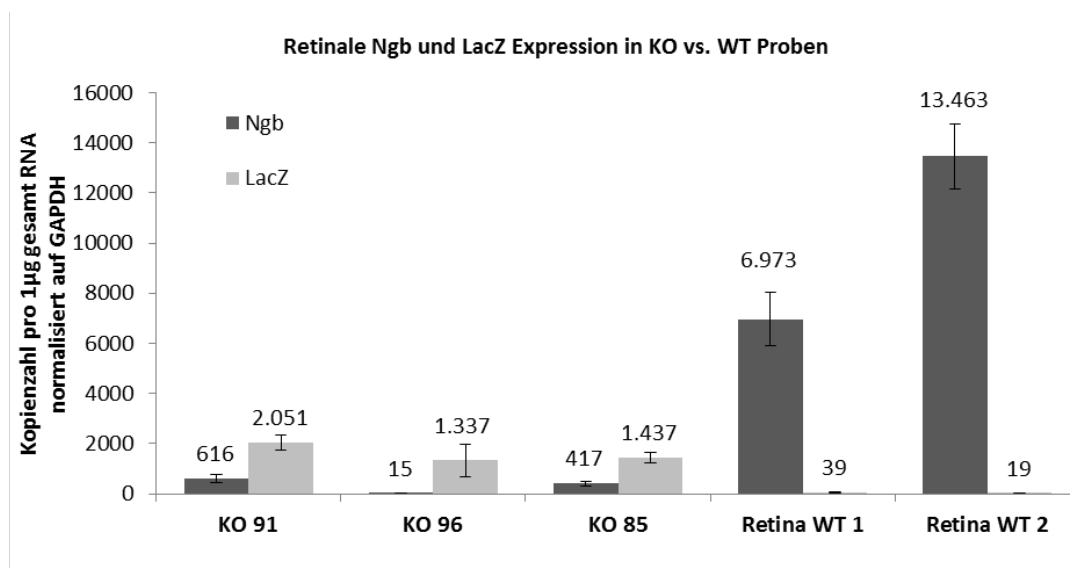


Abbildung 3-20: Ngb und LacZ mRNA Expression in der Retina der Ngb-Eucomm Mauslinie

Die Ngb und LacZ mRNA Expression im transkriptionellen Ngb-KO Mausstamm ermittelt per qRT-PCR. Gezeigt ist die auf GAPDH als Referenzgen normalisierte Ngb- und LacZ-Expression in der Retina. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der technischen Replikate (n = 2) an. Für die cDNA-Synthese wurden je 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

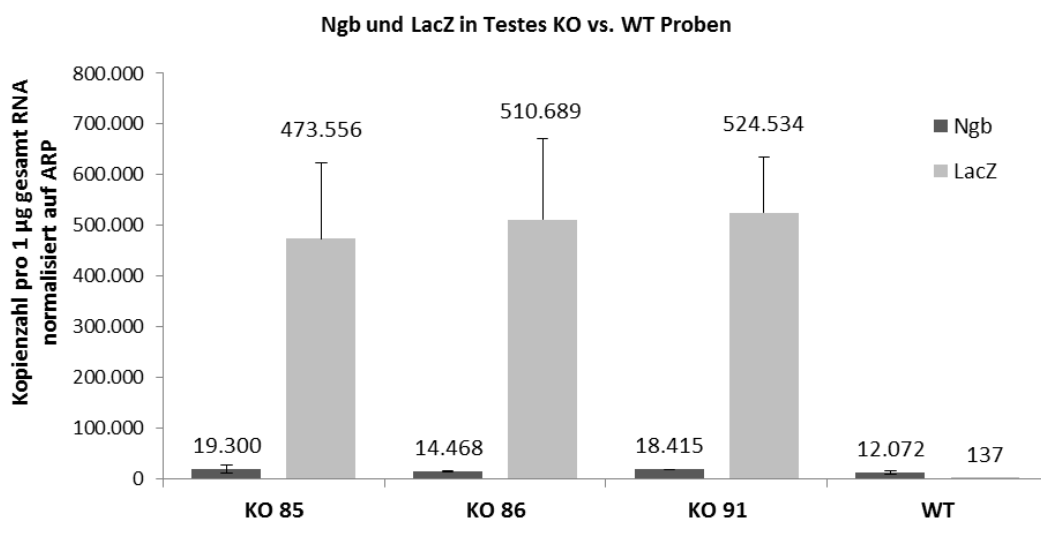


Abbildung 3-21: Ngb und LacZ mRNA-Expression in Testes der Ngb-Eucomm Mauslinie

Die Ngb und LacZ mRNA Expression wurde mittels qRT-PCR im transkriptionellen Ngb-KO Mausstamm im Vergleich zum Wildtyp (WT) ermittelt. Gezeigt ist die absolute, auf ARP als Referenzgen normalisierte Ngb- und LacZ-mRNA Expression in Testes-Gewebe pro 1 µg Gesamt-RNA. Die Standardabweichungen der technischen Replikate (n = 2) sind in Form der Fehlerbalken angegeben.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Ngb-Quantifizierung in Gehirn und Retina unterschieden sich die Kopienzahlen der Ngb-mRNA in Testes Ngb-KO Extrakten nicht von der Wildtyp-Probe (siehe Abbildung 3-21). Die Kopienzahl von Ngb pro 1 µg Gesamt-RNA betrug hiernach unabhängig von der genetischen Konstitution 12 bis 19 Tausend Kopien. Die ermittelte LacZ-mRNA Kopienzahl von ca. 500 Tausend Kopien zeigt, dass es sich bei den untersuchten Geweben eindeutig um genetisch veränderte Ngb-Eucomm Tiere handelt (siehe Abbildung 3-21). Hierbei handelt es sich um ein komplexes Expressionsmuster der LacZ-mRNA aus alternativem Spleißen an das Ngb-Exon 1 und anschließendem Spleißing der Exons 2 bis 4 an dieses Verlängerte Ngb-LacZ Transkript. Dieses verlängerte Transkript wird in manchen Geweben wie Gehirn und Retina durch den Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) Mechanismus Abgebaut ist in anderen Geweben, wie den Testes jedoch weniger effizient.

3.3.4 Untersuchung des murinen Neuroglobin-Promotors mittels X-Gal-Färbung und β-Gal-Immunhistochemie

Neben der quantitativen Expressionsuntersuchung der Ngb-mRNA mittels qRT-PCR wurde das LacZ-Reportergen und die daraus resultierende β-Galactosidase (β-Gal) mittels der indirekten X-Gal Färbung und einer Antikörperfärbung in Schnitten vom Gehirn und Testes der Ngb-Eucomm und der Ngb-KO - LacZ-KnockIn Mauslinien untersucht (siehe 2.3.1 und 2.3.2).

Die Detektion der β-Gal mittels Antikörper und der Nachweis der Aktivität dieses bakteriellen Proteins mit dem X-Gal Farbumschlag in Testes-Kryoschnitten ist in Abbildung 3-22 dargestellt. Deutlich sichtbar ist die mit beiden Methoden detektierte Beschränkung der β-Gal-Lokalisation auf die Schichten der Spermatogonia und der primären Spermatozyten in Übereinstimmung mit der bereits publizierten Ngb-mRNA ISH Untersuchung in murinen Testes (Reuss et al. 2002).

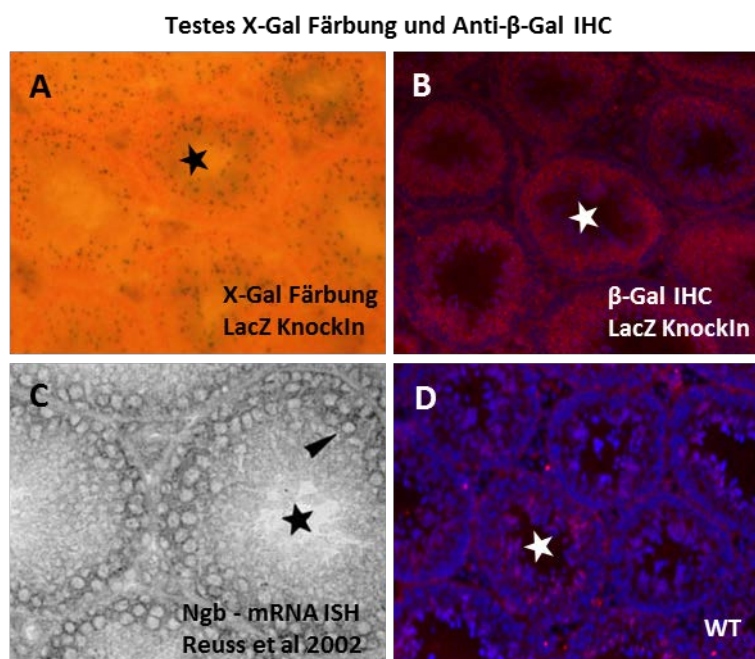


Abbildung 3-22: Nachweis der β-Gal-Expression und Aktivität in Testes von Ngβ-KO – LacZ-KnockIn Mäusen

Gezeigt ist die X-Gal Färbung (A) und der immunhistochemische Nachweis der β-Galactosidase (B) in Testes-Kryoschnitten. Zur Orientierung ist (C) eine Ngβ-mRNA-ISH auf wildtypische Testes aus Reuss et al. (2002) dargestellt. Alle Techniken zeigen ein ähnliches Bild: die Ngβ-mRNA, das β-Gal-Protein und der durch die β-Gal Aktivität produzierte X-Gal Farbniederschlag sind auf die Schichten der Spermatogonia und primären Spermatozyten beschränkt. Wildtypische Testes weisen ein schwaches, unspezifisches Signal im IHC-Nachweis der β-Galactosidase auf (D). Die Lumen der Samenkanäle sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Untersuchung des LacZ-Reportergens mittels indirekter X-Gal Färbung in Kryoschnitten des Gehirns von Ngβ-KO - LacZ-KnockIn Mäusen zeigt das in der Literatur beschriebene Muster der wildtypischen neuronalen Ngβ-Expression (siehe Abbildung 3-23, 1.2.3, Tabelle 4-1). Deutlich sichtbar ist die zytosolische Blau-Färbung der Neuronen im Cortex, der Ca1-Ca3 Regionen des Hippocampus, des Gyrus dentatus (DG) und der Purkinje-Zellen im Cerebellum (siehe Abbildung 3-23). Die parallele Färbung eines wildtypischen Gehirnschnittes ergab keine spezifische Färbung dieser Gehirnregionen (siehe 7.1). Deutlich sichtbar in der Vergrößerung ist die Beschränkung der X-Gal Färbung auf das Zytoplasma der Neuronen im Cortex (Zk: Zellkern, ungefärbt) und die Purkinje Zellen im Cerebellum (Abbildung 3-23).

Gehirn X-Gal Färbung

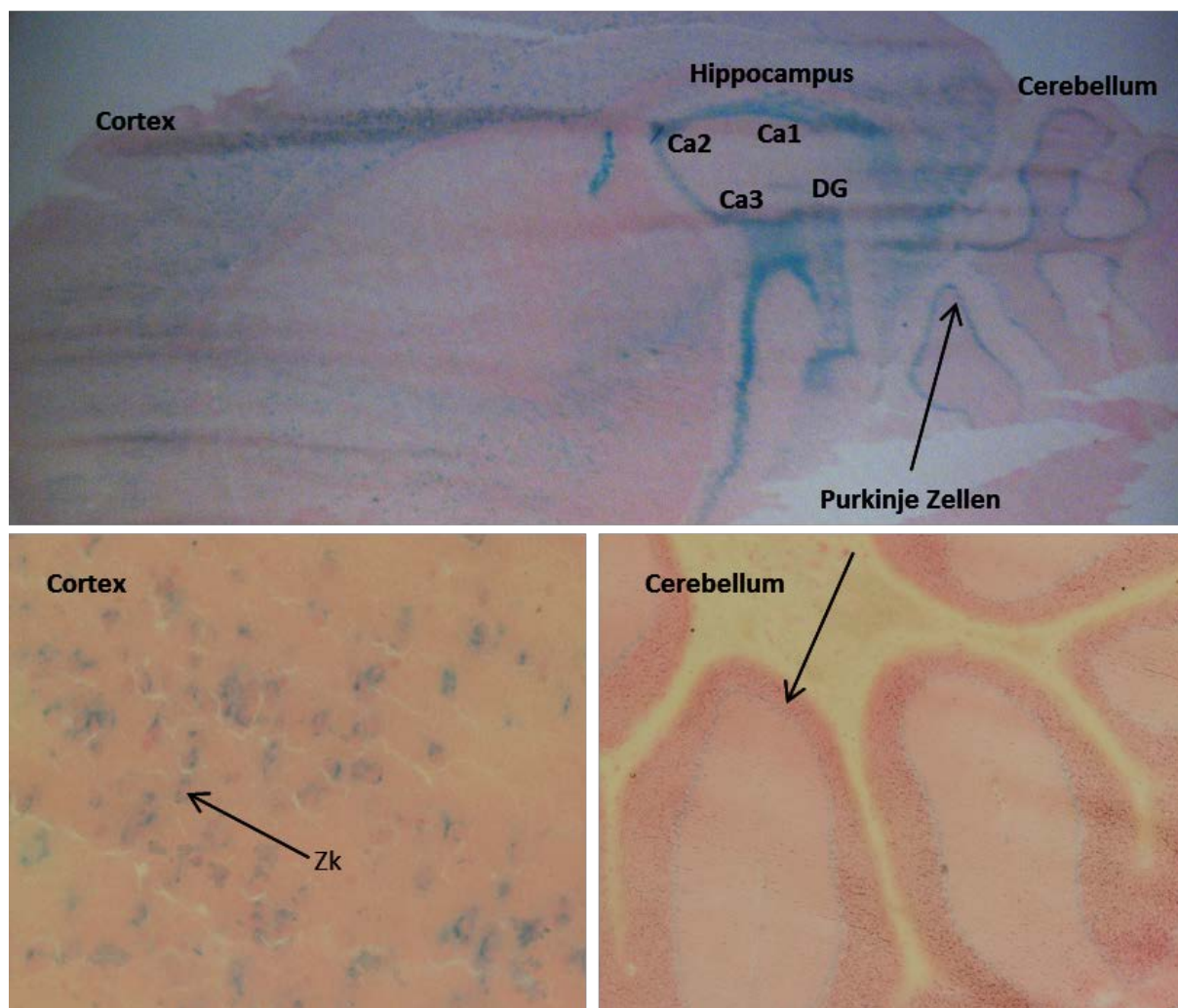


Abbildung 3-23: Nachweis der LacZ-Reportergen-Expression im murinen Gehirn mittels X-Gal-Färbung

Der indirekte Nachweis der β -Gal-Expression mittels X-Gal-Färbung zeigt eine Lokalisation des Proteins im Cortex, Hippocampus (Cornu Ammonis 1-3 (Ca1-3) und Gyrus dentatus (DG) sowie im Cerebellum (Purkinje Zellen). Vergrößert dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem Cortex (unten links) und Cerebellum (unten rechts) wobei deutlich die Beschränkung der X-Gal Färbung auf das Zytoplasma der Neuronen im Cortex (Zk: Zellkern, ungefärbt) und auf die Purkinje Zellen im Cerebellum sichtbar wird. Zur besseren Orientierung wurden die Schnitte mit Neutralrot gegengefärbt.

3.3.5 Phänotypisierung des transkriptionellen und genetischen *Ngb*-Knockouts

In Kooperation mit Prof. Dr. Mathias Seeliger vom Forschungsinstitut für Augenheilkunde am Universitätsklinikum Tübingen wurde eine erste phänotypische Untersuchung der *Ngb*-Eucomm Mauslinie durchgeführt. Hierzu wurden insgesamt acht Tiere im Alter von vier

Monaten auf evtl. vorhandene retinale Degenerationen hin untersucht. Eine Degeneration der Retina in diesem Alter würde z. B. auf eine Beeinträchtigung des oxidativen Stoffwechsels schließen lassen und somit zur Funktionsaufklärung von Neuroglobin im murinen Auge beitragen.

Sowohl die *in vivo* „Scanning Laser Ophthalmoskopische“ Analyse (SLO) als auch die detaillierte elektroretinographische Analyse (ERG) der Retina zeigten keine pathogenen Veränderungen in der Retina der untersuchten Mäuse (siehe 7.1).

Als ein weiterer offensichtlicher Phänotypisierungs-Parameter wurden die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen über die verschiedenen Generationen der Mauszucht beobachtet. Hier konnten jedoch ebenfalls keine besonderen Auffälligkeiten festgestellt werden. Sowohl die Größe der Würfe (im Schnitt 5-10 Nachkommen) als auch die Verteilung der Geschlechter und der von den Elterntieren an die Nachkommen weitergegebenen Ngb-Allele war unauffällig.

3.4 RNA-Seq Expressionsprofile von Neuroglobin

Aufgrund der bestehenden Diskrepanzen in der Literatur bezüglich der Expression von Ngb, vor allem in neuronalen Geweben der Maus (Siehe 1.2.3 und Tabelle 4-1), wurde die Ngb-mRNA Expression mit bioinformatischen Methoden erneut analysiert. Durch die in den letzten Jahren entwickelte NGS-Technik steht eine große Anzahl an Sequenzdatensätzen in öffentlichen Datenbanken zur Verfügung. Durch die bioinformatische Auswertung von öffentlichen Datensätzen mit der RNA-Seq Methode wurde die Ngb-Expression in murinen neuronalen und endokrinen Geweben und einigen ausgewählten Geweben der Modellorganismen Ratte und Zebrafisch untersucht. Mithilfe statistischer Methoden wurde zudem die mögliche Co-Expression von Ngb mit in der Literatur beschriebenen potentiellen Ngb-Interaktionspartnern in neuronalen RNA-Seq Transkriptomdatensätzen der Maus gesucht. Die Ergebnisse der bioinformatischen Expressionsprofile von Ngb wurden mithilfe der qRT-PCR sowie mittels Western Blot überprüft.

3.4.1 Analyse der Ngb-Expression in embryonalen RNA-Seq-Datensätzen der Maus

Die Expression von Ngb während der Entwicklung des murinen ZNS wurde anhand von ausgewählten RNA-Seq-Datensätzen embryonaler Stammzellen und verschiedener Entwicklungsstadien von Embryonen (E11-E18) analysiert. In Abbildung 3-24 sind die ermittelten RPKM-Werte von Ngb, Cygb und β -Aktin als Referenzgen dargestellt. Die Ngb-Expression ist demnach erst ab dem embryonalen E18 Stadium über einem Wert von 1 RPKM und somit erst im vollständig entwickelten ZNS messbar. Im Vergleich dazu konnte die Cygb-Expression schon im E14 Embryonalstadium mit einem deutlich höheren RPKM-Wert (7,7) bestimmt werden, was auf eine früher einsetzende Expression dieses Gens in der Entwicklung des ZNS hindeutet. Zum besseren Vergleich der Expressionswerte in den embryonalen Datensätzen wurden zwei adulte Gehirnregionen (Hypothalamus und Cerebellum) ebenfalls untersucht. Auffällig waren die enormen Unterschiede zwischen der Ngb- und Cygb-Expression in den adulten Gehirnregionen Cerebellum (RPKM-Werte: 1,4 für Ngb und 35,6 für Cygb) und Hypothalamus (RPKM-Werte: 153,6 für Ngb und 47,5 für Cygb) (siehe Abbildung 3-24). Zur besseren Interpretation der Ngb RPKM-Werte wurden ebenfalls die RPKM-Werte von β -Aktin als ein oft verwendetes Referenzgen mit sehr hoher Expression und Cygb als ein in den meisten Geweben eher schwach exprimiertes Gen dargestellt.

Eine detailliertere Untersuchung der Expressionsunterschiede von Ngb in den adulten Gehirnregionen der Maus wird im nächsten Kapitel dargestellt.

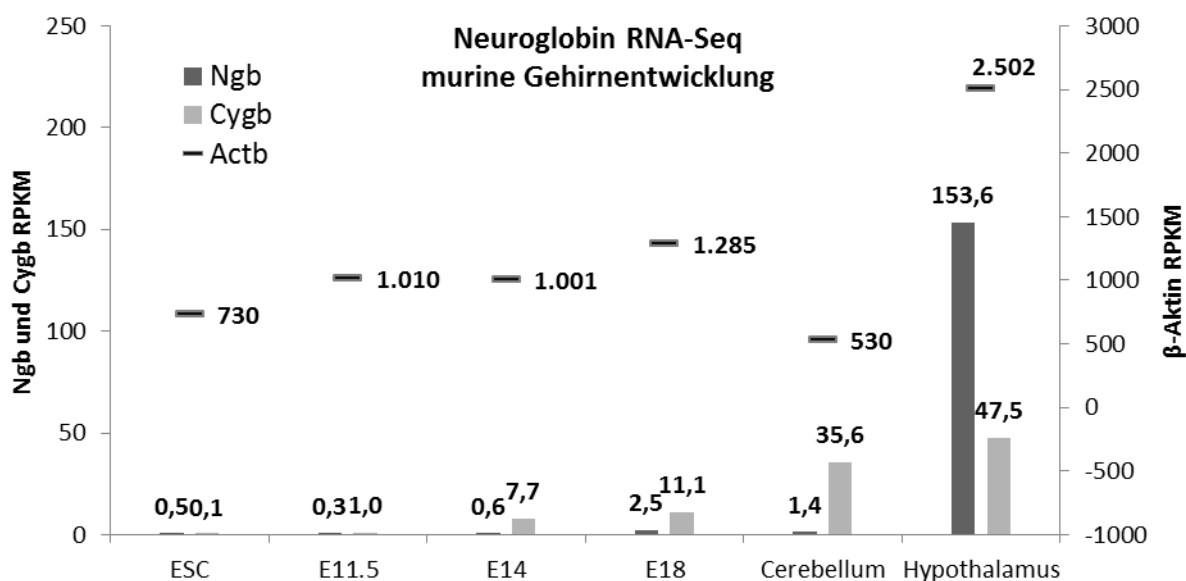


Abbildung 3-24: Ngb, Cygb und β -Aktin mRNA-Expression in embryonalen und adulten Mausgeweben

Aus RNA-Seq-Datensätzen abgeleitete mRNA Expression von Ngb, Cygb und β -Aktin in murinen embryonalen Stammzellen (ESC). Untersucht wurden Datensätze von Embryonen der Stadien E11.5, E14 und E18 sowie von zwei adulten Gehirnregionen. SRA-IDs: ESC: SRR530639; E11.5: SRR567500; E14: SRR567492; E18: SRR567494; Cerebellum: SRR567489; Hypothalamus: SRR573671.

3.4.2 Das Ngb-Expressionsmuster im adulten Mausgehirn: eine quantitative Analyse mittels RNA-Seq, qRT-PCR und Western Blot

Analog zur Analyse der Ngb-Expression während der Entwicklung des murinen ZNS wurden öffentlich verfügbare Datensätze ausgewählter Gehirnregionen der Maus mittels bioinformatischer Methoden (2.5.2) untersucht. In der Abbildung 3-25 sind RNA-Seq-Datensätze aus vier Gehirnregionen der Maus mit den RPKM-Werten von Ngb, Cygb und β -Aktin als Referenzen dargestellt. Die Werte stellen Mittelwerte aus bis zu sieben Datensätzen dar, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben (siehe Abbildung 3-25). Die höchste Ngb-Expression konnte demnach im Hypothalamus ermittelt werden. Hier ist die Ngb-Expression 40 mal höher als in den restlichen untersuchten Gehirnregionen. Zum Vergleich ist die Cygb-Expression in allen vier untersuchten Regionen in etwa gleichbleibend mit einem RPKM im Bereich von 20-44 (siehe Abbildung 3-25).

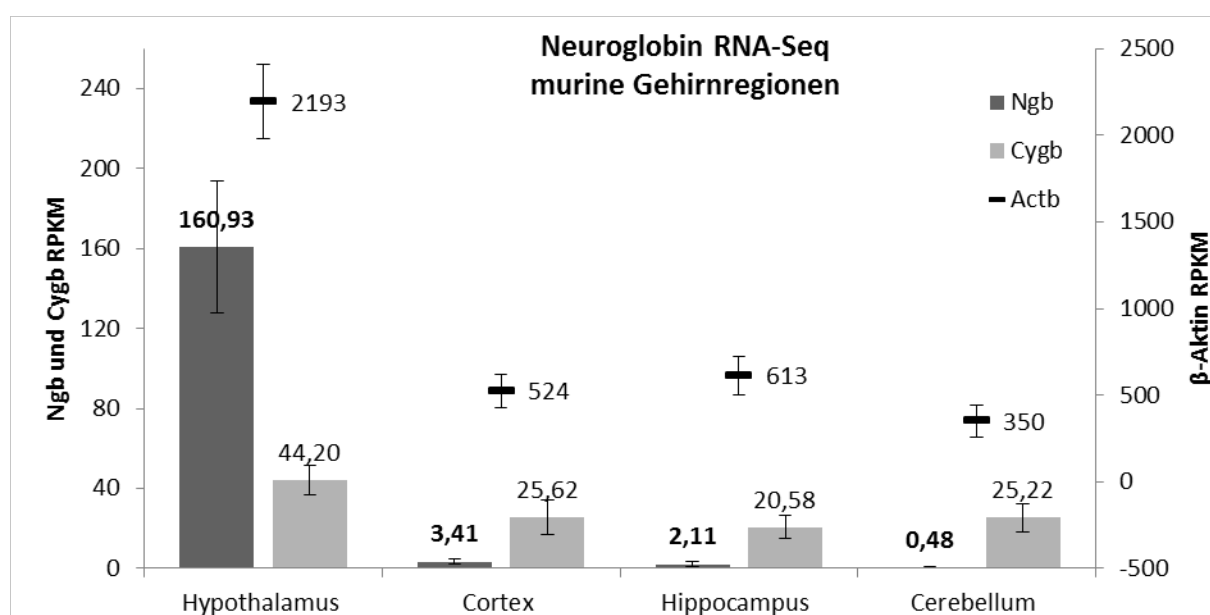


Abbildung 3-25: Ngb, Cygb und β-Aktin mRNA-Expression in murinen Gehirnregionen

Dargestellt sind die RPKM-Werte von vier murinen Gehirnregionen abgeleitet aus öffentlich zugänglichen RNA-Seq-Datensätzen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus bis zu 7 Datensätzen vom gleichen Gewebe. SRA-IDs: Hypothalamus n=4: SRR573671-4; Cortex n=6: SRR567480-1, SRX023112-3, SRR059665-8, SRR059669-71; Hippocampus n=7: SRR504380-1, ERR032232,-4,-5,-7, SRX171524; Cerebellum n=5: SRR648460,-4,-6, SRX147582, SRR567489.

Zur Validierung der Ergebnisse der bioinformatischen RNA-Seq-Analyse wurden die betreffenden Gehirnregionen in wildtypischen Mäusen (BL/6) mittels quantitativer Real Time qRT-PCR (siehe 2.4.7.2, Abbildung 3-26) und Western Blot (siehe 2.2.8, Abbildung 3-27) erneut auf die Ngb mRNA- und Proteinexpression hin untersucht.

Die Ngb mRNA-Expression ist im Hypothalamus mit 350 K Kopien pro 300 ng Gesamt-RNA im Vergleich zum Cortex (11 K), Hippocampus (50 K) und Cerebellum (21 K) am höchsten (siehe Abbildung 3-26). Hier konnte das mittels RNA-Seq ermittelte 40:1-Verhältnis der Ngb-Expression von Hypothalamus zu den restlichen Regionen bestätigt werden.

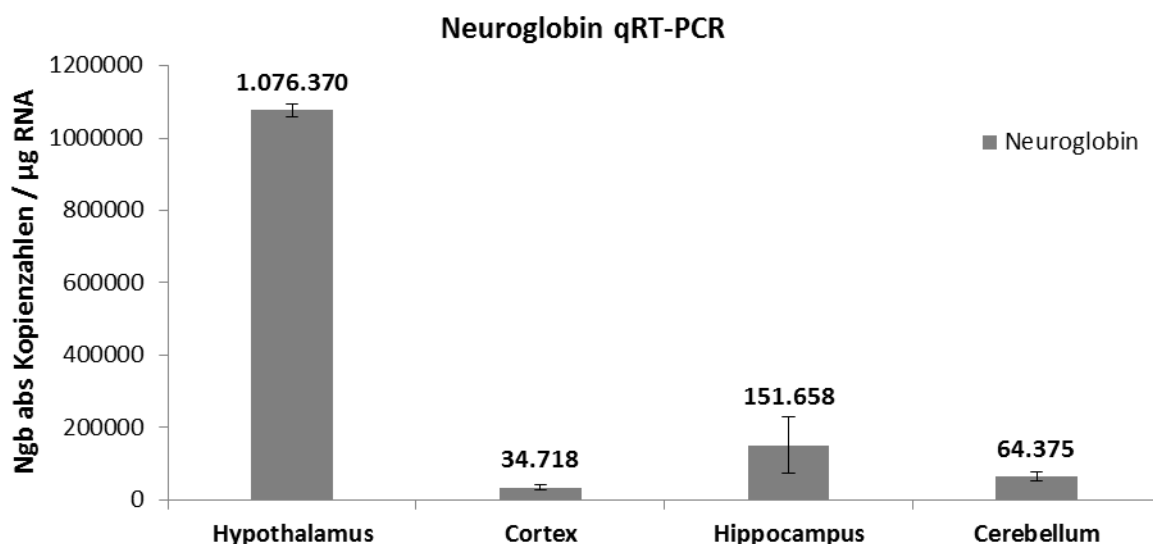


Abbildung 3-26: Ngb-mRNA Expression in wildtypischen murinen Gehirnregionen via qRT-PCR

Dargestellt sind die Kopienzahlen von Ngb in 1 µg Gesamt-RNA in vier verschiedenen Gehirnregionen der adulten Maus. Für Cortex, Hippocampus und Cerebellum geben die Balken den Mittelwert von drei biologischen Replikaten (n = 3) mit der jeweiligen Standardabweichung (als Fehlerbalken) wieder. Beim Hypothalamus ist die Gesamt-RNA von einem Tier (n = 1) untersucht worden und der Balken gibt den Mittelwert der technischen Replikate (n = 2) in der qRT-PCR wieder.

Die Ngb-Protein-Expression in den untersuchten Gehirnregionen zeigte ein ähnliches Ngb-Mengenverhältnis wie die zuvor durchgeführte mRNA-Expressionsanalyse. So ist im Hirnstamm der Maus, welcher auch den Hypothalamus beinhaltet, die Ngb-Protein-Konzentration deutlich höher als in den restlichen untersuchten Gehirnregionen (siehe Abbildung 3-27). Die Ngb-Konzentration beträgt im Cortex nur 15%, im Hippocampus nur 25% und im Cerebellum etwa 10% der Stammhirn-Expression (bs; siehe Abbildung 3-27).

Somit konnte sowohl mittels bioinformatischer Auswertung von RNA-Seq-Datensätzen als auch mit den molekulargenetischen Standardmethoden der qRT-PCR und dem Western Blot ein vergleichbares Ngb-Expressionsverhältnis in Gehirnregionen der adulten Maus ermittelt werden.

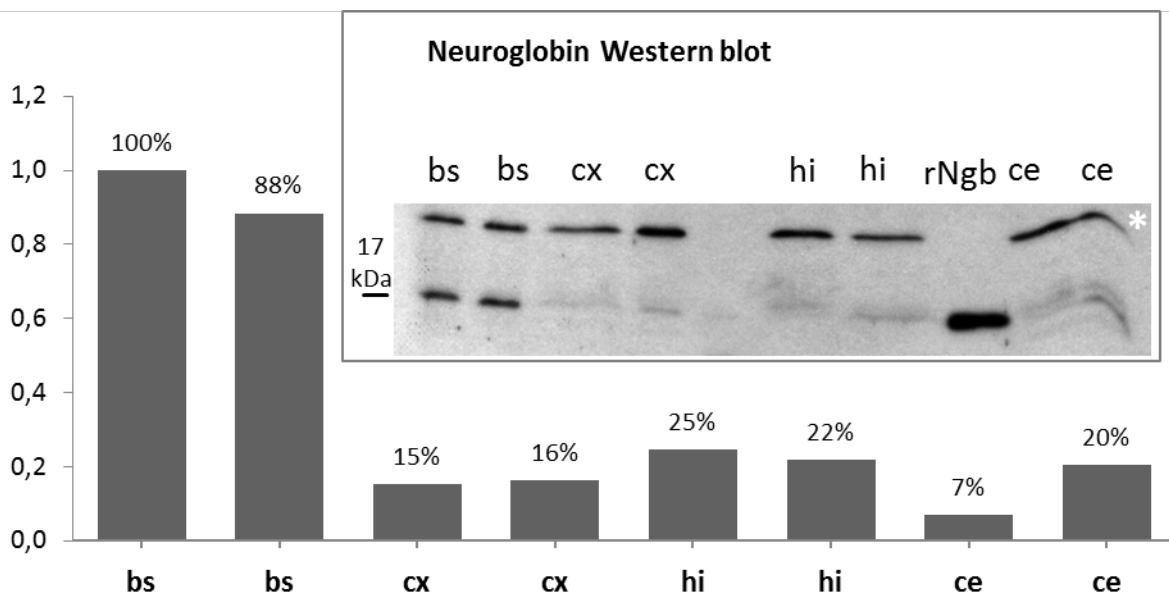


Abbildung 3-27: Ngb Proteinkonzentration in wildtypischen murinen Gehirnregionen

Dargestellt ist die relative Ngb Protein-Expression im wildtypischen Mausgehirn, ermittelt mittels ImageJ, normalisiert auf die unspezifische Bande (*) als Ladekontrolle. Es wurden unterschiedliche Mengen an Proteinextrakt der Gehirnregionen Cortex (cx: 70 µg), Hippocampus (hi: 70 µg), Cerebellum (ce: 70 µg) und Resthirn (bs: 30 µg) aufgetragen (jeweils n = 2) und mit einem rekombinanten Ngb-Protein (rNgb: 15 ng) per Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem selbst hergestellten anti-Ngb-Serum in einer 1:150 Verdünnung.

3.4.3 Die Ngb-Expression im endokrinen und retinalen Mausgewebe

Neben dem ZNS als dem Hauptexpressionsort von Ngb wurden auch weitere in der Literatur beschriebene, meist durch die Innervierung des PNS begründete Ngb-Expressionsorte quantitativ auf die Ngb mRNA-Expression hin untersucht. Die bioinformatische Auswertung von RNA-Seq-Datensätzen endokriner Gewebe wie Testes und Nebenniere zeigte eine mit RPKM-Werten von 2,2 bzw. 3,0 ähnlich geringe Ngb-Expression in diesen Geweben wie im Hippocampus (RPKM: 2,1), dem Cerebellum (RPKM: 0,5) und dem Cortex (3,4) der adulten Maus (siehe Abbildung 3-25, Abbildung 3-28). Auch für Retina und Lunge lagen die RPKM-Werte für Ngb mit 1,9 und 1,8 in diesem Bereich. In den untersuchten Datensätzen der Lunge, der Nebenniere und der Retina zeigten sich vergleichbare Cygb mRNA-Expressionen zu den untersuchten Gehirnregionen (RPKM: 20-45). Die β -Aktin Expression wurde hier nicht dargestellt da sich diese extrem zwischen den Geweben unterscheidet (RPKM-Lunge:2700, RPKM-Retina:200) und somit nicht als Referenzgen eignet.

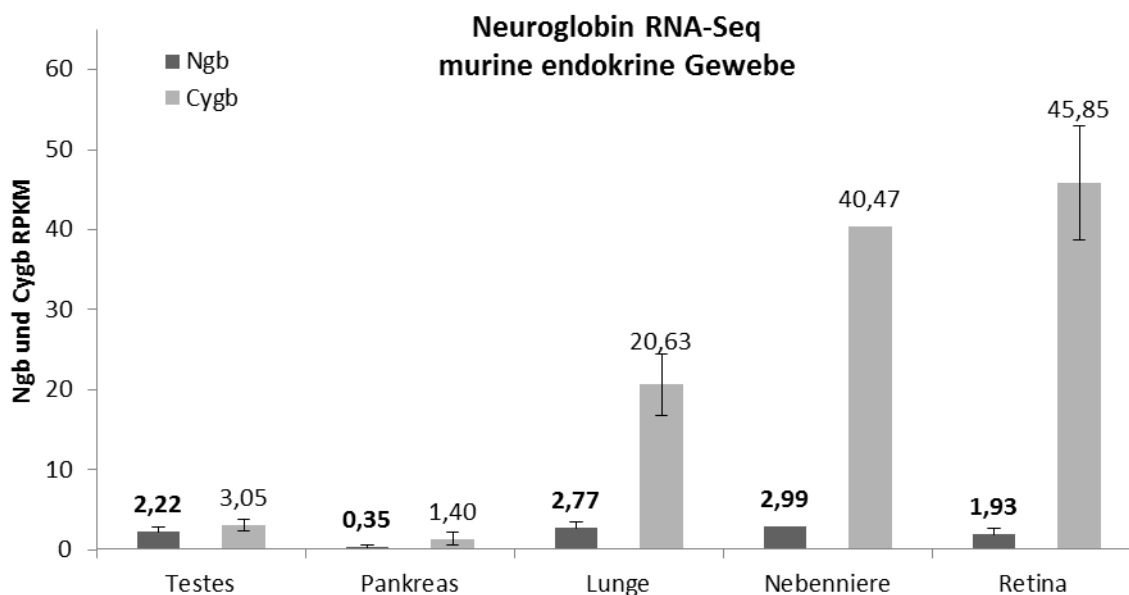


Abbildung 3-28: Ngb Expressions-Analyse in endokrinen und retinalen Geweben der Maus

Gezeigt ist die Ngb und Cygb Expression (RPKM) in endokrinen Geweben (Testes, Pankreas, Nebenniere), der Lunge und der Retina der Maus, abgeleitet aus der Auswertung öffentlich zugänglicher RNA-Seq-Datensätze. Für Gewebe mit mehr als einem verfügbaren Datensatz sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) angegeben. SRA-IDs: Testes n=3: SRR453140-2; Pankreas n=5: SRX110336, ERR173263,-5, SRR527103, ERR173259; Lunge n=3: SRR453156-8; Nebenniere n=1: SRX135155; Retina n=6: SRR35871,-4,-5,-8, SRR248528, SRR327045.

3.4.4 Ngb Korrelationsanalyse in RNA-Seq Transkriptomdatensätzen der Maus

Zur Ermittlung von Genen mit dem gleichen quantitativen regionalen Expressionsmuster wie Ngb wurde eine Korrelationsanalyse der Ngb RPKM-Werte innerhalb der murinen Gehirnregionen durchgeführt. In Tabelle 3-13 sind die 20 am stärksten positiv bzw. negativ mit der Ngb-Expression korrelierenden Gene innerhalb des Hypothalamus, Hippocampus, Cerebellum und Cortex dargestellt. Gene mit einem positiven Pearson-Koeffizient sind in denselben Regionen wie Ngb stark exprimiert und weisen dementsprechend in Gehirnregionen mit einer schwachen Ngb-Expression ebenfalls nur eine schwache Expression auf. Hierzu gehören Gene wie Tachykinin¹ (Tac1), ein Peptidhormon kodierendes Protein, welches als Neurotransmitter fungiert, und Fezf1² (Family Zinc Finger), ein

¹ <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TAC1&search=tac1> (27.08.2014)

² <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FEZF1&search=Fezf1> (27.08.2014)

Transkriptions-Repressor kodierendes Gen, welches bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielt. Antiproportional dazu sind Gene mit negativen Pearson-Korrelationsfaktoren in Regionen mit einer starken Ngb-Expression schwach exprimiert und in Regionen mit schwacher Ngb-Expression sehr stark exprimiert. Hierzu gehören Gene wie Txndc11¹ (Thioredoxin Domain Containing 11), ein zur Thioredoxin-Domäne enthaltene Proteinfamilie gehörendes Gen, welches als Regulator von Redoxreaktionen aktiv sein könnte, oder das Gen Eya3² (Eyes Absent Homolog 3), welches für einen Transkriptions-Aktivator kodiert, der bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielt.

Tabelle 3-13: Ngb Pearson-Korrelationsanalyse in Gehirnregionen der adulten Maus

Dargestellt sind die zwanzig Gene mit den höchsten Pearson-Korrelationsbeiträgen. Gene mit ähnlichen RPKM-Werten innerhalb der untersuchten Gehirnregionen weisen positive Korrelationswerte auf (rechte Spalten), Gene welche genau das gegenteilige Expressionsmuster innerhalb der untersuchten Gehirnregionen aufweisen haben die höchsten negativen Korrelationswerte (linke Spalten). Der Pearson Korrelationskoeffizient wurde mit Excel (Microsoft) anhand der RPKM-Werte der einzelnen Datensätze unter Einbeziehung aller Gene ermittelt. Die Annotation beruht auf GO-Einträgen der Kategorie Molekulare Funktion zu den jeweiligen Genen.

Ngb RNA-Seq Korrelationsanalyse

Gen	Annotation	Pearson	Gen	Annotation	Pearson
Txndc11	cell redox homeostasis	-0,92	Resp18	embryonic development	1,00
Eya3	chromatin binding	-0,88	Fezf1	DNA binding	1,00
Wwtr1	protein binding	-0,88	Tac1	substance P receptor binding	1,00
Rnf130	apoptotic process	-0,88	Tspan6	signal transducer activity	1,00
Fn3krp	transferase activity	-0,88	Crabp1	lipid binding	0,99
Lynx1	negative regulation of receptor activity	-0,87	Fam183b	-	0,99
Kcnj10	potassium ion transport	-0,87	Cited1	chromatin binding	0,99
Lmnb1	JUN kinase binding	-0,87	Gnrh1	hormone activity	0,99
S1pr1	angiogenesis	-0,87	Ghrh	hormone activity	0,99
Ubr2	protein ubiquitination	-0,87	Bicap	cell cycle	0,99

¹ <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TXND11&search=Txndc11> (27.08.2014)

² <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EYA3&search=Eya3> (27.08.2014)

3.4.5 Ngf-Expression in weiteren Modellorganismen: Zebrafisch und Ratte

Zur Validierung der bisher beschriebenen Ngf-Expressionsdaten und zur weitergehenden funktionellen Beschreibung der Ngf-Expression in neuronalen Geweben wurden Datensätze des Zebrafährlings (*Danio rerio*, Trivialname Zebrafisch) und der Ratte (*Rattus norvegicus*) untersucht. Der Zebrafährch zählt wegen seiner relativ schnellen Entwicklung der beinahe komplett durchsichtigen Embryonen und der relativ kurzen Generationszeit von wenigen Monaten zu den Modellorganismen der Genetik. Die Ratte ist neben der Maus das am weitesten verbreitete Säugetier-Modellorganismus der Medizin und Biologie.

Die untersuchten öffentlich verfügbaren Gehirnregionen der Ratte zeigen eine geringe Expression von Ngf im Hippocampus (RPKM: 2,2) und Cortex (RPKM: 1,8) auf, vergleichbar mit der in den Datensätzen der Maus beobachteten Ngf-Expression (siehe Abbildung 3-25 und Abbildung 3-29). Im Gegensatz dazu ist die Ngf-mRNA-Expression im Gesamtgehirn des Zebrafährches um den Faktor 10 höher als im Gesamtgehirn der Maus (siehe Abbildung 3-29). Die Ngf-Expression im retinalen Gewebe des Zebrafährches ist deutlich geringer als im Gesamtgehirn und liegt im einstelligen RPKM-Bereich.

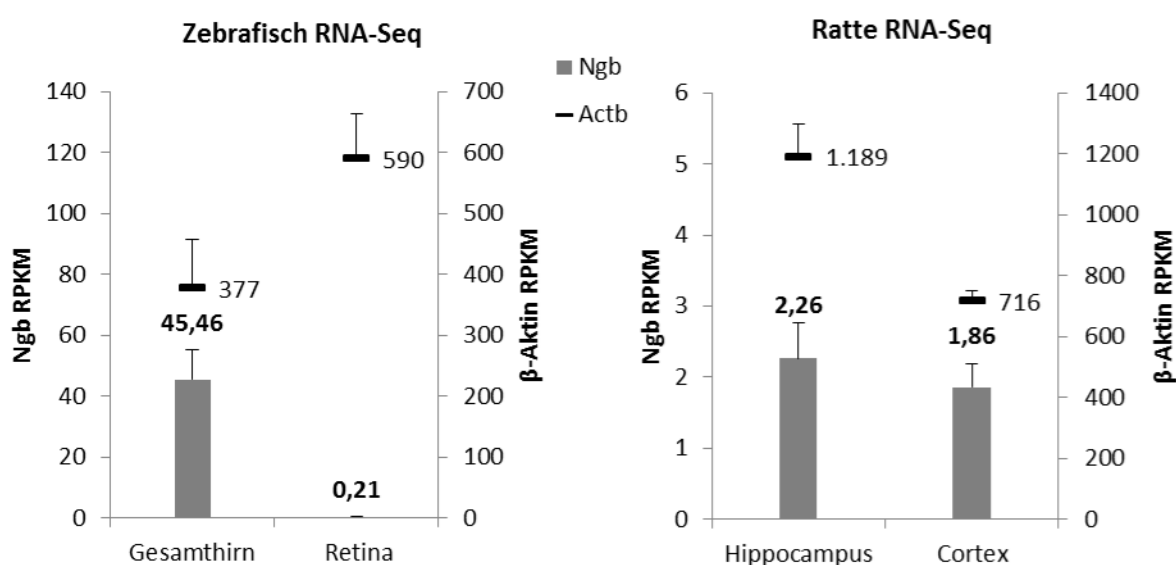


Abbildung 3-29: Ngf RNA-Seq Analyse in neuronalen Geweben von Zebrafisch und Ratte

Dargestellt sind die Expressionswerte (RPKM) von Ngf und β-Aktin in ausgewählten Geweben der Ratte und des Zebrafährches. Untersucht wurden je drei Datensätze pro Gewebe. SRA-IDs: Zebrafährch-Gehirn: ERR023144, ERR035545, ERR023147; Retina: SRR514028-30; Ratte Hippocampus: SRR869020-22; Cortex: SRR868972-74.

4 Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf bereits publizierte Daten diskutiert werden. Zum einen wird die in der Literatur oft beschriebene Protektion durch Ngb (Übersicht in: Hankeln et al. 2005, Burmester und Hankeln 2009) in Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert (4.1.1). Es werden die möglichen molekularen Mechanismen des beobachteten Schadens (Abbildung 4-1) in der Leber Ngb-transgener Mäuse nach einer Hepatotoxin-Behandlung *in vivo* diskutiert. Ebenso wird die mögliche molekulare Grundlage (Abbildung 4-2) der effizienten Protektion vor der Aktivierung der extrinsischen Apoptose *in vitro* in primären Ngb-transgenen Hepatozyten besprochen (4.1.2).

Es werden weiterhin die Ergebnisse der Affymetrix- und RNA-Seq-Transkriptomanalysen (3.1.3 und 3.2.4) von Ngb-transgenem hepatischen und neuronalen Gewebe im Vergleich zum WT sowie die Einordnung der dysregulierten Stoffwechselwege in bestehende Ngb-Funktionshypothesen (Burmester und Hankeln 2009) diskutiert (4.1.3). Die zum Teil widersprüchlichen und oft unvollständigen publizierten Ngb-Expressionsprofile (Tabelle 4-1) werden durch die Analyse von öffentlichen RNA-Seq Datensätzen vervollständigt und diskutiert (4.2). Der Nutzen und die Bedeutung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Ngb-KO- und LacZ-KnockIn-Mauslinien (3.3), für die weitere Erforschung der molekularen Funktion von Ngb, sowie die Erkenntnisse der ersten phänotypischen Analysen in Bezug auf publizierte Ngb-Funktionshypothesen werden ebenfalls besprochen (4.2.1).

4.1 Funktionshypothesen für Ngb: Lehren aus Mausmodellen

Die funktionelle Analyse von Ngb mittels ektopischer Überexpression im Ngb-transgenen Mausmodell und *in vitro* Zellkulturen hat eine ganze Reihe an Funktionshypothesen für das Protein generiert (Sun et al. 2003, Khan et al. 2006, Khan et al. 2007, Yu et al. 2012, Zhao et al. 2012, Raida et al. 2013, Van Leuven et al. 2013). Die postulierte anti-apoptotische Funktion von Ngb beruht vor allem auf der Lokalisation und Distribution der mRNA und des Proteins im ZNS. Die native Verteilung der Ngb-mRNA und des Proteins im ZNS und einigen weiteren Organen der Maus ist in vielen Studien untersucht worden (Burmester et al. 2000, Mammen et al. 2002, Reuss et al. 2002, Schmidt et al. 2003, Wystub et al. 2003, Hankeln et

al. 2004, Laufs et al. 2004, Hundahl et al. 2008a, 2008b, 2010a, 2010b, 2012b, 2013). Jedoch besteht kein Konsens bezüglich der Lokalisation und Expressionsstärke des murinen Ngb-Proteins in den verschiedenen ZNS und PNS-Regionen (Mammen et al. 2002, Hankeln et al. 2004, Laufs et al. 2004, Hundahl et al. 2010a).

Eine Überexpression von Ngb *in vitro* kann die Zellen vor reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) wie Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid (H_2O_2 , NO) schützen indem diese durch eine Redox-Reaktion umgesetzt werden (Jin et al. 2008, Antao et al. 2010, Zhang et al. 2013). Durch die Verwendung eines transgenen Maussystems wurde diese Protektion in einem komplexen Gewebe wie dem zentralen Nervensystem (ZNS) untersucht. Es wurde gezeigt, dass Ngb im experimentellen Tiermodell den Schaden eines Schlaganfalls und Herzinfarktes effektiv vermindert (Sun et al. 2003, Khan et al. 2006, Wang et al. 2008b, Zhao et al. 2012). Bei einer bereits erhöhten Ngb-Expression vor der Applikation der Hypoxie oder eines anderen oxidativen Stresses ist die Protektion durch Ngb sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gut belegt. Diese Protektion der Zellen oder des Gewebes konnte bis dato jedoch auf keinen eindeutigen molekularen Stoffwechselweg zurückgeführt werden.

Einige wenige Autoren haben die Induktion von protektiv wirkenden Proteinen wie eNOS durch Ngb vorgeschlagen (Khan et al. 2006), wodurch Ngb indirekt und gewebsunabhängig protektiv wirken würde. Ebenfalls gibt es eine Reihe an *in vitro* Untersuchungen wonach Ngb indirekt durch die Bindung an die Phosphatase PTEN und die Proteinkinase AKT, eine Aktivierung des antiapoptotischen PI3K/AKT-Signalweges bewirken kann (Antao et al. 2010, Chen et al. 2012, Zhang et al. 2013, Li et al. 2014). Ebenso wurde eine Interaktion mit der Rho-GTPase und die Reduktion von Cyt-C durch Ngb vorgeschlagen, wodurch eine antiapoptotische Signalkaskade ausgelöst wird (Wakasugi et al. 2003, Fago et al. 2006, Khan et al. 2008, Brittain et al. 2010, Raychaudhuri et al. 2010, Brittain 2012). *In vivo*-Untersuchungen zu diesen vorgeschlagenen Funktionen fehlen jedoch bislang. In der Mehrheit der Publikationen wird ein Schutz durch die Ngb-Überexpression vor oxidativem Stress mit der Reduktion von ROS durch Ngb vorgeschlagen (Sun et al. 2001, Mammen et al. 2002, Fordel et al. 2006, Jin et al. 2008, Li et al. 2008, Antao et al. 2010, Li et al. 2010, Cai et al. 2011).

Ob Ngb nun direkt (durch eine Reduzierung von ROS oder Cyt-C) oder indirekt (durch eine Aktivierung anderer Mechanismen wie eNOS oder PI3K/AKT-Signalweg) protektiv wirkt ist

unklar. Auch die biologische Relevanz der Protektion ist fraglich, da es für einen effektiven Schutz einer vorhergehenden Erhöhung der Ngb-Konzentration bedarf, die jedoch *in vivo* bei einem Schlaganfall oder anderem oxidativem Stress nicht gegeben ist (Mammen et al. 2002, Hundahl et al. 2005, Schmidt-Kastner et al. 2006, Burmester et al. 2007, Hundahl et al. 2011). So konnte bei einer Hypoxie sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, mit einigen wenigen Ausnahmen welche vermutlich technischer Natur bedingt sind, keine Erhöhung der Ngb-Expression auf diesen Stimulus hin gemessen werden (Burmester et al. 2007).

Der Mensch und die Maus müssen, zumindest unter normalen nicht-pathologischen oder hochgebirgigen Bedingungen, keine Sauerstoffarmut erleiden und sind an diese nicht adaptiert. Auch ist die Ngb-Expression in Hypoxie-toleranten Wirbeltieren wie der Blindmaus, der Robbe, dem Goldfisch und dem Zebrafisch im Vergleich zu an eine Hypoxie nicht angepassten Säugetieren wie dem Menschen, der Maus und der Ratte höher (Burmester et al. 2007, Roesner et al. 2008, Avivi et al. 2010, Tiedke et al. 2011, Schneuer et al. 2012, Tiedke et al. 2013). Dies bestätigen auch die im Rahmen dieser Arbeit analysierten RNA-Seq Expressionsprofile im Vergleich von Zebrafisch, Maus und Ratte (siehe Abbildung 3-29 und Abbildung 3-24).

Neben der beschriebenen Diskrepanz zwischen dem beobachteten protektiven Ngb-Effekt einerseits und einer fehlenden evolutiven Anpassung an die Hypoxie andererseits fehlt für eine abschließende spezifische Beschreibung der Protektion durch Ngb ein Vergleich mit verwandten Proteinen wie Cygb und Mb, welche über ähnliche biochemische Eigenschaften verfügen und somit ebenfalls einen vergleichbaren protektiven Effekt ausüben könnten.

Entgegen der oft beschriebenen Protektion durch Ngb-Überexpression soll der Ngb-KO im experimentellen Schlaganfallmodell einen geringeren Schaden im Cortex im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Raida et al. 2012). Dies widerspricht einer direkten protektiven Funktion von Ngb. Der Ngb-KO in der Maus hat bis heute wenig zur Aufklärung der Funktion beigetragen. So reagieren zwar kortikale Neuronen der Ngb-KO Maus auf hypoxischen Stress etwas stärker in ihrer Stress-Antwort (erhöhte cFos- und Hif1a-Expression) als Wildtyp-Neuronen. Die Ngb-KO Neuronen zeigen jedoch keinen erhöhten Schaden nach Hypoxie-Stress *in vivo* (Hundahl et al. 2011, Hundahl et al. 2012a).

4.1.1 Die anti-apoptotische Wirkung von Ngb: Effekt versus Funktion

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Hepatotoxin-Behandlung Ngb-transgener Tiere zeigen dass der beobachtete Effekt einer direkten anti-apoptotischen Wirkung von Ngb nicht generell auf alle Organe übertragen werden kann. So wirkt sich die Ngb-Überexpression in der mit dem ROS-generierenden Hepatotoxin Tetrachlormethan (CCl_4) behandelten Leber nachteilig aus. Der beobachtete erhöhte Schaden beruht sehr wahrscheinlich auf der verstärkten Metabolisierung und Aktivierung des Toxins in den Ngb-transgenen Hepatozyten. Die Aktivierung von CCl_4 zum Radikal erfolgt natürlicherweise durch eine Reduktion und anschließende Abspaltung von Chlor in der Leberzelle durch eine Kombination der Aktivitäten von Cytochrom P450, dem Oxygenasesystem des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien (Übersicht in Weber et al. 2003). Hierbei könnte Ngb als Aktivator der Radikalisierung von CCl_4 fungieren, anstatt protektiv zu wirken (siehe Abbildung 4-1). Ob Ngb hierbei als Elektronenüberträger und/oder bei der Bereitstellung von O_2 fungiert (siehe 1 und 2 in Abbildung 4-1) ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Da die Sauerstoffbindungskapazität von Ngb durch das generierte CCl_3^* -Radikal zerstört wird, kann sich die potentiell protektive Wirkung als Antioxidans nicht entfalten und es findet kein Schutz durch die Ngb-Überexpression in den Lebern der Ngb x R26 Mäuse statt (siehe 3.1.4).

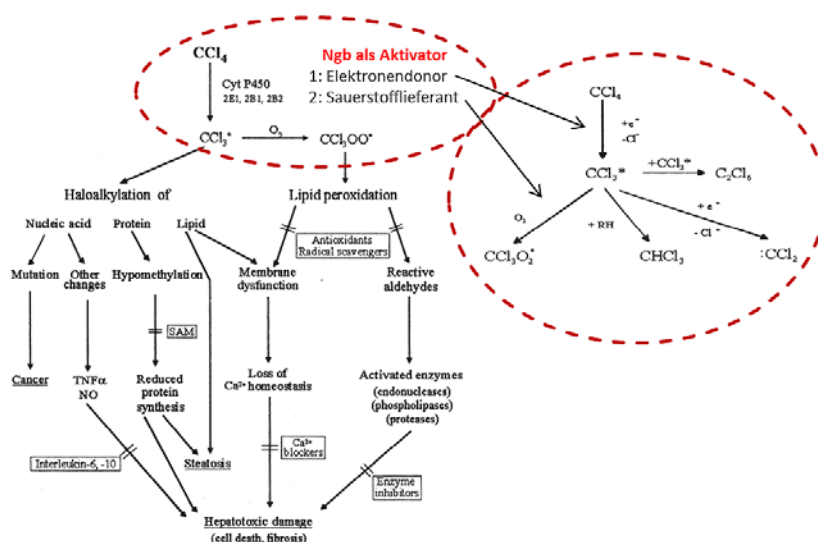


Abbildung 4-1: Putative Beteiligung von Ngb an der Aktivierung von Tetrachlormethan

Die Reaktionswege von Tetrachlormethan im Zusammenspiel mit Enzymen und Molekülen der Leber sind dargestellt. Angedeutet ist die mögliche Wirkung von Ngb bei der Aktivierung von CCl_4 entweder durch Reduktion von CCl_4 als Elektronendonator (1)

oder als Sauerstofflieferant (2) in der Generierung der schädlichen Radikale. (verändert nach Weber et al. 2003).

Die *in vitro* erfolgte Behandlung von isolierten primären Ngb-überexprimierenden Hepatozyten mit dem Todesrezeptor (Fas-Rezeptor) aktivierenden Antikörper (Jo2) zeigt einen eindeutig protektiven Effekt von Ngb (Abbildung 3-10). Hier konnte gezeigt werden, dass Ngb effizient die spezifische Aktivierung der extrinsischen mitochondrialen Signalkaskade, ausgehend vom Fas-induzierten programmierten Zelltod, verhindern kann. Durch die Expression von Ngb wird die Aktivierung der Caspasen im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermindert und die Zelle somit vor dem programmierten Zelltod geschützt. Eine mögliche molekulare Erklärung für diesen beobachteten Effekt könnte die ROS-abhängige Regulation des antiapoptotischen Proteins C-FLIP (FLICE inhibitory protein¹) und sein Einfluss auf den Fas-Rezeptor liefern (Abbildung 4-2). Das antiapoptotische C-FLIP wird durch einen hohen ROS-Level abgebaut und kann somit nicht die Trimerisierung des Todesrezeptors verhindern (Wang et al. 2008a, Wilkie-Grantham et al. 2013). Durch eine hypothetisch konservierte ROS/RNS-Entgiftungsfunktion von Ngb (Herold et al. 2004, Brunori et al. 2005, Herold und Fago 2005) könnte der ROS-Level in den primären Ngb x R26-Hepatozyten möglicherweise reduziert werden. Somit würde die Reduzierung des ROS-Levels zu einer höheren C-FLIP-Aktivität und der Verhinderung der extrinsischen Apoptose führen (Abbildung 4-2).

Der hier postulierte protektive Ngb-Effekt durch ROS-Reduktion ist auch mit der von Brittain et al. (2010) postulierten Reduktion von Cyt-C durch Ngb und der damit einhergehenden Inhibierung der intrinsischen Apoptose kompatibel (Brittain et al. 2010, Raychaudhuri et al. 2010, Brittain 2012). Während Thomas Brittain die Reduktion von Cyt-C und eine folglich verminderte Apoptosombildung als möglichen molekularen Mechanismus der Ngb-Protektion, basierend auf *in vitro* Daten vorschlägt (Brittain et al. 2010), könnte die intrinsische Apoptose nach den Ergebnissen dieser Arbeit ebenso durch eine Verringerung des ROS-Levels (konservierte Redox-Reaktion) indirekt durch Ngb verhindert werden.

Die Auswirkung einer Ngb-Überexpression auf den ROS-Level *in vivo* ist hingegen nicht eingehend untersucht (Raychaudhuri et al. 2010). Ebenso wie bei *in vitro*-Experimenten könnte Ngb die extrinsische Apoptose auch *in vivo* durch ROS-Reduktion vermindern (Circu und Aw 2010). Somit könnte die durch Ngb katalysierte Redox-Reaktion als molekularer

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12633> (27.08.2014)

Mechanismus: **(i)** sowohl für die Aktivierung von Tetrachlormethan und damit für den erhöhten Schaden *in vivo* in der murinen Leber verantwortlich sein als auch **(ii)** protektiv durch eine ROS-Reduktion (in primären Hepatozyten *in vitro*) wirken. Beiden Effekten liegt der gleiche, potentiell unter allen Globintypen konservierte, molekulare Mechanismus einer Redox-Reaktion zugrunde.

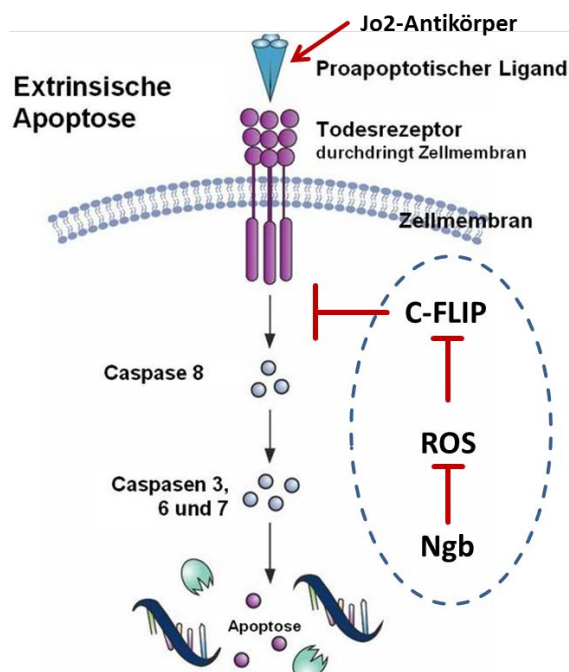


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der extrinsischen Apoptose und der möglichen Ngb-Wirkung

Die Apoptose-Kaskade wird durch die Bindung eines Liganden (z. B. Jo2-Antikörper) aktiviert. Durch die Trimerisierung des Rezeptors wird Caspase 8 (Initiator-Caspase) rekrutiert, welche ihrerseits die Effektor-Caspasen 3/7 aktiviert und hierdurch den programmierten Zelltod einleitet. Das C-FLIP-Protein kann die Trimerisierung des Fas-Rezeptors und die Rekrutierung der Initiator-Caspase 8 verhindern und wird durch einen erhöhten ROS-Level abgebaut. Die mögliche indirekte Regulation von C-FLIP durch die ROS entgiftende Aktivität von Ngb ist gezeigt (Ashkenazi 2002, Wang et al. 2008a, Wilkie-Grantham et al. 2013).

Die Ergebnisse der oben beschriebenen *in vivo* und *in vitro* Versuche zeigen, dass je nach Untersuchungs-System der Effekt von Ngb auf die Zellen bzw. das Gewebe durchaus unterschiedlich sein kann. Ein Vergleich dieses Ngb-Effekts mit der möglicherweise ähnlichen Wirkung anderer Globine wie Mb oder Cygb wurde bisher nicht publiziert. Jedoch zeigen vergleichende Untersuchungen an transgenen eukaryotischen Zellen mit verschiedenen überexprimierten Globintypen (u. a. Ngb, Cygb und Mb) einen Globintyp übergreifenden

Schutz der Zellen vor Hypoxie und H₂O₂ induzierter Apoptose (persönliche Kommunikation Prof. Thorsten Burmester). Dies deutet in der Tat auf eine konservierte Protektionsfunktion der Globine hin. Dabei kann diese Funktion im betrachteten Einzelfall, nämlich der Expression eines bestimmten Globintyps in einem bestimmten Zelltyp, durchaus residualer Natur sein. Eine hypothetische zellspezifische andere Funktion könnte primär wichtig sein und wäre die Grundlage für die Darwin'sche Selektion dieses Globins im betrachteten Gewebe.

4.1.2 Ektopische Expression von Ngb in der Leber und ihre Auswirkung auf das hepatische Transkriptom

Die Untersuchung der Gehirn- und Leber-Transkriptome in Ngb-transgenen Mäusen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, kann eine Reihe an Fragen bezüglich der putativen Ngb-Funktion adressieren. Globale Untersuchungen des Transkriptoms von Ngb-transgenen vs. WT-Zellen und -Geweben sind bis dato in der Literatur nicht beschrieben. So wurde zwar eine Expressionsuntersuchung in primärer neuronaler Zellkultur von Ngb-transgenen vs. WT-Neuronen mit einer kleinen Anzahl an Sonden (113 Gene) durchgeführt (Yu et al. 2009). Diese Arbeit beschränkte sich jedoch auf die Detektion Hypoxie-induzierbarer Gene unter Verwendung eines Hypoxie-Oligo-Arrays. Von den 113 untersuchten Genen wurden 65 detektiert und unter stressfreien Bedingungen wurden 13 Gene in Ngb-transgenen Neuronen im Vergleich zum WT herunterreguliert. Hierzu gehörten Gene wie Hif1 α und Catalase, welche beide zu den Hypoxie regulierten Genen zählen, was auf eine Modulation des oxidativen Stoffwechsels in den Ngb-transgenen Neuronen hindeutet (Yu et al. 2009). Weiterhin das Transkriptom des Gehirns von Ngb-KO Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen untersucht (Hundahl et al. 2011). Die Benennung der untersuchten Gehirnregion fehlt jedoch in der Publikation; vermutlich handelt es sich um sensorischen Cortex. Es wurde ein Affymetrix Mouse GeneChip Array verwendet, um die Expression der Gene global zu ermitteln. Lediglich 22 Gene konnten in der Studie als signifikant reguliert ermittelt werden. Alle 22 Gene sind im Ngb-KO Gehirn niedriger exprimiert als im WT und lediglich 10 davon in

der RefSeq¹ Maus-Datenbank annotiert (Hundahl et al. 2011). Die Relevanz dieser Gene bezüglich möglicher Funktionen von Ngb wurde von den Autoren nicht diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Transkriptom der Leber von Ngb-transgenen und wildtypischen Mäusen bieten zum ersten Mal die Möglichkeit, den Effekt der ektopischen Expression von Ngb auf das gesamte hepatische Transkriptom zu studieren (3.1.1). Durch die Untersuchung eines Gewebes, das natürlicherweise kein Ngb aufweist, sollte die potentielle gewebsunabhängige Wirkung von Ngb auf Ebene der mRNA-Expression global ermittelt werden. Durch die Analyse der dysregulierten Gene und die Annotation der zugrundeliegenden Stoffwechselwege (Tabelle 3-3), konnte eine Reihe an Kandidaten-Genen ermittelt werden, die sowohl potentiell protektive als auch schädliche Wirkung auf das Gewebe ausüben können (Tabelle 3-2). Die größte Funktions-Gruppe mit 67 regulierten Genen (29 hoch und 38 runter) in der transgenen Ngb-Leber kodiert für Enzyme (Abbildung 3-6). Dies ist nicht überraschend, da es sich bei der Leber um ein metabolisch sehr aktives Gewebe handelt und hier viele auf die Leber beschränkte Stoffwechselreaktionen ablaufen (Löffler et al. 2003).

Die Annotation der am häufigsten vertretenen Stoffwechselwege in der Ngb-transgenen Mausleber deutet dabei auf eine nachteilige Wirkung von Ngb auf die murine Leber hin (Tabelle 3-3). Von diesen häufigen Stoffwechselwegen zeigt die statistische Auswertung lediglich drei in der transgenen Leber signifikant angereicherte Stoffwechselwege im Vergleich zum normalen Transkriptom der Leber (Tabelle 3-12). Diese sind: „metabolische Stoffwechselwege“ (18 Gene), welche die enzymatische Regulation der Glycolyse, der Gluconeogenese, des Citratzyklus u. v. a. zusammenfassen, sowie „Steroidhormon-Biosynthese“ (3 Gene) und „Zuckerabbau“ (2 Gene) (Tabelle 3-12), welche ebenfalls zu der übergeordneten Gruppe der metabolischen Stoffwechselwege gehören. Alle drei dysregulierten Pathways enthalten nur herunterregulierte Gene, wobei 18 von 23 Genen dem metabolischen Stoffwechselweg², welcher den Energiemetabolismus (Glykolyse, Citratzyklus), Fettstoffwechsel und Aminosäurestoffwechsel enthält, zuzuordnen sind (Tabelle 3-12). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass Ngb in der murinen Leber

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> (27.08.2014)

² http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?14115593084976/mmu01100.args (24.09.2014)

eine Dysregulation des Metabolismus hervorruft. Bemerkenswert ist, dass keiner der sauerstoffabhängigen oder in der Literatur in funktioneller Verbindung mit Ngb diskutierten Stoffwechselwege (siehe Abbildung 1-3) als signifikant dysreguliert ermittelt werden konnte. Auch die zahlreichen möglichen Interaktionspartner von Ngb (Cyt-C, Flotillin1, Cystatin C, β -Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase, Tau-Protein, siehe 1.2.1) konnten in der transgenen Mausleber auf mRNA-Ebene nicht als dysreguliert identifiziert werden.

Inwiefern die in dieser Arbeit als dysreguliert ermittelten 349 Gene des Metabolismus durch die Ngb-Überexpression bei der Potenzierung des durch CCl₄-Behandlung verursachten Schadens in der Ngb-überexprimierenden Leber (Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9) oder in der Protektion der primären Ngb-transgenen Hepatozyten vor Induktion der extrinsischen Apoptose (Abbildung 3-11) eine Rolle spielen, muss in weitergehenden Versuchen geklärt werden. Insbesondere wären Untersuchungen z. B. von Cygb- und Mb-transgenen Transkriptomen zur Einschätzung des Ngb-Effektes auf das Transkriptom von großem Interesse. Dies würde es ermöglichen, die Spezifität der 349 dysregulierten Gene nach Ngb-Überexpression zu evaluieren. Außerdem könnte eine Untersuchung des Transkriptoms Ngb-transgener Tiere nach der Applikation von Stress dazu beitragen, die durch Ngb beeinflussten Stoffwechsel- und Signalwege im Sinne einer möglichen Protektion des Gewebes durch Ngb weiter einzugrenzen.

4.1.3 Modulation der neuronalen Ngb-Expression im transgenen Maussystem

Die Analyse der Ngb-transgenen Hippocampus- und Cortex-Transkriptome im Vergleich zu Doxycyclin behandelten Kontrollen hat die Beschreibung eines neuronenspezifischen Effektes der Ngb-Überexpression ermöglicht (3.2.3).

Die RNA-Seq Analyse hat zunächst offenbart, dass durch die fünf-wöchige Behandlung der Ngb x Camk2 Mäuse mit Dox die transgene Ngb-mRNA Expression nicht vollständig abgeschaltet wird. Anhand der Reads der transgenen eGFP-mRNA konnte näherungsweise die Effizienz des Tet-Off-Systems ermittelt werden. So konnte nach der Behandlung mit Dox über den Zeitraum von fünf Wochen die Menge transgenen Ngb-mRNA im Vergleich zu unbehandelten Ngb x Camk2 Tieren um die Hälfte reduziert werden. Dies ist insofern überraschend, da das Ngb-Protein nach einer Behandlung der Ngb x Camk2 Mäuse mit

Doxycyclin über den gleichen Zeitraum mittels Western Blot im Hippocampus nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-15 B). Diese Diskrepanz deutet auf eine fehlende Sensitivität der Ngb-Protein Detektion mittels Antikörper hin. Da biologische und technische Replikate und somit eine statistische Absicherung der Gen-Regulation für diese neuronalen Ngb-transgenen RNA-Seq Daten fehlen, sollten weiterführende Arbeiten zunächst mit alternativen Methoden wie der qRT-PCR abgesichert werden. Weiterhin könnte ein stärkerer Effekt auf das Transkriptom nach Abschaltung der transgenen Ngb-Expression über einen längeren Zeitraum (~10 Wochen) der Dox-Behandlung der Ngb x Camk2 Mäuse eintreten. Auch ein Vergleich mit einfach-transgenen Geschwistertieren (ohne Responder-Konstrukt) könnte die Ergebnisse modulieren. Die Annotation der regulierten Gene und Stoffwechselwege im Ngb-transgenen Cortex und Hippocampus lässt trotz dieser Unzulänglichkeiten Aussagen bezüglich der Ngb-Funktion zu.

Eine statistische Auswertung der dysregulierten Pathways lieferte (anders als bei dem hepatischen Transkriptom mit lediglich drei Pathways) eine große Anzahl von je 20 signifikant dysregulierten Stoffwechselwegen sowohl im Cortex (Tabelle 3-11) als auch im Hippocampus (Tabelle 3-10). Es zeigten sich sowohl Unterschiede in der ermittelten Antwort zwischen den beiden neuronalen Ngb-transgenen Transkriptomen (vgl. Tabelle 3-10 und Tabelle 3-11) als auch Gemeinsamkeiten. In den beiden untersuchten Gehirnregionen gab es lediglich einen gemeinsamen Pathway der dysreguliert wurde: „Pathways in cancer“. Mit 34 Genen im Cortex und 7 Genen im Hippocampus war dieser Stoffwechselweg jeweils derjenige mit den drittmeisten der signifikant dysregulierten Genen innerhalb des Pathways.

Die Gene des „Cancer“ Pathways waren jeweils herunterreguliert und mit einer Funktion in verschiedenen Krebsarten annotiert z. B.: „Chronic myeloid leukemia“ (Cortex; 10), „Colorectal cancer“ (Hippocampus; 3). Das Herunterregulieren dieser Pathways könnte auf eine potentielle indirekt protektive Auswirkung der Ngb-Überexpression in den untersuchten Geweben hindeuten. Innerhalb der durch die Anreicherung hochregulierter Gene signifikant dysregulierten Pathways befanden sich auffällig viele mit phänotypisch nachteiliger Annotation: „Huntington`s disease“ (19 Gene), „Alzheimer`s disease“ (14 Gene) und „Parkinson`s disease“ (15 Gene).

Ob die Hochregulation der Gene in den oben besprochenen Pathways einen Schaden des Gewebes durch die erhöhte Ngb-Expression oder eine Protektion reflektiert kann hier nicht

abschließend geklärt werden. Die Gene in diesen regulierten Pathways spielen unter anderem in neurodegenerativen Krankheiten des Menschen eine Rolle. Die mitochondrielle Integrität ist bei diesen neurodegenerativen Krankheiten meist gestört. Die Dysregulation der besprochenen Pathways könnte eine Funktion oder einen Effekt von Ngb in der Protektion der Mitochondrien vor oxidativem Stress andeuten oder aber eine erhöhte Sauerstoffkonzentration im transgenen Gewebe reflektieren (Yu et al. 2013). Es wurde kein offensichtlicher neuronaler Schaden der Ngb-transgenen Mäuse beobachtet, wobei mögliche Langzeiteffekte durch die Ngb-Überexpression nicht untersucht wurden und somit ein akkumulierter Schaden zu einem späteren Zeitpunkt im Leben der Ngb-transgenen Mäuse nicht ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund der gegenteilig regulierten Stoffwechselwege kann auf keine eindeutig positive oder negative Auswirkung der Ngb-Überexpression auf die neuronalen Transkriptome geschlossen werden. Um die Pathways, die an der potentiellen indirekten Ngb-Protektion beteiligt sind, zu identifizieren, sollten Cortex und Hippocampus-Transkriptome aus Ngb-KO Geweben generiert und mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten verglichen werden. Dennoch liefern die mittels RNA-Seq erstellten Transkriptome Ngb-transgener Gehirnregionen potentielle Kandidaten-Gene und Pathways für eine weitergehende Untersuchung der putativ protektiven Ngb-Funktion. Bereits diskutierte Kandidaten-Gene (wie cFos und Cyt-C) und Pathways, in denen Ngb möglicherweise eine Rolle spielen soll (wie die ROS-Detoxifizierung, die sauerstoffabhängige Genregulation (Hif1 α -Kaskade), Apoptosepathways oder die GDP-G α -Signalkaskade) waren in keinem der untersuchten Transkriptome dysreguliert. Hippocampus und Cortex stellen im nativen Gehirn im Vergleich mit anderen Gehirnregionen wie dem Hypothalamus Orte einer eher geringen Ngb-Expression dar. Es ist somit möglich, dass eine spezifische Antwort auf Ebene der mRNA-Expression in diesen Geweben durch die erhöhte Ngb-Expression ausbleibt, da in den Zellen einfach nicht mehr Ngb-Interaktionspartner vorhanden sind. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die dysregulierten Gene schlicht eine Antwort auf die stark erhöhte Ngb-Überexpression und eine durch das Ngb-Protein verursachte nachteilige Störung des zellulären Haushalts darstellen.

4.2 Neubewertung der regionalen Ngb-Expression im ZNS und Implikation für die Ngb-Funktion

Die Funktionshypothesen von Ngb sind eng mit der beschriebenen Expressionsverteilung im ZNS und weiteren metabolisch aktiven Gewebe wie der Retina verknüpft (siehe 1.2.2). Die anfänglich naheliegende Ngb-Funktion als Sauerstofflieferant der Mitochondrien in Neuronen aufgrund der regionalen Expressionsunterschiede innerhalb des ZNS und der geringen Konzentration von Ngb z. B. im Vergleich zu Mb im Muskel ist zumindest als Hauptfunktion von Ngb bei Mensch und Maus nicht sehr wahrscheinlich (Burmester et al. 2000, Dewilde et al. 2001, Laufs et al. 2004, Hankeln et al. 2005, Burmester und Hankeln 2009).

Bis heute fehlen für eine endgültige Einschätzung jedoch belastbare und vor allem vergleichbare und quantitative Expressionsdaten von Ngb. Zum einen liegt dies an der Verwendung unspezifischer Antikörper und unterschiedlicher mRNA-Detektionsmethoden, zum anderen an fehlenden systematischen Untersuchungen (Burmester und Hankeln 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher mittels RNA-Seq generierte und öffentlich verfügbare Datensätze der Maus und ausgewählter weiterer Modelorganismen in großem Umfang auf ihre Ngb-Expression hin untersucht (3.4).

Als wichtigstes Ergebnis konnte gezeigt werden, dass nicht etwa die Retina (Schmidt et al. 2003), sondern das murine Stammhirn und hier vor allem der Hypothalamus die neuronale Region mit der höchsten Ngb-Expression ist (Abbildung 3-25 und Abbildung 3-28). Weiterhin wurde in Gehirnregionen wie dem Hippocampus, Cerebellum und Cortex die relativ niedrige Expression von Ngb, wie sie im Jahr 2000 (Burmester et al. 2000) beschrieben wurde, bestätigt. Die schwache Ngb-Expression in diesen Gehirnregionen wurde in Publikationen anderer Arbeitsgruppen nie nachgewiesen (vgl. Abbildung 3-25 und Tabelle 4-1) (Burmester et al. 2000, Mammen et al. 2002, Hundahl et al. 2010a). Ein möglicher Grund ist die fehlende Sensitivität der jeweils verwendeten Detektionsmethode zum Nachweis des Ngb-Proteins bzw. der Ngb-mRNA.

Die RNA-Seq Analyse zeigt, dass die Ngb-mRNA in zwei Konzentrationen im murinen Gehirn Verteilt vorliegt. Eine geringe „basale“ mRNA-Expression mit RPKM-Werten von 1-5 wurde in ZNS-Regionen wie dem Cortex, Hippocampus und Cerebellum, ebenso wie in der Retina und in endokrinen Geweben wie Testes und Nebennieren nachgewiesen. Eine im Vergleich dazu

um Größenordnungen höhere mRNA-Expression (RPKM-Wert: 160) konnte im Hypothalamus ermittelt werden. Diese stark unterschiedlichen Expressionsstärken der Ngb-mRNA deuten möglicherweise auf distinkte Funktionen des Proteins im Hypothalamus und in den restlichen untersuchten Regionen hin. Die ermittelten RNA-Seq-Expressionswerte konnten auch mittels Western Blot und qRT-PCR bestätigt werden (siehe Abbildung 3-26 und Abbildung 3-27). Die Ergebnisse innerhalb des ZNS können zum Teil in Einklang mit den in der Literatur beschriebenen, teils sehr lückenhaften Ngb-mRNA und -Protein-Expressionsdaten gebracht werden. In Tabelle 4-1 sind alle in den letzten 14 Jahren durchgeführten Ngb-Expressionsuntersuchungen für Ngb aus insgesamt zehn Publikationen zusammengefasst. Es zeigt sich eine von der verwendeten Technik und dem untersuchten Organismus (Mensch, Maus, Ratte) unabhängige Tendenz der höchsten Ngb-Expression im Stammhirn (rot-umrandeter Bereich in Tabelle 4-1). Die Tabelle zeigt jedoch auch, wie lückenhaft die Untersuchungen der Ngb-Expression bis dato sind, und dass eine umfassende regionale und zelluläre Expressionsuntersuchung mit quantitativen Methoden von Nöten ist. Um die Ngb-mRNA-Expression zu quantifizieren, bieten sich die öffentlichen RNA-Seq Datensätze zur Analyse an. Eine Quantifizierung der Ngb-Expression auf Proteinebene ist aufgrund fehlender spezifischer Ngb-Antikörper schwieriger. Hier bieten sich zukünftig Proteomics-Ansätze mit direkter Proteinsequenzierung und Quantifizierung an (Kolker et al. 2012, Montague et al. 2014). Bei dieser Methode werden ähnlich zur RNA-Seq Transkriptomanalyse quantitative Proteinexpressionsdaten durch direkte Sequenzierung der Proteine in einem Gewebe generiert und in öffentlichen Datenbanken zur Verfügung gestellt. So können unspezifische Antikörperdetektionen umgangen werden.

Es wird angenommen, dass viele Proteine der Metazoa mehr als eine Funktion ausüben (Jeffery 1999, 2003, Huberts und van der Klei 2010, Copley 2012). Die Ausübung mehrerer Funktionen wurde in der Literatur u. a. auch für Mb, eines der am besten untersuchten Proteine überhaupt, zuverlässig beschrieben. So versorgt Mb nicht nur die Muskulatur mit Sauerstoff, sondern übt auch eine enzymatische Funktion als Nitrit-Reduktase und als Dioxygenase in der Entgiftung von toxischem NO aus (Flogel et al. 2001, Hendgen-Cotta et al. 2008). Ngb könnte analog dazu zum einen an spezifischen Pathways im murinen und humanen Hypothalamus beteiligt sein und zum anderen eine eher allgemeine, z. B. ROS-entgiftende oder andere protektive Funktion in den restlichen Regionen ausüben.

Tabelle 4-1: Expression von Ngβ in der Literatur

Ergebnisse aller verfügbaren Publikationen zur Ngβ-Expression im ZNS von Mensch, Maus und Ratte. Die Detektion und Quantifizierung ist mit „+“ für schwaches bis „+++“ für starkes Signal sowie mit „-“ für kein Signal markiert. Bei leeren Feldern wurde keine Untersuchung der Ngβ-Expression dieser Region in der jeweiligen Publikation durchgeführt. „p“: Ngβ-Signal detektiert. „m“: Hippocampus der Maus mittels IHC untersucht. Rot umrandet sind Gehirnregionen mit der höchsten Ngβ-Expression. (Expressionsdaten aus: Burmester et al. 2000, Mammen et al. 2002, Reuss et al. 2002, Trent und Hargrove 2002, Zhang et al. 2002, Geuens et al. 2003, Wystub et al. 2003, Hundahl et al. 2008b, 2010a, 2013)

Gehirnregion / Technik	Mensch			Maus						Ratte	
	Burmester 2000 <i>Northern Blot</i>	Trent 2002 <i>Northern Blot</i>	Hundahl 2013 <i>ISH</i>	Reuss 2002 <i>NR-ISH</i>	Mammen 2002 <i>R-ISH</i>	Hundahl 2010 <i>ISH</i>	Geuens 2003 <i>IHC</i>	Wystub 2003 <i>IHC</i>	Hundahl 2010 <i>IHC</i>	Zhang 2002 <i>NR-ISH / IHC</i>	Hundahl 2008 <i>IHC</i>
Olfactory bulb				+		-		+	-	+	
Cerebral cortex (layers II – VI)	++/+++	+++	+	+	-	+	+	++	+	+++	+
Hippocampal formation	++m			+	-	-	-	++	-	+++	
Pyramidal cells (CA1 – CA4)	++m			+	-	-	-	++	-	+++	
Granule cells (dentate gyrus)	++m			+	-	-	-	+	-	+++	
Striatum	+			+				+			
Thalamus	+++	+++		+	+++	++	+	++	++	++	+
Subthalamic nucleus	+++			+		++	+	++	++		
Hypothalamus			+	+	+ / +++	+++		++ / +++	+++	++	++
Median preoptic nucleus/area					+++	+++		+++	+++		++
Arcuate nucleus				+	+++	+++		+++	+++		
Lateral septal nuclei					+++	++		++	++		
Subfornical organ					+++			+++			
Lateral/medial habenula					+	++		++	++		
Amygdala	+				++	++		++	++	++	++
Brainstem nuclei			+	+	+ / +++			++		+	
Inferior colliculi				+	++						
Superior colliculi				+		+			+		
Reticular nucleus				+				++		+	
Locus coeruleus					+++			++			
Lower brainstem					+		+ / +++	p		++ / +++	
Sup. olivary complex				+			+++	+++			
Facial nucleus				+				++			
Lateral reticular nucleus				+				++		+	
Pontine nuclei	+++	+++	+++	+				++		+	
Inferior olive				+				+++			
Cerebellum	+	-		+	-	-		++	-	+++	
Purkinje cells				+		-		++	-	+++	
Cortical granule layer				+				+			
Spinal cord	+	-		+				+++			
Dorsal horn				+				+++			
Ventral horn				+				+++			

Zur weiteren Eingrenzung potentieller Interaktionspartner von Ngb im Hypothalamus der Maus wurde eine Korrelationsanalyse auf Grundlage von öffentlich verfügbaren RNA-Seq Daten durchgeführt (siehe 3.4.4). Die Korrelationsanalyse der Ngb-mRNA-Expression in adulten murinen Gehirnregionen (Hypothalamus, Cortex, Hippocampus und Cerebellum) zeigte jedoch keine bis dato in Verbindung mit Ngb diskutierten Gene auf und liefert somit keine neuen Hinweise zur funktionelle Diskussion bereits bestehender Hypothesen. Die mit Ngb positiv korrelierenden Gene reflektieren viel mehr die Orte der hohen Ngb-Expression und könnten z. B. als Marker zur Identifizierung von Ngb-positiven Neuronen genutzt werden.

Ein Vergleich der mittels RNA-Seq ermittelten Ngb-Expression in Säugern mit denen weiterer Modelorganismen wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) und der Ratte (*Rattus norvegicus*) zeigt die evolutive Veränderung der Ngb-Expression bei Vertebraten, die an eine hypoxische Lebensweise adaptiert sind. So ist die Ngb-Expression im Zebrafisch-Gehirn (RPKM \approx 45) deutlich höher als in der Maus (RPKM \approx 1-5) und der Ratte (RPKM \approx 2) siehe (Abbildung 3-29 und Abbildung 3-25). Diese deutlich höhere Expression der Ngb-mRNA zeigt die Anpassung der Zebrafische an ihre zum Teil hypoxische Umwelt (Roesner et al. 2006). Bei an Hypoxie adaptierten Säugern wie dem Seehund (*Phoca*) und der Blindmaus (*Spalax*) ist die potentielle Funktion von Ngb bei der Versorgung der Nervenzellen mit Sauerstoff und somit die evolutive Anpassung an die Hypoxie bereits gut dokumentiert (Roesner et al. 2006, Avivi et al. 2010, Schneuer et al. 2012). Es ist hingegen unwahrscheinlich, dass die regional erhöhte Ngb-Expression im Hypothalamus der Maus ebenfalls eine ähnliche Umwelanpassung reflektiert, da ein spezifisch auf den Hypothalamus beschränkter Schutz vor oxidativem Stress evolutiv unplausibel erscheint. Weiterhin legt dies nahe, dass die protektive Wirkung von Ngb nach Überexpression im transgenen Maussystem vermutlich einen Globin-Effekt darstellt, jedoch keine Ngb-spezifische Funktion im ZNS der Maus darstellt.

Der Hypothalamus ist für die Aufrechterhaltung des inneren Milieus verantwortlich und damit ein wichtiges Zentrum des vegetativen Nervensystems. Er stellt kein homogenes Gebilde dar, sondern besteht aus einer Vielzahl verschiedener Nuclei, welche als Steuerzentrale wichtige Funktionen wie die Körpertemperatur, die Atmung sowie den zirkadianen Zyklus steuern (Elmqvist 2001, Elmqvist et al. 2005, Hill et al. 2008, Trepel 2011).

Da im Hypothalamus eine Vielzahl an Peptidhormonen und biogenen Aminen synthetisiert werden ist es denkbar, dass Ngb in einem hypothalamusspezifischen Stoffwechselweg als Elektronendonator oder O₂-Versorger fungiert. Zur Aufklärung der Funktion von Ngb innerhalb des Hypothalamus sind detaillierte Expressionsuntersuchungen auf zellulärer Ebene innerhalb des Hypothalamus, z. B. durch die Laser-Mikrodissektion einzelner Neuronen und anschließender Sequenzierung des Transkriptoms von Nöten. Durch die Generierung von Einzelzell-Transkriptomen können Gewebeinhomogenitäten vermieden und Pathways, in denen Ngb eine Rolle spielt, exakter bestimmt werden.

4.2.1 Beitrag der Ngb-KO Maus zur Funktionsanalyse

Durch die Generierung der Ngb-KO Mauslinie im Rahmen dieser Arbeit kann aufgrund fehlender drastischer phänotypischer Merkmale keine definitive Aussage über die potentielle Ngb-Funktion in der embryonalen Entwicklung der Maus getroffen werden. So scheint Ngb nicht essentiell für die Entwicklung der Maus zum adulten Tier zu sein. Die Entwicklung der Ngb-KO Mäuse verlief morphologisch unauffällig, jedoch wurden keine eingehenden morphologischen Untersuchungen der Organogenese durchgeführt. So könnten kryptische Veränderungen des Ngb-KOs auf die Entwicklung des ZNS und PNS vorliegen. Weiterhin scheint Ngb keinen gravierenden Einfluss auf die Fertilität der KO-Tiere auszuüben. Beim Generieren der KO-Linien konnte keine Auffälligkeit in der Allelvererbung festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind auch in Übereinstimmung mit einer weiteren publizierten Ngb-KO Mauslinie (Hundahl et al. 2011). Jedoch zeigt das Beispiel der Mb-KO Maus, dass ein Phänotyp durch physiologische kompensatorische Effekte sehr stark verschleiert werden kann (Garry et al. 1998, Godecke et al. 1999). So zeigten die Mb-KO Mäuse keine offensichtlichen physiologischen Auffälligkeiten aufgrund einer verstärkten Durchblutung der Muskulatur durch vergrößerte Kapillargefäße und der damit einhergehenden Kompensation der Folgen des fehlenden Mb-Proteins. Die gleiche Art der physiologischen Kompensation ist beim Ngb-KO denkbar und muss untersucht werden. Außerdem könnte es bei Ngb auf molekularer Ebene zur Kompensation durch andere Globine wie Cygb kommen (Gu et al. 2003, Conant und Wagner 2004). Die Kompensation einer Funktion durch andere Gene scheint plausibel, da Ngb nach derzeitigem Kenntnisstand in keinem einem Gewebe oder Zelltyp exklusiv exprimiert wird.

Die physiologische Untersuchung der Retina in Ngb-KO Mäusen zeigte keine Auffälligkeiten der retinalen Funktion in drei Monate alten Tieren im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. Dieser fehlende Phänotyp unterstützt die erstmals in der vorliegenden Arbeit beschriebene niedrige Expressionsstärke von Ngb in der murinen Retina und ist ein starkes Indiz gegen die damit verknüpfte Funktionshypothese der Sauerstoffversorgung von Ngb in retinalen Zellen (Schmidt et al. 2003). Die geringe Expressionsstärke von Ngb in der Retina der Maus ist mit einer sauerstoffversorgenden Funktion kaum vereinbar, da hierzu eine hohe Expression von Ngb, vergleichbar mit dem Myoglobin im Muskel, zu erwarten wäre, um eine effektive Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Eine primär sauerstoffversorgende Funktion der Retina durch Ngb würde in KO-Tieren wohl zur vorzeitigen Degenerierung der Retina und Auffälligkeiten in deren Physiologie führen. Ein solcher Phänotyp wäre sicher bei drei Monate alten Tieren nachweisbar, da hier die Entwicklung der Retina abgeschlossen ist und degenerative Stoffwechselstörungen sich nun ausprägen können (persönliche Kommunikation: Prof. Dr. Mathias Seeliger). Grundsätzlich könnte jedoch eine Ngb-Deletion während der Entwicklung in der Ngb-KO Maus durch andere Mechanismen wie z. B. die Weitung der Blutgefäße und einer damit einhergehenden besseren Versorgung der Retina mit Sauerstoff kompensiert werden. Eine solche Möglichkeit sollte zukünftig untersucht werden, indem Ngb erst im adulten Organismus ausgeschaltet wird. Ebenfalls könnte die Deletion von Ngb bei Organismen mit avaskulärer Retina, bei der also keine potentiell kompensatorische O₂-Versorgung über das Blut erfolgen kann, wie dem Meerschweinchen oder Kaninchen, auf eine Beeinträchtigung der retinalen Entwicklung hin untersucht werden (Yu und Cringle 2001).

Das Ausschalten des Ngb-Gens unter Verwendung des Eucomm-Knockout-First Systems liefert ein hervorragendes Untersuchungsmodell für die zukünftige Funktionsanalyse von Ngb in der Maus. Durch die Verwendung des transkriptionellen KO-Ansatzes wird schon in der F1-Generation der Chimären ein Knockout auf Ebene der Ngb-mRNA generiert (1.3.3 und Abbildung 3-18). Dieser Ansatz ist jedoch nicht fehlerfrei und zeigte im Falle der transkriptionellen Ngb-KO Maus eine „leaky expression“ des Ngb-Transkriptes im Gehirn (Abbildung 3-19), der Retina (Abbildung 3-20) und in Testes (Abbildung 3-21). Diese „leaky expression“ wurde auch in anderen mittels desselben Vektors generierten KO-Mauslinien beschrieben (etwa 10% der Untersuchten Linien) (White et al. 2013). Die genetischen Details

dieser fehlerhaften Expression der Ngb-mRNA sind komplex und führen vermutlich nicht zu einem funktionellen Ngb-Protein. Sie wurden im Rahmen einer Diplomarbeit eingehender untersucht (Andre, 2013). Die fehlerhafte mRNA-Expression lässt sich nur durch die anschließende Generierung einer genetischen KO-Linie verhindern.

Ein großer Vorteil des verwendeten Vektorsystems ist jedoch die LacZ-KnockIn Kasette, welche die Analyse des nativen Ngb-Promotors ermöglicht. Durch eine histologische Färbung von Embryonen und adulten Geweben mittels X-Gal Farbstoff und Untersuchung der LacZ-Proteinaktivität kann die regionale Spezifität und Aktivität des Ngb-Promotors während der Entwicklung studiert werden. Die Problematik unspezifischer Antikörper (siehe 1.3.3 und 2.3.2) wird dadurch vermieden. Die fälschliche Detektion der endogen exprimierten β -Galactosidase-Aktivität, eine schwankende Färbeintensität abhängig vom untersuchten Gewebe und die fehlende zelluläre Auflösung der X-Gal-Färbung zählen zu den Nachteilen dieser Methode.

Die in dieser Arbeit durchgeführten X-Gal-Färbungen bestätigen die globale Ngb-Expression in Gehirnregionen der Maus, wie sie bereits durch einige Autoren publiziert wurden (Burmester et al. 2000, Reuss et al. 2002, Wystub et al. 2003). Die schwache Ngb-Expression in ZNS-Regionen wie dem Cortex, dem Hippocampus und dem Cerebellum konnte durch die X-Gal-Färbung bestätigt werden. Dies zeigt, dass die publizierten widersprüchlichen Ngb-Expressionsmuster (Tabelle 4-1) vermutlich technischer Natur sind und schwache Ngb-Expressionen wegen geringer Sensitivität der Nachweismethoden nicht detektiert wurden (Mammen et al. 2002, Hundahl et al. 2010a). Zukünftige Arbeiten sollten die LacZ-Färbung aller Gehirnregionen der Maus durchführen. Ebenfalls sollten LacZ-Färbungen von Mausembryonen in verschiedenen Entwicklungsstufen durchgeführt, werden um die Aktivität des nativen Ngb-Promotors während der Entwicklung zu beschreiben. Dadurch können neben dem ZNS und PNS auch andere Organe, z. B. endokrine Gewebe wie Testes und Nebennieren auf eine Ngb-Expression hin untersucht werden.

Die Ngb-KO Maus bietet nun erstmals die Möglichkeit, das Transkriptom des Ngb-defizienten murinen Hypothalamus im Vergleich zum WT zu untersuchen. Hierbei kann die Auswirkung der bereits diskutierten hohen Ngb-Expression im WT-Hypothalamus auf das Transkriptom in den Ngb-KO Tieren untersucht werden. Durch einen Vergleich der im Hypothalamus dysregulierten Gene mit denjenigen aus Cortex und Hippocampus, also Regionen mit einer

schwachen Ngb-Expression, lassen sich somit regionale Unterschiede und putativ unterschiedliche Funktionen von Ngb beschreiben. Weiterhin sollte unter Verwendung des Ngb-transgenen Tet-on / Tet-off Systems eine Überexpression von Ngb im Hypothalamus angestrebt werden, um anschließend die Auswirkung einer Ngb-Überexpression im Vergleich zum Ngb-KO zu untersuchen. Ein weiteres zukünftiges Arbeitsziel wäre es, die ühysiologische Auswirkung der Ngb-Defizienz im Hypothalamus zu untersuchen. So könnte die Analyse des Hormonhaushalts der Ngb-KO Tiere im Vergleich zum Wildtyp (sowohl der männlichen als auch der weiblichen Tiere) die mögliche Beteiligung von Ngb an Stoffwechselwegen im Hypothalamus aufdecken.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Neuroglobin, eines der evolutiv ältesten respiratorischen Proteine der Metazoa untersucht. Hierzu wurde unter anderem das Tet-on / Tet-off System zur ektopischen Überexpression von Ngb in der murinen Leber und dem Gehirn eingesetzt. Mittels Affymetrix Microarrays und Hochdurchsatzsequenzierung (RNA-Seq) wurden die Transkriptome von Lebergeweben und Gehirnregionen (Hippocampus und Cortex) von Ngb-transgenen und Kontrollmäusen verglichen. In keinem der Transkriptome wurden Kandidaten-Gene einer Ngb-Interaktion wie Cyt-C, Flotillin1, Cystatin C oder Pathways in denen Ngb eine putative Rolle spielen soll: wie die ROS-Detoxifizierung, die sauerstoffabhängige Genregulation (Hif1 α -Kaskade), Apoptosepathways oder die GDP-G α -Signalkaskade dysreguliert.

Weiterhin wurden Ngb-transgene Mäuse *in vivo* mit dem leberspezifischen Toxin Tetrachlormethan (CCl₄) gestresst. Die Überexpression von Ngb zeigte dabei keine protektive Wirkung bezüglich des Toxins, sondern eine Verstärkung des Schadens im Lebergewebe. Vermutlich fördert hier Ngb durch die Bereitstellung von Sauerstoff und/oder Elektronen in der Leber der Ngb-transgenen Mäuse die Radikalisierung des Toxins und potenziert somit den hepatotoxischen Effekt. Aus den Lebern Ngb-transgener Mäuse wurden in einem weiteren Versuch primäre Hepatozyten-Kulturen etabliert und *in vitro* die extrinsische Apoptose durch Behandlung mit einem Fas-Rezeptor aktivierenden Antikörper induziert. Hierbei verminderte die Ngb-Überexpression die Aktivierung der apoptotischen Kaskade im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen. Dieser schützende Effekt beruht möglicherweise auf einer konservierten ROS-detoxifizierenden Funktion von Ngb, wodurch in den Ngb-überexprimierenden Hepatozyten die Trimerisierung des Fas-Rezeptors durch den verminderten ROS-Level inhibiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine generalisierte anti-apoptische Wirkung von Ngb, unabhängig von betrachtetem Gewebe und verwendetem Stressor, nicht belegt werden kann und zwischen einem Effekt der Globin-Überexpression und der spezifischen Funktion von Ngb differenziert werden muss.

Neben dem transgenen Mausmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Ngb-Knockout (Ngb-KO) und eine LacZ-KnockIn (LacZ-KI) Mauslinie hergestellt. Die Ngb-KO Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp in der Entwicklung und konnten sich normal

vermehren. Eine erste phänotypische Untersuchung der Retina auf Degenerationserscheinungen zeigte ebenfalls keine Auswirkung der Ngb-Deletion im Vergleich zu WT-Tieren. Eine tiefergehende Analyse muss zukünftig zeigen, ob das Fehlen eines Phänotyps beim Ngb-KO durch kompensatorische Effekte zustande kommt und/oder ein nicht offensichtlicher, kryptischer Phänotyp vorliegt.

Durch das Einbringen des β -Galactosidase-Reportergens unter der Kontrolle des murinen Ngb-Promotors im Genom der LacZ-KI Mauslinie besteht nun erstmals die Möglichkeit einer Analyse der Promotoraktivität während der embryonalen Entwicklung der Maus und im adulten Tier durch die vergleichsweise einfache histologische X-Gal-Färbung. Hierdurch können die Problematik unspezifischer Antikörper und die daraus resultierenden kontroversen Ergebnisse der Ngb-Expression vermieden werden. Eine erste Untersuchung mittels X-Gal-Färbung im adulten Mausgehirn bestätigte bereits publizierte Ngb-Expressionsorte im Hippocampus, Cortex und Cerebellum der Maus.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit eine bioinformatische Analyse öffentlich verfügbarer RNA-Seq-Datensätze zur Ermittlung von Ngb-Expressionsprofilen durchgeführt. Diese RNA-Seq Expressionsprofile von Ngb in murinen Gehirnregionen in verschiedenen embryonalen Stadien sowie in endokrinen Geweben zeigten distinkte Expressionsmuster von Ngb. So konnte eine geringe „basale“ Expression (RPKM: \sim 1-5) in ZNS-Regionen wie dem Hippocampus, Cortex und Cerebellum, aber auch in der Retina und in Testes ermittelt werden. Eine um den Faktor 20-40 höhere und somit sehr starke Expression (RPKM: \sim 160) liegt dagegen nur im Hypothalamus bzw. im Hirnstamm vor. Diese „digitale“ Expressionsuntersuchung konnte mittels qRT-PCR und Western Blot bestätigt werden. Dieses Expressionsprofil von Ngb in der Maus ist durchaus mit einer Funktionsteilung von Ngb im Hypothalamus einerseits und den restlichen Geweben mit einer schwachen Ngb-Expression andererseits vereinbar. Eine Ngb-Funktion in der Sauerstoffversorgung der neuronalen und retinalen Mitochondrien oder die Funktion der Neuroprotektion ist mit der geringen Expression in der Retina und der Beschränkung der hohen Expression auf den Hypothalamus der Maus eher unwahrscheinlich. Eine potentielle Funktion von Ngb bei der Synthese von Hormonen im Hypothalamus z. B. durch die Bereitstellung von Sauerstoff oder Elektronen sollte in weitergehenden Analysen untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Antao, S. T., T. T. Duong, R. Aran und P. K. Witting (2010). "Neuroglobin overexpression in cultured human neuronal cells protects against hydrogen peroxide insult via activating phosphoinositide-3 kinase and opening the mitochondrial K(ATP) channel." *Antioxid Redox Signaling* 13(6): 769-781.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." 2(6): 420-430.
- Auwerx, J., P. Avner, R. Baldock, A. Ballabio, R. Balling, M. Barbacid, A. Berns, A. Bradley, S. Brown, P. Carmeliet, P. Chambon, R. Cox, D. Davidson, K. Davies, D. Duboule, J. Forejt, F. Granucci, N. Hastie, M. H. de Angelis, I. Jackson, D. Kioussis, G. Kollias, M. Lathrop, U. Lendahl, M. Malumbres, H. von Melchner, W. Muller, J. Partanen, P. Ricciardi-Castagnoli, P. Rigby, B. Rosen, N. Rosenthal, B. Skarnes, A. F. Stewart, J. Thornton, G. Tocchini-Valentini, E. Wagner, W. Wahli und W. Wurst (2004). "The European dimension for the mouse genome mutagenesis program." *Nat Genet* 36(9): 925-927.
- Avivi, A., F. Gerlach, A. Joel, S. Reuss, T. Burmester, E. Nevo und T. Hankeln (2010). "Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50): 21570-21575.
- Azevedo, F. A., L. R. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. Ferretti, R. E. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent und S. Herculano-Houzel (2009). "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." *J Comp Neurol* 513(5): 532-541.
- Baron, U. und H. Bujard (2000). "Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances." *Methods Enzymol* 327: 401-421.
- Bentmann, A., M. Schmidt, S. Reuss, U. Wolfrum, T. Hankeln und T. Burmester (2005). "Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration." *J Biol Chem* 280(21): 20660-20665.
- Blank, M. und T. Burmester (2012). "Widespread occurrence of N-terminal acylation in animal globins and possible origin of respiratory globins from a membrane-bound ancestor." *Mol Biol Evol* 29(11): 3553-3561.
- Blank, M., L. Kiger, A. Thielebein, F. Gerlach, T. Hankeln, M. C. Marden und T. Burmester (2011a). "Oxygen supply from the bird's eye perspective: globin E is a respiratory protein in the chicken retina." *J Biol Chem* 286(30): 26507-26515.
- Blank, M., J. Wollberg, F. Gerlach, K. Reimann, A. Roesner, T. Hankeln, A. Fago, R. E. Weber und T. Burmester (2011b). "A membrane-bound vertebrate globin." *PLoS one* 6(9): e25292.
- Blin, N. und D. W. Stafford (1976). "A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes." *Nucleic Acids Res* 3(9): 2303-2308.
- Bockamp, E., M. Maringer, C. Spangenberg, S. Fees, S. Fraser, L. Eshkind, F. Oesch und B. Zabel (2002). "Of mice and models: improved animal models for biomedical research." *Physiol Genomics* 11(3): 115-132.
- 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.
- Bradley, A., K. Anastasiadis, A. Ayadi, J. F. Battey, C. Bell, M. C. Birling, J. Bottomley, S. D. Brown, A. Burger, C. J. Bult, W. Bushell, F. S. Collins, C. Desaintes, B. Doe, A. Economides, J. T. Eppig, R. H. Finnell, C. Fletcher, M. Fray, D. Friendewey, R. H. Friedel, F. G. Grosveld, J. Hansen, Y. Herault, G. Hicks, A. Horlein, R. Houghton, M. Hrabe de Angelis, D. Huylebroeck, V. Iyer, P. J. de Jong, J. A. Kadin, C. Kaloff, K. Kennedy, M. Koutsourakis, K. C. Lloyd, S. Marschall, J. Mason, C. McKerlie, M. P. McLeod, H. von Melchner, M. Moore, A. O. Mujica, A. Nagy,

- M. Nefedov, L. M. Nutter, G. Pavlovic, J. L. Peterson, J. Pollock, R. Ramirez-Solis, D. E. Rancourt, M. Raspa, J. E. Remacle, M. Ringwald, B. Rosen, N. Rosenthal, J. Rossant, P. Ruiz Noppinger, E. Ryder, J. Z. Schick, F. Schnutgen, P. Schofield, C. Seisenberger, M. Selloum, E. M. Simpson, W. C. Skarnes, D. Smedley, W. L. Stanford, A. F. Stewart, K. Stone, K. Swan, H. Tadepally, L. Teboul, G. P. Tocchini-Valentini, D. Valenzuela, A. P. West, K. Yamamura, Y. Yoshinaga und W. Wurst (2012). "The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium." *Mamm Genome* 23(9-10): 580-586.
- Brittain, T. (2012). "The Anti-Apoptotic Role of Neuroglobin." *Cells* 1(4): 1133-1155.
- Brittain, T., J. Skommer, S. Raychaudhuri und N. Birch (2010). "An antiapoptotic neuroprotective role for neuroglobin." *Int J Mol Sci* 11(6): 2306-2321.
- Brunori, M., A. Giuffre, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, F. M. Scandurra und B. Vallone (2005). "Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24): 8483-8488.
- Brunori, M. und B. Vallone (2007). "Neuroglobin, seven years after." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(10): 1259-1268.
- Burmester, T., B. Ebner, B. Weich und T. Hankeln (2002). "Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues." *Mol Biol Evol* 19(4): 416-421.
- Burmester, T., F. Gerlach und T. Hankeln (2007). "Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia." *Adv Exp Med Biol* 618: 169-180.
- Burmester, T., M. Haberkamp, S. Mitz, A. Roesner, M. Schmidt, B. Ebner, F. Gerlach, C. Fuchs und T. Hankeln (2004). "Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution." *IUBMB life* 56(11-12): 703-707.
- Burmester, T. und T. Hankeln (2009). "What is the function of neuroglobin?" *J Exp Biol* 212(Pt 10): 1423-1428.
- Burmester, T., B. Weich, S. Reinhardt und T. Hankeln (2000). "A vertebrate globin expressed in the brain." *Nature* 407(6803): 520-523.
- Cai, B., Y. Lin, X. H. Xue, L. Fang, N. Wang und Z. Y. Wu (2011). "TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice." *Exp Neurol* 227(1): 224-231.
- Chen, L. M., Y. S. Xiong, F. L. Kong, M. Qu, Q. Wang, X. Q. Chen, J. Z. Wang und L. Q. Zhu (2012). "Neuroglobin attenuates Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating Akt signaling." *J Neurochem* 120(1): 157-164.
- Circu, M. L. und T. Y. Aw (2010). "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis." *Free Radical Biol Med* 48(6): 749-762.
- Conant, G. C. und A. Wagner (2004). "Duplicate genes and robustness to transient gene knock-downs in *Caenorhabditis elegans*." *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 271(1534): 89-96.
- Copley, S. D. (2012). "Moonlighting is mainstream: paradigm adjustment required." *Bioessays* 34(7): 578-588.
- Cossins, A. und M. Berenbrink (2008). "Physiology: Myoglobin's new clothes." *Nature* 454(7203): 416-417.
- Costa, V., M. Aprile, R. Esposito und A. Ciccodicola (2013). "RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives." *European journal of human genetics : EJHG* 21(2): 134-142.
- Decker, H. und K. E. Van Holde (2011). *Oxygen and the evolution of life*. Berlin [u.a.], Springer, XI, 172.
- Denhardt, D. T. (1966). "A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA." *Biochem Biophys Res Commun* 23(5): 641-646.

- Dewilde, S., L. Kiger, T. Burmester, T. Hankeln, V. Baudin-Creuzat, T. Aerts, M. C. Marden, R. Caubergs und L. Moens (2001). "Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family." *J Biol Chem* 276(42): 38949-38955.
- Dietz, G. P. (2011). "Protection by neuroglobin and cell-penetrating peptide-mediated delivery in vivo: a decade of research. Comment on Cai et al: TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*. 2011; 227(1): 224-31." *Exp Neurol* 231(1): 1-10.
- Dorval, V., W. Mandemakers, F. Jolivet, L. Coudert, R. Mazroui, B. De Strooper und S. S. Hebert (2014). "Gene and MicroRNA transcriptome analysis of Parkinson's related LRRK2 mouse models." *PloS one* 9(1): e85510.
- Dorval, V., P. Y. Smith, C. Delay, E. Calvo, E. Planel, N. Zommer, L. Buee und S. S. Hebert (2012). "Gene network and pathway analysis of mice with conditional ablation of Dicer in post-mitotic neurons." *PloS one* 7(8): e44060.
- Dröge, J., A. Pande, E. W. Englander und W. Makalowski (2012). "Comparative genomics of neuroglobin reveals its early origins." *PloS one* 7(10): e47972.
- Ebner, B. (2012). "Phylogenetische und molekulare Analyse des Globin-Repertoires der Metazoa: Bedeutung für das Verständnis der Globingenfamilie der Wirbeltiere" Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Dr. rer nat, T. Hankeln, 127.
- Ebner, B., G. Panopoulou, S. N. Vinogradov, L. Kiger, M. C. Marden, T. Burmester und T. Hankeln (2010). "The globin gene family of the cephalochordate amphioxus: implications for chordate globin evolution." *BMC Evol Biol* 10: 370.
- Elmqvist, J. K. (2001). "Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin." *Physiol Behav* 74(4-5): 703-708.
- Elmqvist, J. K., R. Coppari, N. Balthasar, M. Ichinose und B. B. Lowell (2005). "Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis." *The Journal of comparative neurology* 493(1): 63-71.
- EUCOMM (2007). "A Mouse for All Reasons." *Cell* 128(1): 9-13.
- Fago, A., C. Hundahl, S. Dewilde, K. Gilany, L. Moens und R. E. Weber (2004a). "Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance." *J Biol Chem* 279(43): 44417-44426.
- Fago, A., C. Hundahl, H. Malte und R. E. Weber (2004b). "Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins." *IUBMB life* 56(11-12): 689-696.
- Fago, A., A. J. Mathews, L. Moens, S. Dewilde und T. Brittain (2006). "The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c." *FEBS Lett* 580(20): 4884-4888.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Ferrer, I., A. Gomez, M. Carmona, G. Huesa, S. Porta, M. Riera-Codina, M. Biagioli, S. Gustincich und E. Aso (2011). "Neuronal hemoglobin is reduced in Alzheimer's disease, argyrophilic grain disease, Parkinson's disease, and dementia with Lewy bodies." *J Alzheimers Dis* 23(3): 537-550.
- Fiocchetti, M., E. De Marinis, P. Ascenzi und M. Marino (2013). "Neuroglobin and neuronal cell survival." *Biochim Biophys Acta* 1834(9): 1744-1749.
- Flogel, U., M. W. Merx, A. Godecke, U. K. Decking und J. Schrader (2001). "Myoglobin: A scavenger of bioactive NO." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2): 735-740.

- Fordel, E., L. Thijs, W. Martinet, M. Lenjou, T. Laufs, D. Van Bockstaele, L. Moens und S. Dewilde (2006). "Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death." *Neurosci Lett* 410(2): 146-151.
- Fuchs, C., T. Burmester und T. Hankeln (2006). "The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome." *Cytogenet Genome Res* 112(3-4): 296-306.
- Galli-Taliadoros, L. A., J. D. Sedgwick, S. A. Wood und H. Korner (1995). "Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice." *J Immunol Methods* 181(1): 1-15.
- Garry, D. J., G. A. Ordway, J. N. Lorenz, N. B. Radford, E. R. Chin, R. W. Grange, R. Bassel-Duby und R. S. Williams (1998). "Mice without myoglobin." *Nature* 395(6705): 905-908.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman und S. A. Ben-Sasson (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *J Cell Biol* 119(3): 493-501.
- Geuens, E., I. Brouns, D. Flamez, S. Dewilde, J. P. Timmermans und L. Moens (2003). "A globin in the nucleus!" *J Biol Chem* 278(33): 30417-30420.
- Ghazalpour, A., B. Bennett, V. A. Petyuk, L. Orozco, R. Hagopian, I. N. Mungrue, C. R. Farber, J. Sinsheimer, H. M. Kang, N. Furlotte, C. C. Park, P. Z. Wen, H. Brewer, K. Weitz, D. G. Camp, 2nd, C. Pan, R. Yordanova, I. Neuhaus, C. Tilford, N. Siemers, P. Gargalovic, E. Eskin, T. Kirchgessner, D. J. Smith, R. D. Smith und A. J. Lusis (2011). "Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse." *PLoS genetics* 7(6): e1001393.
- Godecke, A., U. Flogel, K. Zanger, Z. Ding, J. Hirchenhain, U. K. Decking und J. Schrader (1999). "Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10495-10500.
- Godecke, A. und J. Schrader (2000). "Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice--lessons from eNOS and myoglobin knockout mice." *Basic Res Cardiol* 95(6): 492-498.
- Gossen, M. und H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547-5551.
- Gossen, M. und H. Bujard (1995). "Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary." *BioTechniques* 19(2): 213-216; discussion 216-217.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen und H. Bujard (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* 268(5218): 1766-1769.
- Gossler, A., A. L. Joyner, J. Rossant und W. C. Skarnes (1989). "Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes." *Science* 244(4903): 463-465.
- Greenberg, D. A., K. Jin und A. A. Khan (2008). "Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant." *Curr Opin Pharmacol* 8(1): 20-24.
- Gu, Z., L. M. Steinmetz, X. Gu, C. Scharfe, R. W. Davis und W. H. Li (2003). "Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations." *Nature* 421(6918): 63-66.
- Hamdane, D., L. Kiger, S. Dewilde, B. N. Green, A. Pesce, J. Uzan, T. Burmester, T. Hankeln, M. Bolognesi, L. Moens und M. C. Marden (2003). "The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin." *J Biol Chem* 278(51): 51713-51721.
- Hanke, M. und M. Wink (1994). "Direct DNA sequencing of PCR-amplified vector inserts following enzymatic degradation of primer and dNTPs." *BioTechniques* 17(5): 858-860.

- Hankeln, T., B. Ebner, C. Fuchs, F. Gerlach, M. Haberkamp, T. L. Laufs, A. Roesner, M. Schmidt, B. Weich, S. Wystub, S. Saaler-Reinhardt, S. Reuss, M. Bolognesi, D. De Sanctis, M. C. Marden, L. Kiger, L. Moens, S. Dewilde, E. Nevo, A. Avivi, R. E. Weber, A. Fago und T. Burmester (2005). "Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family." *J Inorg Biochem* 99(1): 110-119.
- Hankeln, T., S. Wystub, T. Laufs, M. Schmidt, F. Gerlach, S. Saaler-Reinhardt, S. Reuss und T. Burmester (2004). "The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function?" *IUBMB life* 56(11-12): 671-679.
- Harper, S. und D. W. Speicher (2001). "Detection of proteins on blot membranes." *Curr Protoc Prot Sci Chapter 10: Unit 10 18*.
- Hayashi, S. und A. P. McMahon (2002). "Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse." *Dev Biol* 244(2): 305-318.
- Hendgen-Cotta, U. B., M. Kelm und T. Rassaf (2010). "A highlight of myoglobin diversity: the nitrite reductase activity during myocardial ischemia-reperfusion." *Nitric Oxide* 22(2): 75-82.
- Hendgen-Cotta, U. B., M. W. Merx, S. Shiva, J. Schmitz, S. Becher, J. P. Klare, H. J. Steinhoff, A. Goedecke, J. Schrader, M. T. Gladwin, M. Kelm und T. Rassaf (2008). "Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29): 10256-10261.
- Herculano-Houzel, S., B. Mota und R. Lent (2006). "Cellular scaling rules for rodent brains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 12138-12143.
- Herold, S. und A. Fago (2005). "Reactions of peroxynitrite with globin proteins and their possible physiological role." *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 142(2): 124-129.
- Herold, S., A. Fago, R. E. Weber, S. Dewilde und L. Moens (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(22): 22841-22847.
- Hill, J. W., J. K. Elmquist und C. F. Elias (2008). "Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction." *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 294(5): E827-832.
- Hoffmann, F. G., J. C. Opazo und J. F. Storz (2011). "Differential loss and retention of cytoglobin, myoglobin, and globin-E during the radiation of vertebrates." *Genome Biol Evol* 3: 588-600.
- Hoffmann, F. G., J. F. Storz, T. A. Gorr und J. C. Opazo (2010). "Lineage-specific patterns of functional diversification in the alpha- and beta-globin gene families of tetrapod vertebrates." *Mol Biol Evol* 27(5): 1126-1138.
- Holm, L. und C. Sander (1993). "Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A." *FEBS Lett* 315(3): 301-306.
- Holton, T. A. und M. W. Graham (1991). "A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors." *Nucleic Acids Res* 19(5): 1156.
- Hoogewijs, D., B. Ebner, F. Germani, F. G. Hoffmann, A. Fabrizius, L. Moens, T. Burmester, S. Dewilde, J. F. Storz, S. N. Vinogradov und T. Hankeln (2012). "Androglobin: a chimeric globin in metazoans that is preferentially expressed in Mammalian testes." *Mol Biol Evol* 29(4): 1105-1114.
- Huang da, W., B. T. Sherman und R. A. Lempicki (2009a). "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists." *Nucleic Acids Res* 37(1): 1-13.

- Huang da, W., B. T. Sherman und R. A. Lempicki (2009b). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." *Nat Protoc* 4(1): 44-57.
- Huberts, D. H. und I. J. van der Klei (2010). "Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking." *Biochim Biophys Acta* 1803(4): 520-525.
- Hundahl, C., M. Stoltenberg, A. Fago, R. E. Weber, S. Dewilde, E. Fordel und G. Danscher (2005). "Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues." *Neuropathol Appl Neurobiol* 31(6): 610-617.
- Hundahl, C. A., G. C. Allen, J. Hannibal, K. Kjaer, J. F. Rehfeld, S. Dewilde, J. R. Nyengaard, J. Kelsen und A. Hay-Schmidt (2010a). "Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain." *Brain Res* 1331: 58-73.
- Hundahl, C. A., G. C. Allen, J. R. Nyengaard, S. Dewilde, B. D. Carter, J. Kelsen und A. Hay-Schmidt (2008a). "Neuroglobin in the rat brain: localization." *Neuroendocrinology* 88(3): 173-182.
- Hundahl, C. A., J. Fahrenkrug, A. Hay-Schmidt, B. Georg, B. Faltoft und J. Hannibal (2012a). "Circadian behaviour in neuroglobin deficient mice." *PloS one* 7(4): e34462.
- Hundahl, C. A., J. Fahrenkrug, H. Luuk, A. Hay-Schmidt und J. Hannibal (2012b). "Restricted expression of Neuroglobin in the mouse retina and co-localization with Melanopsin and Tyrosine Hydroxylase." *Biochem Biophys Res Commun* 425(1): 100-106.
- Hundahl, C. A., J. Hannibal, J. Fahrenkrug, S. Dewilde und A. Hay-Schmidt (2010b). "Neuroglobin expression in the rat suprachiasmatic nucleus: colocalization, innervation, and response to light." *J Comp Neurol* 518(9): 1556-1569.
- Hundahl, C. A., J. Kelsen, S. Dewilde und A. Hay-Schmidt (2008b). "Neuroglobin in the rat brain (II): co-localisation with neurotransmitters." *Neuroendocrinology* 88(3): 183-198.
- Hundahl, C. A., J. Kelsen und A. Hay-Schmidt (2013). "Neuroglobin and Cytoglobin expression in the human brain." *Brain Struct Funct* 218(2): 603-609.
- Hundahl, C. A., H. Luuk, S. Ilmarj, B. Falktoft, Z. Raida, J. Vikesaa, L. Friis-Hansen und A. Hay-Schmidt (2011). "Neuroglobin-deficiency exacerbates Hif1A and c-FOS response, but does not affect neuronal survival during severe hypoxia in vivo." *PloS one* 6(12): e28160.
- Hunt, P. W., R. A. Watts, B. Trevaskis, D. J. Llewelyn, J. Burnell, E. S. Dennis und W. J. Peacock (2001). "Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants." *Plant Mol Biol* 47(5): 677-692.
- Jeffery, C. J. (1999). "Moonlighting proteins." *Trends Biochem Sci* 24(1): 8-11.
- Jeffery, C. J. (2003). "Multifunctional proteins: examples of gene sharing." *Ann Med* 35(1): 28-35.
- Jensen, F. B. (2009). "The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective." *Biochim Biophys Acta* 1787(7): 841-848.
- Jin, K., X. O. Mao, L. Xie, A. A. Khan und D. A. Greenberg (2008). "Neuroglobin protects against nitric oxide toxicity." *Neurosci Lett* 430(2): 135-137.
- Kakar, S., F. G. Hoffman, J. F. Storz, M. Fabian und M. S. Hargrove (2010). "Structure and reactivity of hexacoordinate hemoglobins." *Biophys Chem* 152(1-3): 1-14.
- Kanehisa, M., S. Goto, S. Kawashima, Y. Okuno und M. Hattori (2004). "The KEGG resource for deciphering the genome." *Nucleic Acids Res* 32(Database issue): D277-280.

- Kaufmann, S. H., C. M. Ewing und J. H. Shaper (1987). "The erasable Western blot." *Anal Biochem* 161(1): 89-95.
- Kawada, N., D. B. Kristensen, K. Asahina, K. Nakatani, Y. Minamiyama, S. Seki und K. Yoshizato (2001). "Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells." *J Biol Chem* 276(27): 25318-25323.
- Kendrew, J. C., G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff und D. C. Phillips (1958). "A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis." *Nature* 181(4610): 662-666.
- Khan, A. A., X. O. Mao, S. Banwait, C. M. DerMardirossian, G. M. Bokoch, K. Jin und D. A. Greenberg (2008). "Regulation of hypoxic neuronal death signaling by neuroglobin." *FASEB J* 22(6): 1737-1747.
- Khan, A. A., X. O. Mao, S. Banwait, K. Jin und D. A. Greenberg (2007). "Neuroglobin attenuates beta-amyloid neurotoxicity in vitro and transgenic Alzheimer phenotype in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(48): 19114-19119.
- Khan, A. A., Y. Wang, Y. Sun, X. O. Mao, L. Xie, E. Miles, J. Graboski, S. Chen, L. M. Ellerby, K. Jin und D. A. Greenberg (2006). "Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47): 17944-17948.
- Kiermayer, C., M. Conrad, M. Schneider, J. Schmidt und M. Brielmeier (2007). "Optimization of spatiotemporal gene inactivation in mouse heart by oral application of tamoxifen citrate." *Genesis* 45(1): 11-16.
- Kim, D. G., H. M. Kang, S. K. Jang und H. S. Shin (1992). "Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus." *Mol Cell Biol* 12(8): 3636-3643.
- Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jercecic, C. Ullmer, H. Lubbert und H. Bujard (1996). "Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20): 10933-10938.
- Kolker, E., R. Higdon, W. Haynes, D. Welch, W. Broomall, D. Lancet, L. Stanberry und N. Kolker (2012). "MOPED: Model Organism Protein Expression Database." *Nucleic Acids Res* 40(Database issue): D1093-1099.
- Krestel, H. E., M. Mayford, P. H. Seeburg und R. Sprengel (2001). "A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse." *Nucleic Acids Res* 29(7): E39.
- Kugelstadt, D., M. Haberkamp, T. Hankeln und T. Burmester (2004). "Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken." *Biochem Biophys Res Commun* 325(3): 719-725.
- Labat-Moleur, F., C. Guillermet, P. Lorimier, C. Robert, S. Lantuejoul, E. Brambilla und A. Negoescu (1998). "TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement." *J Histochem Cytochem* 46(3): 327-334.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lakso, M., J. G. Pichel, J. R. Gorman, B. Sauer, Y. Okamoto, E. Lee, F. W. Alt und H. Westphal (1996). "Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 5860-5865.
- Laufs, T. L. (2010). "Untersuchungen zur Expression und Lokalisation der respiratorischen Proteine Neuroglobin (Ngb) und Cytoglobin (Cygb) in Säugern" Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Dr rer. nat., P. D. T. Hankeln, 191.
- Laufs, T. L., S. Wystub, S. Reuss, T. Burmester, S. Saaler-Reinhardt und T. Hankeln (2004). "Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals." *Neurosci Lett* 362(2): 83-86.

- Lechauve, C., H. Rezaei, C. Celier, L. Kiger, M. Corral-Debrinski, S. Noinville, C. Chauvierre, D. Hamdane, C. Pato und M. C. Marden (2009). "Neuroglobin and prion cellular localization: investigation of a potential interaction." *J Mol Biol* 388(5): 968-977.
- Lewandoski, M. (2001). "Conditional control of gene expression in the mouse." *Nat Rev Genet* 2(10): 743-755.
- Li, L., Q. R. Liu, X. X. Xiong, J. M. Liu, X. J. Lai, C. Cheng, F. Pan, Y. Chen, S. B. Yu, A. C. Yu und X. Q. Chen (2014). "Neuroglobin Promotes Neurite Outgrowth via Differential Binding to PTEN and Akt." *Mol Neurobiol* 49(1): 149-162.
- Li, R. C., S. Z. Guo, S. K. Lee und D. Gozal (2010). "Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia." *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30(11): 1874-1882.
- Li, R. C., M. W. Morris, S. K. Lee, F. Pouranfar, Y. Wang und D. Gozal (2008). "Neuroglobin protects PC12 cells against oxidative stress." *Brain Res* 1190: 159-166.
- Lipshutz, R. J., S. P. Fodor, T. R. Gingeras und D. J. Lockhart (1999). "High density synthetic oligonucleotide arrays." *Nat Genet* 21(1 Suppl): 20-24.
- Liu, L., Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu und M. Law (2012). "Comparison of next-generation sequencing systems." *J Biomed Biotechnol* 2012: 251364.
- Löffler, G., P. Löffler und P. E. Petrides (2003). *Biochemie und Pathobiochemie : mit 218 Tabellen*. Berlin u.a., Springer, XXXVII, 1267.
- Malone, J. H. und B. Oliver (2011). "Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome." *BMC Biol* 9: 34.
- Mammen, P. P., J. M. Shelton, S. C. Goetsch, S. C. Williams, J. A. Richardson, M. G. Garry und D. J. Garry (2002). "Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain." *J Histochem Cytochem* 50(12): 1591-1598.
- Mansuy, I. M. und H. Bujard (2000). "Tetracycline-regulated gene expression in the brain." *Curr Opin Neurobiol* 10(5): 593-596.
- Mayford, M., M. E. Bach, Y. Y. Huang, L. Wang, R. D. Hawkins und E. R. Kandel (1996). "Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene." *Science* 274(5293): 1678-1683.
- Millikan, G. A. (1933). "The kinetics of blood pigments: haemocyanin and haemoglobin." *J Physiol (Lond)* 79(2): 158-179.
- Mitz, S. A., S. Reuss, L. P. Folkow, A. S. Blix, J. M. Ramirez, T. Hankeln und T. Burmester (2009). "When the brain goes diving: glial oxidative metabolism may confer hypoxia tolerance to the seal brain." *Neuroscience* 163(2): 552-560.
- Montague, E., L. Stanberry, R. Higdon, I. Janko, E. Lee, N. Anderson, J. Choiniere, E. Stewart, G. Yandl, W. Broomall, N. Kolker und E. Kolker (2014). "MOPED 2.5--an integrated multi-omics resource: multi-omics profiling expression database now includes transcriptomics data." *Omics : a journal of integrative biology* 18(6): 335-343.
- Morin, R., M. Bainbridge, A. Fejes, M. Hirst, M. Krzywinski, T. Pugh, H. McDonald, R. Varhol, S. Jones und M. Marra (2008). "Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing." *BioTechniques* 45(1): 81-94.
- Mortazavi, A., B. A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer und B. Wold (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq." *Nat Methods* 5(7): 621-628.

- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." *Genesis* 26(2): 99-109.
- Nakatani, K., H. Okuyama, Y. Shimahara, S. Saeki, D. H. Kim, Y. Nakajima, S. Seki, N. Kawada und K. Yoshizato (2004). "Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis." *Lab Invest* 84(1): 91-101.
- Oleksiewicz, U., T. Liloglou, J. K. Field und G. Xinarianos (2011). "Cytoglobin: biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family." *Cell Mol Life Sci* 68(23): 3869-3883.
- Osterwalder, M., A. Galli, B. Rosen, W. C. Skarnes, R. Zeller und J. Lopez-Rios (2010). "Dual RMCE for efficient re-engineering of mouse mutant alleles." *Nat Methods* 7(11): 893-895.
- Palladino, P., G. L. Scaglione, A. Arcovito, R. Maria Vitale, P. Amodeo, B. Vallone, M. Brunori, E. Benedetti und F. Rossi (2011). "Neuroglobin-prion protein interaction: what's the function?" *J Pept Sci* 17(5): 387-391.
- Perutz, M. F. (1979). "Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron." *Annu Rev Biochem* 48: 327-386.
- Pesce, A., M. Bolognesi, A. Bocedi, P. Ascenzi, S. Dewilde, L. Moens, T. Hankeln und T. Burmester (2002). "Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family." *EMBO Rep* 3(12): 1146-1151.
- Raida, Z., C. A. Hundahl, J. Kelsen, J. R. Nyengaard und A. Hay-Schmidt (2012). "Reduced infarct size in neuroglobin-null mice after experimental stroke in vivo." *Exp Transl Stroke Med* 4(1): 15.
- Raida, Z., C. A. Hundahl, J. R. Nyengaard und A. Hay-Schmidt (2013). "Neuroglobin over expressing mice: expression pattern and effect on brain ischemic infarct size." *PloS one* 8(10): e76565.
- Raychaudhuri, S., J. Skommer, K. Henty, N. Birch und T. Brittain (2010). "Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death." *Apoptosis* 15(4): 401-411.
- Rayner, B. S., T. T. Duong, S. J. Myers und P. K. Witting (2006). "Protective effect of a synthetic anti-oxidant on neuronal cell apoptosis resulting from experimental hypoxia re-oxygenation injury." *J Neurochem* 97(1): 211-221.
- Reimers, M. (2010). "Making informed choices about microarray data analysis." *PLoS Comput Biol* 6(5): e1000786.
- Reuss, S., S. Saaler-Reinhardt, B. Weich, S. Wystub, M. H. Reuss, T. Burmester und T. Hankeln (2002). "Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues." *Neuroscience* 115(3): 645-656.
- Rodriguez, C. I., F. Buchholz, J. Galloway, R. Sequerra, J. Kasper, R. Ayala, A. F. Stewart und S. M. Dymecki (2000). "High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP." *Nat Genet* 25(2): 139-140.
- Roesner, A., C. Fuchs, T. Hankeln und T. Burmester (2005). "A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals." *Mol Biol Evol* 22(1): 12-20.
- Roesner, A., T. Hankeln und T. Burmester (2006). "Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*)." *The Journal of experimental biology* 209(Pt 11): 2129-2137.
- Roesner, A., S. A. Mitz, T. Hankeln und T. Burmester (2008). "Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus*." *FEBS J* 275(14): 3633-3643.

- Salinovich, O. und R. C. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem* 156(2): 341-347.
- Sambrook, J. und D. W. Russell (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344.
- Sauer, B. (1998). "Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system." *Methods* 14(4): 381-392.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis und P. O. Brown (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* 270(5235): 467-470.
- Schmidt-Kastner, R., M. Haberkamp, C. Schmitz, T. Hankeln und T. Burmester (2006). "Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture." *Brain Res* 1103(1): 173-180.
- Schmidt, A., K. Tief, A. Foletti, A. Hunziker, D. Penna, E. Hummler und F. Beermann (1998). "lacZ transgenic mice to monitor gene expression in embryo and adult." *Brain Res Brain Res Protoc* 3(1): 54-60.
- Schmidt, M., A. Giessl, T. Laufs, T. Hankeln, U. Wolfrum und T. Burmester (2003). "How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina." *J Biol Chem* 278(3): 1932-1935.
- Schneuer, M., S. Flachsbarth, N. U. Czech-Damal, L. P. Folkow, U. Siebert und T. Burmester (2012). "Neuroglobin of seals and whales: evidence for a divergent role in the diving brain." *Neuroscience* 223: 35-44.
- Schnutgen, F., S. De-Zolt, P. Van Sloun, M. Hollatz, T. Floss, J. Hansen, J. Altschmied, C. Seisenberger, N. B. Ghyselinck, P. Ruiz, P. Chambon, W. Wurst und H. von Melchner (2005). "Genomewide production of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(20): 7221-7226.
- Schroeder, A., O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow und T. Ragg (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." *BMC Mol Biol* 7: 3.
- Schwarze, K. und T. Burmester (2013). "Conservation of globin genes in the "living fossil" *Latimeria chalumnae* and reconstruction of the evolution of the vertebrate globin family." *Biochim Biophys Acta* 1834(9): 1801-1812.
- Skarnes, W. C., B. Rosen, A. P. West, M. Koutsourakis, W. Bushell, V. Iyer, A. O. Mujica, M. Thomas, J. Harrow, T. Cox, D. Jackson, J. Severin, P. Biggs, J. Fu, M. Nefedov, P. J. de Jong, A. F. Stewart und A. Bradley (2011). "A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function." *Nature* 474(7351): 337-342.
- Smagghe, B. J., J. T. Trent, 3rd und M. S. Hargrove (2008). "NO dioxygenase activity in hemoglobins is ubiquitous in vitro, but limited by reduction in vivo." *PloS one* 3(4): e2039.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." *Nat Genet* 21(1): 70-71.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* 98(3): 503-517.
- Stekel, D. J., Y. Git und F. Falciani (2000). "The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries." *Genome Res* 10(12): 2055-2061.

- Storz, J. F., J. C. Opazo und F. G. Hoffmann (2013). "Gene duplication, genome duplication, and the functional diversification of vertebrate globins." *Mol Phylogenet Evol* 66(2): 469-478.
- Strand, S., W. J. Hofmann, A. Grambihler, H. Hug, M. Volkmann, G. Otto, H. Wesch, S. M. Mariani, V. Hack, W. Stremmel, P. H. Krammer und P. R. Galle (1998). "Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis." *Nat Med* 4(5): 588-593.
- Strand, S., W. J. Hofmann, H. Hug, M. Muller, G. Otto, D. Strand, S. M. Mariani, W. Stremmel, P. H. Krammer und P. R. Galle (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?" *Nat Med* 2(12): 1361-1366.
- Sun, Y., K. Jin, X. O. Mao, Y. Zhu und D. A. Greenberg (2001). "Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15306-15311.
- Sun, Y., K. Jin, A. Peel, X. O. Mao, L. Xie und D. A. Greenberg (2003). "Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3497-3500.
- Testa, G., J. Schaft, F. van der Hoeven, S. Glaser, K. Anastassiadis, Y. Zhang, T. Hermann, W. Stremmel und A. F. Stewart (2004). "A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles." *Genesis* 38(3): 151-158.
- Tiedke, J., C. Cubuk und T. Burmester (2013). "Environmental acidification triggers oxidative stress and enhances globin expression in zebrafish gills." *Biochem Biophys Res Commun* 441(3): 624-629.
- Tiedke, J., F. Gerlach, S. A. Mitz, T. Hankeln und T. Burmester (2011). "Ontogeny of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*)." *J Comp Physiol [B]* 181(8): 1011-1021.
- Tiso, M., J. Tejero, S. Basu, I. Azarov, X. Wang, V. Simplaceanu, S. Frizzell, T. Jayaraman, L. Geary, C. Shapiro, C. Ho, S. Shiva, D. B. Kim-Shapiro und M. T. Gladwin (2011). "Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase." *J Biol Chem* 286(20): 18277-18289.
- Trent, J. T., 3rd und M. S. Hargrove (2002). "A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin." *J Biol Chem* 277(22): 19538-19545.
- Trepel, M. (2011). *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. München, Elsevier, XII, 420.
- Truett, G. E., P. Heeger, R. L. Mynatt, A. A. Truett, J. A. Walker und M. L. Warman (2000). "Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT)." *BioTechniques* 29(1): 52, 54.
- Ullmann, A., F. Jacob und J. Monod (1967). "Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 24(2): 339-343.
- Utomo, A. R., A. Y. Nikitin und W. H. Lee (1999). "Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice." *Nat Biotechnol* 17(11): 1091-1096.
- Uzan, J., S. Dewilde, T. Burmester, T. Hankeln, L. Moens, D. Hamdane, M. C. Marden und L. Kiger (2004). "Neuroglobin and other hexacoordinated hemoglobins show a weak temperature dependence of oxygen binding." *Biophys J* 87(2): 1196-1204.
- Van Leuven, W., D. Van Dam, L. Moens, P. P. De Deyn und S. Dewilde (2013). "A behavioural study of neuroglobin-overexpressing mice under normoxic and hypoxic conditions." *Biochim Biophys Acta* 1834(9): 1764-1771.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe und F. Speleman (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* 3(7): 34.31-34.11.

- Vinogradov, S. N., D. Hoogewijs, X. Bailly, R. Arredondo-Peter, J. Gough, S. Dewilde, L. Moens und J. R. Vanfleteren (2006). "A phylogenomic profile of globins." *BMC Evol Biol* 6: 31.
- Wakasugi, K., C. Kitatsuji und I. Morishima (2005). "Possible neuroprotective mechanism of human neuroglobin." *Ann N Y Acad Sci* 1053: 220-230.
- Wakasugi, K., T. Nakano, C. Kitatsuji und I. Morishima (2004a). "Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein." *Biochem Biophys Res Commun* 318(2): 453-460.
- Wakasugi, K., T. Nakano und I. Morishima (2003). "Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor." *J Biol Chem* 278(38): 36505-36512.
- Wakasugi, K., T. Nakano und I. Morishima (2004b). "Association of human neuroglobin with cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor." *Biochemistry* 43(18): 5119-5125.
- Wang, L., N. Azad, L. Kongkaneramt, F. Chen, Y. Lu, B. H. Jiang und Y. Rojanasakul (2008a). "The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation." *J Immunol* 180(5): 3072-3080.
- Wang, X., J. Liu, H. Zhu, E. Tejima, K. Tsuji, Y. Murata, D. N. Atochin, P. L. Huang, C. Zhang und E. H. Lo (2008b). "Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia." *Stroke* 39(6): 1869-1874.
- Wang, Z., M. Gerstein und M. Snyder (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nat Rev Genet* 10(1): 57-63.
- Watanabe, S., N. Takahashi, H. Uchida und K. Wakasugi (2012). "Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection." *J Biol Chem* 287(36): 30128-30138.
- Weber, L. W. D., M. Boll und A. Stampfl (2003). "Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model." *Crit Rev Toxicol* 33(2): 105-136.
- Wehner, R., W. Gehring und A. Kühn (1991). *Zoologie*. Stuttgart [u.a.], Thieme: XV, 816.
- White, J. K., A. K. Gerdin, N. A. Karp, E. Ryder, M. Buljan, J. N. Bussell, J. Salisbury, S. Clare, N. J. Ingham, C. Podrini, R. Houghton, J. Estabel, J. R. Bottomley, D. G. Melvin, D. Sunter, N. C. Adams, P. Sanger Institute Mouse Genetics, D. Tannahill, D. W. Logan, D. G. Macarthur, J. Flint, V. B. Mahajan, S. H. Tsang, I. Smyth, F. M. Watt, W. C. Skarnes, G. Dougan, D. J. Adams, R. Ramirez-Solis, A. Bradley und K. P. Steel (2013). "Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes." *Cell* 154(2): 452-464.
- Wilfinger, W. W., K. Mackey und P. Chomczynski (1997). "Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity." *BioTechniques* 22(3): 474-476, 478-481.
- Wilkie-Grantham, R. P., S. Matsuzawa und J. C. Reed (2013). "Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein." *J Biol Chem* 288(18): 12777-12790.
- Wittenberg, J. B. (1970). "Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle." *Physiol Rev* 50(4): 559-636.
- Wittenberg, J. B. und B. A. Wittenberg (2003). "Myoglobin function reassessed." *J Exp Biol* 206(Pt 12): 2011-2020.
- Wortge, S., L. Eshkind, N. Cabezas-Wallscheid, B. Lakaye, J. Kim, R. Heck, Y. Abassi, M. Diken, R. Sprengel und E. Bockamp (2010). "Tetracycline-controlled transgene activation using the ROSA26-iM2-GFP knock-in mouse strain permits GFP monitoring of DOX-regulated transgene-expression." *BMC Dev Biol* 10: 95.

- Wystub, S. (2007). "Expressions- und Funktionsanalysen von Neuroglobin und Cytoglobin" Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Dr rer. nat., P. D. T. Hankeln, 241.
- Wystub, S., B. Ebner, C. Fuchs, B. Weich, T. Burmester und T. Hankeln (2004). "Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements." *Cytogenet Genome Res* 105(1): 65-78.
- Wystub, S., T. Laufs, M. Schmidt, T. Burmester, U. Maas, S. Saaler-Reinhardt, T. Hankeln und S. Reuss (2003). "Localization of neuroglobin protein in the mouse brain." *Neurosci Lett* 346(1-2): 114-116.
- Xu, W. L., C. L. Wang, Z. Y. Liao, Y. L. Zhang, L. H. Yu, F. W. Meng, X. X. Wang, F. W. Meng, Z. Y. Yin, L. J. Qian und C. G. Zhang (2003). "[Identification of interaction and interaction domains between neuroglobin and Na(+), K(+)-ATPase beta2 subunit]." *Acta Biochim Biophys Sin* 35(9): 823-828.
- Yu, D.-Y. und S. J. Cringle (2001). "Oxygen Distribution and Consumption within the Retina in Vascularised and Avascular Retinas and in Animal Models of Retinal Disease." 20(2): 175-208.
- Yu, Z., J. Liu, S. Guo, C. Xing, X. Fan, M. Ning, J. C. Yuan, E. H. Lo und X. Wang (2009). "Neuroglobin-overexpression alters hypoxic response gene expression in primary neuron culture following oxygen glucose deprivation." *Neuroscience* 162(2): 396-403.
- Yu, Z., J. L. Poppe und X. Wang (2013). "Mitochondrial mechanisms of neuroglobin's neuroprotection." *Oxid Med Cell Longev* 2013: 756989.
- Yu, Z., J. Xu, N. Liu, Y. Wang, X. Li, S. Pallast, K. van Leyen und X. Wang (2012). "Mitochondrial distribution of neuroglobin and its response to oxygen-glucose deprivation in primary-cultured mouse cortical neurons." *Neuroscience* 218: 235-242.
- Zhang, B., X. Ji, S. Zhang, H. Ren, M. Wang, C. Guo und Y. Li (2013). "Heminmediated neuroglobin induction exerts neuroprotection following ischemic brain injury through PI3K/Akt signaling." *Mol Med Report* 8(2): 681-685.
- Zhang, C., C. Wang, M. Deng, L. Li, H. Wang, M. Fan, W. Xu, F. Meng, L. Qian und F. He (2002). "Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin." *Biochem Biophys Res Commun* 290(5): 1411-1419.
- Zhao, S., W. P. Fung-Leung, A. Bittner, K. Ngo und X. Liu (2014). "Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells." *PloS one* 9(1): e78644.
- Zhao, S., Z. Yu, G. Zhao, C. Xing, K. Hayakawa, M. J. Whalen, J. M. Lok, E. H. Lo und X. Wang (2012). "Neuroglobin-overexpression reduces traumatic brain lesion size in mice." *BMC Neurosci* 13: 67.
- Zhu, Z., B. Ma, R. J. Homer, T. Zheng und J. A. Elias (2001). "Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice." *J Biol Chem* 276(27): 25222-25229.
- Zhu, Z., T. Zheng, C. G. Lee, R. J. Homer und J. A. Elias (2002). "Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling." *Semin Cell Dev Biol* 13(2): 121-128.

7 Anhang

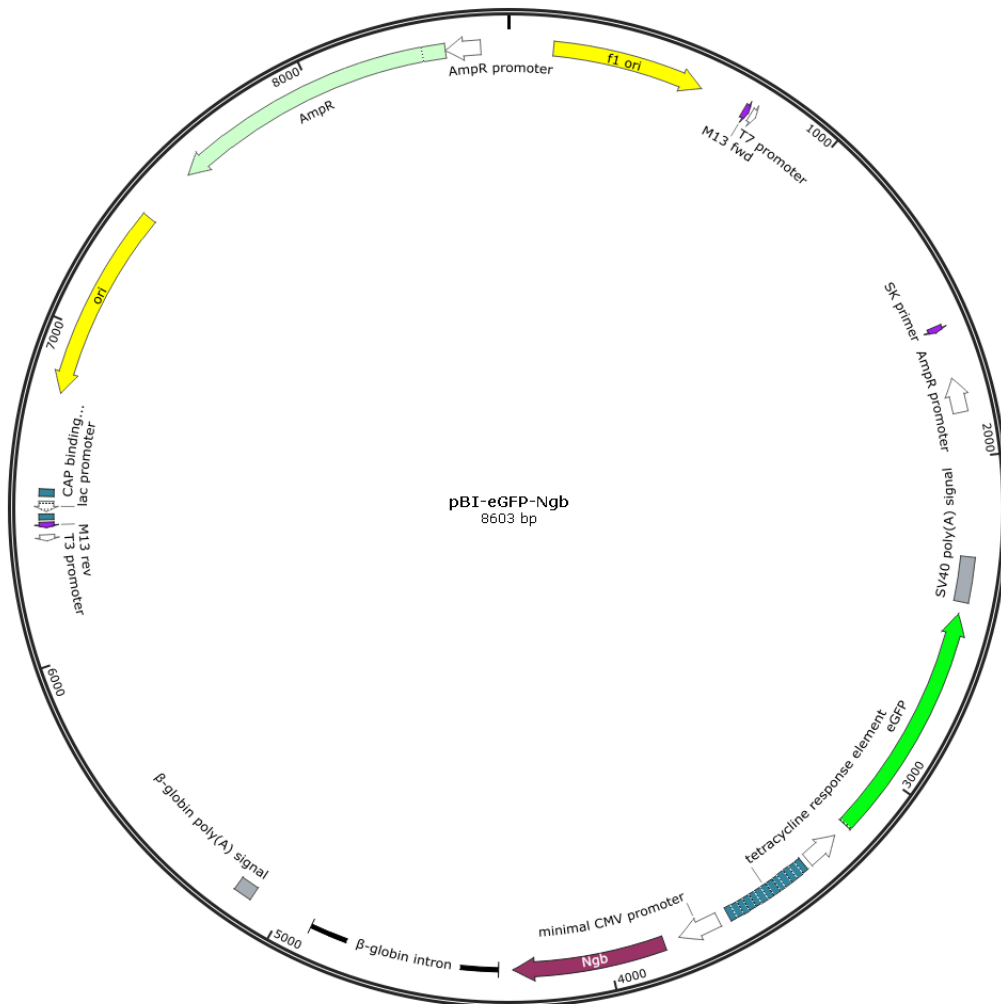


Abbildung 7-1: Vektorkarte des pBI-eGFP-Ngb Plasmids

Dargestellt ist die Vektorkarte des modifizierten (Wystub, 2007) pBI-eGFP-Plasmidvektors (Clontech) mit der CDS von murinem Ngf und eGFP unter der Kontrolle des Tetracycline Responsive Elements (TRE) und der minimalen CMV promotoren. Vollständige Sequenz ist dem elektronischen Anhang zu entnehmen.

Tabelle 7-1: Für die Korrelationsanalyse verwendete RNA-Seq-Datensätze

Gewebe	Sequence Read Archive-ID
Cerebellum	SRR496231-32, SRX216826, SRR648460, SRX216830, SRR648464, SRX216832, SRR648466, SRR567489
Cortex	SRR059665-8, SRR059669-71, SRR567480, SRR567481, SRX023112, SRX023113
Hippocampus	ERR032232, ERR032234, ERR032235, ERR032237, SRX151658, SRR504380, SRX151659, SRR504381, SRX171524
Hypothalamus	SRR573671, SRR573672, SRR573673, SRR573674

7.1 Elektronischer Anhang

- Genotypisierungsreaktionen der verwendeten Mausstämme
- In der Arbeit verwendete Primersequenzen
- Ngb x R26 Leber Affymetrix regulierte Gene
- Ngb x Camk2 Hippocampus und Cortex regulierte Gene
- Ngb x R26 primäre Hepatozyten-Daten (Kooperation Prof. Dr. S. Strand)
- Ngb x R26 *in vivo* CCl4-Behandlung (Kooperation Prof. Dr. J. Hengstler)
- Ngb-Del LacZ KnockIn X-Gal Färbungen
- Ngb x Camk2 Ngb-IHC Cortex und Hippocampus
- Ngb-KO Retina: SLO und ERG Daten (Kooperation Prof. Dr. M. Seeliger)
- Ngb-KO β -Gal-IHC Testes
- Mauszuchtplanung und Genotypisierung

8 Danksagung

Ich danke den Gutachtern dieser Arbeit, meinen Kooperationspartnern, Diplomanden und Praktikanten die beim entstehen dieser Arbeit geholfen und mich unterstützt haben.

Danke an meine lieben Kollegen für die tolle Zeit in Mainz, für die Unterstützung und die vielen netten Abende sowohl im als auch außerhalb des Labors. Ihr seid zu viele als das ich jeden einzelnen hier nennen könnte!

Danke an meine Familie und Freunde, für Zuspruch und Zusammenhalt. Insbesondere danke an meine Frau, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9 Eidesstattliche Erklärung

Erklärungen gemäß § 6 der Promotionsordnung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Hankeln durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und mit keinen anderen als den darin angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde, dass die wörtlichen oder dem Inhalt nach aus fremden Arbeiten entnommenen Stellen, Zeichnungen, Skizzen, bildlichen Darstellungen und dergleichen als solche genau kenntlich gemacht sind.

Weiterhin bestätige ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit, oder Teile davon, nicht als Arbeit in einer anderen Fakultät oder für eine andere Prüfung eingereicht habe.

Mainz, 30. September 2014

Andrej Fabrizius

10 Lebenslauf

Aus datenrechtlichen Gründen entfernt.

