

Untersuchungen zur Expression und Funktion intrazellulärer Globine

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität
in Mainz

Marc Schmidt

Mainz, 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2005

Kein zweites Mal hat die Natur eine solche Fülle der wertvollsten Nährstoffe auf einem so kleinen Raum zusammengedrängt wie gerade bei der Kakaobohne."

Alexander von Humboldt (1769-1859)

Veröffentlichungen

Originalveröffentlichungen:

Hankeln, T., Jaenicke, V., Kiger, L., Dewilde, S., Ungerechts, G., **Schmidt, M.**, Urban, J., Marden, M. C., Moens, L., and Burmester, T. (2002) Characterization of *Drosophila* hemoglobin: Evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects. *J. Biol. Chem.* **277**, 29012-29017

Schmidt, M., Gießl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., and Burmester, T. (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply of the mammalian retina. *J. Biol. Chem.* **278**, 1932–1935

Wystub, S., Laufs, T., **Schmidt, M.**, Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T., and Reuss, S. (2003) Localisation of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* **346**, 114-116

Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J. C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Cytoglobin is a respiratory protein expressed in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **279**, 8063-8069

Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., **Schmidt, M.**, Hamdane, D., Marden, M. C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 24116-24122

Schmidt, M., Laufs, T., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2005) Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye. *Neurosci. Lett.* **374**, 207-211

Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T., Roesner, A., **Schmidt, M.**, Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M.C., Kiger, L., Dewilde, S., Moens, L., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A., and Burmester, T. (2005) Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 110-119

Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., **Schmidt, M.**, Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., and Hankeln, T. Neuroglobin and Cytoglobin: Genes, Proteins and Evolution (zur Veröffentlichung eingereicht).

Hankeln, T., Wystub, S., Gerlach, F., Laufs, T., **Schmidt, M.**, Reuss, S., and Burmester, T. Cellular and subcellular localisation of neuroglobin and cytoglobin (zur Veröffentlichung eingereicht).

Bentmann, A., **Schmidt, M.**, Reuss, S., Wolfrum, U., Hankeln, T., and Burmester, T. Differential expression of neuroglobin in vascular and avascular retinae (in Vorbereitung)

Tagungsabstracts:

Burmester, T., **Schmidt, M.**, Weich, B., Ebner, B., Wystub, S., Laufs, T., and Hankeln, T. (2002). Function and evolution of vertebrate neuroglobin and cytoglobin. 95. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Halle*. *Zoology* 105, Suppl. V, p. 50

Schmidt, M., Gießl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., and Burmester, T. (2002) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *2nd Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*

Wystub, S., Reuss, S., Laufs, T., Saaler-Reinhardt, S., Hill, M., **Schmidt, M.**, Burmester, T., and Hankeln, T. (2002) Expression analysis of neuroglobin in rodent tissue. *2nd Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*

Burmester, T., Jaenicke, V., Kiger, L., Dewilde, S., **Schmidt, M.**, Marden, M. C., Moens, L., and Hankeln, T. (2003) *Drosophila* hemoglobin provides evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects *VIth International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Mt. Buller. Comp. Biochem. Physiol.* 124A, S81

Wolfrum, U., Gießl, A., **Schmidt, M.**, Laufs, T., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply of the mammalian retina. *ARVO Meeting Abstracts. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: E-Abstract 3266.

Burmester, T., **Schmidt, M.**, Gießl, A., Laufs, T., Wolfrum, U., and Hankeln, T. (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *96. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Berlin*. Abstract map, p. 187

Schmidt, M., Wystub, S., Laufs, T., Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003) Expression of neuroglobin and cytoglobin in mammalian tissues. *96. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Berlin*. Abstract map, p. 194

Schmidt, M., Gießl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., and Burmester, T. (2003) Neuroglobin-mediated oxygen supply in the vertebrate retina. *XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Mainz*. Abstract map. p. 116

Haberkamp, M., **Schmidt, M.**, Heib, V., Mitz, S., Rösner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003) Analyses of neuroglobin genes and expression patterns in the fishes. *XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Mainz*. Abstract map. p. 117

Wystub, S., **Schmidt, M.**, Laufs, T., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003) Expression of neuroglobin and cytoglobin in mammalian tissues. *XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Mainz*. Abstract map. p. 125

Haberkamp, M., Fuchs, C., **Schmidt, M.**, Heib, V., Mitz, S., Roesner, A., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003) *Danio* neuroglobin: Differences and conservation of mammalian

and fish neuroglobins. *3rd Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*

Wystub, S., **Schmidt, M.**, Laufs, T., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2003) Expression of neuroglobin and cytoglobin in mammalian tissues. *3rd Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*

Wystub, S., Laufs, T., **Schmidt, M.**, Maas, U., Reuss, M. H., Saaler-Reinhardt, S., Burmester, T., Hankeln, T., and Reuss, S. (2004) Expression of neuroglobin and cytoglobin in central and peripheral nervous systems. *99. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Wien*, Abstract map, p. 41

Schmidt, M., Gerlach, F., Laufs, T., Wystub, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Cytoglobin is a connective tissue and neuron-specific protein that is induced by hypoxia: a function in collagen synthesis? *97. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock*. Abstract map, p. 42

Bentmann, A., **Schmidt, M.**, Reuss, S., T., Wolfrum, U., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Distinct distribution of neuroglobin in vascular and avascular mammalian retinae. *97. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock*. Abstract map, p. 42

Storf, J., **Schmidt, M.**, Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) A novel hemoglobin from *Drosophila melanogaster*. *97. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock*. Abstract map, p. 43

Burmester, T., Bentmann, A., **Schmidt, M.**, Reuss, S., T., Wolfrum, U., and Hankeln, T. (2004) Distinct distribution of neuroglobin in vascular and avascular mammalian retinae. *Proteins in Adaptation and Evolution (International Symposium on Animal Physiology Physiology), Greifswald*. Abstract map, p. 28

Schmidt, M., Gerlach, F., Laufs, T., Wystub, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Cytoglobin is a connective tissue and neuron-specific protein that is induced by hypoxia: a function in collagen synthesis? *Proteins in Adaptation and Evolution (International Symposium on Animal Physiology Physiology), Greifswald*. Abstract map, p. 34

Wystub, S., Laufs, T., **Schmidt, M.**, Weich, B., Ebner, B., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Burmester, T. and Hankeln, T. (2004) Expression of Neuroglobin and Cytoglobin in the central and peripheral nervous system. *4th Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*

Burmester, T., Bentmann, A., **Schmidt, M.**, Reuss, S., Wolfrum, U., and Hankeln, T. (2004) Distinct distribution of neuroglobin in vascular and avascular mammalian retinae. *4th Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*

| | | |
|----------|--|-----------|
| A | EINLEITUNG | 1 |
| 1 | Respiratorische Proteine | 1 |
| 2 | Globine | 3 |
| 2.1 | Struktur des Häms..... | 4 |
| 2.2 | Vertebraten-Globine | 5 |
| 2.2.1 | Pentakoordinierte Globine | 5 |
| 2.2.2 | Hexakoordinierte Globine | 7 |
| 2.2.2.1 | Neuroglobin | 7 |
| 2.2.2.2 | Cytoglobin | 10 |
| 2.2.2.3 | Globin X..... | 12 |
| 2.3 | Evolution der Globine der Vertebraten | 12 |
| 2.4 | Die Globine der Invertebraten | 13 |
| 2.4.1 | Vielfalt der Invertebraten-Globine..... | 14 |
| 2.4.2 | Hämoglobine der Insekten | 15 |
| 3 | Zielsetzung | 16 |
| B | MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 1 | Allgemeines..... | 17 |
| 1.1 | Versuchstiere..... | 17 |
| 1.1.1 | Säugetiere (Mammalia) | 17 |
| 1.1.2 | Fische (Pisces)..... | 17 |
| 1.1.3 | Insekten (Insecta) | 17 |
| 1.2 | Verwendete Computerprogramme und Datenbanken | 17 |
| 1.3 | Chemikalien und Geräte | 18 |
| 2 | Mikrobiologische Methoden..... | 19 |
| 2.1 | Mikroorganismen..... | 19 |
| 2.1.1 | Bakterienstämme..... | 19 |
| 2.1.2 | Hefestämme..... | 19 |
| 2.2 | Nährmedien..... | 19 |
| 2.2.1 | Bakterienmedien | 19 |
| 2.2.2 | Hefemedien | 20 |
| 2.3 | Flüssigkulturen..... | 21 |
| 2.4 | Glycerinkulturen | 21 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5 | Kompetente Bakterien | 21 |
| 3 | Zellbiologische Methoden..... | 21 |
| 3.1 | Zelllinien..... | 21 |
| 3.2 | Nährmedien..... | 22 |
| 3.3 | Makrophagenisolierung | 22 |
| 3.4 | Passage von Zellkulturen..... | 23 |
| 3.5 | Einfrieren von Zellkulturen | 23 |
| 3.5.1 | Hybridomzellen | 23 |
| 3.5.2 | Sonstige Zelllinien | 23 |
| 3.6 | Auftauen von Zellkulturen | 23 |
| 3.7 | Cytozentrifugenpräparat | 24 |
| 4 | Proteinbiochemische Methoden | 24 |
| 4.1 | Bakterielle Proteinexpression und Aufreinigung | 24 |
| 4.1.1 | Expressionssystem | 24 |
| 4.1.2 | Bakterielle Proteinexpression..... | 25 |
| 4.1.3 | Aufbrechen der Zellen | 25 |
| 4.1.4 | Verdau von Nukleinsäuren..... | 26 |
| 4.1.5 | Reinigung | 26 |
| 4.1.5.1 | Ammoniumsulfatfällung | 26 |
| 4.1.5.2 | Dialyse | 27 |
| 4.1.5.3 | Ionenaustauschchromatographie..... | 27 |
| 4.1.5.4 | Gelfiltrationschromatographie..... | 27 |
| 4.2 | Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern | 28 |
| 4.2.1 | Kopplung an KLH..... | 28 |
| 4.2.2 | Immunisierung | 29 |
| 4.2.2.1 | Isolierung von B-Lymphozyten | 30 |
| 4.2.2.2 | Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen | 30 |
| 4.2.3 | Affinitätsreinigung | 31 |
| 4.2.4 | Verwendete Primärantikörper..... | 31 |
| 4.3 | Proteinfällung und –quantifizierung | 32 |
| 4.3.1 | Methanol-Chloroform-Fällung..... | 32 |
| 4.3.2 | Bradford | 33 |
| 4.3.3 | Spektroskopisch | 33 |
| 4.4 | Nachweis und Quantifizierung von Proteinen im Polyacrylamidgel..... | 33 |
| 4.4.1 | Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese..... | 33 |
| 4.4.2 | Zweidimensionale Gelelektrophorese | 34 |
| 4.4.2.1 | Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung) | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.4.2.2 | Zweite Dimension..... | 36 |
| 4.4.3 | Silberfärbung | 37 |
| 4.4.4 | Coomassiefärbung | 37 |
| 4.4.5 | Phosphoproteindetektion..... | 37 |
| 4.5 | Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Westernblot)..... | 38 |
| 4.5.1 | Elektrotransfer | 38 |
| 4.5.2 | PonceauS | 38 |
| 4.5.3 | Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern..... | 39 |
| 4.6 | Immunhistochemie und Immunzytochemie..... | 40 |
| 4.6.1 | Fixierung | 40 |
| 4.6.1.1 | Fixierung von Zellkulturen..... | 40 |
| 4.6.1.2 | Fixierung von <i>Drosophila melanogaster</i> | 40 |
| 4.6.1.3 | Perfusionsfixierung von Säugetieren..... | 41 |
| 4.6.2 | Gefrierschnitte | 41 |
| 4.6.3 | Kompetitionstest | 41 |
| 4.6.4 | Antikörperdetektion | 41 |
| 4.6.4.1 | Peroxidasenachweis..... | 42 |
| 4.6.4.2 | Fluoreszenznachweis | 42 |
| 4.6.4.3 | Herstellung des Einbettmediums | 42 |
| 4.6.4.4 | Mikroskopieren und Fotografieren | 43 |
| 4.6.4.5 | Doppelmarkierungen | 43 |
| 4.7 | ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay; Engvall & Perlman, 1971)..... | 43 |
| 4.8 | Two-Hybrid System | 44 |
| 4.8.1 | BacterioMatch Two-Hybrid (Stratagene) | 45 |
| 4.8.2 | Matchmaker Hefe Two-Hybrid (Clontech) | 46 |
| 5 | Molekularbiologische Methoden..... | 47 |
| 5.1 | Isolierung von Nukleinsäuren | 47 |
| 5.1.1 | Plasmid-Isolierung | 47 |
| 5.1.2 | DNA-Gelelektrophorese | 47 |
| 5.1.3 | Konzentrationsbestimmung | 48 |
| 5.1.4 | Gelextraktion | 48 |
| 5.1.5 | RNA-Isolation | 49 |
| 5.1.6 | mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA | 49 |
| 5.1.7 | RNA-Gelelektrophorese | 49 |
| 5.2 | Amplifikation von Nukleinsäuren..... | 50 |
| 5.2.1 | Verwendete Primer | 50 |
| 5.2.2 | PCR | 51 |
| 5.2.3 | RT-PCR | 51 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.3 | Klonierung | 52 |
| 5.3.1 | Ligation | 52 |
| 5.3.2 | Transformation | 52 |
| 5.3.3 | Klonierung von PCR Produkten..... | 52 |
| 5.4 | Restriktionsverdau..... | 52 |
| 5.5 | Dephosphorylierung des Vektors..... | 53 |
| 5.6 | Vektoren..... | 53 |
| 5.7 | Sequenzierung..... | 53 |
| C | ERGEBNISSE | 54 |
| 1 | Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern | 54 |
| 1.1 | Antigenproduktion | 54 |
| 1.2 | Antikörperproduktion | 55 |
| 1.3 | Charakterisierung von Antikörpern..... | 55 |
| 2 | Lokalisation der Globine im Gewebe | 59 |
| 2.1 | <i>Drosophila melanogaster</i> Globin | 59 |
| 2.2 | Neuroglobin | 61 |
| 2.2.1 | Expression von Neuroglobin in Mausgeweben | 61 |
| 2.2.2 | Zelluläre Lokalisierung von Neuroglobin mRNA und Protein in der Mäuseretina | 62 |
| 2.2.3 | Subzelluläre Lokalisation von Neuroglobin in Photorezeptorzellen der Mäuseretina.... | 63 |
| 2.2.4 | Expression von Neuroglobin bei hell- bzw. dunkeladaptierten Mäuseretinae | 64 |
| 2.2.5 | Expression von Neuroglobin in verschieden stark vaskularisierten Retinae | 65 |
| 2.2.6 | Expression von Neuroglobin in der Fischretina..... | 67 |
| 2.2.7 | Posttranslationale Modifikationen bei Neuroglobin..... | 68 |
| 2.3 | Cytoglobin | 69 |
| 2.3.1 | Expression von Cytoglobin in Mausgeweben | 69 |
| 2.3.2 | Zelluläre und subzelluläre Expression von Cytoglobin | 70 |
| 2.3.2.1 | Vergleich der Antikörper aCygb 1-4 | 70 |
| 2.3.2.2 | Dickdarm (Colon) | 71 |
| 2.3.2.3 | Herzmuskulatur (Myokard) | 72 |
| 2.3.2.4 | Niere (Ren)..... | 72 |
| 2.3.2.5 | Haut (Cutis) | 73 |
| 2.3.2.6 | Sehnenzellen (Tenocyten) | 73 |
| 2.3.2.7 | Leber (Hepar) | 74 |
| 2.3.2.8 | Knochen- und Knorpelgewebe | 75 |
| 2.3.2.9 | Augenbecher (Cupula optica)..... | 76 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.3.2.10 | Vergleich verschiedener Cygb Ak zur Klärung von unterschiedlichen Lokalisationsergebnissen | 77 |
| 3 | Mögliche Interaktionspartner von Neuroglobin und Cytoglobin | 78 |
| 3.1 | BacterioMatch Two-Hybrid System (Stratagene) | 78 |
| 3.2 | Matchmaker Hefe Two-Hybrid System (Clontech) | 78 |
| D | DISKUSSION..... | 79 |
| 1 | Mögliche Funktionen cytoplasmatischer Globine..... | 79 |
| 2 | <i>Drosophila melanogaster</i> Hämoglobin | 81 |
| 3 | Neuroglobin..... | 83 |
| 3.1 | Neuroglobin wird verstärkt in der Retina exprimiert | 83 |
| 3.2 | Zelluläre und Subzelluläre Lokalsiation von Neuroglobin | 83 |
| 4 | Cytoglobin | 89 |
| 4.1 | Fibroblastenspezifische Expression von Cytoglobin | 89 |
| 4.2 | Mögliche Funktion von Cytoglobin im Bindegewebe | 90 |
| 4.3 | Cytoglobin auch in neuronalen Geweben | 92 |
| 4.4 | Andere Funktionen von Cytoglobin? | 93 |
| E | ZUSAMMENFASSUNG..... | 94 |
| F | LITERATUR..... | 95 |

A Einleitung

1 Respiratorische Proteine

Vor mehr als zwei Milliarden Jahren wurden die damals lebenden Organismen in der bis dahin anaeroben Welt mit einer stetig ansteigenden Sauerstoffkonzentration konfrontiert (Campbell, 2003). Diese durch photosynthetisch aktive Cyanobakterien verursachte Umweltveränderung vollzog sich zunächst schleichend, da der produzierte Sauerstoff durch im Wasser gelöste Metalle in Form von Metalloxiden der Atmosphäre entzogen wurde. Nach Absättigung der freien Metallionen vollzog sich die Anreicherung mit Sauerstoff wesentlich schneller. Somit mussten sich Organismen in immer stärkerem Maße vor dem für sie toxischen Gas schützen. Ein Schutz könnte die Entwicklung von O₂-bindenden Proteinen mit hohen Sauerstoffaffinitäten gewesen sein. Solche Proteine sind heute noch in Einzellern und Invertebraten zu finden (Hardisson, 1998; Weber & Vinogradov 2001).

Auf der anderen Seite bietet der Sauerstoff jedoch die Möglichkeit effizientere Energieausbeuten zu erzielen (Berg et al., 2003). Diese konnten so gegenüber Organismen, die Gärung betreiben, etwa um den Faktor 15 höher ausfallen, falls Sauerstoff der finale Elektronenakzeptor im Glykosemetabolismus ist (Berg et al., 2003). Bei Organismen, die ihre Energie aus anaerober Atmung beziehen, also andere Elektronenakzeptoren als O₂ benutzen, ist die Differenz je nach verwendetem Elektronenendakzeptor geringer (Schlegel, 1992).

Nach der Entstehung vielzelliger Eukaryoten vor ~ 1,2 Milliarden Jahren entwickelten sie sich im Laufe der Evolution zu immer komplexeren und größeren Organismen. Diese wurden mit dem Problem konfrontiert (Campbell, 2003), dass nur bei sehr kleinen bzw. verzweigten Tieren mit einem großen Oberflächen/Volumenverhältnis der Gasaustausch allein über die Körperoberfläche stattfinden kann. Der passive Sauerstofftransport hängt hauptsächlich von der Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs im Medium ab. Diese Diffusionsgeschwindigkeit ist von der Größe der Oberfläche des Epithels und dem Gas-Konzentrationsgradienten über dem Epithel direkt abhängig, während sie mit der Epitheldicke indirekt proportional korreliert (Wehner & Gehring, 1995). Daraus resultieren diverse Anpassungen an den gestiegenen Sauerstoffverbrauch und die zunehmende Diffusionsstrecke zu den Zellen im Körperinneren. Eine Möglichkeit war die Vergrößerung der respiratorischen Oberfläche, die bei höheren Metazoen die nichtrespiratorische

Körperoberfläche um ein Vielfaches übersteigt. Eine andere Möglichkeit war die Ausbildung eines Kreislaufsystems, das zu einer verbesserten Ventilation der Körperflüssigkeiten führte. Auch eine Steigerung der Transportkapazität der Körperflüssigkeit, die rein physikalisch nur sehr wenig Sauerstoff aufnehmen kann, durch respiratorische Proteine war eine weitere Lösung des O_2 -Transportproblems.

Bei Tieren sind drei grundlegend verschiedene Typen von respiratorischen Proteinen, Hämocyanine, Hämerythrine und Globine, zu finden.

Hämocyanine kommen bei Mollusken und Arthropoden vor (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995). Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin weisen jedoch wesentliche Strukturunterschiede auf, weshalb man davon ausgeht, dass sie sich unabhängig voneinander aus unterschiedlichen Vorläuferproteinen entwickelt haben. Alle Hämocyanine haben jedoch gemein, dass sie zwei Kupferionen im aktiven Zentrum besitzen. Diese sind jeweils über drei Histidinreste direkt mit dem Protein verknüpft. Die blaue Farbe des Hämocyanins im oxygenierten Zustand resultiert aus dem Kupfer-Sauerstoff-Komplex.

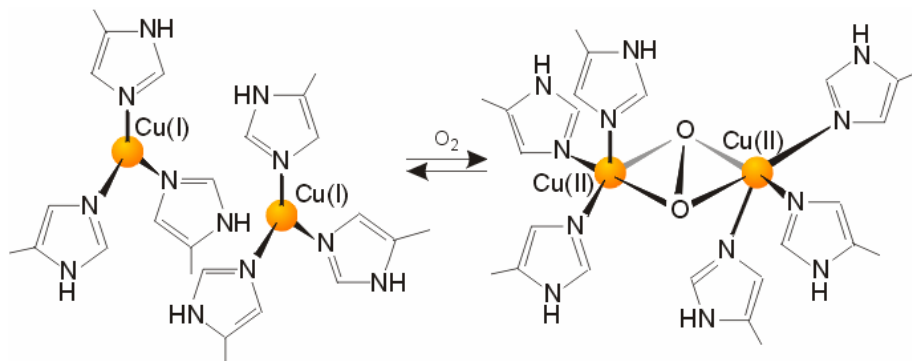


Abb. 1: Sauerstoffbindung an Hämocyanin. (<http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem341/fig1903c.gif>)

Hämerythrine findet man nur bei wenigen Tiergruppen (Anneliden, Brachiopoden, Priapuliden und Sipunculiden). Die Sauerstoffbindung geschieht über zwei Eisenionen, die direkt mit dem Protein verbunden sind. Hämerythrin ist also ein nicht-Häm-Eisenprotein.

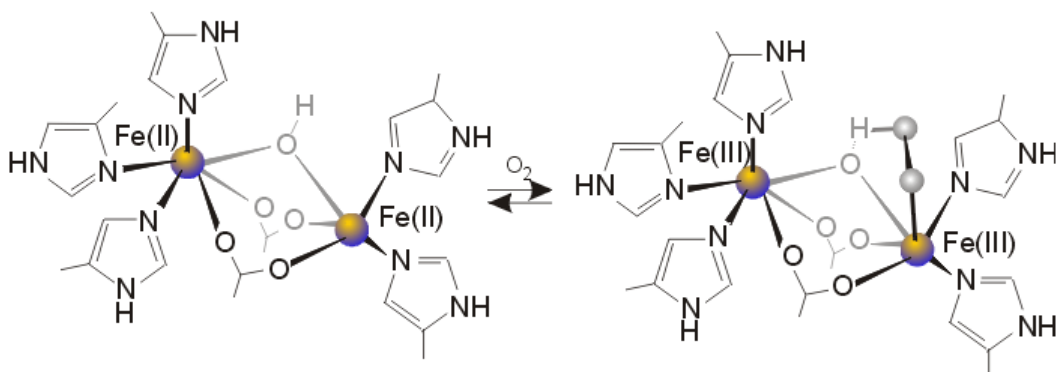


Abb. 2: Sauerstoffbindung an Hämerythrin. (<http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem341/fig1904c.gif>)

2 Globine

Globine sind die im Organismenreich am weitesten verbreiteten respiratorischen Proteine. Man findet sie bei Prokaryoten, Protisten, Pilzen, Pflanzen und Tieren, also in allen Organismenreichen (Hardisson, 1998; Weber & Vinogradov 2001). Ihre Primärstruktur ist jedoch sehr unterschiedlich (Perutz, 1986; Moens et al., 1996). Es gibt nur zwei invariante Aminosäuren, das Phenylalanin an der Aminosäureposition Position CD1 (erste Aminosäure zwischen den Helices C und D) und das proximale Histidin an Position F8 (achte Aminosäure in Helix F). Allen gemein ist außerdem eine aus sechs bis acht α -helikalen Bereichen bestehende und über Loops verbundene Region. Diese Tertiärstruktur formt das globintypische „3 über 3 α -helikale Sandwich“, das die Hämbindung in einer hydrophoben Tasche ermöglicht (Dickerson & Geis, 1983).

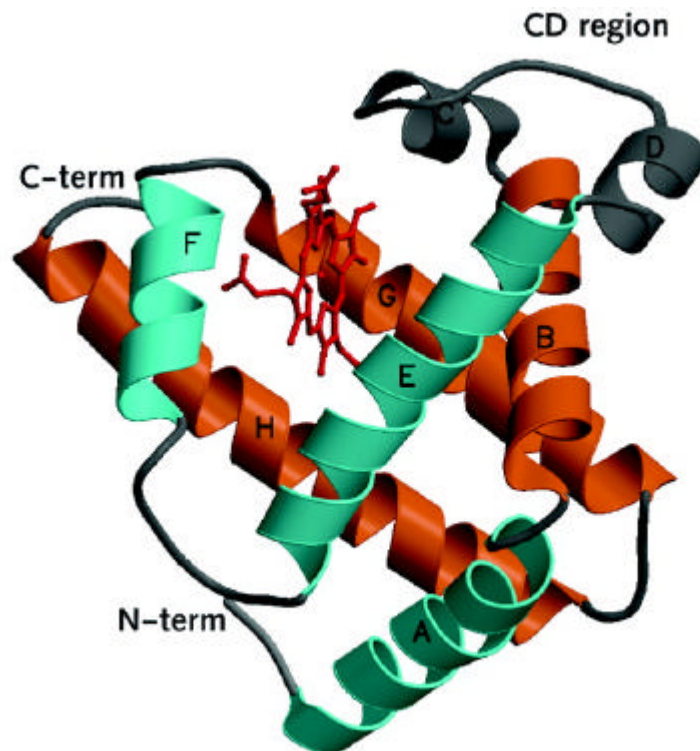


Abb. 3: Typische Globinstruktur. Die Helices sind nach der konventionellen Globinnomenklatur vom N-Terminus ausgehend mit A bis h gekennzeichnet. Die Lage des Häms ist in rot, Helices A, E und F in grün (obere Lage des 3 über 3 Sandwichs), die Helices B, G und H (untere Lage des 3 über 3 Sandwichs) in orange dargestellt (Pesce et al., 2002).

2.1 Struktur des Häms

Die Fähigkeit, Sauerstoff reversibel zu binden, wird allen Globinen durch die prosthetische Häm-Gruppe verliehen. Diese ist aus vier Pyrrolringen, die über Methinbrücken miteinander verbunden sind, zusammengesetzt (Berg et al., 2003). Im Zentrum dieses Tetrapyrrolysystems können verschiedene Metalle gebunden werden. Im Fall von Hämoglobin ist es Eisen, das durch die vier Stickstoffatome der Pyrrolringe fixiert ist. Außer diesen vier äquatorialen Bindungsstellen hat das Eisenion zwei weitere Koordinationsstellen, die senkrecht zur Häm-Ebene stehen.

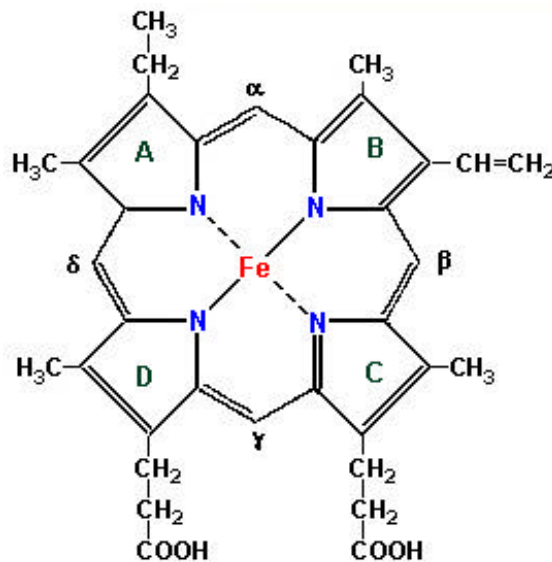


Abb. 4: Koordinierung des Eisenions im Häm. Die vier Pyrrolringe sind mit A-D, die vier Methinbrücken mit a-d gekennzeichnet. (<http://ntri.tamuk.edu/homepage-ntri/lectures/protein/hemoglobin/heme.jpg>)

Die fünfte Koordinationsstelle wird vom proximalen Histidin F8 der Globinkette belegt (Berg et al., 2003). Die Sauerstoffbindung erfolgt an der sechsten Koordinationsstelle des zweiwertigen Ferroglobins. Ferriglobin, die andere physiologische Form des Proteins, besitzt ein dreiwertiges Eisenion, welches nicht in der Lage ist, Sauerstoff zu binden. Die sechste Koordinationsstelle wird jedoch bei einigen Globinen im deoxygenierten Zustand von dem distalen Histidin (E7) belegt. Man spricht dann von einem hexakoordinierten Globin, wie z.B. Neuroglobin oder Cytoglobin, im Gegensatz zu pentakoordinierten Globinen, wie z.B. Myoglobin oder Hämoglobin, bei denen die sechste Bindungsstelle frei bleibt (Kundu et al., 2003).

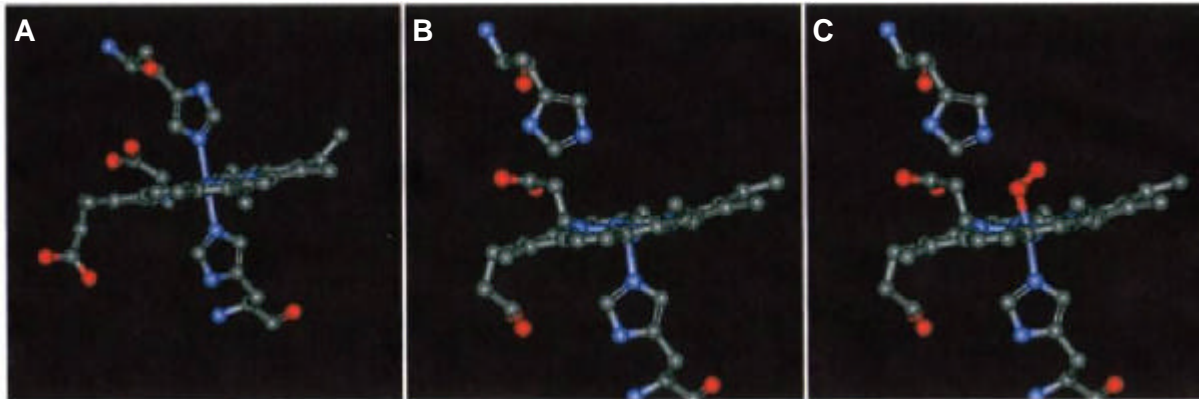


Abb. 5: Schematische Darstellung der Koordinierung des Eisens im Häm. A: Hexakoordiniertes deoxy Globin, B: Pentakoordiniertes deoxy Globin, C: Oxigeniertes Globin (Dewilde et al., 2001).

2.2 Vertebraten-Globine

In Vertebraten wurden fünf verschiedene Globine mit unterschiedlicher Struktur, Funktion und Expressionsmuster gefunden (Dickerson & Geiss; 1983; Burmester et al., 2000; 2002; Roesner et al., 2005). Die pentakoordinierten Hämoglobine und Myoglobin, sowie die hexakoordinierten Neuroglobin und Cytoglobin sind in fast allen Vertebraten zu finden. Das kürzlich entdeckte Globin X, ein fünfter Vertreter der Globine, ist nur bei niederen Vertebraten (Fisch, Amphibien) zu finden.

2.2.1 Pentakoordinierte Globine

Myoglobin ist das erste Protein, dessen Tertiärstruktur entschlüsselt wurde (Kendrew, 1961). Das aus 153 Aminosäuren bestehende monomere Protein mit einer Molekularmasse von ca. 17 kDa, bildet acht α -Helices (A-H) aus, die ein so genanntes „3 über 3 α -helikales Sandwich“ bilden. Diese globintypische Struktur ist nahezu identisch mit der dreidimensionalen Struktur des Hämoglobins, obwohl die Primärstruktur dieser beiden Globine sehr stark voneinander abweicht (Dickson et al., 1992). Ebenso sind die globintypischen Introns an den Positionen B12.2 (zwischen dem zweiten und dritten Kodon der 12. Aminosäure der B-Helix) und G7.0 in den Genen beider Globine erhalten (Hardison, 1996). Myoglobin dient als kurzfristiger Sauerstoffspeicher im aktiven Skelett- und Herzmuskel (Wittenberg, 1992). Belegen lässt sich diese Funktion durch die 10-30 fach erhöhte Myoglobinmenge in tauchenden Säugern und Vögeln im Vergleich zu Tieren, die keinen hypoxischen bzw. anoxischen Bedingungen ausgesetzt sind (Noren & Williams, 2000). Auch korreliert seine Konzentration im Gewebe mancher Tiere mit der Dauer der Hypoxie. Neben dieser Funktion verbessert Myoglobin in Geweben die Sauerstoffdiffusion von der Plasmamembran zu den stoffwechselaktiven Mitochondrien (Wittenberg & Wittenberg, 2003). Eine dritte vermutete Funktion ist die Pufferung der Sauerstoffkonzentration in Muskelgeweben (Ordway & Garry, 2004).

Bisher ging man davon aus, dass die Sauerstoffaffinität des Myoglobins ($p_{50} = 1$ Torr) weitgehend unabhängig von äußeren Faktoren (ausser Temperatur) ist (Bergs et al., 2003). Auch besitzt es nicht die Fähigkeit Sauerstoff kooperativ zu binden, was an der hyperbolischen Sauerstoffbindungskinetik zu erkennen ist. Es hat sich jedoch gezeigt, dass Laktat das unter anaeroben Bedingungen produziert wird, und so den ungestörten Ablauf der Glykolyse gewährleistet, die Sauerstoffaffinität des Myoglobins signifikant herabsetzt (Giardina et al., 1996). Somit ermöglicht es z.B. tauchenden Säugern, unter hypoxischen Bedingungen, zusätzlich Sauerstoff freizusetzen und so den Energiestoffwechsel weiter mit Sauerstoff zu versorgen. Neben der Sauerstoffversorgung von Muskelzellen spielt Myoglobin noch eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von toxischem Stickstoffmonoxid aus den Zellen (Flögel et al., 2001; Wittenberg & Wittenberg, 2003). Es wirkt dabei als NO-Dioxygenase, die NO zu Nitrat oxidiert.

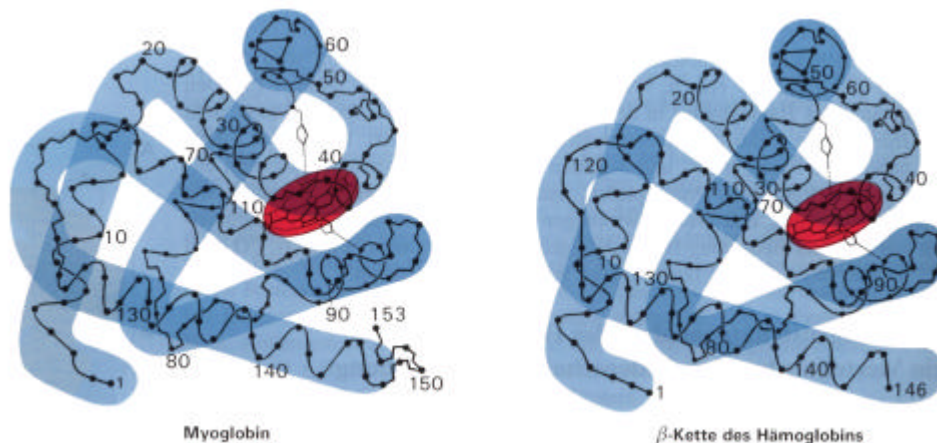


Abb. 6: Strukturvergleich von Myoglobin mit der β -Kette von Hämoglobin. Die Aminosäurepositionen sind vom N-Terminus her durchnummeriert. Die Lage des Häms ist in rot dargestellt. (Berg et al., 2003)

Hämoglobin ist das Sauerstofftransportprotein der Erythrozyten. Es befördert Sauerstoff von den Alveolen der Lunge zu den Geweben (Berg et al., 2003). Auch bei der Entsorgung von CO_2 , das in stoffwechselaktiven Geweben gebildet wird, spielt es eine wichtige Rolle. Das adulte menschliche Hämoglobin besteht aus vier Polypeptidketten, zwei α - und zwei β -Ketten, wobei jede Untereinheit eine Häm-Gruppe besitzt. Die α - und β -Ketten bestehen aus 141 bzw. 146 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 15,1 bzw. 15,9 kDa. Insgesamt ergibt sich daraus inklusive der vier Häm-Gruppen eine Masse von ca. 64 kDa.

Die Sauerstoffaffinität von vollständig gereinigtem Hämoglobin ($p_{50} = 1$ Torr) ist viel höher als die von nativem Hb in den Erythrozyten ($p_{50} = 26$ Torr) (Berg et al., 2003). Diese Diskrepanz resultiert aus der Wechselwirkung von Hämoglobin mit 2,3-Bisphosphoglycerat (BPG) in den Erythrozyten. BPG bindet dabei im Zentrum des Hämoglobintetramers und

stabilisiert dabei die Quartärstruktur des Desoxyhämoglobin, was gleichzeitig die Sauerstoffaffinität erniedrigt.

Hämoglobin zeigt einen sigmoidalen Verlauf der Sauerstoffbindung. Diese kooperative Wechselwirkung der vier Untereinheiten bewirkt eine um den Faktor 1,7 erhöhte Sauerstoffaufnahme gegenüber unabhängigen Untereinheiten.

Auch der pH-Wert hat einen Einfluss auf die Sauerstoffaffinität des Hb. Eine pH-Wert Erniedrigung stabilisiert ebenfalls die Quartärstruktur des Deoxyhämoglobin und fördert somit eine Freisetzung von Sauerstoff in stoffwechselaktivem Gewebe. Dieser als Bohr-Effekt beschriebene Vorgang wird durch Kohlensäure, Laktat und andere sauer wirkende Metabolite des Stoffwechsels hervorgerufen. Einen ähnlichen Effekt übt Kohlendioxid direkt auf Hämoglobin aus, indem es mit den Aminotermini unter Bildung von Carbamatgruppen reagiert. Diese Stabilisieren über Salzbrücken die Konformation des Deoxyhämoglobins, was die Freisetzung von Sauerstoff im Gewebe weiter verstärkt.

2.2.2 Hexakoordinierte Globine

Zusätzlich zu den zwei bereits erwähnten pentakoordinierten Globinen der Vertebraten wurde kürzlich in anonymen cDNA-Banken von Maus und Mensch zwei weitere Globine, Neuroglobin und Cytoglobin, entdeckt (Burmester et al., 2000, Burmester et al., 2002). Diese sind jedoch im Gegensatz zu den bisher bekannten Globinen im deoxygenierten Zustand hexakoordiniert.

2.2.2.1 Neuroglobin

Der Name Neuroglobin (Ngb) resultiert aus der gewebespezifischen Expression dieses Globins in Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems (Burmester et al., 2000). Zusätzlich konnte es noch in endokrinen Geweben, wie z.B. dem Hoden nachgewiesen werden. Neben den Säugetieren konnte auch bei Teleostiern (Awenius et al., 2001) und Vögeln (Kugelstadt et al., 2004) eine *Ngb*-Expression gezeigt werden.

Das menschliche *NGB*-Gen liegt auf Chromosom 14q24, kodiert für ein Protein mit 151 Aminosäuren und einer Molekularmasse von ca. 17 kDa. Es ist zu 94% mit dem murinen Protein identisch. Neuroglobin gehört damit zu den am höchsten konservierten Proteinen, zeigt aber nur eine geringe Sequenzidentität mit Häm- und Myoglobin (< 21% und 25%). Die größten Sequenzübereinstimmungen zeigt es mit dem Nervenglobin des Anneliden *Aphrodite aculeata* (<30%) (Burmester et al., 2000).

Einleitung

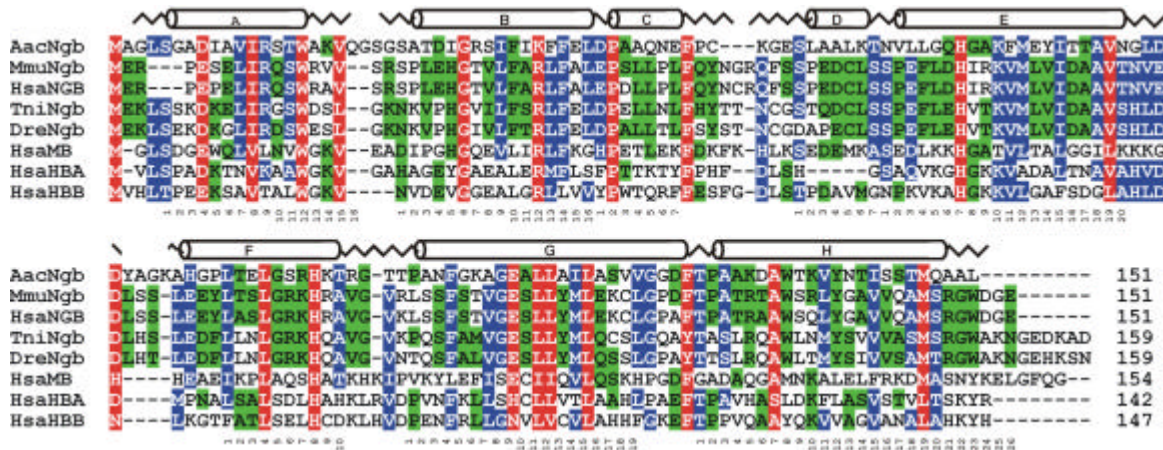


Abb. 7: Primärstrukturvergleich der Neuroglobine von Mensch (HsaNGB), Maus (MmuNgb), Kugelfisch (TniNgb), Zebrafisch (DreNgb) und der Seemaus (AacNgb) mit humanem Myoglobin (HsaMB), sowie α - und β -Hämoglobin (HsaHBA und HBB). Der Aminosäurevergleich wurde mit der Sekundärstruktur des Pottwal Myoglobins überlagert. Die acht α -Helices sind mit A-H gekennzeichnet.

Das Säugetier Ngb evolviert wesentlich langsamer als z.B. Häm- und Myoglobin. Die Aminosäureaustauschrate liegt bei $0,4 \times 10^{-9}$ pro Position und Jahr. Sie ist damit im Durchschnitt um den Faktor 3-4 niedriger als bei den bisher bekannten Globinen (Burmester et al., 2000, Awenius et al., 2001). In den kodierenden Regionen besitzt *Ngb* neben den zwei globintypischen Introns an den Positionen B12.2 und G7.0 (Dixon & Pohajdak, 1992) noch ein neuroglobinspezifisches drittes Intron an der Position E11.0 (Burmester, 2000). Sowohl Fisch als auch Säugetier Ngb besitzen die typische Globinstruktur mit dem „3 über 3 α -helikalen Sandwich“ (Pesce et al., 2002). Trotz der großen Sequenzunterschiede ist die *Ngb*-Tertiärstruktur nahezu identisch mit der von Myoglobin. Größere Unterschiede sind nur in der CD-Region sowie N- und C-terminal zu beobachten (Pesce et al., 2003).

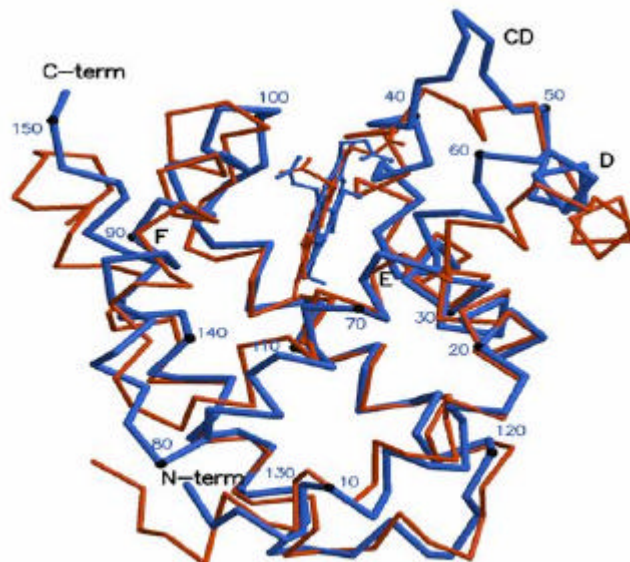


Abb. 8: Strukturüberlagerung von Neuroglobin (blau) und Myoglobin (orange). Die Häm-Gruppe befindet sich zwischen den Helices E und F. Die distale Bindungsstelle des Eisens zeigt nach rechts. Größere Unterschiede sind in der CD-Region sowie N- und C-terminal zu beobachten. (Pesce et al., 2003)

Spektroskopische Studien an Ngb haben gezeigt, dass sowohl das deoxygenierte ferro (Fe^{2+})-Ngb, als auch das ferri (Fe^{3+})-Ngb ein hexakoordiniertes Eisen im Häm besitzen. Dabei ist die Aminosäure HisE7 der sechste, also distale Ligand des Eisens.

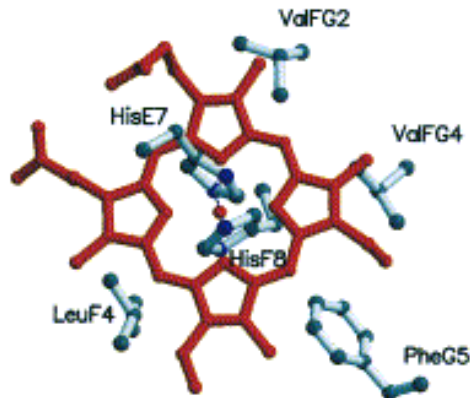


Abb. 9: Hexakoordination des Eisens im Häm von Neuroglobin. Der Tetrapyrrolring des Häms ist in rot dargestellt (Pesce et al., 2003).

Sauerstoff kann diesen endogenen Liganden reversibel verdrängen (Dewilde et al., 2001). Dabei ist die Dissoziation des Sauerstoffs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion. Wegen der Konkurrenz des internen (proximales His) und externen (O_2) Liganden um die Bindung an das Eisen liegt die Sauerstoffaffinität beim Neuroglobin mit $P_{50} = 1$ Torr leicht unter der des Myoglobins (Trent und Hargrove, 2002), aber über der des Hämoglobins (Burmester et al., 2000; Dewilde et al., 2001). Jedoch könnte die reversible Hexakoordination des Eisens über die Aminosäure HisE7, sowie die Flexibilität der E-Helix eine Feineinstellung der Sauerstoffaffinität ermöglichen (Pesce et al., 2003).

Bisher wurden viele Funktionen für Ngb in betracht gezogen (Burmester et al., 2000; Sun et al., 2001; Pesce et al., 2002; Reuss et al., 2002; Schmidt et al., 2003; Sun et al., 2003).

Das Vorkommen von Ngb in Säugern und Fischen spricht für eine Entstehung dieses Globins vor der Auftrennung der Tetrapoden und Teleostiern vor ungefähr 420 Mio. Jahren (Benton, 1990). Die größte Sequenzidentität von Ngb mit dem Nervenglobin des Anneliden *Aphrodite aculeata* (Burmester et al., 2000) sowie phylogenetische Studien lassen sogar vermuten, dass sich Ngb aus einem Vorläuferglobin entwickelt hat, das bereits vor der Auftrennung der Protostomier und Deuterostomier existiert hat (Pesce et al., 2002; Burmester & Hankeln, 2004).

2.2.2.2 Cytoglobin

Cytoglobin (Cygb) wurde unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen entdeckt. Die Arbeitsgruppe um Kawada identifizierte ein Häm-Protein in den Sternzellen der Leber, das dort unter Fibrose verstärkt exprimiert wird und deshalb „Stellate cell activation associated protein“ oder auch STAP genannt wurde (Kawada et al., 2001). Zeitgleich wurden durch eine EST (Expressed sequence tags) Datenbanksuche mit einem *Drosophila*-Globin als Vorlage globinähnliche Sequenzen bei Mensch, Maus und Zebrafisch entdeckt, die nicht mit den bisher bekannten Globinen übereinstimmten (Burmester et al., 2002). mRNA-Hybridisierungsexperimente zeigten eine Expression dieses Proteins in allen untersuchten Geweben, welches daraufhin als Cytoglobin bezeichnet wurde. Besonders starke Signale waren in Herz, Blase, Magen und Dünndarm zu erkennen.

Das menschliche *CYGB*-Gen liegt auf Chromosom 17q25 und kodiert ebenso wie das Gen der Maus für ein Protein mit 190 Aminosäuren (*Danio rerio*: 174 Aminosäuren) und einer Molekularmasse von ca. 21 kDa. Die für ein Globin untypische Größe des *Cygb* resultiert aus N- und C-terminalen Verlängerungen, die sich bei Säugetieren wahrscheinlich durch eine Verdopplung des 5' kodierenden Bereichs am N-Terminus und einem *Cygb* spezifischen zusätzlichen Exon am C-Terminus erklären lassen (Burmester et al., 2002).

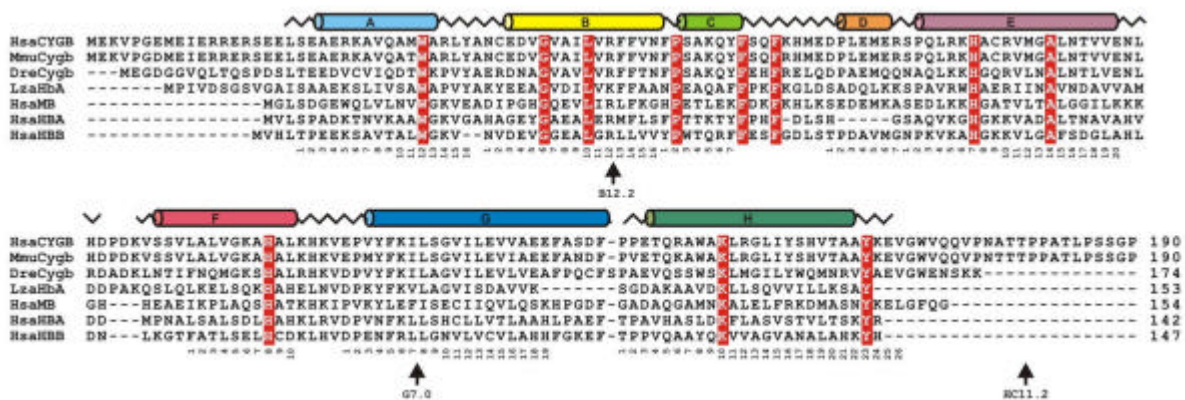


Abb. 10: Primärstrukturvergleich der Cytoglobine von Mensch (HsaCYGB), Maus (MmuCygb) und Zebrafisch (DreCygb) mit dem humanen Myoglobin (HsaMB), dem Hämoglobin a des Neunauges und den Hämoglobinketten α und β des Menschen. Der Aminosäurevergleich wurde mit der Sekundärstruktur des Pottwal Myoglobins überlagert. Die acht α -Helices sind mit A-H gekennzeichnet. Die Introns im menschlichen CYGB sind mit Pfeilen markiert.

Trotz der hohen Sequenzunterschiede zwischen Myoglobin und Cytoglobin, sind die globintypischen Introns an den Positionen B12.2 und G7.0, sowie die acht α -helikale Tertiärstruktur mit dem „3 über 3 α -helikalen Sandwich“ konserviert (Burmester et al., 2002).

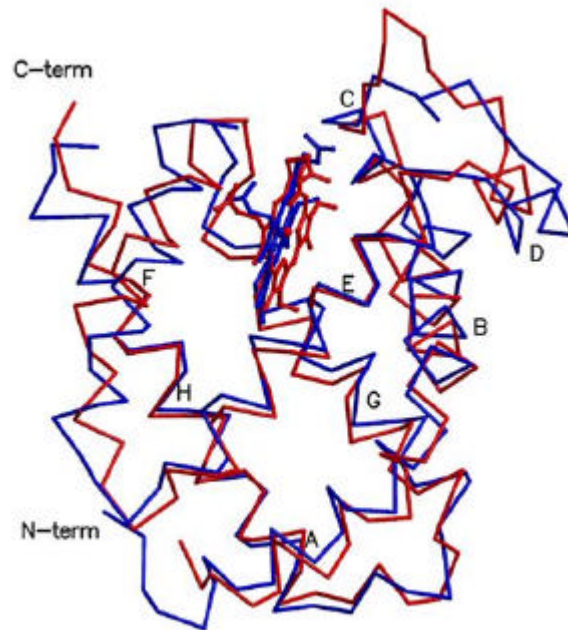


Abb. 11: Strukturüberlagerung von HsaCYGB (rot) und SwMb (blau). Helices wurden mit A-H gekennzeichnet. (De Sanctis et al., 2004). Größere Unterschiede sind in der CD-Region, am Anfang der E-Helix und in den Übergangsbereichen der Helices EF und GH zu beobachten.

Die Aminosäuresequenzen von humanem und murinem Cygb sind zu 95% identisch. Dies zeigt, dass Cygb genau wie Ngb zu den am höchsten konservierten Proteinen innerhalb der Säugetiere gehört. Die Aminosäureaustauschrate liegt mit $0,3 \times 10^{-9}$ AS-Austausche pro Position und Jahr noch etwas niedriger als bei Ngb. Die größte Übereinstimmung zeigt sich mit Myoglobin (30% Sequenzidentität). Diese Verwandtschaft wird auch durch einen Vergleich der chromosomalen Region beider Gene unterstützt. Diese Regionen sind lange paraloge Bereiche genomischer DNA, die Cygb (17q25) und Mb (22q13) enthalten (McLysaght, 2002). Es lässt sich aufgrund dieser Daten vermuten, dass diese beiden Gene durch Genduplikation entstanden sein könnten (Burmester et al., 2002).

Die Überlagerung der Tertiärstrukturen von Myoglobin und Cytoglobin zeigt weitgehende Übereinstimmung (DeSanctis et al., 2004). Es sind jedoch Unterschiede in den Übergangsregionen zwischen den Helices A und B, sowie E und F zu beobachten. Ebenso zeigen sich Differenzen in der D- und E-Helix.

Spektroskopische Studien konnten zeigen, dass es sich wie bei Neuroglobin um ein hexakoordiniertes Globin handelt (Trent & Hargrove, 2002). Auch biphasische Sauerstoffbindungskinetiken zeigen die Hexakoordinierung. Hierbei ist wieder, wie bei Ngb, das Histidin an Position E7 der sechste Ligand des Eisenions. Dieser sechste Ligand könnte wie im Neuroglobin eine Möglichkeit sein, die Sauerstoffaffinität zu modulieren. Die Sauerstoffaffinität des Cygb liegt mit $P_{50} = 0,65$ Torr im Bereich von Myoglobin.

Obwohl bisher diverse Funktionen für Cygb vorgeschlagen wurden, ist die tatsächliche Funktion im Organismus bislang unklar geblieben (siehe D; Kawada et al., 2001; Burmester et al., 2002; Trent und Hargrove, 2002; Geuens et al., 2003).

2.2.2.3 Globin X

Ein fünftes Vertebraten-Globin konnte bei Fischen und Amphibien identifiziert werden (Roesner et al., 2005). Da es nicht bei anderen Vertebraten gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass es bei der Entwicklung höherer Vertebraten verloren gegangen ist. Aufgrund seiner bislang unbekanntenen Funktion wurde dieses *Globin X* genannt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Globine zeigt die größte Übereinstimmung mit Neuroglobin (~26-35%), obwohl es kein neuronales Protein ist. Dieses konnte für Fische durch Expressionsstudien mittels RT-PCR-Experimenten beim Goldfisch gezeigt werden. Typische Globin-Merkmale wie die beiden hämbindenden Histidine (E7 und F8), das konservierte Phenylalanin an Position CD1, sowie die Introns an den Positionen B12.2 und G7.0 sind vorhanden. Jedoch besitzt das *Globin X* noch zwei zusätzliche Introns an den Positionen E10.2 und H10.0. Auch ist das *Globin X* durch C- und N-terminale Verlängerungen mit 200 Aminosäuren größer als die typischen Vertebraten-Globine.

2.3 Evolution der Globine der Vertebraten

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von Ngb zu dem Nervenglobin eines Anneliden, ist anzunehmen, dass Ngb sich sehr früh von den anderen Globinen abgespalten hat. Wenn man weiter davon ausgeht, dass ein Vorgänger der heutigen Vertebraten wahrscheinlich zwei Globine besaß, könnte Ngb eine nervenspezifische Funktion ausgeübt haben.

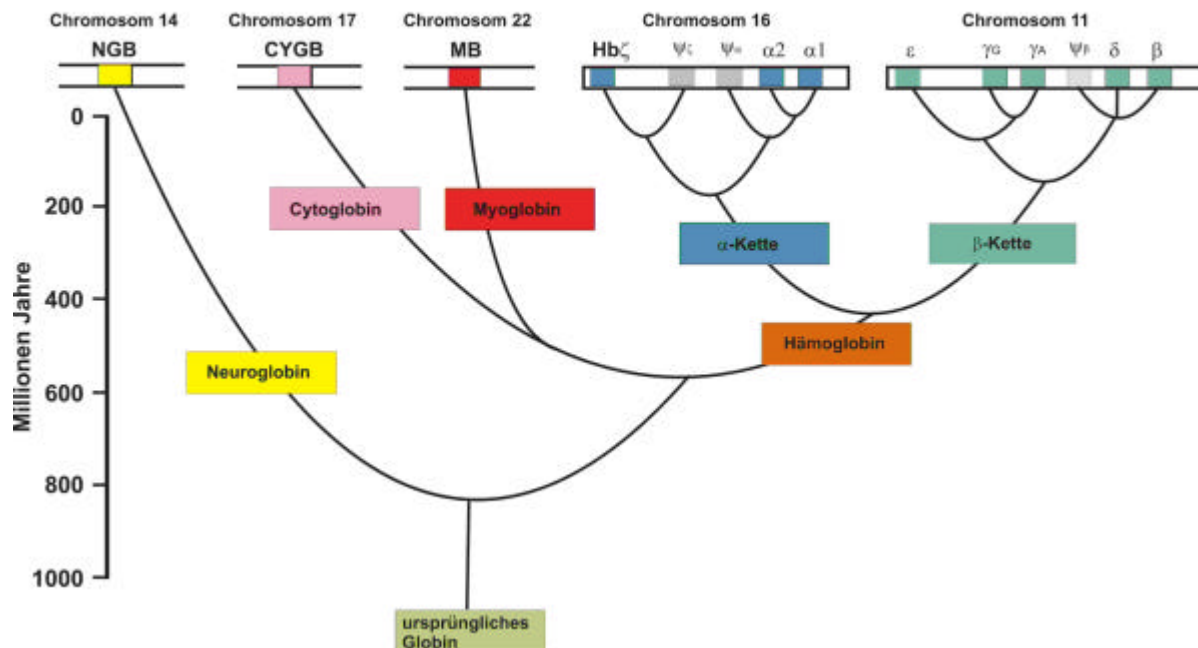


Abb. 12: Phylogenie der Globingene des Menschen (aus Burmester et al., 2002, verändert).

Diese Funktion übernahm es wahrscheinlich sehr früh in der Evolution der Bilateria (Burmester et al., 2000). Das zweite Globin könnte sich in ein Hämoglobin und ein zelluläres Globin, aus dem später Cygb und Myoglobin hervorgegangen sind, aufgetrennt haben (vor ca. 500-600 Mio. Jahren) (Goodman et al., 1988). Der gemeinsame Stamm von Myoglobin und Cytoglobin trennte sich vor ca. 450 Mio. Jahren, jedoch vor der Auftrennung der Knochenfische und der anderen Kiefermäuler (Benton 1990).

Globin X ist in diesem Stammbaum der Vertebraten-Globine nicht abgebildet, da es nur noch bei niederen Vertebraten (Amphibien und Fischen) zu finden ist. Phylogenetische Untersuchungen von Roesner und Mitarbeitern (2005) konnten jedoch zeigen, dass Globin X in diesem Stammbaum einen gemeinsamen Ast mit Neuroglobin bildet.

2.4 Die Globine der Invertebraten

Globinen konnten auch in verschiedenen Vertretern der Invertebraten nachgewiesen werden (Weber & Vinogradov, 2001). Neben einer ähnlichen Tertiärstruktur, dem so genannten „3 über 3 α -helikalem Sandwich“, sind Invertebraten-Globine eine sehr variable Gruppe von Proteinen (Bolognesi et al., 1997). Sie unterscheiden sich sehr stark in ihrer Primärstruktur, Quartärstruktur und auch in ihren Funktionen. Die große Bandbreite an physiologischen Funktionen, die durch diese Proteine ausgeübt werden, spiegelt damit die Komplexität der Invertebraten wieder.

2.4.1 Vielfalt der Invertebraten-Globine

Monomere Häm- und Myoglobine mit einer Länge von 140-150 Aminosäuren bilden die größte Globingruppe bei den Invertebraten (Weber & Vinogradov, 2001). Sie kommen sowohl intrazellulär (im Cytoplasma oder in roten Blutkörperchen) als auch extrazellulär vor. Es handelt sich dabei z.B. um die Myoglobine der Mollusken, Anneliden, Nematoden und das Hämoglobin in den roten Blutkörperchen der Anneliden. Außerdem zählt man zu den monomeren Globinen noch die so genannten trunkierten Globine (Vandergon et al., 1998). Es handelt sich dabei um Globine, die um 30-40 Aminosäuren verkürzt sind, wie z.B. das aus 109 Aminosäuren bestehende Neuroglobin eines Nemertini. Di- bzw. Tetramere Globine findet man z.B. in den roten Blutkörperchen der Muschel *Scapharca* (Royer et al., 1989). Noch größere Polymere einzelkettiger Globine kann man unter anderem intrazellulär bei dem Anneliden *Glycera* finden (Vinogradov et al., 1970). „Multi-Subunit“ Hämoglobine, die aus mehreren Globinuntereinheiten (~35 kDa) zusammengesetzt sind, findet man bei Nematoden und Arthropoden (Blaxter, 1993; Ilan & Daniel, 1979). Multi-Dömanen Globine mit einem relativen Molekulargewicht von 124 – 8000 findet man bei Mollusken, Crustaceen und Polychaeten (Terwilliger et al., 1978; Bonaventura & Bonaventura, 1983; Manning et al., 1990). Sie bestehen aus einer unterschiedlich großen Anzahl von Ketten, die wiederum aus 4-20 kovalent miteinander verknüpften Globindömanen bestehen. Außerdem sind noch hexagonale Bilayer-Globine bei Mollusken und Anneliden zu finden (Lamy et al., 1996). Sie bestehen aus 180-192 Polypeptidketten, von denen 1/3 Linkerprotein sind, mit einem rel. Molekulargewicht von bis zu 3600.

Invertebraten besitzen eine große Heterogenität an Globinen, die sowohl Isoformen eines Globins in einem Individuum (multiple Heterogenität), als auch verschiedene Globinkomponenten und Verteilungsmuster in genetisch unterschiedlichen Organismen (polymorphe Heterogenität) enthalten (Weber und Vinogradov, 2001). Aber auch das Auftreten zweier verschiedener Globine am selben Ort, eine örtliche Heterogenität, ist zu beobachten. Diese Heterogenität verleiht den Organismen die Fähigkeit, neue oder sich stark verändernde Lebensräume zu besiedeln.

Neben der Fähigkeit, Sauerstoff zu transportieren, zu speichern oder abzufangen, gibt es noch eine Vielzahl anderer Funktionen, die Globine in Invertebraten übernehmen (Weber und Vinogradov, 2001). Globine können in höheren Konzentrationen eine wichtige Rolle im Säure-Base-Haushalt spielen. Sie transportieren Protonen von sauren Geweben (stoffwechselaktiv) zu den respiratorischen Oberflächen. Dies konnte z.B. für die extrazellulären Globine von *Arenicola marina* (Toulmond, 1973; 1975), *Neoamphitrites figulus* (Wells & Warren, 1982) und *Megascolides australis* (Weber & Baldwin, 1985) gezeigt werden. Eine weitere häufig zu beobachtende Funktion ist die Interaktion der Globine mit Sulfiden (Weber & Vinogradov, 2001). Entweder ist eine direkte Reaktion bei der

Detoxifikation des Sulfids zu beobachten oder aber ein Transport zu Schwefel oxidierenden Symbionten. Weniger verbreitete sind Funktionen als Peroxidase (z.B. *Amphitrite ornata*; Lebioda et al., 1999; Lacount et al., 2000), Superoxiddismutase (z.B. *Lumbricus terrestris*; Liochev et al., 1996), Speicherprotein (z.B. *Chironimus thummi*; Trewitt et al., 1986), Regulierung des Auftriebs bei schwimmenden Invertebraten (z.B. *Anisops pellucens*; Miller, 1964, 1966).

2.4.2 Hämoglobine der Insekten

Bei Insekten vollzieht sich der Gasaustausch hauptsächlich über Tracheen, die eine Diffusion des Atemmediums von der Umgebung bis hin zu den sauerstoffverbrauchenden Geweben ermöglichen. Aufgrund dieser speziellen Anpassung wurde lange angenommen, dass Insekten keine respiratorischen Proteine benötigen (Wehner & Gehring, 1995). Als Ausnahmen galten die aquatischen *Chironomiden* Larven, die in sauerstoffarmer Umgebung leben. Es konnten 12 extrazelluläre, pentakoordinierte Hämoglobine auf Proteinebene und 30 auf Genebene identifiziert werden. Fünf dieser Globine liegen als Monomere mit einer Molekularmasse von 15-17 kDa vor. Sechs sind Homodimere (~34 kDa) und ein Globin kommt sowohl als Monomer als auch als Dimer vor. Mit einer Sauerstoffaffinität von $P_{50} = 0,12-0,61$ Torr dienen sie wahrscheinlich als Sauerstoffspeicher, da die Pausen der periodischen O_2 -Ventilation mit der Speicherdauer korreliert (Weber, 1965). Zusätzlich übernehmen die Globine in den Ovarien der *Chironomiden* wohl auch eine Speicherfunktion bei der Ernährung (Trewitt et al., 1986, Fabb et al., 1990;).

Es wurden Globine jedoch auch bei anderen Insekten, wie z.B. bei einigen aquatischen Hemipteren (*Buenoa confusa*, *Anisops pellucens* und *A. assimilis*) und bei der Diptere *Gastrophilus intestinalis* gefunden. Sie werden hauptsächlich in Trachealzellen und dem Fettkörper der Larven exprimiert. Sie besitzen eine relativ hohe Sauerstoffaffinität und dienen wahrscheinlich dem Transport und der Speicherung von Sauerstoff (Dewilde et al., 1998).

Alle bis dato identifizierten Globine finden sich bei Insekten, deren Larven in einer hypoxischen Umwelt leben. Die Entdeckung eines Globins bei *Drosophila melanogaster* (Burmester & Hankeln, 1999), die lediglich während ihrer Embryonalentwicklung mit Sauerstoffmangel konfrontiert wird, kam deshalb überraschend (Wingrove & O'Farrell, 1999). Es handelt sich im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Invertebraten-Globinen, um ein hexakoordiniertes Globin. Die höchste Sequenzidentität zeigt es mit dem Globin der Pferdebremse *Gastrophilus intestinalis* (Dewilde et al., 1998).

3 Zielsetzung

Man ging lange davon aus, dass Vertebraten ausser Myoglobin im Skelett- und Herzmuskel keine weiteren intrazellulären Globine benötigen. Jedoch wurden bei EST-Datenbanksuchen zwei neue Globine, Neuro- und Cytoglobin, in Vertebraten entdeckt (Burmester et al., 2000; 2002). mRNA-Hybridisierungsexperimente zeigten, dass Ngb hauptsächlich im Gehirn, aber auch im peripheren Nervensystem, sowie in einigen endokrinen Geweben exprimiert wird. Mit derselben Methode konnte für Cygb eine ubiquitäre Expression gezeigt werden. Die Funktion von Ngb und Cygb ist bisher jedoch noch nicht verstanden. Deshalb sollte die zelluläre sowie intrazelluläre Lokalisation beider Proteine mittels Immunfluoreszenz untersucht werden, um daraus Rückschlüsse auf die Funktion dieser Globine ziehen zu können.

Ein weiteres intrazelluläres Globin konnte bei dem Insekt *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden (Burmester & Hankeln 1999). Die Funktion und die zelluläre, sowie subzelluläre Lokalisation waren auch bei diesem Protein unbekannt. Deshalb sollte bei der Fruchtfliege das Protein mittels immunologischen Methoden im adulten Tier sowie bei Larven nachgewiesen werden, um auch hier Hinweise auf die Funktion dieses Globins zu erhalten.

B Material und Methoden

1 Allgemeines

1.1 Versuchstiere

1.1.1 Säugetiere (Mammalia)

Maus (*Mus musculus*), Stamm: BalbC

Ratte (*Rattus norvegicus*)

Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus domestica*)

Meerschweinchen (*Cavia porcellus*)

Diese Versuchstiere wurden vom zentralen Tierstall der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen.

1.1.2 Fische (Pisces)

Zebrafisch (*Danio rerio*)

Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Die Zebrafische stammten aus eigener Zucht, die Regenbogenforellen wurden von einer lokalen Fischzucht (Richtmann Jürgen, Fischhandel GmbH, Alsheim) bezogen.

1.1.3 Insekten (Insecta)

Taefliege (*Drosophila melanogaster*)

Bei den im Labor für die Versuche verwendeten Fliegen handelte es sich ausschließlich um gentechnisch unveränderte Wildtyp-Fliegen (Oregon R) von *D. melanogaster*, welche vom Institut für Molekulargenetik, Gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt wurden.

1.2 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Folgende im Internet zur Verfügung stehende Computerprogramme und Datenbanken wurden benutzt.

| | |
|---------------------------|---|
| - Blast NCBI | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/ |
| - BLAST Japan | http://blast.genome.as.jp/ |
| - Chromas 1.55 | http://www.technelysium.com.au/chromas.html |
| - GeneDoc 2.6 | http://www.psc.edu/biomed/genedoc |
| - ExPASy Proteomics tools | http://www.expasy.org/tools/ |
| - Webcutter | http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html |

1.3 Chemikalien und Geräte

Alle für die Laborarbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fermentas (St. Leon-Rot), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sigma (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg), Amersham Biosciences (Freiburg), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Peqlab (Erlangen), QIAGEN (Hilden), Invitrogen (Groningen), Qbiogene (Heidelberg) und Sigma Aldrich (Darmstadt).

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Geräte verwendet:

| | |
|---------------------------------|--|
| Zentrifugen: | Heraeus Biofuge pico, Rotor 3325 (Kendro GmbH, Hanau) Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 3360 Sorvall (RC5B), GSA- und SS34-Rotor Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen) Eppendorf Zentrifuge, Rotor 5415 (Eppendorf, Hamburg) Cyto-Zentrifuge (Shandon) |
| Mikroskop: | Leitz DM RD, Kamera: Leica DC500 |
| Fotometer: | Ultrospec [®] (Amersham Pharmacia biotech, Freiburg) Biophotometer (Eppendorf, Köln) |
| Autoklav: | Technoclav (Integra Biosciences, Fernwald) |
| pH-Meter: | Digital-pH-Meter (Knick, Berlin) |
| Thermocycler: | Techne Progene (Techne, Cambridge, UK) Biometra T-Gradient (Biometra, Göttingen) |
| 2D IEF: | Amersham Biosciences (Freiburg) |
| Zellkultur: | Sterile Werkbank (Baker Company, Maine, USA) |
| Kryostat: | Microm HM500 O (Microm International GmbH, Walldorf-Heidelberg) |
| Transilluminator: | Geldoc 100, UV-Lampe: 306 nm (Bio-Rad, München) Software: Molecular Analyst (Bio-Rad, München) |
| Mikrotiterplattenreader: | TitertekPlus (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA) |
| Brutschrank: | Memmert Modell 300 (Memmert, Schwabach) |

2 Mikrobiologische Methoden

2.1 Mikroorganismen

2.1.1 Bakterienstämme

Es wurden folgende Bakterienstämme der Art *Escherichia coli* verwendet:

Top10 (Invitrogen, Groningen); F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) f 80*lacZ*?M15 Δ *lacX74*
recA1 araD139 Δ (*araI*)7697 *galJ galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

BL21 (DE3)pLys (Stratagene, Heidelberg); *E. coli* B F- *dcm ompT hsdS*(rB mB-) *gal*
 Δ (DE3)[pLysSCamr]

XL1-Blue MRF⁺Kan Library Pack Competent Cells (Stratagene, Heidelberg);
 Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96*
relA1 lac [F⁺ *proAB lac*^fZ?M15 Tn5 (Kan^r)]

BacterioMatchTM Two-Hybrid System Reporter Strain (Stratagene, Heidelberg)
 Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96*
relA1 lac [F⁺ *lac*^f*bla lacZ Kan*^r]

XL1-Blue MRF⁺ strain^a 13 Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1*
recA1 gyrA96 relA1 lac [F⁺ *proAB lac*^fqZ?M15 Tn10 (Tetr)]

2.1.2 Hefestämme

KF1 (**MAT a** *trp1-901 leu2-3,112 his3-200 gal4D gal80D LYS2: GAL1-HIS3 GAL2-ADE2*
met2::GAL7-lacZ SPAL10-URA3)

Y187^c (**Mata**, *ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4?*, *gal80?*, *met*,
URA3: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1)

2.2 Nährmedien

2.2.1 Bakterienmedien

| | |
|-----------------------|-----------------|
| LB-Medium (pro Liter) | 10 g NaCl |
| | 10 g Trypton |
| | 5 g Hefeextrakt |
| | pH 7,4 |

| | |
|---------|---------------------------------------|
| LB-Agar | 20 g Agar-Agar auf 1 Liter LB- Medium |
|---------|---------------------------------------|

| | |
|----------------------|-----------------|
| L-Medium (pro Liter) | 5 g NaCl |
| | 10 g Trypton |
| | 5 g Hefeextrakt |
| | pH 7,4 |

Alle Medien wurden direkt nach der Herstellung bei 121°C (1,0 bar) für 30 min autoklaviert. Der Agar wurde danach auf ca. 55°C abgekühlt und etwa 5mm hoch in Petrischalen gegossen.

Um ein selektives Wachstum von bestimmten Bakterien zu ermöglichen, wurden die Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

Folgende Konzentrationen von Antibiotika wurden verwendet:

| | |
|-----------------|--|
| Ampicillin | 100 mg/Liter (50 mg/Liter für Bacteriomatch-System) |
| Kanamycin | 12,5 mg/Liter (50 mg/Liter für Bacteriomatch-System) |
| Tetracyclin | 50 mg/Liter (15 mg/Liter für Bacteriomatch-System) |
| Chloramphenicol | 34 mg/Liter |
| Carbenicillin | 25 mg/Liter |

2.2.2 Hefemedien

Alle Medien (Qbiogene; Heidelberg) wurden direkt nach der Herstellung bei 121°C (1,0 bar) für 30 min autoklaviert. Der Agar wurde danach auf ca. 55°C abgekühlt und etwa 5 mm hoch in Petrischalen gegossen.

Dropout Base (DOB): Wachstumsmedium ohne essentielle Aminosäuren
26.7 g/Liter (Inhalt/Liter: 1.7 g YNB, 5 g Ammoniumsulfat,
20 g Dextrose)

YNB: Wachstumsmedium ohne Kohlenstoffquelle und ohne essentielle Aminosäuren

Complete supplement Mixture (CSM): Aminosäurezusatz für DOB
CSM-TRP
CSM-TRP-LEU-ADE
CSM-TRP-LEU-Ura-His

YPD: Vollständiges Wachstumsmedium :
50 g /Liter (Inhalt/L: 20 g Peptone-Y, 10 g Hefeextrakt-Y,
20 g Dextrose)
pH 6,5

2.3 Flüssigkulturen

Zur Vermehrung einzelner Bakterienklone wurden diese mit sterilen Zahnstochern in LB-Medium mit der entsprechenden Menge Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

2.4 Glycerinkulturen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterien können diese bei -80°C in einer Glycerinkultur gelagert werden. Hierfür wurde ein Aliquot der Flüssigkultur der zu lagernden Bakterien, mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt. Diese Glycerinkultur ist nun für mehrere Monate haltbar.

2.5 Kompetente Bakterien

Um Plasmide vervielfältigen zu können, müssen sie zuvor in Bakterien transformiert werden. Falls nicht die bei einigen Klonierungsvektoren mitgelieferten kompetenten Bakterien verwendet wurden (z.B. bei Invitrogen, PCR 4 TOPO TA), konnte man XL1-Blue Bakterien nach einer modifizierten CaCl_2 -Methode (Cohen *et al.*, 1972) kompetent machen. Dazu wurden die Bakterien einer Flüssigkultur (siehe B2.3) im Verhältnis 1:100 in frischem Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis sie eine OD_{600} von 0,2 bis 0,4 erreicht hatten. Die sich dabei in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Bakterien wurden pelletiert (5 min, 500 g, 4°C), in 10 ml eiskaltem MgCl_2 (0,1 M) resuspendiert, erneut pelletiert und anschließend in zwei ml eiskaltem CaCl_2 (0,1 M) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden dann für mindestens 30 min auf Eis gehalten und konnten anschließend direkt für die Transformation verwendet werden.

3 Zellbiologische Methoden

3.1 Zelllinien

Hela:

| | |
|-------------------------|---|
| Wachstumseigenschaften: | adhärent |
| Sicherheitsstufe: | 2 |
| Organismus: | Mensch |
| Gewebe | Gebärmutterhals, Epithelial, Adenocarcinom |

Hek:

| | |
|-------------------------|----------|
| Wachstumseigenschaften: | adhärent |
| Sicherheitsstufe: | 2 |
| Organismus: | Mensch |
| Gewebe | Niere |

3.2 Nährmedien

| | |
|---------------------------|--|
| Hybridoma Medium (Gibco): | + 1-15% Fötale Kälberserum (FCS) + β -Mercaptoethanol, 50 μ M |
| DMEM | +10% FCS |
| Einfriermedium | Kultivierungsmedium plus 10% DMSO |
| HAT Supplement (50 X) | Gibco Life Technologies (Karlsruhe) |
| HT Supplement (100 X) | Gibco Life Technologies (Karlsruhe) |

3.3 Makrophagenisolierung

In einer sterilen Werkbank wurden aus den Bauchhöhlen von adulten nicht zu fetten Balb c Mäusen, Makrophagen isoliert. Dazu wurde zunächst das Fell mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach der Sterilisation wurde die Bauchdecke durch einen kleinen Schnitt geöffnet und mit einer sterilen Pasteurpipette mit 1 ml PBS je Bauchseite 3 mal gespült und die Flüssigkeit dann in ein steriles Gefäß überführt. Anschließend wurden die isolierten Makrophagen gezählt. Es konnten ungefähr 15×10^6 Makrophagen pro Maus isoliert werden. Diese wurden dann in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² ausgesät und entweder als Feeder-Zellen bei einer Fusion oder zur Herstellung von konditioniertem Medium verwendet. Für das konditionierte Medium wurde das Kulturmedium für 5-7 Tage mit Wachstumsfaktoren der Makrophagen angereichert, dann abgenommen, nochmals zentrifugiert und portioniert bei -20°C eingefroren. So gelagert hält sich das Medium für 1-2 Jahre. Pro 24er Well gibt man 1-2 Tropfen, pro kleiner 25 ml Flasche 0,5 ml des konditionierten Mediums zu.

PBS:

| | | |
|--------|--|--------|
| 1l 10x | 1,4 M NaCl | 81,8 g |
| | 27 mM KCl | 2,0 g |
| | 81 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 14,4 g |
| | 15 mM KH ₂ PO ₄ | 2 g |
| | pH 7,4 | |

3.4 Passage von Zellkulturen

Zunächst wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen (gr. Fl. 4 ml; kl. Fl. 2 ml). Mit der Pasteurpipette wurde das PBS nun in einem starken Strahl auf die Zellen gespritzt um sie von der Zellkulturflasche zu lösen. Adhärenente Zellen mussten zusätzlich mit Trypsin behandelt werden. Dazu wurden die Zellen 30 sec mit 0,5% Trypsin inkubiert und die Zellen dabei durch kräftiges Klopfen gegen die Flasche abgelöst. Das Trypsin wurde nun mit Medium + 10% FCS abgestoppt werden, um eine Lyse der Zellen zu verhindern. Die Zellsuspension wurde nun nach Bedarf auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt und mit Medium aufgefüllt (kl. Flaschen 6 ml, gr. Flaschen 15 ml).

3.5 Einfrieren von Zellkulturen

3.5.1 Hybridomzellen

Die Zellen wurden von der Kulturschale abgespült und bei 180 g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen anschließend in wenig Einfriermedium resuspendiert (Zellen von 3 x 24er Wells in 3 ml Einfriermedium). Die Zellen wurden nun in einer Styroporbox bei -80°C über Nacht eingefroren und anschließend zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.5.2 Sonstige Zelllinien

Einfriermedium 5:3:2

5 Teile normales Medium (incl. FCS u. Antibiotika)

3 Teile FCS

2 Teile DMSO (Dimethylsulfoxid)

Die Zellen wurden vor dem Einfrieren mit Medium abgespült und bei 180 g 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend gründlich in entsprechendem Medium (~ 2 ml) resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens Einfriermedium wurde die Lösung gemischt. Sobald die Zellen mit DMSO in Kontakt kommen, wurde zügig gearbeitet werden, um die schädliche Wirkung des DMSO zu minimieren. Im Kryoröhrchen wurden die Zellen nun über Nacht bei -80°C vorgefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die Röhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

3.6 Auftauen von Zellkulturen

Die eingefrorenen Zellen wurden unter vorsichtigem Schütteln im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Durch tropfenweise Zugabe von 5 ml Kulturmedium wurde das DMSO langsam

ausverdünnt. Nun wurden die Zellen pelletiert (siehe B3.5.1), der Überstand abgesaugt und die Zellen vorsichtig in Kulturmedium suspendiert.

3.7 Cytozentrifugenpräparat

Ca. $1-2 \times 10^5$ Hybridomzellen wurden in 200-300 μ l Medium mit 2000 rpm 5 min auf einen Objektträger aufgeschleudert (Cyto-Zentrifuge). Die Zellen wurden eine h getrocknet und anschließend 2 min in Aceton fixiert. Nach erneuter Trocknung wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 min mit 10% FCS in PBS abgesättigt. Nun wurden IgG produzierende Zellen mit einem fluoreszierenden anti-Maus IgG Sekundärantikörper markiert (siehe B4.6.4.2). Es sollten dabei annähernd 100% der Zellen IgG positiv sein.

4 Proteinbiochemische Methoden

4.1 Bakterielle Proteinexpression und Aufreinigung

4.1.1 Expressionssystem

Für die rekombinante Expression von Proteinen wurde das bakterielle T7 Expressionssystem (Studier et al., 1990) verwendet. Es wurde dabei der Expressionvektor pET3a („plasmid for expression by T7 RNA polymerase“) und der Bakterienstamm BL21 (DE3)pLys (F⁻ ompT⁻ r_m⁻) (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

Bei diesem System wird die cDNA, die für das gewünschte Protein kodiert, unter die Kontrolle eines Bakteriophagen-Promoters (T7) gestellt. Solange die RNA Polymerase des Wirts andere Promotoren erkennt als die RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 und die Wirtszelle keine anderen T7 Promotoren besitzt, kann dieses spezifische System verwendet werden. Somit transkribiert die T7 Polymerase selektiv nur die DNA unter der Kontrolle des T7 Promotors. Dieser steht, um eine basale Transkription zu minimieren und so auch die Expression von toxischen Proteinen zu ermöglichen, unter der Kontrolle eines lac-Repressors durch Inserierung eines lac Operators 3' des T7 Promotors. Zusätzlich sorgt das in der Wirtszelle vorhandene pLysS Plasmid für eine basale Transkription von Lysozym. Das Enzym sorgt unter anderem für eine Inaktivierung der T7 RNA Polymerase. Lysozym hilft zusätzlich beim späteren Aufschluss der Zellen, wenn zuvor die innere Plasmamembran durch Detergenzien oder Frier-Tau-Zyklen zerstört wird. Dann kann Lysozym die Zellwand der Bakterien lysieren. Durch Aktivierung des lacUV5 Promotors, der die Transkription der T7 RNA Polymerase steuert, mittels IPTG, ist es jedoch möglich, die normale Transkriptionsleistung wieder herzustellen.

4.1.2 Bakterielle Proteinexpression

Die Bakterienklone wurden in 5 ml LB-Medium, versetzt mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml), über Nacht bei 37°C unter Schütteln herangezogen. Je 1 ml dieser Übernacht-Kultur wurde in einen Liter L-Medium mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) überführt. Die Suspension wurde mit 1 M 5-Aminolävulinsäure (ADA) auf eine Endkonzentration von 1 mM ADA eingestellt, auf mehrere Erlenmeyerkolben verteilt und bei ca. 25°C so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,8 erreicht war. Dieser OD-Wert ist optimal für eine Induktion mit IPTG. Zunächst wurden ca. 100 ml als Induktionskontrolle abgenommen und die verbleibende Kultur mit einer 0,5 M IPTG-Stammlösung versetzt, bis eine Endkonzentration von 0,4 mM erreicht war. Beide Kulturen wurden unter Schütteln bei ca. 25°C über Nacht weiter inkubiert.

Die Bakterien wurden in 200 ml Zentrifugenbecher gefüllt und bei 4332 g 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen, das Pellet in Protease-Inhibitor-Puffer resuspendiert (50 ml pro Liter Bakterienkultur) und in 50 ml Falcon-Röhrchen gefüllt.

Protease-Inhibitor-Puffer:

50 mM Tris pH 8,0

1 mM MgCl₂

1 mM DTT

1 mM Pefabloc

50 µg/ml DNase

Eine Spatelspitze RNase

1 Tablette Complete Protease Inhibitor-Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

auf 50 ml Puffer

4.1.3 Aufbrechen der Zellen

Zum Zerstören der Plasmamembran der Bakterienzellen wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur im Wasserbad wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf Eis mit Ultraschall (Labsonic 1510, B. Braun, Melsungen AG) behandelt. Dazu wurde der Ultraschallstab direkt in die Bakteriensuspension eingetaucht. Die Beschallung erfolgte kontinuierlich in Intervallen von jeweils 30 sek, gefolgt von 30 sec Pause, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden. Insgesamt wurden je Probe 10-20 Beschallungen durchgeführt. Um Zelltrümmer und Organellen von der Proteinlösung zu trennen, wurde anschließend 1 h bei 4332 g und 4°C zentrifugiert.

4.1.4 Verdau von Nukleinsäuren

Da in der Zellsuspension vorliegende DNA und RNA die spätere Aufreinigung der Proteine stört und die Nukleinsäuren durch die Ultraschallbehandlung nicht vollständig fragmentiert waren, wurde nach dem Sonifizieren ein DNA- und RNA-Verdau angeschlossen. Dazu wurden die Proben für 2 h bei 37°C inkubiert. Die dem Protease-Inhibitor-Puffer zugesetzten Nukleasen konnten so optimal die DNA und RNA verdauen. Ein gleichzeitiger Abbau der Proteine durch in den Bakterien enthaltenen Proteasen wurde durch zwei Inhibitoren (Complete Protease Inhibitor-Mix und Pefabloc) wirkungsvoll verhindert.

Um Zelltrümmer, Organellen und verdaute Nukleinsäuren von der Proteinlösung abzutrennen, wurde anschließend bei 5500 g und 4°C für mindestens 1 h zentrifugiert.

4.1.5 Reinigung

Für verschiedene weiterführende Untersuchungen war es notwendig die Globine in sehr reiner Form, ohne Fremdproteine, vorliegen zu haben. Um Verunreinigungen zu minimieren, wurde die Proteinprobe diversen Reinigungsschritten unterzogen. Bei der Reinigung kann man sich die verschiedenen Eigenschaften der Proteine wie Löslichkeit, Größe, Ladung oder spezifische Bindungsaffinität zu Nutze machen.

4.1.5.1 Ammoniumsulfatfällung

Die aus der Bakterienkultur gewonnene Proteinlösung wurde zunächst mit Ammoniumsulfat - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - ausgesalzt. Ammoniumsulfat ist ein antichaotropes Salz, das hydrophobe Effekte in Lösungen verstärkt und so die Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen fördert. Für eine erste Reinigung von Proteinen ist es besonders gut geeignet, da es ihre biologische Aktivität in Konzentrationen $> 0,5 \text{ M}$ schützt und durch Dialyse oder Ionenaustauscher leicht zu entfernen ist. Zunächst wurden so die Proteine grob fraktioniert, da sich die Löslichkeit in Abhängigkeit von der Salzkonzentration von Protein zu Protein unterscheidet.

Die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration wurde in 10% Schritten von 0% bis auf 100% erhöht. Dabei wurde ständig auf Eis gearbeitet, um ein Denaturieren der Proteine zu verhindern. Anschließend wurde jeweils 20 min bei 4°C und 4332 g zentrifugiert. Die gewonnenen Pellets wurden in einem Volumen 1 x PBS resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Es wurde nach der Ammoniumsulfattabelle aus „Methods of Enzymology“ präzipitiert (Deutscher, 1990).

4.1.5.2 Dialyse

Vor dem nächsten Reinigungsschritt, der Ionenaustauschchromatographie, musste das Ammoniumsulfat entfernt werden, um eine Anlagerung an den Anionenaustauscher zu verhindern. Zur Entsalzung der Proteinlösung wurde die Methode der Dialyse gewählt. Eine Dialysemembran lässt kleine Moleküle wie Salze und Wasser, frei diffundieren, während größere Moleküle wie Proteine zurückgehalten werden. Durch das Ausschlussvolumen (14000) wird die Molekulargewichts-Ausschlussgröße angegeben. Benutzt wurden Dialyseschläuche (Breite 25 mm, Wandstärke 0,02 mm) der Firma Roth, Karlsruhe. Die Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und über Nacht in circa fünf Litern 1 x PBS unter Rühren dialysiert. Zuvor wurde der Dialyseschlauch mit 1mM EDTA für 10 min ausgekocht.

4.1.5.3 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie macht man sich die unterschiedliche Nettoladung von Proteinen, welche durch die verschieden geladenen Aminosäuren (AS) zustande kommt, zu Nutze. Die Trennung der Proteine wird durch unterschiedliche Bindungseigenschaften der Proteine, welche durch die Stärke der Ladung hervorgerufen werden, gewährleistet. Dabei konkurrieren die Probenmoleküle mit Salzionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. Als Austauschträgermaterial diente das positiv geladene DEAE [Diethylaminoethyl; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$]. Mit dessen Hilfe konnten negativ geladene (anionische) Proteine aufgetrennt werden und gleichzeitig positiv geladene ausgewaschen werden.

Zunächst binden negativ geladene Proteine, also die dessen pI kleiner als 8,5 (pH des Laufpuffer) ist, an den Anionenaustauscher. Die Elution der Proteine erfolgte mit Hilfe einer FPLC, die einen linear ansteigenden NaCl Gradienten (0-1 M NaCl) erzeugte. Dabei wurden stärker geladene Proteine länger zurückgehalten als schwächer geladene. Die eluierten Proben wurden dann mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die verschiedenen Fraktionen wurden, um den Gehalt des Zielproteins und die Reinheit zu bestimmen, einer SDS Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen (siehe B4.4.1).

Laufpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,5

4.1.5.4 Gelfiltrationschromatographie

Um das gewünschte Protein in reiner Form zu erhalten, wurde nach der DEAE-Säule eine Gelfiltrationschromatographie angeschlossen, bei der die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Größenfraktionierung). Die Gelfiltrationsmatrix wird dabei von kleinen porösen Kügelchen eines Kohlenhydratpolymers gebildet. Kleine Moleküle können in die

Poren eindringen, wohingegen größeren nur das wässrige Medium zwischen den Kügelchen zur Verfügung steht. Dies führt dazu, dass große Proteine die Säule schneller passieren können als kleine Proteine, die eine weitere Wegstrecke zurücklegen müssen.

Die Gelfiltration wurde mit einer "High Load™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade" Säule der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Säule wurde mit 20 mM Tris-HCl (pH 8,5) equilibriert. Nach Auftragen der Probe wurde mit dem gleichen Puffer in einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert und 80 Fraktionen (6 min/Fraktion) aufgefangen. Die Absorption des Eluates wurde mit Hilfe eines eingebauten Photometers bestimmt und über einen Schreiber wiedergegeben. Im Anschluss wurde die Reinheit der Proben (siehe B4.4.1) und ihre Konzentration bestimmt (siehe B4.3.2).

4.2 Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern

Antikörper gegen rekombinant exprimiertes Protein oder synthetisch hergestellte Peptide wurden entweder von den Firmen Charles River (Kißleg) und Eurogentec (Seraing, Belgien) oder durch eigenes Immunisieren von Kaninchen bzw. Mäusen im Tierstall der Physiologischen Chemie (Universität Mainz) in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. habil. Sigrid Saaler-Reinhardt hergestellt.

Polyklonale Antikörper

Zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen Neuroglobin wurden Kaninchen mit verschiedenen Antigenen immunisiert.

- 15meres Peptid (H₂N-CLSSPEFLDHIRKVML-CONH₂, AS: 55-70), an das Hämocyanin der Schlüssellochschncke *Megathura crenulata* (KLH, siehe 4.2.1) gekoppelt
- rekombinantes HsaNGB
- rekombinantes HsaNGB an KLH gekoppelt

Monoklonale Antikörper

Zur Gewinnung von monoklonalen Maus Antikörpern gegen Neuroglobin wurden je zwei Mäuse mit verschiedenen Antigenen immunisiert.

- 15meres Peptid (H₂N-CLSSPEFLDHIRKVML-CONH₂, AS: 55-70), an KLH gekoppelt
- rekombinantes HsaNGB
- rekombinantes HsaNGB an KLH gekoppelt

4.2.1 Kopplung an KLH

Um die Immunogenität des rekombinanten Proteins bzw. des synthetischen Peptids zu erhöhen wurden die Antigene mit einem Immunstimulanz, in unserem Fall mit dem Hemocyanin der Schlüssellochschncke *Megathura crenulata* (KLH), gekoppelt. So konnte

das Immunsystem angeregt werden, vermehrt Antikörper, auch gegen das jeweilige Globin, zu produzieren.

2 mg gereinigtes Protein und 50 mg KLH wurden mit Phosphatpuffer auf 4 ml aufgefüllt und ü/N bei 4°C gegen Phosphatpuffer dialysiert. Wenn ein synthetisches Peptid (250 µg) gekoppelt wurde, durfte nur KLH dialysiert werden, da die Dialysemembran eine zu weite Porengröße besitzt und somit das Peptid durch die Membran diffundieren würde. Das Peptid wurde deshalb erst am nächsten Tag beigemischt. Zum Vernetzen der Moleküle wurden diese mit 4 ml 0,2% Glutaraldehyd versetzt und ü/N bei 4°C geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2 ml 1 M Glycin in Phosphatpuffer zugegeben und anschließend 1 h bei RT gerührt. Ü/N wurde gegen Phosphatpuffer dialysiert, um überschüssiges Glutaraldehyd zu entfernen.

Phosphatpuffer:

50 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)

50 mM DiNatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

pH 7,8

4.2.2 Immunisierung

Die Menge des verabreichten Antigens kann die Stärke und Spezifität der Immunantwort erheblich beeinflussen. So können zu niedrige bzw. zu hohe Antigenkonzentrationen zur sogenannten Niedrig- oder Hochzonentoleranz führen. Eine Verstärkung der Immunantwort kann durch gleichzeitige Zugabe von Adjuvansien erzielt werden. Freundesches Adjuvans (FA), eine Öl in Wasser Emulsion mit abgetöteten Mycobakterien, verzögert die Antigenfreisetzung, verstärkt außerdem die Aufnahme des Antigens durch Makrophagen und induziert Costimulatoren in den Makrophagen.

Nach der Kopplung (siehe B4.2.1) des Antigens an ein Trägermolekül wurde die Probe auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml gebracht und nach folgendem Schema dem Tier zugeführt.

| Tag | Prozedur | Bemerkung |
|-----|--|---------------------------------------|
| 0 | 1. Immunisierung | 100 µg Antigen + 100 µl FA komplett |
| 48 | 2. Immunisierung | 100 µg Antigen + 100 µl FA inkomplett |
| 58 | 1. Blutentnahme | Testen des Titers per Elisa |
| 78 | 3. Immunisierung | 50 µg Antigen + 100 µl FA inkomplett |
| 88 | 2. Blutentnahme | Testen des Titers per Elisa |
| 124 | 4. Immunisierung | 50 µg Antigen + 100 µl FA inkomplett |
| 127 | Fusion der isolierten Milzzellen ($\sim 1-1,5 \times 10^8$) mit Myelomzellen | |

Bei jeder Blutentnahme wurde die Antikörperproduktion mittels Elisa (B4.7) überprüft.

4.2.2.1 Isolierung von B-Lymphozyten

Am Tag der Fusion wurde einer immunisierten Maus die Milz steril entnommen und in serumfreies Medium überführt. Die Milz wurde nun klein geschnitten und mit ca. 10 ml serumfreies Medium mit einem Spritzenstempel durch ein steriles Gazenetzt durchpassiert. Mit einer Pasteurpipette wurde weiter suspendiert und anschließend die Zellzahl aus einer 1:10 Verdünnung bestimmt, wobei nur die stark lichtbrechenden Lymphoblasten gezählt wurden.

4.2.2.2 Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen

Die Flaschen mit den Myelomzellen wurden vor dem Trypsinieren mit 10 ml serumfreiem Medium gespült. Dann wurden die Flaschen mit 5 ml einer 1:3 verdünnten 2,5%igen Trypsinlösung (verdünnt mit sterilem PBS) für ungefähr 5min im Brutschrank, bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen vom Boden lösten. Mit 10 ml DMEM plus 15% FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Nach dem Pelletieren der Zellen (180 g), wurden sie mit einem Überschuss an serumfreiem Medium aufgenommen, erneut pelletiert und in 10 ml serumfreiem Medium aufgenommen. Dabei durften die Zellen nicht verklumpen. Nach Zählung der Zellen aus einer 1:10 Verdünnung wurden die Myelomzellen im Verhältnis 1:1 mit den isolierten B-Lymphozyten gemischt. Zum Ausplattieren wurden je 10 Platten für eine Milz vorgesehen, d.h. 5×10^7 Milzzellen wurden mit der gleichen Anzahl Myelomzellen fusioniert. Die Zellen wurden wieder pelletiert und verblieben anschließend mit dem Medium für eine h auf Eis (Milzzellen rot, Myelomzellen weiß). Es bildeten sich zwei homogene Schichten aus.

Nach der Inkubation auf Eis wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen durch leichtes Aufschlagen des Röhrchens vermengt. Nun wurde 1 ml PEG innerhalb von einer Minute vorsichtig am Rand einlaufen gelassen, wobei das Röhrchen immer wieder aufgeklopft wurde. Zum Schluss wurde das Pellet einmal mit der Pipette aufgesaugt. Nun wurden mit einer 10 ml Pipette 5 ml serumfreies Medium innerhalb von 5 min auf dieselbe Art langsam dazupipettiert. Das anschließende Ausverdünnen des PEG mit 50 ml serumfreiem Mediums erfolgte innerhalb von 15 min, nach dem gleichen Schema wie oben. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen 10 min mit 200 g pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das einheitlich rosa wirkende Pellet vorsichtig mit einer 10 ml Pipette in 4 ml HAT Medium suspendiert. Je 2 ml wurde mit 46 ml HAT vermischt und dann auf 5 Platten verteilt.

Nach 5-7 Tagen sollten die Milz- und Myelomzellen abgestorben sein. Wachsende Klone wurden mit HAT Medium gefüttert, ebenso nach einer weiteren Woche. Nach zwei Wochen

wurde auf HT Medium umgestellt. Nun wurden die wachsenden Klone per ELISA (siehe B4.7) getestet und nur die positiven Klone auf 24er Platten umgesetzt.

Bevor jedoch eine Hybridomzelllinie zur Produktion von monoklonalen Antikörpern verwendet werden kann, müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Die Hybridomzelllinie muss monoklonal sein, d.h. sie muss mindestens einmal rekloniert worden sein.
- Sie muss homogen sein, d.h. fast alle Zellen müssen den monoklonalen Antikörper produzieren
- Der Antikörper muss immunreaktiv sein (ELISA, Immunfluoreszenz).

4.2.3 Affinitätsreinigung

Zur Affinitätsreinigung der Antikörperseren wurde das SulfoLink Kit der Firma Pierce (Rockford) benutzt.

An eine Gelmatrix sind Iodoacetyl-Gruppen kovalent gebunden, die spezifisch mit Sulfhydrylgruppen reagieren können. Deshalb muss das Antigen, gegen das aufgereinigt wird, freie Sulfhydrylgruppen besitzen. Wenn ein Peptid als Antigen diente, wurde es mit einem C-terminalen Cysteinrest synthetisiert, Proteine mussten vor der Reaktion mit der Gelmatrix mit 2-Mercaptoethanolamin reduziert werden, um freie SH-Gruppen zu schaffen. Das Antikörperserum wurde zu der Gelmatrix mit gebundenem Antigen gegeben. Die antigenspezifischen Antikörper banden an das Antigen und konnten nach einigen Waschrissen durch eine pH-Wert-Änderung wieder eluiert werden. Der so gereinigte Antikörper konnte nun für die Immunhistochemie (siehe B4.6) verwendet werden.

4.2.4 Verwendete Primärantikörper

Tab. 1 : Verwendete Primärantikörper

| Antikörper | Tier | Antigen | Firma |
|------------------|-----------|--------------------|---------------|
| α Ngb#1 | Kaninchen | MmuNgb rekombinant | Charles River |
| α Ngb#2 | Kaninchen | HsaPeptid (aa2-16) | Charles River |
| α Ngb#103 | Huhn | HsaPeptid (aa2-16) | Eurogentec |
| α Ngb#104 | Huhn | HsaPeptid (aa2-16) | Eurogentec |
| α Ngb#133 | Huhn | MmuNgb rekombinant | Eurogentec |

Material und Methoden

| | | | |
|--------------|-----------|---------------------------|-------------------|
| αNgb#134 | Huhn | MmuNgb rekombinant | Eurogentec |
| αNgbTB1 | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa55-70) | Eurogentec |
| αNgbTB2 | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa55-70) | Eurogentec |
| αNgbTB3 | Kaninchen | MmuNgb+KLH | Universität Mainz |
| αNgbTB4 | Kaninchen | MmuNgb rekombinant | Universität Mainz |
| αNgbTB5A | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa46-61) | Seqlab |
| αNgbTB5B | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa93-107) | Seqlab |
| αNgbTB6A | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa46-61) | Seqlab |
| αNgbTB6B | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa93-107) | Seqlab |
| αNgbTB7 | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa55-70) | Eurogentec |
| DreNgb | Kaninchen | DreNgb rekombinant | Charles River |
| OmyNgb | Kaninchen | OmyNgb rekombinant | Charles River |
| Cygb1 | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa2-16) | Eurogentec |
| Cygb2 | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa66-80) | Eurogentec |
| Cygb3 | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa92-106) | Eurogentec |
| Cygb4 | Kaninchen | HsaNgb Peptid (aa176-190) | Eurogentec |
| Cygb | Kaninchen | rekombinantes Protein | Charles River |
| DmeGlobin | Kaninchen | rekombinantes DmgGlobin | Eurogentec |
| Cytochrome c | Maus | Cytochrome c | Dianova |
| Hsp47 | Maus | Hsp47 | Calbiochem |

4.3 Proteinfällung und –quantifizierung

4.3.1 Methanol-Chloroform-Fällung

Um störende Salze und Detergenzien aus Proteinproben zu entfernen, wurden die Proteine nach Wessel und Flugge (1984) Methanol-Chloroform gefällt.

100 µg Protein in 150 µl Lösung wurden mit 600 µl Methanol versetzt und gevortext. Nach Zugabe von 150 µl Chloroform wurde erneut gevortext und mit 450 µl H₂O versetzen. Nach 5 minütiger Zentrifugation (12000 rpm, Eppendorf Zentrifuge) wurde die obere Phase verworfen und die restliche Lösung mit 450 µl Methanol gemischt. Nach erneuter

Zentrifugation wurde das Pellet anschließend für 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in einem kleinen Volumen des entsprechenden Puffers gelöst.

4.3.2 Bradford

In Gegenwart von Proteinen verschiebt sich in einem sauren Milieu das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliantblue von 465 nm zu 595 nm. Der exakte Mechanismus ist noch nicht genau verstanden, jedoch könnte die Stabilisierung der unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form des Coomassies durch Komplexierung mit dem Protein ein Grund sein. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und nichtpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine.

Nachweisgrenze: 50-500 ng

Bradford-Reagenz:

| | |
|--|--------|
| 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250 | 100 mg |
| in 0,5% 95% Ethanol lösen | 50 ml |
| Zugabe 100 ml 85% H ₃ PO ₄ | |
| ad 1 l mit dH ₂ O | |

4.3.3 Spektroskopisch

Aromatische Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin gering) absorbieren Licht der Wellenlänge 280 nm.

Für Neuroglobin gilt: $1 \text{ OD}_{280} \approx 0,75 \text{ mg/ml}$

Für Cytoglobin gilt: $1 \text{ OD}_{280} \approx 0,9 \text{ mg/ml}$

Bei nukleinsäurehaltigen Proben bis zu 20% (w/v) gilt:

$$(1,55 \cdot \text{OD}_{280}) - (0,76 \cdot \text{OD}_{260}) = \text{Proteinkonzentration in mg/ml}$$

4.4 Nachweis und Quantifizierung von Proteinen im Polyacrylamidgel

4.4.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach dem denaturierenden und diskontinuierlichen System von Laemli (1970) durchgeführt. Nach Reduktion von Disulfidbrücken durch Thiolverbindungen wie z.B. DTT oder β -Mercaptoethanol kann SDS die Proteine mit einem negativem Ladungsmantel umgeben und dabei Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstören. Anschließend wurden die Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die zurückgelegte Strecke der

Proteine im Gel ist dabei über weite Strecken linear abhängig vom dekadischen Logarithmus der Molekülgrößen.

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,4% (w/v) SDS

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
0,4% (w/v) SDS

Elektrophoresepuffer: 23 mM Tris/HCl
190 mM Glycin
0,2% (w/v) SDS

Probenpuffer: 62,5 mM Tris/Cl pH 6,8
2% beta-Mercaptoethanol
10% (w/v) Glycerin
2% (w/v) SDS
0,1% Bromphenolblau

- Rotiphorese Gel30 Acrylamidlösung 37,5:1 (30% (w/v) Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid
- Ammoniumpersulfat (APS) 10% (w/v) in dH₂O
- N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED) 99% p.A.

Verwendet wurde die vertikale Elektrophoresekammer PHERO – minivert von Biotec Fischer (Reiskirchen) für zwei Gele im Format 80 x 82 mm.

4.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Eine der wenigen Methoden, die es ermöglichen, einzelne Proteine in einem komplexen Proteingemisch wie Gewebe oder Zellextrakten zu identifizieren, ist die zweidimensionale Gelelektrophorese. Dazu werden die Proteine nach zwei verschiedenen Eigenschaften in zwei separaten Schritten getrennt. Der erste Schritt ist die Auftrennung der Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten (1). Proteine sind amphiphile Moleküle, die je nach pH ihrer Umgebung positiv, negativ oder ungeladen sind. Die Nettoladung eines Proteins ist die Summe der Teilladungen seiner Aminosäuregruppen-Seitenketten. Am isoelektrischen Punkt ist die Nettoladung des Proteins Null. Bei einem pH unterhalb des pI sind Proteine positiv geladen, negativ geladen sind sie bei einem pH oberhalb des pI. In einem pH-Gradienten unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wandern positiv geladene Proteine zur

Kathode, negativ geladene zur Anode. Bei Annäherung an einen pH in der Nähe ihres pI, schwächt sich die Stärke ihrer Ladung ab. Die Wanderung wird gestoppt, sobald das Protein ungeladen ist, also bei einem pH = pI. Sollte das Protein wegdiffundieren, wird es sofort geladen und aufgrund des elektrischen Feldes wieder zu dem Bereich zurückwandern, bei dem der pH = pI ist. Hier spricht man von einer Fokussierung, die dazu beiträgt, dass es mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese möglich ist, Proteine mit geringen Ladungsunterschieden aufzutrennen. Anschließend erfolgt eine eindimensionale Gelelektrophorese, die nun die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt (siehe B4.4.1).

4.4.2.1 Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Bei der ursprünglichen Methode (O'Farrell 1975) bildet sich ein durch Carrierampholyte vermittelter pH-Gradient in einem Polyacrylamidrundgel während der Elektrophorese aus. Für diese Arbeit wurde jedoch ausschließlich das modifizierte Verfahren nach Bjellqvist (1982) verwendet. Hier wird durch kovalente Verknüpfung von basischen und sauren Puffergruppen an ein Polyacrylamidgel während der Polymerisation ein pH-Gradient erzeugt.

Probenaufbereitung

Das Gewebe wurde isoliert und anschließend in PBS homogenisiert. Zusätzlich wurden das Gewebe und die Zellen durch 1-2 stündiges Inkubieren in einem Sonifizierbad aufgeschlossen. Um Gewebereste und Zelltrümmer zu entfernen wurde 5 min bei 12000 rpm (Eppendorf Zentrifuge) abzentrifugiert. Nach einer Proteinbestimmung (siehe B4.3) des Überstandes wurden die Proteine Methanol-Chloroform gefällt (siehe B4.3.1), um eventuell störende Substanzen zu entfernen. Nun wurde das Proteinpellet in Probenpuffer gelöst und eine h bei Raumtemperatur inkubiert. Falls das Proteinpellet schwerlöslich war, wurde die Inkubation im Sonifizierwasserbad durchgeführt. Hierbei sollten die Proteine denaturiert und solubilisiert werden. Proteinaseinhibitor sollte eine Degradation der Proteine verhindern.

| | | |
|-----------------------------|---|--------------------|
| Probenpuffer: 9 M Harnstoff | } | Lagerung bei -20°C |
| 2% NP40 | | |
| 1% IGP Puffer (Amersham) | | |
| 20 mM DTT | | |
| 10 mM Pefabloc | } | frisch dazugeben |

Probenauftrag und Laufbedingungen

Die Proteinlösung wurde in die Elektrophoresekammer pipettiert. Darüber wurde blasenfrei der vorgefertigte Gelstreifen gelegt. Um eine Austrocknung während der Elektrophorese zu verhindern, wurde nun mit Mineralöl überschichtet, bis ein geschlossener Ölfilm entstand.

Material und Methoden

Elektrophoreseprogramm:

| | | |
|------------------|--|-------------------------------|
| Rehydratisierung | 12 h | |
| 300 V | 15 min, | 50 μ A/Strip, Step-n-hold |
| 500 V | 30 min, | 50 μ A/Strip, Step-n-hold |
| 1000 V | 60 min, | 50 μ A/Strip, Step-n-hold |
| 3000 V | 60 min, | 50 μ A/Strip, Step-n-hold |
| 8000 V | 420 min, | 50 μ A/Strip, Step-n-hold |
| 8000 V | bis 60000 Vhr, 50 μ A/Strip, Step-n-hold | |

Nach der 1. Dimension wurden die Gelstreifen 15 min in Äquilibrationpuffer 1 geschwenkt. Anschließend wurden sie 5 min in Äquilibrationpuffer 2 inkubiert, kurz mit Wasser gespült und dann für eine eindimensionale SDS-PAGE verwendet (siehe B4.4.2.2).

Äquilibrationpuffer 1

| | | |
|-------------------|-------|---------------|
| Tris/HCl, pH 6,8 | 50 mM | 10 ml (0,5 M) |
| Harnstoff | 6 M | 36 g |
| Glycerin | 30% | 30 ml (87%) |
| SDS | 2% | 2 g |
| DTT | 2% | 2 g |
| dH ₂ O | | ad 100 ml |

Äquilibrationpuffer 2

| | | |
|-------------------|-------|-------------------|
| Tris/HCL, pH 6,8 | 50 mM | 10 ml (0,5 M) |
| Harnstoff | 6 M | 36 g |
| Glycerin | 30% | 30 ml(87%) |
| SDS | 2% | 2 g |
| Iodacetamid | 2,5% | 2,5 g |
| Bromphenolblau | | Eine Spatelspitze |
| dH ₂ O | | ad 100 ml |

4.4.2.2 Zweite Dimension

Die Gelstreifen wurden nun auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgelegt und mit 1% Agar-Agar zur Fixierung auf der 2. Dimension überschichtet. Für Bedingungen und Puffer der Elektrophorese siehe B4.4.1.

4.4.3 Silberfärbung

Einige Silberionen werden von Proteinen gebunden und können so durch funktionelle Gruppen und Peptidbindungen zu Silberkeimen reduziert werden. Alle im Gel befindlichen Silberionen werden nun durch starke Reduktionsmittel zu Silber reduziert. Da dies verstärkt an den Silberkeimen der Proteine geschieht, färben sich Proteinbanden viel schneller schwärzlich. Zum Abstoppen genügt eine starke pH-Wert Änderung mit Essigsäure. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei ~5-30 ng.

Die Silberfärbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Hilfe des Roti-Black P der Firma Roth durchgeführt.

4.4.4 Coomassiefärbung

Reversibel können Proteine im SDS Polyacrylamidgel mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue gefärbt werden. Die Nachweisgrenze liegt hier bei ~ 100-200 ng.

Coomassie:

| | | |
|---|----------------------------------|---------|
| 0,2% | Coomassie Brilliant Blue R250 | 2 g |
| 40% | Methanol ü/N. unter Rühren lösen | 400 ml |
| 7,5% | Essigsäure | 75,2 ml |
| ad 1 l mit dH ₂ O, durch Faltenfilter filtrieren | | |
| bei RT verschlossen lagern | | |

Entfärber:

| | | |
|------------------------------|-------------|-------------------------|
| 20% | Isopropanol | 1000 ml |
| 7,5% | Essigsäure | 625 ml (60% Essigsäure) |
| ad 5 l mit dH ₂ O | | 3375 ml |

4.4.5 Phosphoproteindetektion

Zum Nachweis von Phosphoproteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde das „Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain“ Kit der Firma Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) verwendet. Es ermöglicht eine direkte Identifizierung von Phosphatgruppen, die an Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten gekoppelt sind. Die Intensität des Signals steigt mit zunehmender Anzahl der Phosphatgruppen linear an. Somit ist es möglich, den Grad der Phosphorylierung zu bestimmen.

Zunächst wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel über Nacht mit 50% Methanol, 10% Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel zweimal 10 min mit destilliertem Wasser

gewaschen und für zwei h in der Gelfärbelösung im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Entfärben (je 10 min) unter Lichtabschluss wurden markierte Phosphoproteine durch UV-Licht (300 nm) angeregt und emittierten dann bei 580 nm. Detektiert wurde die Fluoreszenz mit einem Transilluminator.

Fixierlsg.:

| | |
|-------------------|------------|
| 50% Methanol | 500 ml |
| 10% Essigsäure | 100 ml |
| dH ₂ O | ad 1000 ml |

Färbelsg.: Pro-Q Diamond Phosphoprotein stain Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA)

Entfärber: 50 ml 1M NaAc pH 4,0
750 ml dH₂O,
200 ml 1,2 Propandiol

4.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Westernblot)

4.5.1 Elektrotransfer

Beim Elektrotransfer werden die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten und fokussierten Proteine über ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulose oder PVDF Membran übertragen. Dabei bleiben die Lagebeziehungen der Proteine zueinander erhalten. Aufgrund der guten Zugänglichkeit der Proteine für Antikörper sind nun spezifische Nachweisreaktionen (z.B. Antikörperdetektion) durchführbar.

Hier wurde das Semidry Verfahren nach Kyse-Anderson (1984) verwendet.

TRANSFER-PUFFER

| | | |
|--------|----------|-------------------|
| | | 1 Liter (pH 8,3): |
| 39 mM | Glycin | 2,9 g Glycin |
| 48 mM | Tris | 5,8 g Tris |
| 0,037% | SDS | 0,37 g SDS |
| 20% | Methanol | 200 ml Methanol |

4.5.2 PonceauS

Um alle Proteine reversibel auf Nitrocellulose-Membranen zu färben, wurde die Membran in 1:10 verdünnter PonceauS-Lösung (Sigma, Deisenhofen) gefärbt. Durch waschen in dH₂O wurde der Hintergrund entfärbt. Nun wurden Proteinbanden der gewünschten Größe und der

Marker mit Bleistift markiert und anschließend die PonceauS Färbung wieder vollständig durch dH₂O entfernt.

4.5.3 Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern

Nach Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran und den transferierten Proteinen mit 2% igem BSA in TBS, wurde die Membran ü/N bei 4°C mit dem Primärantikörper (1:500 – 1:2000 in 2% BSA) inkubiert. Nach 15 min waschen (3 x mal TBS wechseln) wurde die Membran eine h mit einem Phosphatase gekoppeltem Sekundärantikörper (1:10000 in 1% BSA) inkubiert. Zum Anfärben wurde die Membran nach erneutem waschen in 10 ml AP-Puffer, 66 µl NBT und 33 µl BCIP gegeben. Nachdem die braun-violetten Banden gut sichtbar waren, wurde die Membran zum Abstoppen der Farbreaktion mit dH₂O gespült. In TBS gelagert konnte sie später für weitere Detektionen mit anderen Primärantikörpern verwendet werden.

TBS:

| | |
|----------------------|--------|
| 10 mM Tris | 1,21 g |
| 0,14 M NaCl | 8,18 g |
| dH ₂ O ad | 1 l |
| pH | 8,0 |

AP-Puffer:

| | |
|----------------------|--------|
| 100 mM Tris | 12,1 g |
| 100 mM NaCl | 5,85 g |
| dH ₂ O ad | 1 l |
| pH | 9,5 |

BCIP: 50 mg/ml BCIP-Pulver in 100% Dimethylformamid, 4°C lagern

NBT: 50 mg/ml in 70% Dimethylformamid, -20°C lagern

Verwendete Sekundärantikörper:

polyklonaler anti-Kaninchen-IgG-Ak aus Ziege, Alkalische Phosphatase gekoppelt (Dianova).

polyklonaler anti-Huhn-IgY (IgG)-F(ab')₂-Fragment-Ak, Alkalische Phosphatase gekoppelt (Dianova).

4.6 Immunhistochemie und Immunzytochemie

4.6.1 Fixierung

Zum besseren Erhalt der Gewebe und Zellkulturen mussten diese vor der Verwendung im Kryostat fixiert werden.

4.6.1.1 Fixierung von Zellkulturen

Nach dem Aufschleudern der Zellen auf einen Objektträger mit einer Zellzentrifuge wurden diese für 5 min mit Ethanol/Eisessig 95:5 fixiert.

4.6.1.2 Fixierung von *Drosophila melanogaster*

Die Fruchtfliegen (Adulte bzw. Larven) wurden zunächst in Carnoy-Lösung betäubt und anschließend so lange gewartet, bis sich ihr Körper gerade streckte. Zur Fixierung wurden die Tiere über Nacht bei 4°C in BT-Fix/PFA fixiert. Um eine bessere Zugänglichkeit des Fixativs zu gewährleisten, wurden sie zuvor mit einer feinen Nadel angestochen. Nach zweimaligem Waschen in BT-Fix wurden die Versuchstiere in flüssigen, nicht zu heißen (50~60°C) Agar überführt, ausgerichtet und zu möglichst kleinen Blöcken zugeschnitten. Die Blöcke mussten vor dem Anfertigen von Gefrierschnitten bis zum Absinken in 30% Sucrose bei 4°C gelagert werden

| | |
|------------------|--|
| Carnoy: | 6 Teile 98% Ethanol p.a. 3 Teile Chloroform 1 Teil Eisessig |
| Paraformaldehyd: | 4% oder 8% in PBS pH 7,4 |
| BT-Fix: | 8% Saccharose (w/v) 0,24 M CaCl ₂ 0,2 M NaH ₂ PO ₄ ad 100 ml dH ₂ O pH 7,4 |
| BT-Fix/PFA: | Mischung 1:1 BT-Fix/PFA |
| Agar/Saccharose: | 1,5% Agar (w/v) 5% Saccharose (w/v) ad 50 ml dH ₂ O (aufkochen) |

4.6.1.3 Perfusionsfixierung von Säugetieren

Die Tiere wurden mit Tribromoethanol (0,3 g/kg Körpergewicht) betäubt und zunächst mit 100 ml 0,1 M PBS und 15.000 IU Heparin/Liter transcardial bei Raumtemperatur durchspült. Anschließend wurde mit ca. 200 ml eiskaltem 4% Paraformaldehyd, 1,27% L-Lysin, 0,21% Natriumperodat in PBS mit einem konstanten Fluss von 10 ml/min perfusionsfixiert. Das rechte Atrium wurde vorher geöffnet, um einen venösen Ausfluss des Fixativs zu gewährleisten. Die Organe und Gewebe wurden sofort entnommen und 1 h im selben Medium nachfixiert. Zur Lagerung bei 4°C konnten die Proben in PBS mehrere Tage bis wenige Wochen gelagert werden. Zur weiteren Verarbeitung wurden sie je eine h in PBS/10% Sucrose, PBS/20% Sucrose und anschließend ü/N in PBS/30% Sucrose überführt. Knochen wurden nach der Fixierung noch in 12,5% EDTA (pH 7,2-7,4), unter leichtem Schütteln für mehrere Tage bei Raumtemperatur entkalkt.

4.6.2 Gefrierschnitte

Zur Lokalisation von Proteinen im Gewebe und in Zellen wurden Gefrierschnitte der Gewebe mit einem Kryostat (Microm HM500 O) angefertigt. Die Temperatur von Schneidekammer und Messer betrug genau wie die Objekttemperatur -20 bis -30°C. Vor dem Schneiden wurden die Gewebe mit Cryo-embedding compound (Microm International GmbH, Walldorf-Heidelberg) ummantelt und auf dem Objektisch festgefroren. Die Schnitte wurden mit einer Schnittdicke von 14 µm angefertigt und sofort auf Superfrost-Plus® (Roth, Karlsruhe) Objektträger überführt. Nach dem Aufziehen der Schnitte mussten diese für 2h bei RT getrocknet werden, um ein besseres Anhaften am Objektträger zu gewährleisten.

4.6.3 Competitionstest

Zur Überprüfung der Spezifität des Primärantikörpers, wurde dieser ü/N bei 4°C mit 1-8 µg des jeweiligen rekombinanten Proteins inkubiert. Im Vergleich mit ungeblocktem Primärantikörper sollte dieser ein schwächeres oder gar kein Signal mehr im Gewebe verursachen. War dies nicht der Fall, kreuzreagierte der Antikörper mit anderen Molekülen.

4.6.4 Antikörperdetektion

Zur spezifischen Detektion von zellulären Antigenen mit Antikörpern wurden entweder Systeme verwendet, die auf fluoreszierenden Zweitantikörpern oder auf eine Peroxidase vermittelte Reaktion basierten.

Nach der Fixierung wurden die Proben für eine h mit 2% BSA/PBS inkubiert um unspezifische Bindungsstellen für Proteine im Gewebe und auf dem Objektträger abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:20 – 1:100) in 2% BSA und wasserdampfgesättigter Umgebung ü/N bei 4°C. Nach dreimaligem waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper nach Angaben des Herstellers.

4.6.4.1 Peroxidasenachweis

Das verwendete System (UltraVision Detection System, Dianova) basiert auf der Streptavidin / Biotin-Peroxidase Signalverstärkungsmethode. Bei dieser Methode wird die Probe zunächst mit einem unmarkiertem Primärantikörper inkubiert. Der Nachweis des Antigens bzw. des Primärantikörpers erfolgt anschließend durch die Inkubation mit biotyniliertem Sekundärantikörper, gefolgt von dem Streptavidin-Peroxidasekomplex und der folgenden Umsetzung des Substrates 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) mit Hilfe von Wasserstoffperoxid. Die positive Reaktion ist an einer rötlich bis braunen Färbung zu erkennen. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Diese Methode eignet sich jedoch nicht für Gewebe mit hoher interner Peroxidaseaktivität (z.B. Leber), da hier zunächst die Enzymaktivität durch H_2O_2 inaktiviert werden muss. Dies kann zur Zerstörung von Teilen des Gewebes führen.

4.6.4.2 Fluoreszenznachweis

Eine sensitivere Methode zur Detektion des Primärantikörpers ist sein Nachweis über einen direkt an den Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff. Hier wurde das fotostabile Fluorochrom Indocarbocyanin (Cy3) und bei Doppelmarkierungen zusätzlich der Farbstoff Carbocyanin (Cy2) verwendet. Cy3/Cy2 wird anschließend bei 550/492 nm maximal angeregt, was durch den Einsatz von Argonlasern, Helium/Neon-Lasern oder durch Quecksilberlampen erfolgen kann und emittiert dann bei 570/510 nm.

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:200 in 2% BSA) erfolgte im Dunkeln, zum Schutz des Fluorochroms, für 90 min in wasserdampfgesättigter Umgebung. Nach erneutem Waschen und Entfernen von überschüssigem Wasser wurde der Schnitt eingedeckelt (siehe 4.6.4.3).

4.6.4.3 Herstellung des Einbettmediums

Als Einbettmedium wurde Mowiol®4-88 (Calbiochem, La Jolla, USA)-Lösung verwendet. Dazu wurde der pH-Wert des PBS-Puffers auf 8,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Nach dem Abkühlen wurden 20 g Mowiol unter Rühren ca. 24 h bei Raumtemperatur in 80 ml PBS gelöst. Anschließend wurden 40 ml wasserfreies Glycerin (Glycerin 99%, Serva, Heidelberg) zugesetzt und über Nacht gerührt. Das Gemisch wurde anschließend für 15 min bei Raumtemperatur mit 12000 rpm (Sorvall, Rotor SS34) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren. Einmal aufgetaute Aliquots wurden bei 4°C gelagert

4.6.4.4 Mikroskopieren und Fotografieren

Es wurde das Epifluoreszenzmikroskop Leitz DM/RBD (Leica, Wetzlar) verwendet. Als UV-Lichtquelle diente eine Quecksilberhöchstdrucklampe (HB050) vom Typ L1. Die Phasenkontrast- / und Fluoreszenzaufnahmen wurden mit den Objektiven PL Fluotar, 10 x / 0,30, 40 x / 0,70, 40 x / 1,0 (Ölimmersion) und PL APO 63 x / 1,32 (Ölimmersion) durchgeführt (Okular 10-25 fach).

4.6.4.5 Doppelmarkierungen

Bei Doppelmarkierungen mussten die verschiedenen Primärantikörper aus verschiedenen Spezies stammen, um eine spezifische Detektion mit den jeweiligen Sekundärantikörpern zu gewährleisten.

Die Nachweisreaktionen wurden für jeden Primärantikörper separat nacheinander, wie in B4.6.4.2 beschrieben, durchgeführt. Das Fluorochrom des zweiten Sekundärantikörpers musste jedoch andere Emissionsmaxima als der erste Sekundärantikörper besitzen. Neben dem bereits erwähnten Fluorochrom Cy3 (siehe B4.6.4.2) wurde noch Cy2 mit einem Absorptionsmaximum von 492 nm und einem Emissionsmaximum von 510 nm verwendet.

Die verwendeten Sekundärantikörper wurden von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen.

- polyklonaler anti-Kaninchen-IgG-F(ab')₂-Fragment-Ak aus Ziege, Cy3TM gekoppelt
- polyklonaler anti-Maus-IgG-F(ab')₂-Fragment-Ak aus Ziege, Cy3TM gekoppelt
- polyklonaler anti-Maus-IgG-F(ab')₂-Fragment-Ak aus Ziege, Cy2TM gekoppelt
- polyklonaler anti-Huhn-IgY (IgG)-F(ab')₂-Fragment-Ak aus Esel, Cy3TM gekoppelt

4.7 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay; Engvall & Perlman, 1971)

Um die Vielzahl angefallener Zellkulturüberstände der monoklonalen Antikörperproduktion auf ihre Aktivität zu testen, wurde ein Hochdurchsatzverfahren, ELISA, verwendet. Hiermit ist es möglich, in wenigen Stunden hunderte von Seren zu charakterisieren.

96-Loch Mikrotiterplatten (Qiagen) wurden für 2 h mit 50 ng/50 µl Antigen in PBS beschichtet (keine kovalente Verknüpfung). Mit 2%igem BSA/PBS wurden freie Proteinbindungsstellen auf den Platten und dem Antigen für eine Stunde abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 2% BSA/PBS ü/N oder für 2 h bei Raumtemperatur. Dabei wurde mit Verdünnungen von 1:1.000.000 bis unverdünnt gearbeitet. Nach erneutem Waschen wurde für 90 min mit einem Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper (Dianova) 1:10.000 in PBS verdünnt, inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der gebundene Antikörper durch Färbung mit 1 mg/ml O-Phenylenediamin in Phosphat-Citrat-Puffer nachgewiesen. Nach 30 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 25 µl 4,5 molarer Schwefelsäure pro Loch gestoppt und die Absorption bei 492 nm mit einem Mikrotiterplattenreader bestimmt.

PBS-Puffer (10x): (Phosphate Buffered Saline)

| | | |
|-----|--|--------|
| 1 l | 1,4 M NaCl | 81,8 g |
| | 27 mM KCl | 2,0 g |
| | 81 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | 14,4 g |
| | 15 mM KH ₂ PO ₄ | 2 g |

PBST: PBS + 0,03% TWEEN

Phosphat-Citratpuffer:

| | |
|---|---------------------------|
| 34,7 mM | Citronensäure-1-hydrat |
| 66,7 mM | DiNatriumhydrogenphosphat |
| pH/OH 5,0 | |
| + 5 µl H ₂ O ₂ (30%)/10 ml Puffer | |

4.8 Two-Hybrid System

Eine Methode zur *in vivo* Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen ist das Two-Hybrid System (Fields and Song, 1989). Es können entweder gezielt spezifische Interaktionen untersucht werden, es ist aber auch möglich, bei unbekanntem Proteinen Expressionsbanken nach einem oder mehreren Interaktionspartnern zu durchsuchen. Vor der Verwendung des Two-Hybrid Systems muss jedoch überprüft werden, ob das zu untersuchende Protein zur Dimerisierung neigt, autonom die Reportergene aktiviert oder toxisch auf die Expressionszellen wirkt. Wenn dies der Fall ist, kann das Two-Hybrid System nicht verwendet werden.

4.8.1 BacterioMatch Two-Hybrid (Stratagene)

Das zu untersuchende Protein oder Köderprotein (bait) wurde durch Expression in *E.coli* im pBT Bait Vektor mit einer Nterminalen DNA Bindedomäne und carboxyterminal mit einer Dimerisierungsdomäne fusioniert. Das Zielprotein oder eine cDNA-Bank wurde durch Expression im pTRG Target Vektor an die N-terminale Domäne der α Untereinheit einer RNA-Polymerase fusioniert. Bei einer Coexpression beider Vektoren im „BacterioMatch™ Two-Hybrid System Reporter Strain“ bindet der Köder durch die DNA Bindedomäne an die Operator Sequenz 5' vom Reporter Promoter und ermöglicht bei einer Interaktion des Köders mit dem Zielprotein ein Rekrutieren und Stabilisieren der Bindung der RNA-Polymerase nahe dem Promotor. So wird die Transkription des Reportergens Carbenicillin aktiviert. Ein zweites Reportergen, die beta-Galactosidase, wird über denselben Promoter reguliert, was eine weitere Kontrolle der Interaktion liefert. Es ist auch möglich, eine Aussage über die Stärke der Interaktion abzuleiten, da eine höhere Resistenz gegen Carbenicillin und eine erhöhte β -Galactosidase Aktivität aus einer stärkeren Interaktion resultieren.

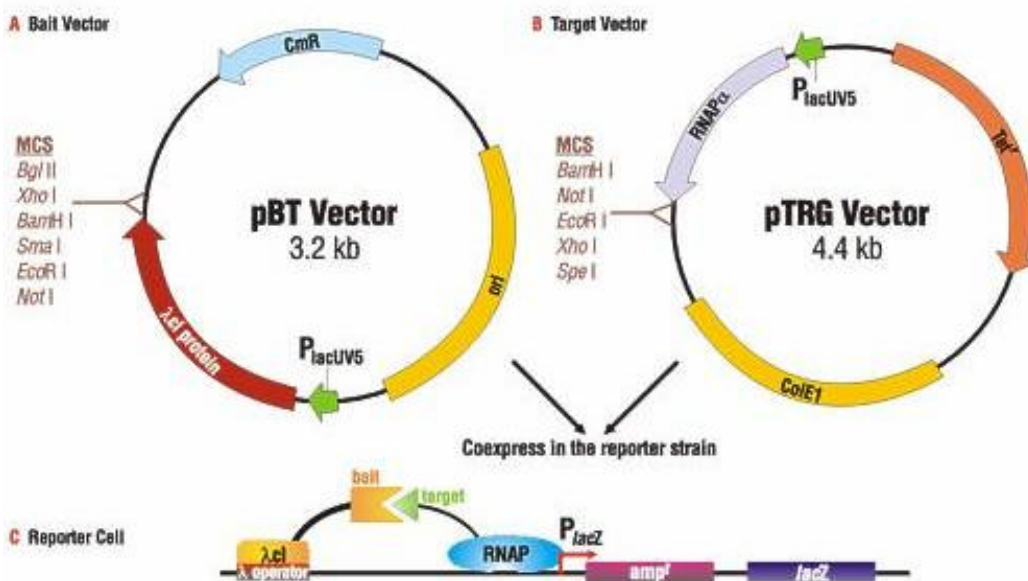


Abb. 13: Interaktion der BacterioMatch Two-Hybrid Vektoren pBT und pTRG.

4.8.2 Matchmaker Hefe Two-Hybrid (Clontech)

Das Köderprotein wird hier als Fusionsprotein mit einer GAL4DNA Bindedomäne exprimiert, während das Zielprotein oder eine cDNA Bank mit der GAL4 Aktivierungsdomäne fusioniert exprimiert wird. Interagieren Köder und Zielprotein, kommt es zu einer Aktivierung der Transkription der Reportergene HIS3, ADE2, MEL1 und lacZ. Diese werden im Gegensatz zum bakteriellen System unabhängig voneinander und unterschiedlich stark reguliert. Durch die Gene HIS3 und ADE2 erhält die Hefe die Fähigkeit, auf dem entsprechenden Mangelmedium ohne Histidin oder Adenin zu wachsen. Wenn nur nach sehr starken Interaktionspartnern gesucht wird, muss auf ADE2 und HIS3 selektioniert werden. Wenn man schwache Interaktionen identifizieren will, muss nach HIS3 allein selektioniert werden. Positive Wechselwirkungen können durch ihren MEL1 (α -Galactosidase) oder lacZ (β -Galactosidase) Phänotyp bestätigt werden. Wobei die α -Galactosidase ein sekretorisches Protein ist und somit direkt auf einer X-a-Gal Indikatorplatte nachgewiesen werden kann. Zur Steigerung der Sensitivität und Minimierung des Hintergrunds muss beim β -Galactosidasetest der Koloniefilter Assay (Breedon & Nasmyth, 1985) benutzt werden.

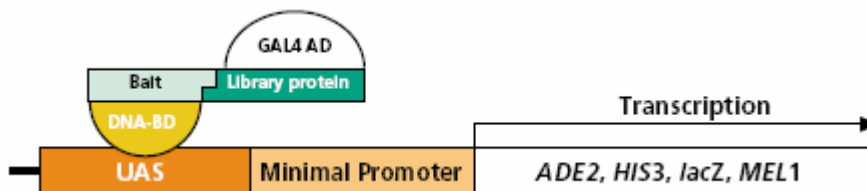


Abb. 14: Interaktion der GAL4Aktivierungsdomäne mit der GAL4DNA-Bindedomäne.

5 Molekularbiologische Methoden

5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

5.1.1 Plasmid-Isolierung

Um Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen zu isolieren, wurde das "E.Z.N.A Miniprep Kit" der Firma Peqlab (Erlangen) nach Anleitung verwendet. Dieses System beruht auf dem System der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Die Bakterien werden über Nacht kultiviert, pelletiert und anschließend lysiert. Nach dem Neutralisieren wird der Ansatz durch einen kurzen Zentrifugationsschritt geklärt und das Lysat in eine Zentrifugationssäule gegeben. Hier bindet die episomale DNA an ein Hi-Bind®-Silikafilterfließ und kann so problemlos gewaschen und nach der Trocknung der Säule mit 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) von der Säule gelöst werden.

5.1.2 DNA-Gelelektrophorese

Eine Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA ist die Elektrophorese in Agarosegelen. Da Nukleinsäuren über einen großen pH-Bereich hinweg negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld in Richtung Anode. DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe lassen sich dabei auftrennen, da Masse und Ladung der DNA-Fragmente bei einem pH > 5 zueinander proportional sind und somit die Laufstrecke im Gel von der Größe des Fragments abhängt (vorausgesetzt, es handelt sich um linearisierte DNA). Je nach Größe der zu untersuchenden Fragmente wurden 0,6–2%ige Agarosegele verwendet. Dabei gilt: für kleine Fragmente werden höherprozentige Gele benutzt als für große Fragmente.

Die entsprechende Menge an Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TBE-Puffer (Mikrowelle) gelöst. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Kammern bei 40-120 V. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet, der zum Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 mg/L) versetzt war. Ethidiumbromid kann aufgrund seiner planaren Form in die große Furche doppelsträngiger DNA interkalieren und diese über seine Fluoreszenz bei 590 nm (nach UV-Anregung durch einen Transilluminator) sichtbar machen. Zum Beschweren und Anfärben der DNA-Proben wurden diese vor dem Auftrag mit Auftragspuffer versetzt. Als Größen- und Konzentrationsvergleich dienten Längenstandards, die in definierter Menge mit auf das Gel aufgetragen wurden.

TBE (10x): Tris-Bor-EDTA
1 l 0,9 M Tris 108 g
0,9 M Borsäure 55,6 g
20 mM EDTA 4,65 g (40 ml 0,5 M EDTA pH 8,3)
pH 8,3

Ethidiumbromid: 10 mg/ml

Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)
Lambda-DNA x EcoRI+HindIII (Fermentas)

6x "Loading Dye": 0.09% Bromophenolblau, 0.09% Xylene cyanol FF, 60% Glycerin und
60 mM EDTA

5.1.3 Konzentrationsbestimmung

Bei relativ großen DNA-Mengen wurde die Konzentration fotometrisch über das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm bestimmt. Dabei entsprechen 50 µg DNA/ml einer Extinktion von 1.

Gleichzeitig wurde ein Spektrum der DNA-Lösung zwischen 200 und 300 nm aufgenommen, anhand dessen man die Reinheit der DNA-Lösung überprüfen kann. Dazu wird der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und dem Wert bei 280 nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Proteine, vor allem Tryptophan) berechnet. Bei einer reinen DNA-Lösung sollte dieser Wert mindestens 1,8 betragen.

Zur Abschätzung kleinerer DNA-Mengen diente der Vergleich der Fluoreszenz der Probe mit der eines Basenpaarstandards definierter DNA-Konzentration), der bei der Gelelektrophorese mitlief.

5.1.4 Gelextraktion

PCR-Produkte und geschnittene Vektoren wurden per Agarose-Gelelektrophorese auf richtige Größe untersucht und aufgereinigt. Zur Weiterverarbeitung wurde das gewünschte Fragment unter UV-Licht zügig mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit Hilfe eines Gelelutions-Kits (Nucleotrap, Macherey und Nagel GmbH, Düren) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert. Die Aufnahme der extrahierten DNA erfolgte in dH₂O.

5.1.5 RNA-Isolation

Um RNA aus frischem Gewebe zu isolieren, wurde dieses zunächst in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Zum Aufbrechen von Zellen und Denaturieren von Proteinen wurde das zerkleinerte Gewebe in GITC-Puffer aufgenommen.

Durch die anschließende Zugabe von saurem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 sollten Protein-bzw. DNA-Kontaminationen beseitigt werden, da sich DNA in saurem Phenol besser löst und Proteine durch Chloroform zusätzlich denaturiert werden. Isoamylalkohol sollte eine Schaumbildung beim Ausschütteln verhindern (Chirgwin et al., 1979).

GITC-Puffer:

- 100 g Guanidinisothiocyanat in 117 ml dH₂O lösen
- 7,0 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0
- 10,6 ml 10% Natrium-N-Lauroylsarcosinat
- 1,52 ml β -Mercaptoethanol

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

5.1.6 mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA

Für die Isolation von mRNA aus einer Gesamt-RNA-Lösung wurde das „PolyAttract mRNA Isolation System IV“ („small scale“) von Promega (Mannheim) verwendet. Bei diesem System bindet ein mit Biotin markierter oligo(dT)-Primer spezifisch an die 3'-poly(A) Region der mRNA. Das Biotin wiederum reagiert mit Streptavidin, an welches ein paramagnetischer Partikel (PMP) gekoppelt ist. In einem Magnetfeld wird dieser Komplex festgehalten, während die restliche RNA (und eventuell noch vorhandene DNA) abgewaschen wird. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

5.1.7 RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen, die mit Formaldehyd als denaturierendem Agens versetzt wurden, das gleichzeitig noch die Aktivität von RNasen während der Elektrophorese reduzierte.

Ansatz für ein horizontales Minigel:

- 0,4 g Agarose
- 4 ml 10 x MOPS-Puffer
- 30 ml dH₂O

aufkochen und abkühlen auf ca. 50°C

6,8 ml Formaldehyd dazugeben

| | |
|----------------------|---|
| 10 x MOPS-Puffer | 0,2 M MOPS, pH 7 0,05 M NaAcetat, pH 7 |
| 10 x Beladungspuffer | 50% Glycerin 0,4% Bromphenolblau 0,4% Xylencyanol 10 x TBE |

Vorbereiten der Proben:

6 µl RNA-Lösung

12 µl Formamid

2,5 µl 10x MOPS

4 µl Formaldehyd 37%

Der Ansatz wurde für 5 min bei 70°C denaturiert und dann auf Eiswasser abgekühlt.

+ 2 µl Beladungspuffer

+ 0,5 µl Ethidiumbromid, direkt in die Probentasche gegeben

5.2 Amplifikation von Nukleinsäuren

5.2.1 Verwendete Primer

| Primer | Sequenz 5'-3' |
|--------------|---------------------------------------|
| HsaNGB-BamHI | 5'-GGTGGATCCTTACTCGCCATCCCAGCCTCG-3' |
| HsaNGB-NdeI | 5'-GACCATATGGAGCGCCCGGAGCCCGAGCTG-3' |
| MmuNgb-EcoRI | 5'-AGAGAATTCTATGGAGCGCCCGGAG-3' |
| MmuNgbNotI | 5'-AGATGCGGCCGCGGAGCGCCCGGAGTCAGA-3' |
| MmuCygbEcoRI | 5'-AGAGAATTCTATGGAGAAAAGTGCCG-3' |
| MmuCygbNotI | 5'-AGATGCGGCCGCGGAGAAAAGTGCCGGGCGA-3' |
| NdeI-OmyNgb | 5'-ACCCTGCATATGGAGAAGCTGACAGAGAAA-3' |
| BamHI-OmyNgb | 5'-GCAGGATCCTCAGTCAGTCTTGTGTTCCCC-3' |
| NdeIDreCygb | 5'-AGCGTCCATATGGAGGGAGACGGAGGA-3' |
| BglIIDreCygb | 5'-TTGAGATCTTCACTTTTTGCTGTTCTCCCA-3' |
| pTRG forward | 5'-CAGCCTGAAGTGAAAGAA-3' |
| pTRG reverse | 5'-ATTCGTCGCCCGCCATAA-3' |
| pBT forward | 5'-TCCGTTGTGGGGAAAAGTTATC-3' |
| pBT reverse | 5'-GGTAGCCAGCAGCATCC-3' |
| DreMbNde | 5'-GCGACAGCATATGGCTGATCATGATC-3' |

| | |
|-------------|--------------------------------|
| DreMbBamHI | 5'-AGCGGATCCACCGGCAAATCCG-3' |
| DreHbbNde | 5'-GGCTGTACATATGGTTGAGTGG-3' |
| DreHbbBglII | 5'-GATAGATCTCTAGTGGTACTGTCT-3' |
| DreHbaNde | 5'-AAACGCACATATGAGTCTCTCTG-3' |
| DreHbaBglII | 5'-ACTAGATCTTTAGCGGTACTTCTC-3' |

5.2.2 PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist ein *in-vitro* Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäureabschnitten. Doppelsträngige (Matrizen-) DNA muss zunächst bei jedem Zyklus durch Denaturierung bei 94°C in ihre Einzelstränge zerlegt werden. Der nächste Schritt ist die Anlagerung (Annealing) der Primer an die komplementären Sequenzen der Einzelstränge. Die Annealing-Temperatur richtet sich hierbei nach den Schmelztemperaturen der beiden Primer. Diese sollte sich nicht allzu sehr von einander unterscheiden, da die Anlagerung der Primer entscheidend für die Spezifität der PCR ist. Die von den Primern ausgehende Synthese des komplementären Stranges (Elongation) erfolgt bei einer Temperatur von 72°C. Sie ist abhängig von der zu erwartenden Länge der Zielsequenz (pro Minute wird von der Taq-Polymerase ~1 kb synthetisiert). Hier liegt das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase (isoliert aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus*).

Der neu synthetisierte Strang dient im nächsten Zyklus zusätzlich als Matrize. Durch diese exponentielle Vervielfältigung, liegt normalerweise nach 30-35 Zyklen genug Material zur weiteren Analyse zur Verfügung. Anschließend wird der Ansatz noch einmal auf 72°C erwärmt, um unvollständig synthetisierte Fragmente zu komplettieren und an dem 3'Ende ein überhängendes Adenosinnucleotidtriphosphat anzuhängen.

Alle PCR-Experimente wurden in Thermocyclern der Firmen Biometra® (TGradient) und Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) durchgeführt.

5.2.3 RT-PCR

RNA kann nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden und muss deshalb zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Enzyme, die den komplementären DNA-Strang (cDNA) synthetisieren, nennt man Reverse Transkriptasen. Anschließend kann eine Standard PCR durchgeführt werden. Es wurde hier das One Step RT-PCR Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Experimente wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.3 Klonierung

5.3.1 Ligation

Die Inserts und der Expressionsvektor wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut (siehe B5.4) und die dadurch hergestellten „sticky-ends“ durch eine T4 DNA-Ligase (Fermentas) miteinander verknüpft. Dabei betrug das molare Verhältnis von Vektor zu Insert mindestens 1:3, die Gesamtmenge an eingesetzter DNA mindestens 100 ng und die Enzymmenge 1 U. Außerdem wurden noch 1 µl 10 x Ligasepuffer zugefügt. Der Ligationsansatz wurde auf ein Endvolumen von 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt, gut gemischt, ü/N bei 8°C inkubiert und dann transformiert.

5.3.2 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von Fremd-DNA (z.B. gentechnisch veränderter Plasmide) in transformationskompetente Bakterienzellen. Die verwendeten Vektoren verleihen den Bakterien ein zusätzliches Resistenzgen (B5.6). Die Antibiotikaresistenz der neu transformierten Klone wurde als Selektionsmerkmal genutzt. Zunächst wurden kompetente, d.h. zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigte Zellen, hergestellt (B2.5). 100 µl kompetenter Zellen wurden mit dem Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 20 sekündigem Hitzeschock und kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Zellen zur Erholung mit 900 µl LB-Medium versetzt und für zwei h bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation (1000 g) und Abnahme von überschüssigem Medium wurde der Ansatz auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

5.3.3 Klonierung von PCR Produkten

Zum Klonieren von PCR-Produkten wurden diese zunächst über ein Agarosegel aufgetrennt (B5.1.2), die DNA Bande mit der zu erwartenden Größe ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (B5.1.4). Anschließend wurde das TopoTA System der Firma Invitrogen verwendet, um das PCR Fragment in dem pCR4 TOPO Vektor zu verfielfältigen.

5.4 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde durchgeführt, um isolierte Plasmide auf ihre Qualität zu untersuchen oder um Insert und Vektor für die Ligation vorzubereiten.

Der DNA-Verdau wurde nach Vorschrift des Herstellers und in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Es wurde pro µg DNA mindestens eine Unit (meistens jedoch 4-5 U) Enzym

eingesetzt. Dabei entspricht eine U der Menge an Enzym, die in einer h bei optimalen Bedingungen (Temperatur, Puffer) 1 µg DNA vollständig verdaut. Bei einem Doppelverdau wurde der laut Herstellerangabe optimale Puffer verwendet.

5.5 Dephosphorylierung des Vektors

Um das Religieren des Vektors zu verhindern wurde dieser vor der Ligation für 30 min bei 37°C mit alkalischer Phosphatase behandelt, um Phosphatgruppen am 5'-Ende zu entfernen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA für 10 min bei 72°C gestoppt. Anschließend wurde eine PCR-Reinigung (Qiagen) durchgeführt, um überschüssige Phosphatase und Nukleotide zu beseitigen.

Dephosphorylierungsansatz: x µl Vektor (ca. 4-5 µg)
 10 µl 10 x Puffer
 1 µl Alkalische Phosphatase
 ad 100 µl H₂O

5.6 Vektoren

| Plasmid | Funktion | System | Resistenz |
|---------|---|--------------------------|----------------------|
| pACT 2 | Zielgen fusioniert mit Gal4 AD | Hefe Two-Hybrid | Ampicillin |
| pGBKT77 | Zielgen fusioniert mit Gal4 BD | Hefe Two-Hybrid | Kanamycin |
| pTRG | Zielgen fusioniert mit aUE der RNA Polymerase | Bacteriomatch Two-Hybrid | Tetracyclin |
| pBT | Zielgen fusioniert mit DNA Bindedomäne und einer Dimerisierungsdomäne | Bacteriomatch Two-Hybrid | Chloramphenicol |
| pET3a | Überexpression | pET System | Ampicillin |
| TopoTA | Klonierung von PCR-Produkten | TopoTA | Ampicillin/Kanamycin |

5.7 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von den Firmen SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) und GENTERprise (Mainz) nach dem „Taq Dye Terminator Cycle Sequencing“-Prinzip durchgeführt. Die Aufarbeitung der Sequenzchromatogramme erfolgte mit dem Computerprogramm Chromas.

C Ergebnisse

1 Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern

Mit Hilfe von Antikörpern ist es möglich Proteine zellulär sowie subzellulär zu lokalisieren und daraus Rückschlüsse auf ihre Funktion zu ziehen. Im Folgenden wird die Herstellung und Charakterisierung der verschiedenen verwendeten Antikörper beschrieben.

1.1 Antigenproduktion

Als Antigene dienen entweder synthetisch hergestellte Peptide (vergleiche B4.2, **Tab. 3**) oder rekombinant exprimierte Proteine (vergleiche B4.1) der entsprechenden Globine.

Für die rekombinante Expression der Globine wurde zunächst die kodierende Sequenz des jeweiligen Globins über RT-PCR amplifiziert (vergleiche B5.2.3), in einen Expressionsvektor kloniert (siehe B5.3.2) und in *E.coli* überexprimiert (vergleiche B4.1.2). Nach dem Pelletieren der Bakterien (vergleiche **Abb. 15/1**) und Entfernung von überschüssigem Medium enthielt das Bakterienpellet neben dem Zielprotein noch DNA-, RNA- und Bakterienprotein-Kontaminationen. Durch die vier folgenden Reinigungsschritte, Nukleinsäureverdau (vergleiche **Abb. 15/2**), Ammoniumsulfatfällung (**Abb. 15/3**), Ionenaustauschchromatographie (vergleiche **Abb. 15/4**) und Größenfraktionierung (vergleiche **Abb. 15/5**), sollte das jeweilige Globin in der Probe angereichert werden. Der Erfolg der einzelnen Konzentrierungsschritte wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

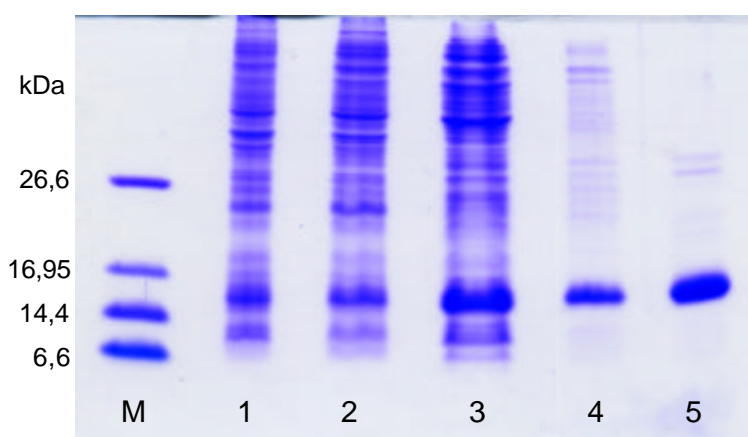


Abb. 15: Reinigung von rekombinant exprimiertem Protein am Beispiel von murinem Ngb. M = Marker; 1 = Bakterienpellet; 2 = nach DNA- und RNA-Verdau; 3 = Proteinpellet nach dem Aussätzen; 4 = nach DEAE Säule; 5 = nach Größenfraktionierung.

Abb. 15 zeigt beispielhaft, wie sich durch die verschiedenen Reinigungsschritte das exprimierte Protein (bei ~ 15 kDa) in der Probe anreichert bzw. andere Proteine und

Ergebnisse

Nukleinsäuren aus der Probe entfernt wurden. Nach dem letzten Schritt der Reinigung, der Größenfraktionierung (Spur 5), enthält die Probe außer dem exprimierten Globin und dem in SDS-Gelen globintypischen Dimer (~29 kDa) fast kein Fremdprotein mehr.

In **Tab. 2** sind die in *E.coli* rekombinant exprimierten Proteine zusammengestellt.

Tab. 2: Rekombinant exprimierte Proteine. + = Versuche selbst durchgeführt, ^{-a} = nicht durchgeführt; ^{-b} war im Labor bereits vorhanden.

| Globin | RT-PCR | Klonierung | Expression | Aufreinigung |
|---------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| DreNgb | - | + | + | + |
| DreCygb | + | + | + | + |
| MmuNgb | + | + | + | + |
| OmyNgb | + | + | ^{-a} | ^{-a} |
| HsaNGB | ^{-b} | + | + | + |
| HsaCYGB | ^{-b} | ^{-b} | + | + |
| DmeGb | ^{-b} | ^{-b} | ^{-b} | + |

1.2 Antikörperproduktion

Der überwiegende Teil der polyklonalen Antikörper wurde von den Firmen Charles River (Kißleg) und Eurogentec (Seraing, Belgien) und SeqLab (Göttingen) hergestellt. Zwei polyklonale und ein monoklonaler Antikörper resultierten aus eigenen Immunisierungen (vergleiche B4.2), in Kooperation mit dem Labor von Dr. rer. nat. habil. Sigrid Saaler-Reinhardt, Institut für Physiologische Chemie, J.G. Universität Mainz.

1.3 Charakterisierung von Antikörpern

Bei monoklonalen Antikörpern mussten zunächst mehrfach mehrere hundert Klone (vergleiche B4.2.2.2) parallel überprüft werden, weshalb hier zunächst eine Vorauswahl durch ELISA-Analysen (siehe B4.7) getroffen wurde. Hierdurch wurde die Anzahl positiver Klone stark reduziert. Diese Klone wurden anschließend wie bei polyklonalen Antikörpern, über Westernblot (vergleiche B4.5.3) und Immunhistochemie (vergleiche B4.6) auf ihre Funktionalität hin überprüft. Als Positivkontrolle diente rekombinant exprimiertes Protein, als Negativkontrolle Gewebe oder Gewebeextrakte, die laut mRNA-Hybridisierungsexperimenten das jeweilige Protein nicht exprimierten.

Die Charakterisierung von Antikörpern mittels Westernblot wird hier exemplarisch für alle Antikörper am Beispiel von aNgbTB1 gezeigt (vergleiche **Abb. 16**).

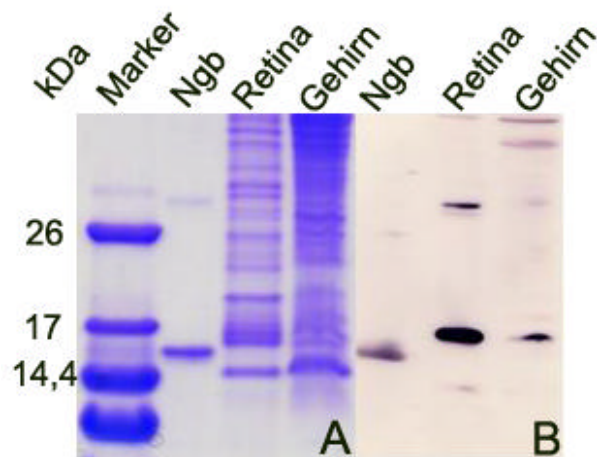


Abb. 16: Charakterisierung von Antikörpern mittels Westernblot. Beispielhaft gezeigt für aNgbTB1. Ngb = rekombinantes Ngb (200 ng). Von den Mausgeweben (Retina & Gehirn) wurden je 50 µg Protein je Spur aufgetragen. Positive Ngb-Signale sind bei ca. 17 kDa in Gehirn Retina und der Positivkontrolle (Ngb) zu erkennen.

aNgbTB1 reagiert in **Abb. 16** spezifisch mit dem rekombinanten Protein sowie mit den Gewebeextrakten von Mäusegehirn und -Retina.

Zur weiteren Antikörper-Charakterisierung wurde die zelluläre sowie subzelluläre Lokalisation durch immunhistochemische Methoden, die hier am Beispiel von aCygb1 auf Leber-Gefrierschnitten einmal exemplarisch gezeigt wird (vergleiche Abb. 17), untersucht. Die Spezifität der Antikörper (Ak) konnte hier durch Präadsorption mit ihrem Antigen, wie in B4.6.3 beschrieben, nachgewiesen werden. So konnte ausgeschlossen werden, dass der Antikörper weitere Strukturen im jeweiligen Gewebe detektiert.

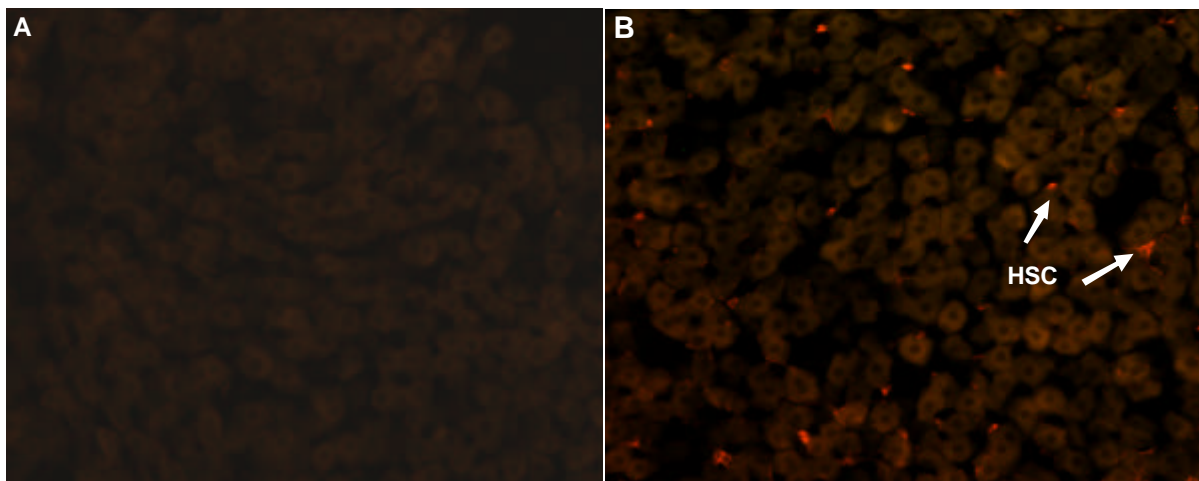


Abb. 17: Charakterisierung der Antikörper mittels Immunfluoreszenz (vergleiche B4.6.4.2). Beispielhaft gezeigt an Gefrierschnitten perfusionsfixierter Mausleber. Detektiert wurde mit aCygb1. In A wurde der Primärantikörper mit seinem Antigen präadsorbiert (siehe B4.6.3). B zeigt die Reaktion des ungeblockten Antikörpers.

In **Abb. 17A** (präadsorbierter Primärantikörper) ist keine positive Reaktion zu finden. **Abb. 17B** zeigt ein cytoglobintypisches Muster, mit starken anti-Cygb Immunfluoreszenzsignalen

Ergebnisse

in den Sternzellen der Leber (HSC). Nach dem oben genannten Verfahren wurden folgende polyklonale Antikörper auf ihre Funktionalität hin untersucht (vergleiche **Tab. 3**).

Tab. 3: Charakterisierte polyklonale Primärantikörper: + = in dieser Methode anwendbar; (+) = reagiert schwach; - = nicht anwendbar; n.d. = nicht durchgeführt. IF, Immunfluoreszenz.

| Antikörper | Tier | Antigen | Firma | Jahr | ELISA | Western | IF |
|------------|-----------|--|---------------|------|-------|---------|------|
| aNgb#1 | Kaninchen | MmuNgb | Charles River | 1999 | - | - | n.d. |
| aNgb#2 | Kaninchen | Peptid (aa2-16) | Charles River | 1999 | - | - | n.d. |
| aNgb#103 | Huhn | Peptid (aa2-16) | Eurogentec | 2000 | n.d. | (+) | n.d. |
| aNgb#104 | Huhn | Peptid (aa2-16) | Eurogentec | 2000 | n.d. | + | - |
| aNgb#133 | Huhn | Mmu Ngb | Eurogentec | 2000 | + | + | - |
| aNgb#134 | Huhn | Mmu Ngb | Eurogentec | 2000 | + | - | - |
| aNgbTB1 | Kaninchen | Peptid (aa55-70) | Eurogentec | 2002 | + | (+) | + |
| aNgbTB2 | Kaninchen | Peptid (aa55-70,) | Eurogentec | 2002 | + | - | - |
| aNgbTB3 | Kaninchen | Mmu Ngb+KLH | Uni-Mainz | 2004 | + | - | - |
| aNgbTB4 | Kaninchen | Mmu Ngb | Uni-Mainz | 2004 | + | + | (+) |
| aNgbTB5A | Kaninchen | Peptid (aa46-61) | Seqlab | 2004 | n.d. | + | + |
| aNgbTB5B | Kaninchen | Peptid (aa93-107) | Seqlab | 2004 | n.d. | + | + |
| aNgbTB6A | Kaninchen | Peptid (aa46-61) | Seqlab | 2004 | n.d. | (+) | n.d. |
| aNgbTB6B | Kaninchen | Peptid (aa93-107) | Seqlab | 2004 | n.d. | (+) | n.d. |
| aNgbTB7 | Kaninchen | Peptid(aa55-70) | Eurogentec | 2004 | n.d. | - | - |
| aCygb1 | Kaninchen | Peptid (aa2-16) | Eurogentec | 2002 | n.d. | + | + |
| aCygb2 | Kaninchen | Peptid (aa66-80) | Eurogentec | 2003 | n.d. | + | + |
| aCygb3 | Kaninchen | Peptid (aa92-106) | Eurogentec | 2003 | n.d. | + | + |
| aCygb4 | Kaninchen | Peptid (aa176-190) | Eurogentec | 2002 | n.d. | + | - |
| CygbProt | Kaninchen | MmuCygb | Charles River | 2001 | n.d. | - | - |
| DmeHb | Kaninchen | Peptid 1 (aa34-46) Peptid 2 (aa76-89) | Eurogentec | 2001 | n.d. | + | + |
| DreNgb | Kaninchen | DreNgb | Charles River | 2002 | n.d. | + | + |
| OmyNgb | Kaninchen | OmyNgb | Charles River | 2001 | n.d. | + | + |
| aCygbB | Kaninchen | MmuNgb | Antwerpen | 2002 | n.d. | + | + |

Neben den untersuchten polyklonalen Antikörpern aus **Tab. 3** wurden noch monoklonale Antikörper (vergleiche **Tab. 4**), die in Kooperation mit Dr. rer. nat. habil. Sigrid Saaler-Reinhardt hergestellt wurden, charakterisiert. Die im ersten Auswahlverfahren, der ELISA-Analyse, negativen Klone sind hier nicht mehr aufgeführt.

Ergebnisse

Tab. 4: Charakterisierte monoklonale HsaNGB-Primärantikörper: + = in dieser Methode anwendbar; (+) = reagiert schwach; - = nicht anwendbar; n.d. = nicht durchgeführt. IF, Immunfluoreszenz; NE, Neuralepithel. fett markiert sind die positiv reagierenden Antikörper. 1) durchgeführt von S. Saahler-Reinhardt; 2) durchgeführt von S.Reuss.

| Klon | ELISA | Western | Dot Blot | IF pränatales Gehirn ¹ | IF adultes Gehirn ² |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 9D11 | (+) | - | (+) | NE (+) | + |
| 9G3 | + | - | + | NE (+) | n.d. |
| 9G10 | + | - | + | Blutgefäß +, NE (+) | n.d. |
| 10A8 | (+) | - | n.d. | Zellkern | Zellkern |
| 11B12 | + | - | n.d. | NE + | + |
| 13F7 | + | - | (+) | NE + | ++ |
| 17B12 | + | - | + | Zellkern | Zellkern |
| 18E10 | + | - | + | NE + | Zellkern |
| 18G2 | n.d. | n.d. | + | NE + | ++ |

Tab. 4 zeigt die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper. Es konnte bisher kein Klon identifiziert werden, der eine positive Reaktion in Westernblot-Experimenten hervorruft. Jedoch konnten 5 Klone (fett) isoliert werden, die sowohl im pränatalen als auch im adulten Gehirn positive Signale zeigen, die charakteristisch für eine Ngb-Lokalisation sind. Antikörper, die eine Reaktion im Zellkern und/oder in Blutgefäßen aufweisen, werden nicht weiter verwendet, da es bisher keine Indizien für ein nukleäres sowie nichtneuronales Vorkommen von Ngb gibt (siehe auch Diskussion).

2 Lokalisation der Globine im Gewebe

Für das Verständnis der Funktion der Globine ist es entscheidend sich einen Einblick in die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der Proteine zu verschaffen, da diese mit der Funktion korreliert.

2.1 *Drosophila melanogaster* Globin

Die physiologische Rolle von intrazellulären Globinen bei Invertebraten, ist bisher nicht gesichert (Hankeln et al., 2002). Um speziell die Rolle von intrazellulären Globinen bei Insekten zu verstehen, wurde die Globinverteilung in *Drosophila melanogaster* (Dme) untersucht.

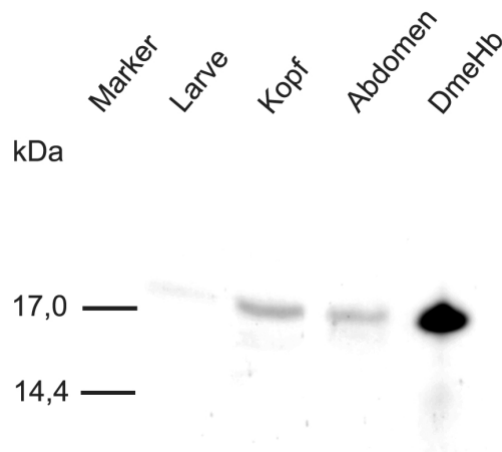


Abb. 18: Westernblot-Analyse der altersabhängigen Globinexpression bei *Drosophila melanogaster*. Je Spur/Stadium wurden ~ 50 µg Protein aufgetragen. Als Kontrolle diente 1 µg rekombinant exprimiertes DmeHb. Detektiert wurde mit anti-DmeHb Antikörper.

Westernblot Analysen (vergleiche

Abb. 18) zeigen eine DmeHb positive Bande bei etwa 18 kDa in Gewebeextrakten von Larve, dem Abdomen und dem Kopf von adulten Fliegen.

Immunperoxidaseuntersuchungen sollten anschließend die zelluläre Expression von DmeHb im adulten Tier klären (vergleiche Abb. 19). Hier konnten aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz, die aus dem starken Pigmentengehalt im Auge resultiert, keine Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt werden.

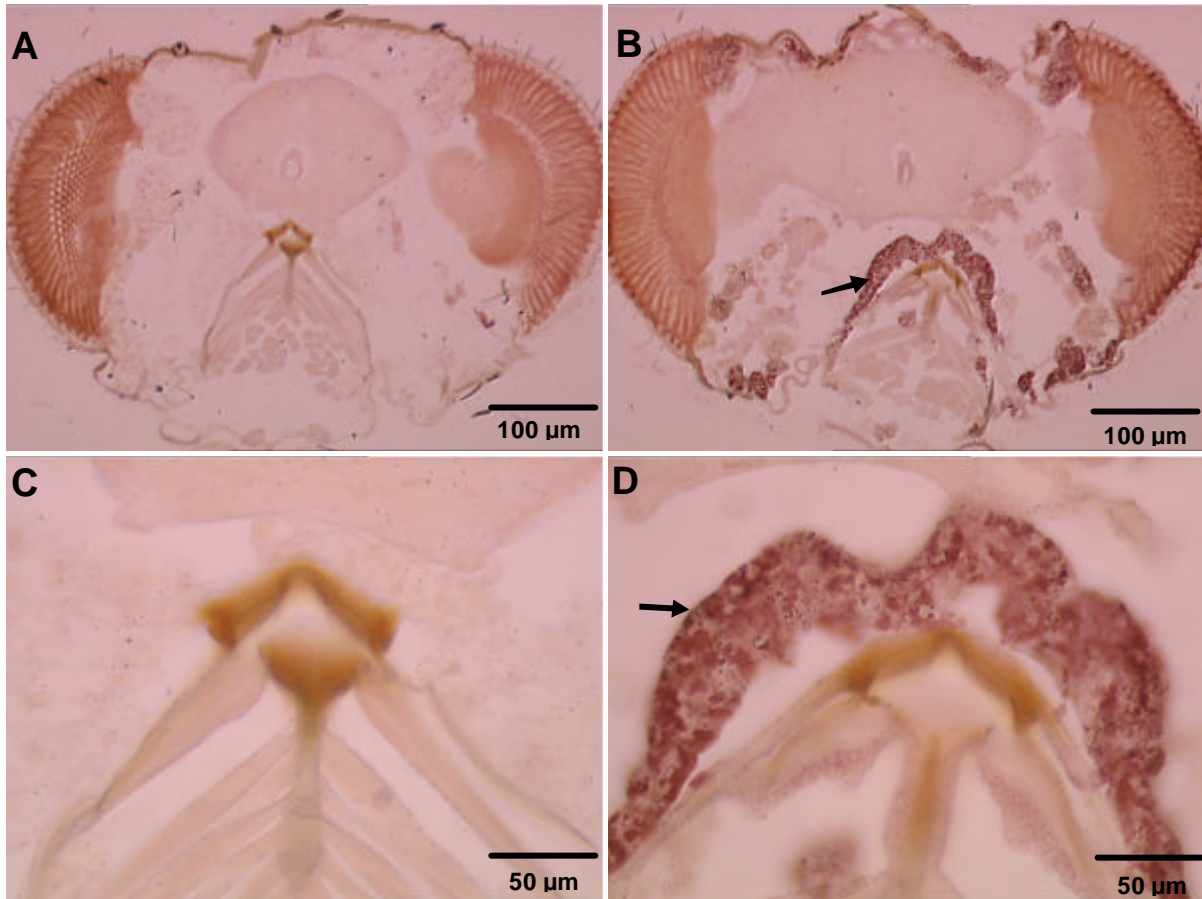


Abb. 19: Gefrierschnitte von adulten *Drosophila melanogaster* Köpfen. A und C sind Negativkontrollen ohne Primärantikörper. In B und D detektiert der anti-DmeHb Primärantikörper Fettkörperzellen (Pfeil).

Im Kopf der adulten Taufliege reagiert der Antikörper in Fettkörperzellen (Pfeil, braun-rot). Im Abdomen der Tiere sind neben Fettkörperzellen noch Tracheen DmeHb positiv (vergleiche Hankeln et al., 2002, in situ Hybridisierungsexperimente).

2.2 Neuroglobin

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur auf Hybridisierungsexperimenten basierende Daten vor (Burmester et al., 2000). Hier sollte nun die Verteilung des Ngb-Proteins, sowie dessen zelluläre und subzelluläre Lokalisation untersucht werden.

2.2.1 Expression von Neuroglobin in Mausgeweben

Zunächst wurde mittels Westernblot die Expression von Ngb in einigen neuronalen sowie nichtneuronalen Geweben verglichen.

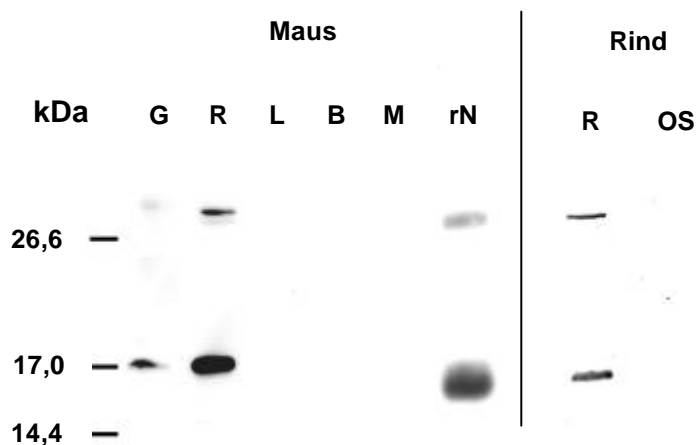


Abb. 20: Westernblot-Analyse der Ngb-Expression in Maus und Rind. Je Spur wurden ~ 30 µg Proteinextrakt aufgetragen. Als Kontrolle diente 2 µg rekombinant exprimiertes MmuNgb (rN). G, Gehirn; R, Retina; L, Leber; B, Blut; M, Muskel; AS, Aussensegment. Zur Detektion wurde aNgbTB1 verwendet.

Positive Ngb Signale (~ 17 kDa) wurden in Gewebextrakten von Gehirn und Retina der Maus beobachtet (vergleiche **Abb. 20**). Die Extrakte von Leber, Blut und Muskel zeigten keine Reaktion (vergleiche **Abb. 20**). Die zusätzliche Bande bei ~ 35 kDa stellt wahrscheinlich das für SDS-Polyacrylamidgele typische Globindimer dar. Die Diskrepanz von etwa 1 kDa zwischen nativem Neuroglobin (in Gewebeextrakten aus Gehirn [G] und Retina [R]) und rekombinant exprimiertem Ngb (rN) ist wahrscheinlich auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen. Außerdem wurde Ngb in der Retina des Rinds (R) nachgewiesen. In einer Aussensegmentpreparationen (AS) befindet sich jedoch kein Ngb. Die Intensität des Signals im Westernblot wurde mit dem Scion Image Programm quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Retina der Maus ~ 50 bis 100 fach mehr Ngb enthält als der Proteinextrakt des Gehirns. Aus der aufgetragenen Proteinmenge der Extrakte und des rekombinanten Ngb wurde abgeschätzt, dass Ngb 2 bis 4 % der Gesamtproteinmenge in der Mausretina ausmacht. Die Konzentrationsbestimmung der Gesamtheit der löslichen Proteine in der Retina ergab 100 mg/ml. Folglich liegt die Ngb-Konzentration bei ca. 100 – 200 µM.

2.2.2 Zelluläre Lokalisierung von Neuroglobin mRNA und Protein in der Mäuseretina

Aufgrund ihrer strukturierten, leicht im Mikroskop zu identifizierenden Schichtung ist die Retina ein hervorragendes Untersuchungsobjekt, um die zelluläre sowie subzelluläre Lokalisation von Proteinen und mRNA zu ermitteln.

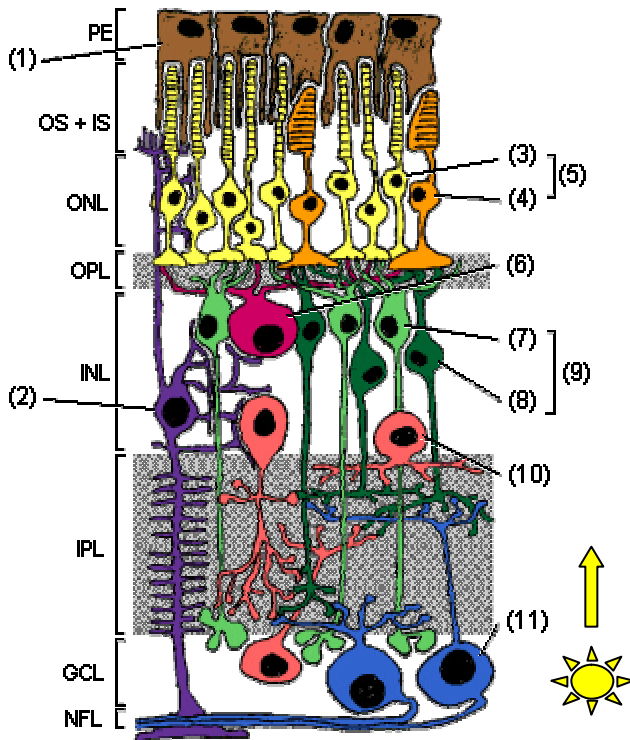


Abb. 21: Schematischer Aufbau der Säugerretina. 1) Zellen des Pigmentepithels; 2) Müller Zellen; 3) Stäbchen; 4) Zapfen. 5) Photorezeptoren; 6) Horizontalzellen; 9) Bipolarzellen der Stäbchen 7) und Zapfen 8); 10) Amakrine Zellen; 11) Ganglionzellen. Die Sonne zeigt die Richtung des eintretenden Lichts an. PE, Pigmentepithel; OS, Aussensegment; IS, Innensegment; ONL, Äußere nukleäre Schicht; OPL, Äußere plexiforme Schicht; INL, Innere nukleäre Schicht; IPL, Innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht; NFL, Fasern des Sehnervs. Die Sonne markiert die Richtung aus der das Licht in die Retina einfällt. www.mpih-frankfurt.mpg.de/global/Na/about.htm.

Bei der Mäuseretina handelt es sich um einen vaskularisierten Typ von Säugerretina, der durch Kapillaren in der Aderhaut (Choroidea), sowie tiefer liegenden Gefäßen in der äußeren Plexiformen- und Ganglienzellschicht versorgt wird. Es wurde sowohl die Lokalisierung der Ngb mRNA (durchgeführt von T. Laufs, AG Hankeln, J.G. Universität Mainz) als auch die des Proteins untersucht.

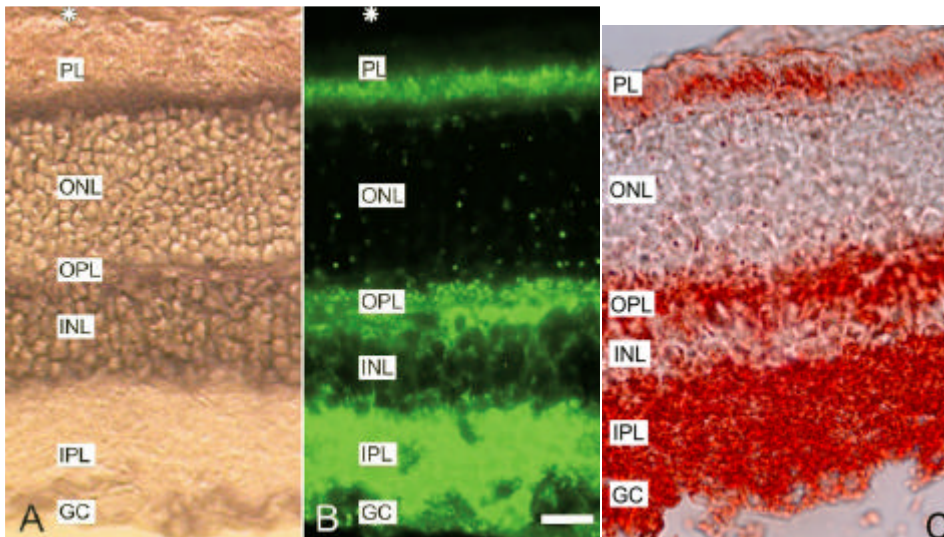


Abb. 22: Lokalisierung von Ngb mRNA und Protein in der Mäuseretina. A, in situ Hybridisierung auf einem longitudinalen Gefrierschnitt der perfundierten Mäuseretina (durchgeführt von T. Laufs). Ngb-Hybridisierungssignal (dunkle Färbung) hauptsächlich in den Innensegmenten der Photorezeptoren, den Körnerschichten (ONL, INL) und der Ganglienzellschicht (GC); B, indirekte anti-Ngb Immunfluoreszenz mit aNgbTB1. C, indirekte anti Ngb Immunperoxidasefärbung mit aNgbTB1. Beide Methoden zeigen starke anti-Ngb Signale in den Innensegmenten der Photorezeptoren, den plexiformen Zellschichten (OPL, IPL) und in der Ganglienzellschicht. Der Balken entspricht 10 μm .

In Gefrierschnitten der Mäuseretina (vergleiche **Abb. 22A**) sind starke mRNA Hybridisierungssignale in den Innensegmenten der Photorezeptoren, in den inneren und äußeren Körnerschichten, sowie in der Ganglienzellschicht zu finden. Schwache Hybridisierungssignale sind in den plexiformen Schichten lokalisiert.

Die Lokalisation des Ngb-Proteins wurde sowohl mit Immunfluoreszenz- als auch mit Immunperoxidasefärbungen (vergleiche **Abb. 22B, C**) untersucht. Beide Methoden zeigen ein starkes anti-Ngb-Signal in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen, in der inneren und äußeren plexiformen Schicht und in der Ganglienzellschicht. Schwache anti-Ngb Signale sind im perinukleären Cytoplasma der Zellkörper in der inneren und äußeren nukleären Schicht zu finden. Außerdem wurden noch starke, punktförmige anti-Ngb Signale in der äußeren nukleären Schicht gefunden. Sie representieren wahrscheinlich Bereiche von Müller-Gliazellen, die sich durch die ONL bis zur äußeren Grenzmembran der Retina (Stratum limitans externum) ziehen.

2.2.3 Subzelluläre Lokalisation von Neuroglobin in Photorezeptorzellen der Mäuseretina

Photorezeptorzellen lassen sich in vier Schichten unterteilen: Außensegmente, Innensegmente, Zellkörper und die Präsynaptische Region. Diese gut im Mikroskop erkennbaren Strukturen ermöglichen eine subzelluläre Lokalisation von Ngb in longitudinalen Gefrierschnitten der Retina.

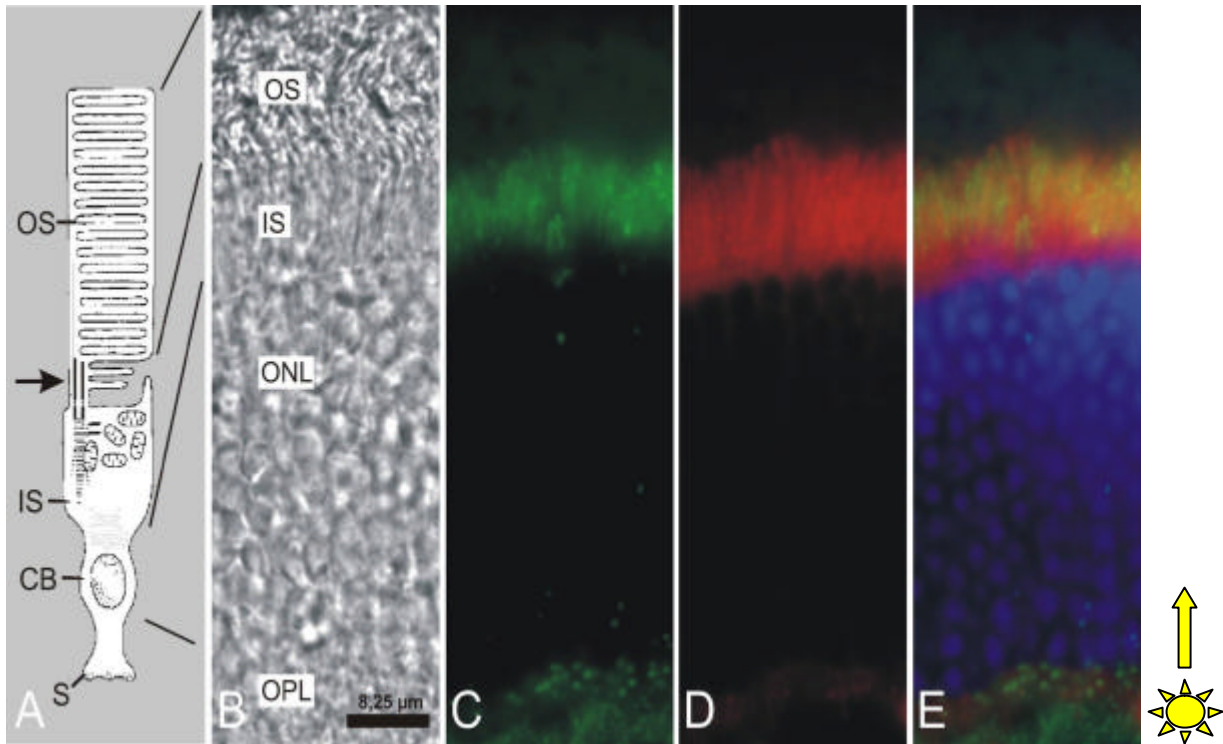


Abb. 23: Subzelluläre Lokalisierung von Ngb in den Photorezeptoren der Mäuseretina. A, schematische Darstellung einer Photorezeptorzelle; CB, Zellkörper; S, Präsynaptische Region; B, Differenzielles Interferenz-Kontrast-Bild eines longitudinalen Gefrierschnitts durch dunkel adaptierte Mäuseretina. ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht. C, indirekte anti-Ngb Immunfluoreszenz zeigt sich im Ellipsoid der Innensegmente und in der äußeren plexiformen Schicht (OS). D, indirekte anti-Arrestin Immunfluoreszenz ist im gesamten Bereich der Innensegmente (IS) zu finden, sowie schwach in der präsynaptischen Region (S). E, Überlagerung von C und D. Zellkerne sind mit dem Farbstoff Hoechst 33342 blau gefärbt. Die Sonne markiert die Richtung aus der das Licht in die Retina einfällt. Nur im distalen Abschnitt (Ellipsoid) der Innensegmente überlagert sich das anti-Ngb mit dem anti-Arrestin Signal (in Zusammenarbeit mit Andreas Gießl (AG Wolfrum). Die Immunfluoreszenz wurde mit aNgbTB1 durchgeführt.

Es wurden Doppelmarkierungsexperimente mit anti-Ngb (vergleiche **Abb. 23C**) und anti-Arrestin Antikörpern (vergleiche **Abb. 23D**) auf Gefrierschnitten durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass Arrestin eine lichtabhängige Wanderung von den Innensegmenten und den perinukleären und synaptischen Regionen (dunkel) zu den Außensegmenten (hell) durchführt (Philp et al., 1987; McGinnis et al., 2002). In der Überlagerung beider Experimente (vergleiche **Abb. 23E**) ist zu erkennen, dass sich Ngb nur im Ellipsoid, nicht wie Arrestin in den gesamten Innensegmenten befindet. Außerdem ist eine focale anti-Ngb Immunfluoreszenz im Bereich der Präsynapse zu erkennen, die wohl den Terminalen der Präsynapse entspricht. Im Gegensatz zu dem exklusiv präsynaptischen Signal von Arrestin scheint Ngb auch noch in Bereichen der äußeren plexiformen Schicht vorzuliegen.

2.2.4 Expression von Neuroglobin bei hell- bzw. dunkeladaptierten Mäuseretinae

Hinweise auf die Funktion von Proteinen kann auch deren differenzielle Expression zu verschiedenen Zeitpunkten und unter veränderten äußeren Bedingungen geben. Zur

Überprüfung einer lichtabhängigen Expression von Ngb in der Retina wurden Gefrierschnitte von hell- bzw. dunkeladaptierten Retinae angefertigt.

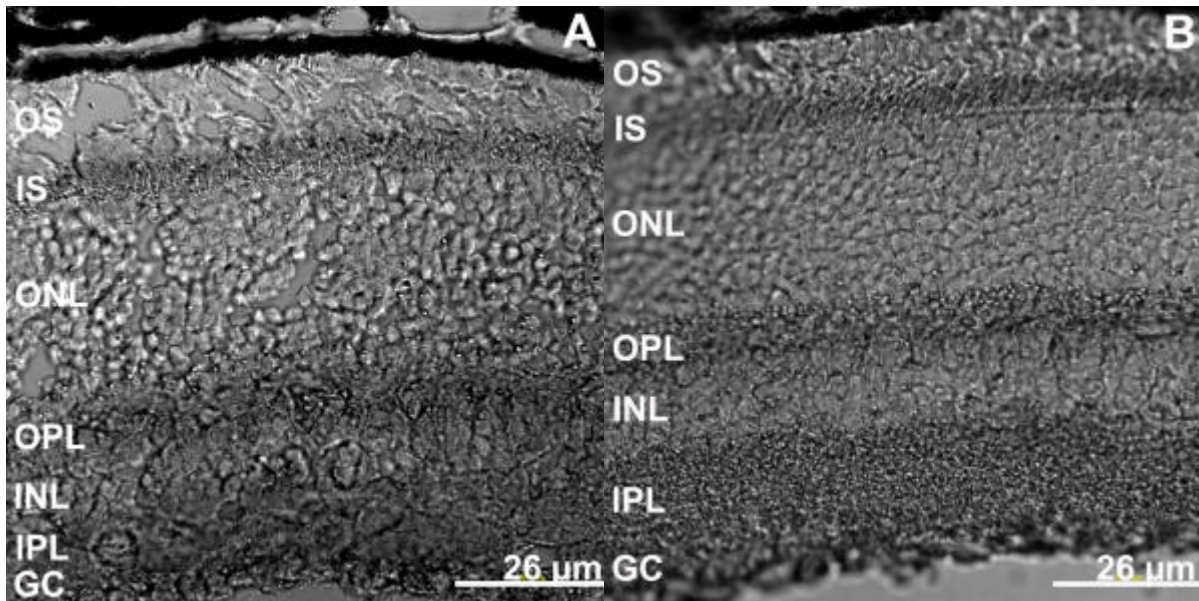


Abb. 24: Vergleich der Ngb-Expression in der Retina bei hell (A)- bzw. dunkeladaptierten (B) Mäusen. Anti-Ngb Immunperoxidasefärbung auf Gefrierschnitten von Mäuseretinae mit aNgbTB1. AS, Aussensegment; IS, Innensegment; ONL, Äußere nukleäre Schicht; OPL, Äußere plexiforme Schicht; INL, Innere nukleäre Schicht; IPL, Innere plexiforme Schicht; GC, Ganglienzellschicht. In beiden Versuchen ist das anti-Ngb Signal in den Innensegmenten, in der inneren und äußeren plexiformen Schicht, sowie in der Ganglienzellschicht zu beobachten. Die Intensität beider Signale ist nicht signifikant unterschiedlich.

Sowohl in der hell- (vergleiche **Abb. 24A**) als auch in der dunkeladaptierten Retina (vergleiche **Abb. 24B**) sind wie schon in **Abb. 22** anti-Ngb Signale in den Innensegmenten, in beiden plexiformen Schichten sowie in der Ganglienzellschicht zu beobachten. Es ist kein signifikanter Unterschied in der Intensität, die bei verstärkter Expression höher ausfallen sollte, zu detektieren.

2.2.5 Expression von Neuroglobin in verschieden stark vaskularisierten Retinae

Zur Bestätigung der bei Maus gefundenen Lokalisation von Ngb sollte die ebenfalls vaskularisierte Retina der Ratte untersucht werden. Parallel sollte eine avaskuläre Säugerretina (Kaninchen) auf ihren Ngb-Gehalt und -Verteilung hin bearbeitet werden. Dieser Retinatyp verfügt lediglich über choroideale Kapillaren, nicht aber über die inneren Blutgefäße der OPL und GC. Diese Versuche wurden in der Diplomarbeit von Anke Bentmann (2004) durchgeführt, die von mir mitbetreut wurde.

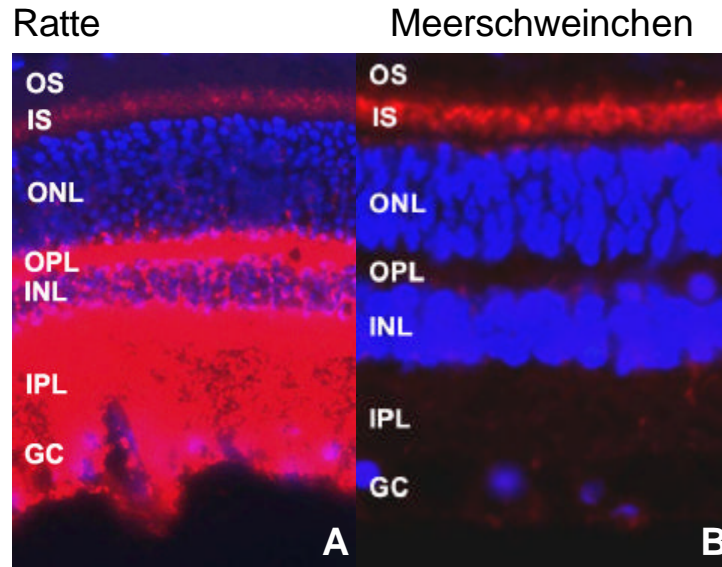


Abb. 25: Vergleich der Lokalisation von Ngb in der Retina von Ratte und Meerschweinchen. Indirekte anti-Ngb-Immunfluoreszenz wurde mit aNgbTB5A Antikörpern auf Gefrierschnitten von perfundierter Retina durchgeführt. Zellkerne wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33342 blau angefärbt. (Diplomarbeit Bentmann, 2004). AS, Außensegment; IS, Innensegment; ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GC, Ganglienzellschicht. A, starke anti-Ngb Signale in beiden plexiformen Schichten (innere und äußere) und der Ganglienzellschicht der Ratte. Ein schwächeres Signal ist im Ellipsoid der Innensegmente zu finden. B, anti-Ngb Signal im Ellipsoid der Innensegmente.

In der vaskularisierten Rattenretina (vergleiche **Abb. 25A**) wird Ngb in den distalen Bereichen der Innensegmente, den beiden plexiformen Schichten und der Ganglienzellschicht exprimiert. Bei der avaskulären Meerschweinchenretina (vergleiche **Abb. 25B**) ist Ngb ausschließlich in den distalen Bereichen der Innensegmente nachgewiesen worden.

2.2.6 Expression von Neuroglobin in der Fischretina

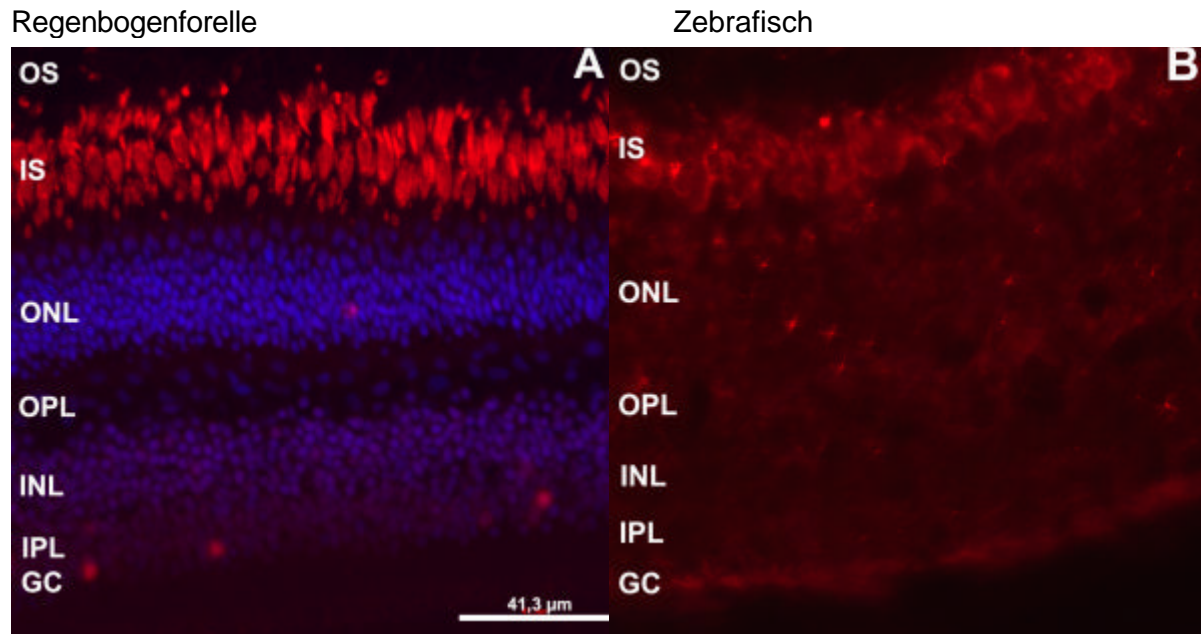


Abb. 26: Vergleich der Lokalisation von Ngb in der Retina der Regenbogenforelle und des Zebrafischs. A, Indirekte anti-Ngb-Immunfluoreszenz wurde mit OmyNgb Antikörpern auf Gefrierschnitten von Forellen-Retina durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Andreas Gießl, AG Wolfrum). Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 blau angefärbt. B, Indirekte anti-Ngb-Immunfluoreszenz wurde mit DreNgb Antikörpern auf Zebrafisch-Retina durchgeführt (Diplomarbeit 2003, V. Heib). AS, Außensegment; IS, Innensegment; ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GC, Ganglienzellschicht. A, starke anti-Ngb Immunfluoreszenz-Signale in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen (IS), sowie eine schwächere Färbung in der inneren Körnerschicht (INL) und der inneren plexiformen Schicht (IPL). Die in der Ganglienzellschicht (GC) vereinzelt markierten Zellen sind wohl Artefakte. B, Eine starke Immunfluoreszenz zeigt sich in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen. Eine schwache Reaktion ist in den beiden plexiformen Schichten sowie der Ganglienzellschicht zu detektieren.

Sowohl die Retina der Regenbogenforelle (A) als auch die des Zebrafischs (B) zeigen eine starke anti-Ngb Immunfluoreszenz in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen (vergleiche **Abb. 26**). Bei Forelle ist noch eine schwache Färbung in der inneren nukleären sowie plexiformen Schicht zu beobachten. Die fokale Fluoreszenz in der Ganglienzellschicht stellt wohl ein Artefakt dar. Beim Zebrafisch sind schwächere Färbungen in den beiden plexiformen Schichten und der Ganglienzellschicht zu detektieren.

2.2.7 Posttranslationale Modifikationen bei Neuroglobin

In der SDS-Gelelektrophorese wurde eine Massendifferenz von ~ 1 kDa zwischen rekombinant exprimiertem Ngb und nativem Protein festgestellt (vergleiche **Abb. 20**). Diese Diskrepanz resultiert möglicherweise aus einer posttranslationalen Modifikation. Eine mögliche Erklärung wäre eine Phosphorylierung des Globins, eine regulatorische Veränderung, wie sie bei vielen Proteinen in der Retina beobachtet wird. Diese Möglichkeit sollte in nativem Gewebe über eine spezifische Färbung von Phosphoproteinen (vergleiche B4.4.5) im SDS-Gel überprüft werden.

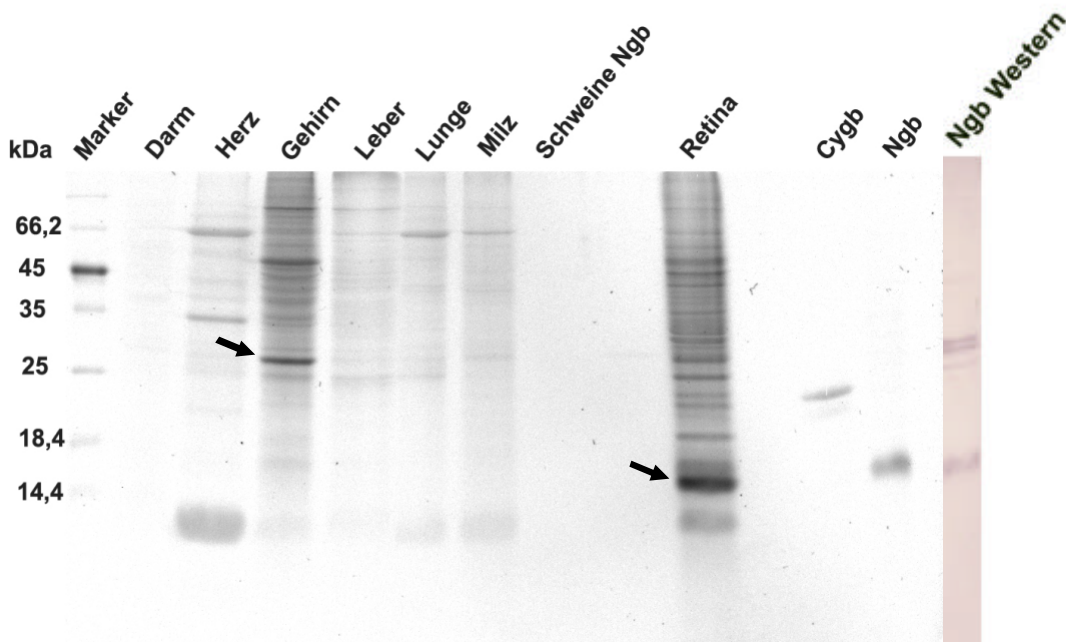


Abb. 27: Phosphoproteinfärbung auf Mäusegewebeextrakten im SDS-Gel. Es wurden je 50 µg Gewebeextrakt bzw. 200 ng der rekombinanten Proteine aufgetragen. Schweine-Ngb, nativ isoliert; Cygb, rekombinantes Cygb; Ngb, rekombinantes Ngb. WR zeigt einen Westernblot mit aNgbTB1 auf Retinaextrakt. Als Positivkontrolle diente das phosphorylierte Ovalbumin (45 kDa Bande) im Marker. Nur im Gehirn (25 kDa) sowie in der Retina (15 kDa) ist eine eindeutige Phosphoproteinfärbung (schwarz) zu erkennen. Alle anderen Gewebeextrakte zeigen keine nachweisbaren Phosphoproteine auf.

In **Abb. 27** sind eindeutige Färbungen von Phosphoproteinen im Gehirn (25 kDa) und in der Retina (15 kDa) zu erkennen, die jedoch weder im Molekulargewichtsbereich von nativem Ngb (17 kDa) noch von nativem Cygb (21 kDa) liegen. Diese Fakten werden von der parallel durchgeführten Westernblotanalyse gestützt, die bestätigt, dass sich kein positives Signal im Molekulargewichtsbereich von nativem Ngb befindet.

2.3 Cytoglobin

Zu Beginn dieser Arbeit lagen wenige, sich widersprechende Daten zur Lokalisation von Cytoglobin (Cygb) vor. Hinweise auf die Rolle des Globins im Organismus sollten Cygb Expressionsstudien in verschiedenen Geweben liefern. Ebenso sollten diese Daten helfen, die bis dato kontroversen Ergebnisse zur zellulären sowie subzellulären Lokalisation zu klären (Kawada et al., 2001; Asahina et al., 2002; Geuens et al., 2003).

2.3.1 Expression von Cytoglobin in Mausgeweben

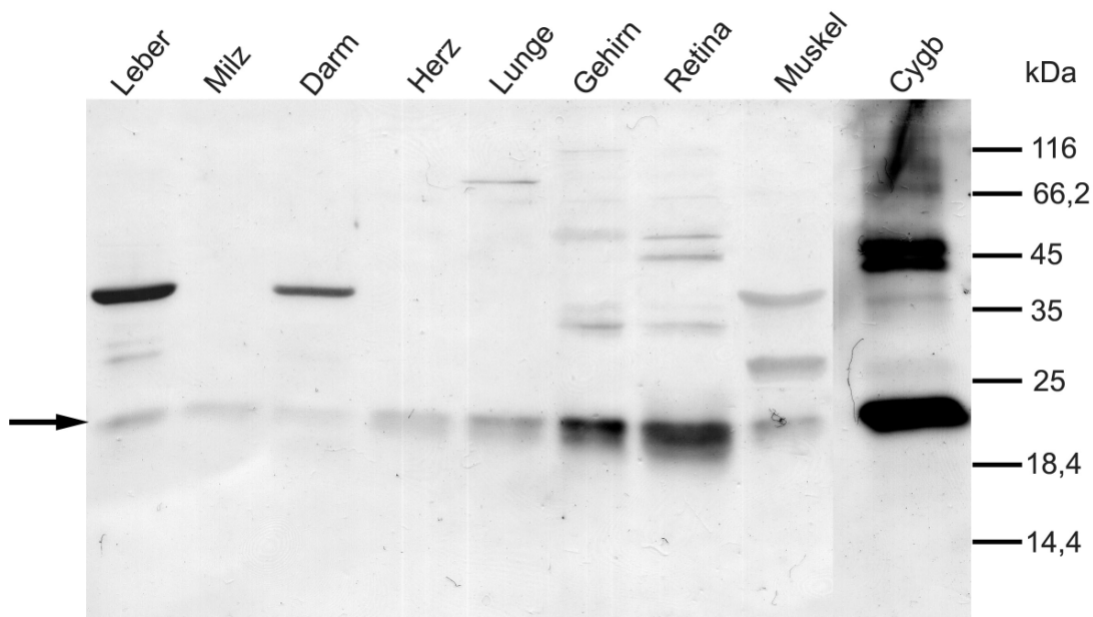


Abb. 28: Westernblot-Analyse der Cygb-Expression in Mausgeweben. Je Spur/Gewebe wurden 50 µg Proteinextrakt aufgetragen. Als Kontrolle diente ~ 100 ng rekombinant exprimiertes Cygb. Zur Detektion wurde aCygb2 verwendet. Der Pfeil markiert die monomere Cygb-Bande.

Die erwartete Cygb-Bande bei ~21 kDa zeigt sich in allen untersuchten Geweben (vergleiche **Abb. 28**). Die Bande bei ~40 kDa zeigt wahrscheinlich das Cygb-Dimer, das hauptsächlich in Leber, Darm und Muskel zu finden ist. Die Monomer- sowie Dimerbande ließen sich durch Präadsorption des Antikörpers mit dem Antigen blocken. Die anderen schwachen Banden ließen sich auf diese Weise nicht blocken. Dies spricht dafür, dass es sich hierbei um unspezifische Kreuzreaktion des Antikörpers handelt. Das Expressionsmuster von Cygb in Mausgeweben konnte durch einen zweiten Antikörper (aCygb3; vergleiche **Tab. 3**) bestätigt werden.

2.3.2 Zelluläre und subzelluläre Expression von Cygbin

Nach der Kenntnis der Expressionsorte von Cygb folgte als nächster Schritt zur Funktionsanalyse des Proteins die Untersuchung der zellulären sowie subzellulären Lokalisation in einem Teil der im Westernblot positiven Gewebe. Bei allen folgenden Immunfluoreszenz-Experimenten wurden jeweils die vier polyklonalen Antikörper aCygbin 1-4, die gegen unterschiedliche Peptide hergestellt wurden, verwendet (vergleiche **Tab. 3**).

2.3.2.1 Vergleich der Antikörper aCygbin 1-4

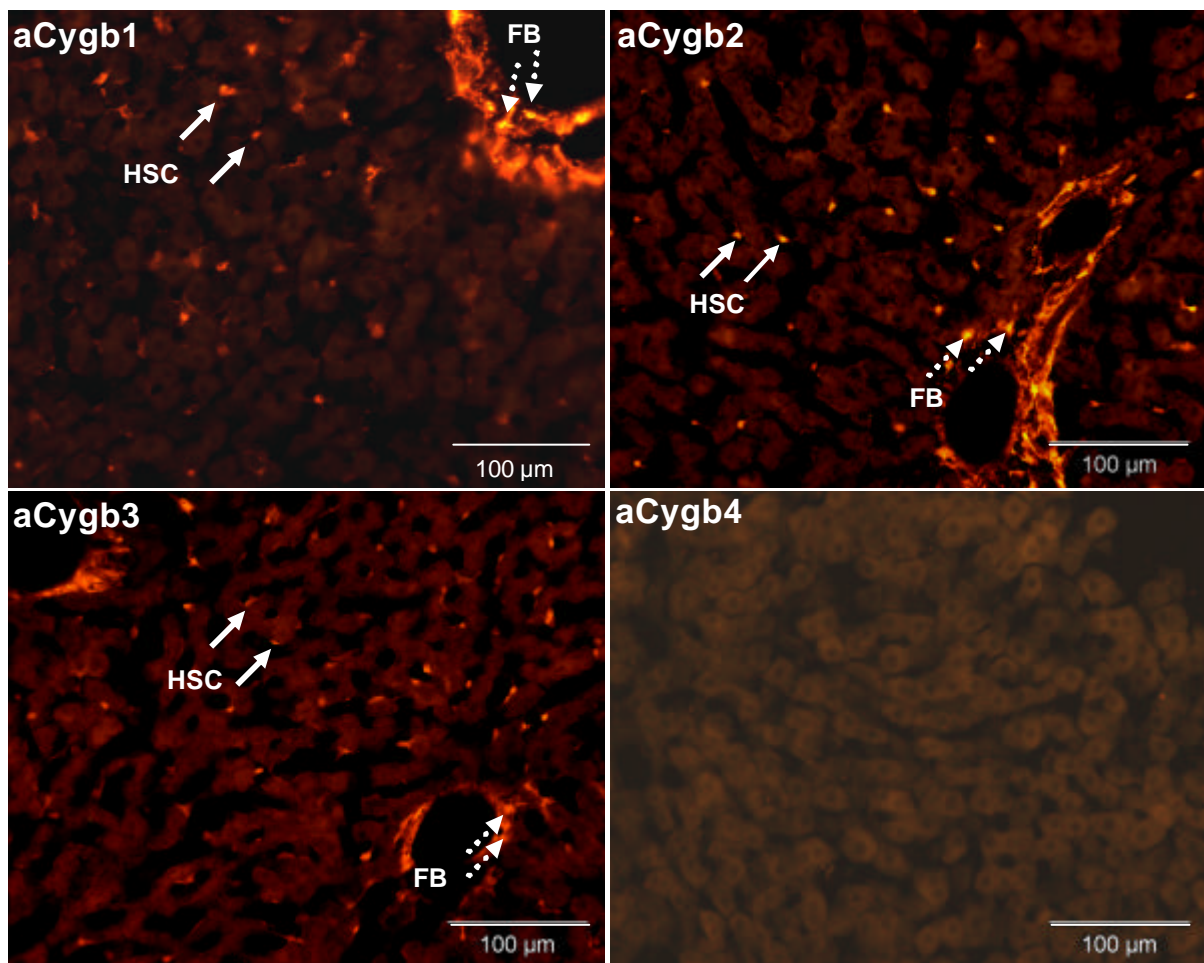


Abb. 29: Vergleich der vier Antikörper aCygbin 1-4 auf Gefrierschnitten von Mäuseleber. aCygbin 1 ruft eine starke Immunfluoreszenzreaktion in den Sternzellen der Leber (HSC), sowie in den Fibroblasten (FB) hervor. aCygbin 2 zeigt ein starkes anti-Cygb Signal in den HSC sowie in den Leber-Fibroblasten, die die Pfortader umgeben. aCygbin 3 zeigt die gleiche Immunfluoreszenzfärbung wie die zuvor gezeigten Antikörper. aCygbin 4 zeigt kein positives Signal in der Leber.

aCygbin 1-3 zeigen in **Abb. 29** jeweils ein starkes anti-Cygb Signal in den Sternzellen der Leber (HSC) und in den Fibroblasten des Bindegewebes (FB). Die großen Hepatozyten sind nicht Cygb positiv. aCygbin 4 zeigt in keinem der Zelltypen eine Immunfluoreszenzreaktion. Die Intensität sowie der Hintergrund der Immunfluoreszenzreaktion bei Antikörpern aCygbin 1 und 2 sind nahezu identisch. aCygbin 3 reagiert etwas schwächer, mit einem stärkeren Hintergrund.

Da sich nur minimale Unterschiede auch bei allen anderen Immunfluoreszenzexperimenten für die Antikörper aCygb1-3 zeigte, wird für die folgenden Immunfluoreszenzen nur jeweils die Reaktion eines Antikörpers exemplarisch gezeigt.

2.3.2.2 Dickdarm (Colon)

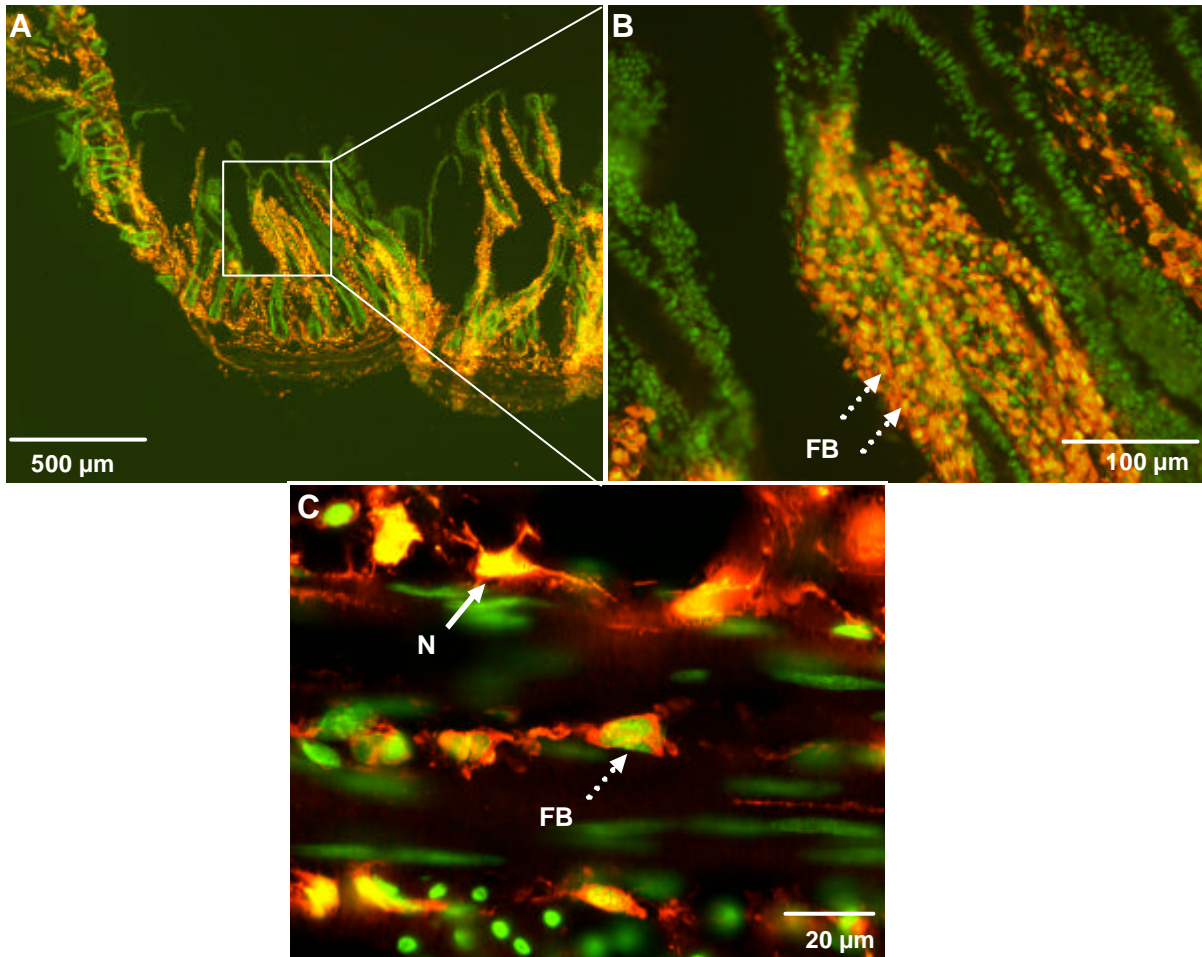


Abb. 30: Immunhistochemische Lokalisation von Cygb im Dickdarm. Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz wurde mit aCygb Antikörpern auf Gefrierschnitten von Darm durchgeführt. Zellkerne wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33342 grün angefärbt. A) zeigt eine Dickdarmübersicht. In höherer Vergrößerung (B) zeigt sich das rot-orange Cygb-Signal in den Fibroblasten des Bindegewebes in der Lamina propria mucosae. Bei noch stärkerer Vergrößerung (C) zeigt sich eine ausschließlich cytoplasmatische Färbung in den Fibroblasten (FB), aber eine cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation in Neuronen (N) des Plexus myentericus.

Anti-Cygb Signale konnten in Fibroblasten (FB) des Bindegewebes der Lamina propria mucosae (vergleiche **Abb. 30**), die der Stabilisierung des Darmepithels dient, jedoch nicht in Epithelzellen der Schleimhaut (wie z.B. Becherzellen) beobachtet werden. In stärkerer Vergrößerung (vergleiche **Abb. 30C**) ist das ausschließlich cytoplasmatische Vorkommen von Cygb in den Fibroblasten zu erkennen. Außerdem sind die Neurone des Plexus myentericus Cygb positiv. Hier ist allerdings eine nukleäre sowie cytoplasmatische anti-Cygb Färbung zu erkennen.

2.3.2.3 Herzmuskulatur (Myokard)

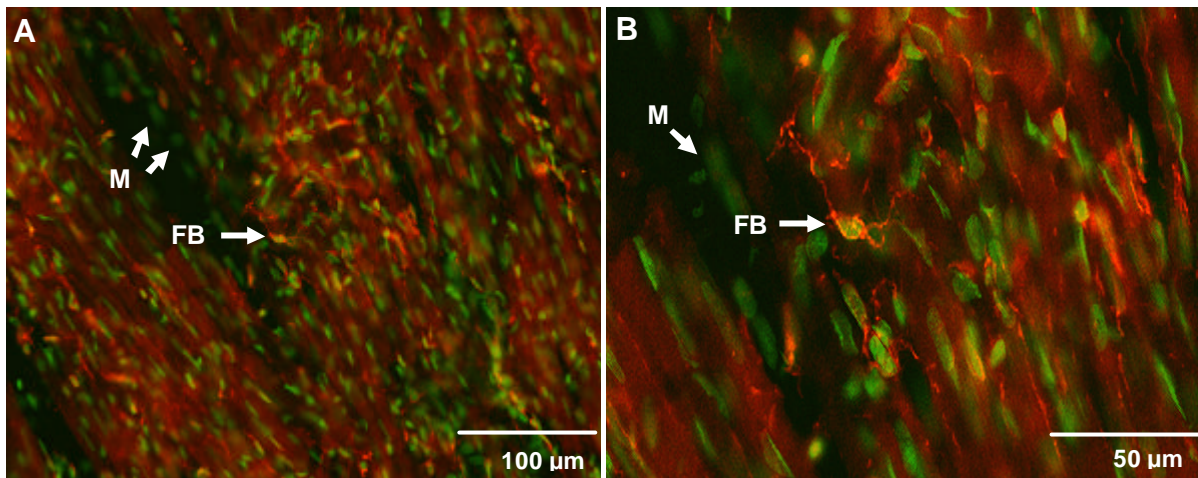


Abb. 31: Immunhistochemische Lokalisation von Cygb im Herz. Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz wurde mit aCygb Antikörpern auf Herz-Gefrierschnitten durchgeführt. Zellkerne wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33342 grün angefärbt. In der Übersicht (A) ist zu erkennen, dass ausschließlich Herz-Fibroblasten (FB) Cygb positiv (rot) sind, jedoch nicht die länglichen Myozyten (M). In stärkerer Vergrößerung (B) ist in den Herz-Fibroblasten eine cytoplasmatische Lokalisation des anti Cygb Signals zu erkennen.

Im Herzmuskel sind ausschließlich die Fibroblasten des Bindegewebes Cygb-positiv. Die Herzmuskelzellen (Myozyten), zeigen kein anti-Cygb Signal. Bei stärkerer Vergrößerung (vergleiche **Abb. 31B**) fällt das exklusiv cytoplasmatische Vorkommen von Cygb ins Auge.

2.3.2.4 Niere (Ren)

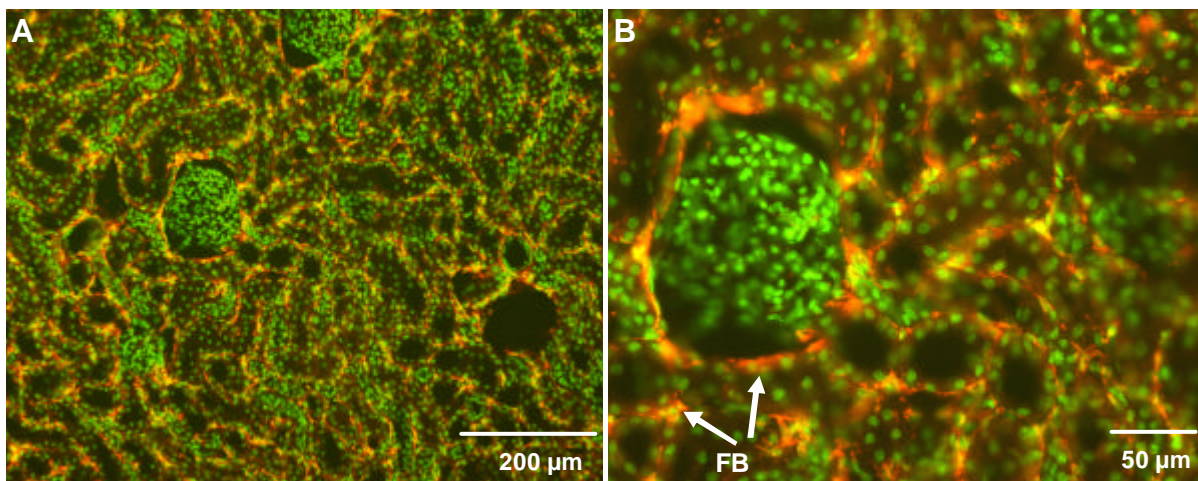


Abb. 32: Immunhistochemische Lokalisation von Cygb in der Niere. Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz wurde mit aCygb Antikörpern auf Nieren-Gefrierschnitten durchgeführt. Zellkerne wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33342 grün angefärbt. A zeigt eine Übersicht. In stärkerer Vergrößerung (B) ist zu erkennen, dass nur Fibroblasten (FB) Cygb positiv (rot) sind. Endothelzellen sind jedoch nicht gefärbt.

In der Niere (vergleiche **Abb. 32A**) zeigt sich die anti-Cygb Immunfluoreszenz in den Fibroblasten des Bindegewebes (FB), jedoch nicht in den Epithelzellen. Bei stärkerer Vergrößerung (vergleiche **Abb. 32B**) ist auch hier eine cytoplasmatische Lokalisation von Cygb zu erkennen.

2.3.2.5 Haut (Cutis)

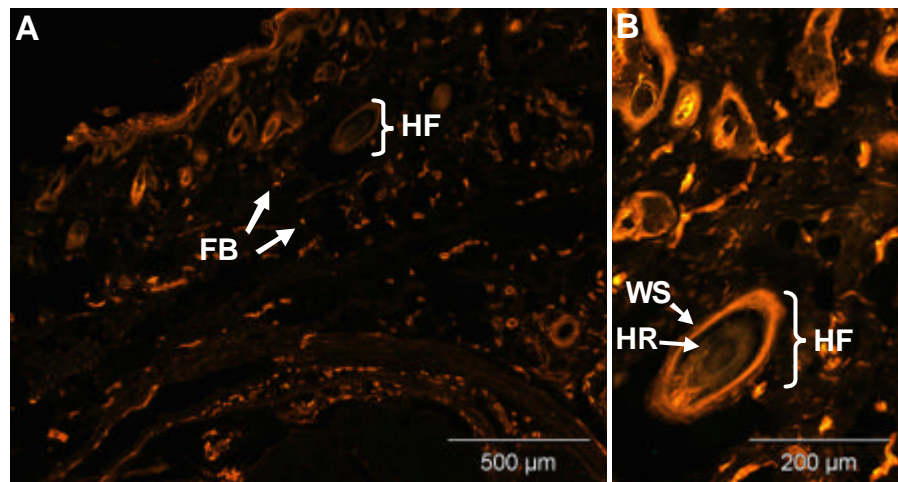


Abb. 33: Immunhistochemische Lokalisation von Cygb in der Rattenhaut. Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz wurde mit aCygb Antikörpern auf Haut-Gefrierschnitten durchgeführt. Anti-Cygb-Signale (rot) sind in Haut-Fibroblasten (FB), sowie in Haarfollikeln (HF) zu erkennen (A). In stärkerer Vergrößerung (B) zeigt sich, dass nur die Wurzelscheide (WS), jedoch nicht die Haarrinde (HR) Cygb positiv ist.

In den Gefrierschnitten der Rattenhaut (vergleiche Abb. 33A) sind anti-Cygb Immunfluoreszenzsignale in Fibroblasten (FB) sowie Haarfollikeln (HF) zu erkennen. Bei stärkerer Vergrößerung vergleiche (Abb. 33B) ist jedoch zu erkennen, dass nur die Wurzelscheide (WS), nicht jedoch die Haarrinde (HR) eine positive Fluoreszenz aufweisen.

2.3.2.6 Sehnenzellen (Tenocyten)

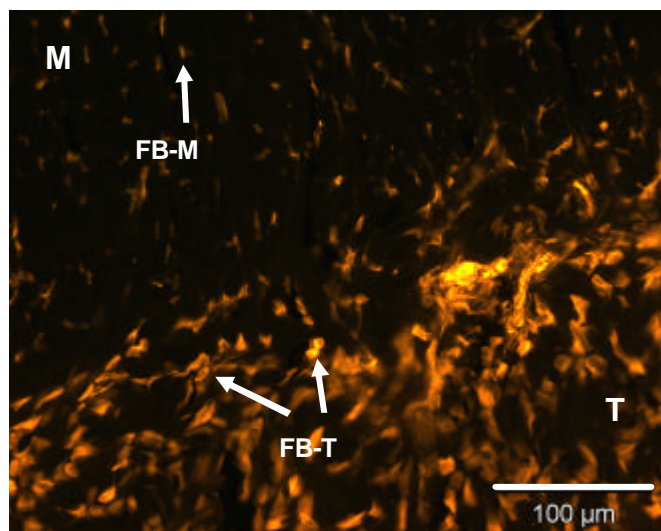


Abb. 34: Immunhistologische Lokalisation von Cygb in der Sehne (T). Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz, mit aCygb Antikörpern auf Gefrierschnitten durch eine Sehne. Starkes Immunfluoreszenzsignal in den Matrixfibroblasten (FB-T) der Sehne. Schwächere Signale in Fibroblasten (FB-M) des umgebenden Muskels (M).

In **Abb. 34** ist ein sehr starkes anti-Cygb Signal in den Matrixfibroblasten der Sehne zu erkennen. Im angrenzenden Muskel zeigen die Fibroblasten ein schwächeres Immunfluoreszenz-Signal.

2.3.2.7 Leber (Hepar)

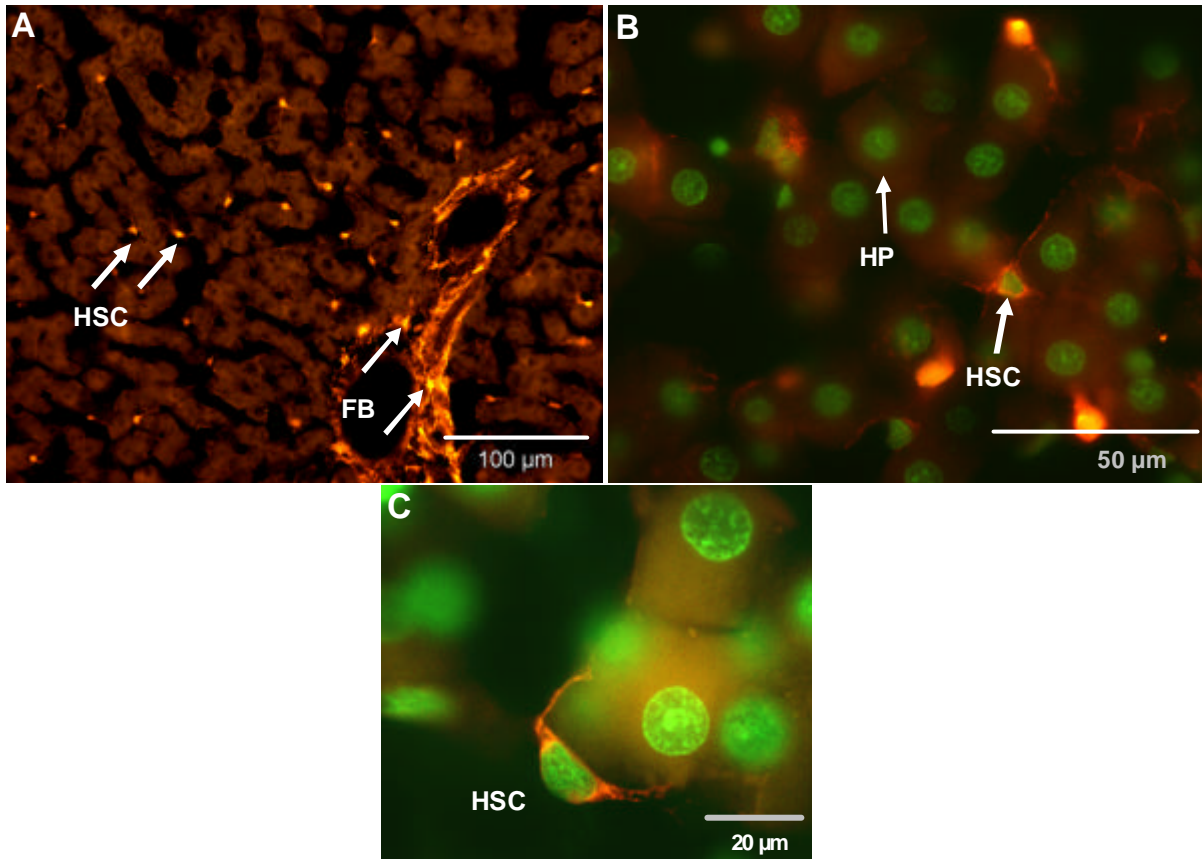


Abb. 35: Immunhistochemische Lokalisation von Cygb in der Leber. Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz wurde mit aCygb Antikörpern auf Leber-Gefrierschnitten durchgeführt. Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 grün angefärbt. Ein positives Cygb-Signal (rot) ist in den Sternzellen der Leber (HSC) sowie in Leber-Fibroblasten, die die Blutgefäße umgeben (F). Hepatozyten (HP) sind Cygb negativ. In stärkeren Vergrößerungen (B,C) ist die ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation von Cygb zu erkennen.

Starke anti-Cygb Immunfluoreszenzsignale (vergleiche **Abb. 35A**) sind in den Sternzellen der Leber (HSC) und in den die Pfortader umgebenden Fibroblasten zu finden. Hepatozyten (HP) und Endothelzellen der Blutgefäße, sowie rote Blutkörperchen waren nicht gefärbt. In stärkerer Vergrößerung (vergleiche **Abb. 35C&D**) ist die ausschließlich cytoplasmatische anti-Cygb Färbung in den HSC und ihren Plasmafortsätzen zu erkennen.

2.3.2.8 Knochen- und Knorpelgewebe

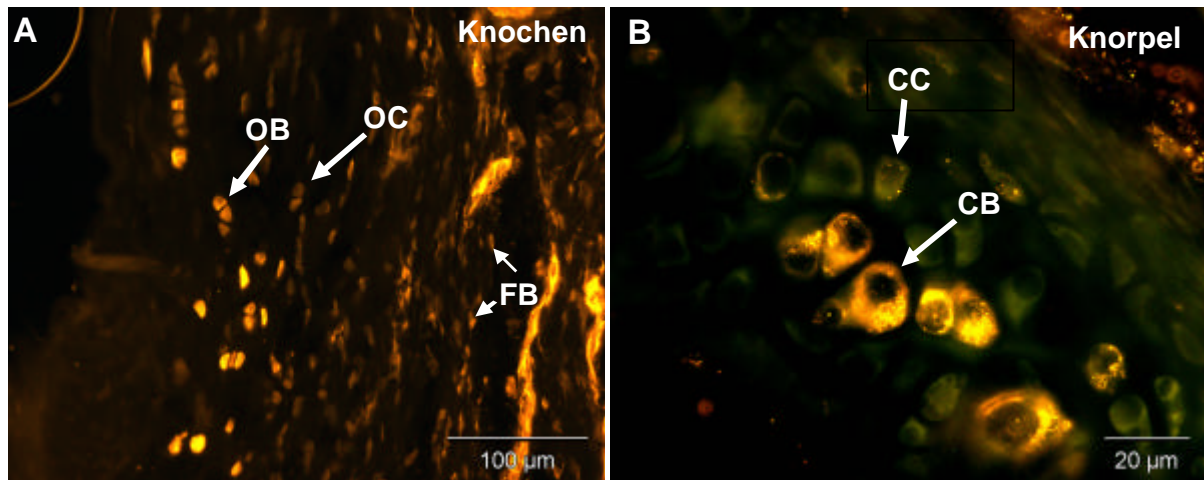


Abb. 36: Immunhistochemische Lokalisation von Cygb im Fingerknochen und der Luftröhre der Ratte. Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz wurde mit aCygb Antikörpern auf Gefrierschnitten des entkalkten Rattenfingers (A, Knochen) und der Luftröhre (B, Knorpel) durchgeführt. Eine starke Cygb Immunfluoreszenz ist in den Osteoblasten (OB) des Knochens und Chondroblasten (CB) des Knorpels zu detektieren. Eine schwache Fluoreszenz ist in den Osteozyten (OC) des Knochens und den Chondrozyten (CC) des Knorpels der Luftröhre zu identifizieren.

Im entkalkten Fingerknochen der Ratte (vergleiche **Abb. 36A**) zeigen sowohl Knochenbildungszellen (Osteoblasten, OB), als auch Knochenzellen (Osteozyten, OC) ein anti-Cygb Signal. Jedoch ist die Intensität der Fluoreszenz bei den OB wesentlich stärker als bei den OC. Des Weiteren sind Fibroblasten im interstitiellen Bindegewebe markiert. Starke, exklusiv cytoplasmatische anti-Cygb Signale (vergeliche **Abb. 36B**) sind in Knorpelbildungszellen (Chondroblasten, CB), sehr schwache in den murenen ausdifferenzierten Chondrozyten (CC) des Knorpels zu detektieren.

2.3.2.9 Augenbecher (Cupula optica)

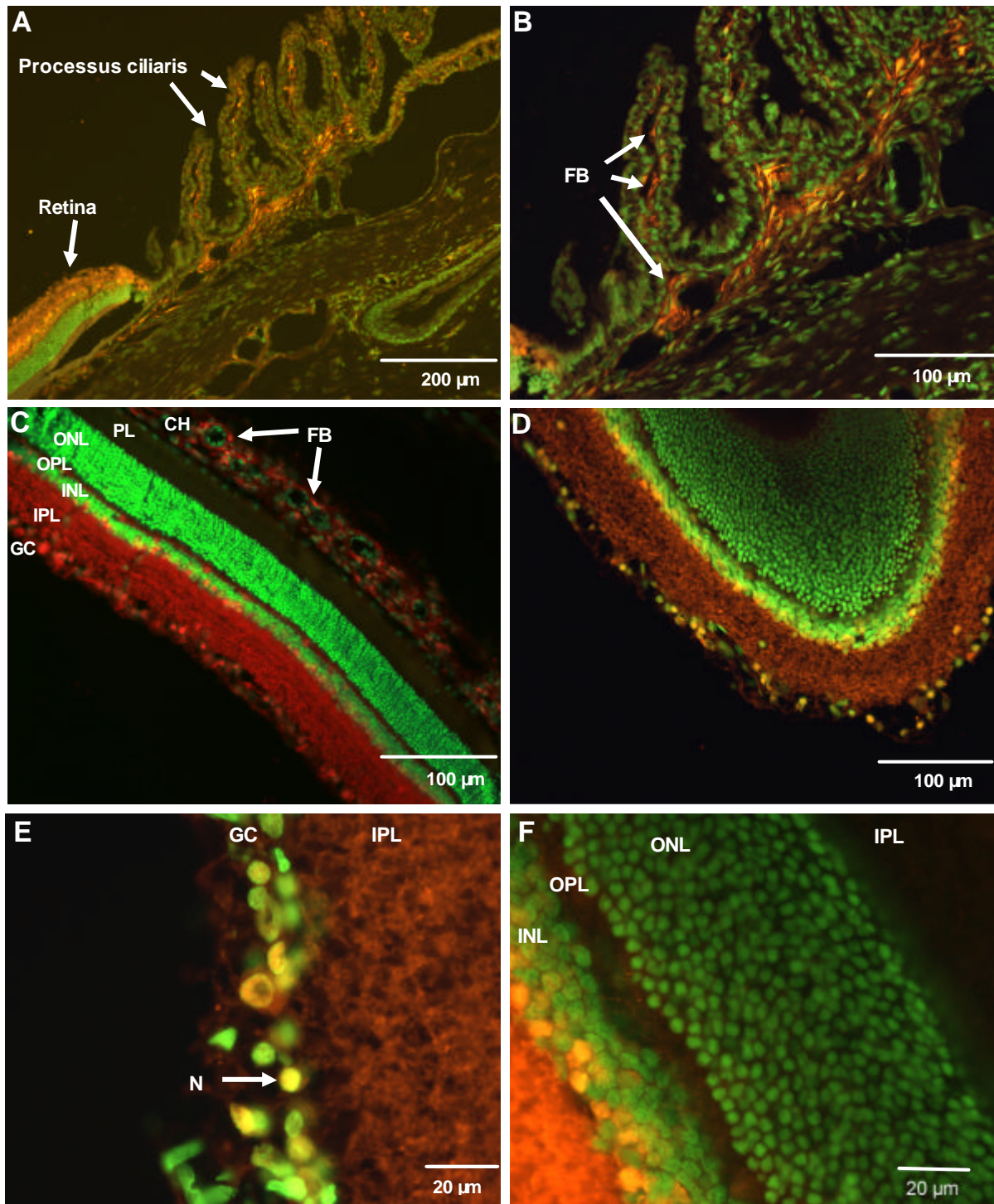


Abb. 37: Immunhistochemische Lokalisation von Cygb im Augenbecher der Maus. Indirekte anti-Cygb Immunfluoreszenz wurde mit aCygb Antikörpern auf Augapfel-Gefrierschnitten durchgeführt. Zellkerne wurden m. dem Farbstoff Hoechst 33342 grün angefärbt. A,B, starke antiCygb Immunfluoreszenzsignale (rot) sind in der Retina, sowie in Fibroblasten (FB) der Ziliarfortsätze (Processus ciliaris) des Strahlenkörpers (Corpus ciliare) zu finden. C,D, in der Retinaübersicht zeigt sich ein starkes anti-Cygb Signal (rot,orange) in den Fibroblasten (FB) der Aderhaut (Choroidea, CH), in einigen Neuronen der äußeren und inneren plexiformen Schicht (OPL, IPL), der inneren nukleären Schicht (INL), sowie der Ganglienzellschicht (GC). E,F, In stärker Vergrößerung ist die nukleäre anti-Cygb Fluoreszenz in wenigen Neuronen (N) der Ganglienzellschicht (GC) und der innerer Körnerschicht zu erkennen (INL).

Im Augapfel (vergleiche **Abb. 37A+B**) zeigte sich eine starke anti-Cygb Immunfluoreszenz (rot) in nicht-neuronalen Zellen des Processus ciliaris, eine schwächere Färbung wurde in der Regenbogenhaut (Iris) nachgewiesen. Diese Zellen representieren wahrscheinlich Fibroblasten, wie sie sich auch in der ebenfalls Cygb-positiven Aderhaut (Choroidea) finden lassen. In der neuronalen Retina (vergleiche **Abb. 37C+D+E+F**) findet man eine starke Cygb-Fluoreszenz in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht. Eine schwache Färbung zeigt sich in beiden plexiformen Schichten. Bei stärkerer Vergrößerung ist zu erkennen, dass nur einige Zellkerne in der Ganglienzellschicht, sowie in der INL eine Immunfluoreszenz ausstrahlen, dass aber auch die zellkernfreien Schichten (OPL, IPL) ein, wenn auch schwächeres Signal besitzen.

2.3.2.10 Vergleich verschiedener Cygb Ak zur Klärung von unterschiedlichen Lokalisationsergebnissen

Kontroverse Ergebnisse in der Lokalisation von Cygb (siehe Diskussion; Geuens et al., 2003; Schmidt et al., 2004) veranlassten uns, die eigenen Antikörper (exemplarisch aCygb1) mit den Ak unserer Kooperationspartner (aCygbB, AG Moens; Antwerpen, Belgien) zu vergleichen, um den Einfluss methodischer Unterschiede zu überprüfen.

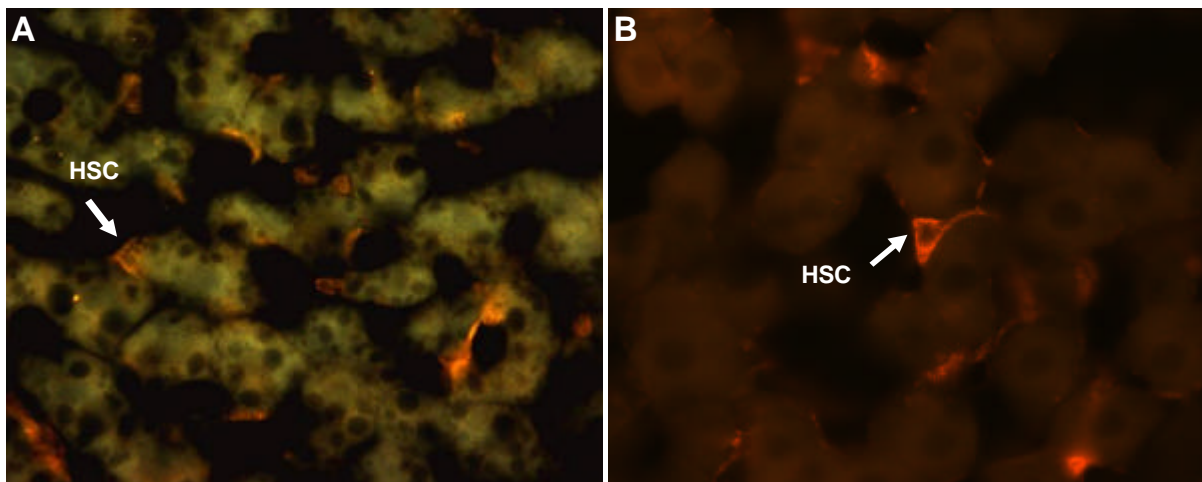


Abb. 38: Vergleich von aCygb1 und aCygbB auf Lebergefrierschnitten. A, der Antikörper aCygbB reagiert schwach (orange) im Cytoplasma der Lebersternzellen (HSC). Hepatocyten sind unmarkiert. B, aCygb1 zeigt eine starke, cytoplasmatische anti-Cygb Immunfluoreszenz (rot) in den Lebersternzellen (HSC). Die Hepatocyten sind hier ebenfalls unmarkiert.

In **Abb. 38** zeigen beide unabhängig voneinander hergestellten Antikörper ein identisches Bild. Eine anti-Cygb Immunfluoreszenz ist in den HSC der Leber zu finden, Hepatocyten sind jedoch unmarkiert. Lediglich die Intensität des Signals und der Hintergrund sind unterschiedlich. aCygb1 (vergeliche **Abb. 38A**) zeigt im Gegensatz zum Antikörper der AG Moens (vergleiche **Abb. 38B**) weniger Hintergrund und eine starke Immunfluoreszenz.

3 Mögliche Interaktionspartner von Neuroglobin und Cytoglobin

Neben Lokalisationsstudien sollte auch die direkte Suche nach einem Interaktionspartner mit Two-Hybrid Systemen helfen die Funktion von Ngb bzw. Cygb zu klären.

3.1 BacterioMatch Two-Hybrid System (Stratagene)

Zunächst sollte der Interaktionspartner von Ngb in einer selbst hergestellten cDNA-Bank aus Mäusegehirn gesucht werden. Jedoch war es nicht möglich, diese cDNA-Bank zu synthetisieren, da das käuflich erworbene System (BacterioMatch Two-Hybrid System XR Library Construction Kit, Stratagene) fehlerhaft war. Nach der Rücknahme des Systems wurde probiert, den Interaktionspartner in einer gekauften Gehirn cDNA-Bank (Stratagene) zu finden. Die Interaktionsstudien lieferten auch positive Klone, die jedoch entweder mitochondrialen Proteinen entsprachen oder im falschen Leseraster vorlagen. Beide Arten von Klonen würden nicht in kompletter Länge und/oder korrekter Sequenz in *E. coli* exprimiert werden. Somit kann es auch nicht zu einer Interaktion dieser Proteine mit Ngb gekommen sein.

Aufgrund dieser Untersuchungen wurde das Produkt von der Firma Stratagene inzwischen vom Markt genommen.

3.2 Matchmaker Hefe Two-Hybrid System (Clontech)

Das gefundene Ngb-Verteilungsmuster in der Retina (vergleiche C2.2.2 und Schmidt et al., 2003) und die daraus resultierende wahrscheinliche Funktion verlagerten unser Interesse auf Funktionsanalysen von Cygb. Da das System von Stratagene (siehe oben) sich als unzuverlässig erwiesen hatte, wurde das Matchmaker Hefe Two-Hybrid System von Clontech verwendet. Der Interaktionspartner von Cygb sollte in einer gekauften Leber cDNA-Bank (Pretransformed BD Matchmaker GAL4™ Libraries, Clontech) gefunden werden.

Alle gefundenen positiven Klone zeigten nach Sequenzierung ihre größte Identität mit Proteinen des Muskelgewebes. Jedoch zeigten unsere eigenen Cygb-Lokalisationsstudien, dass Cygb ausschließlich in Fibroblasten des Bindegewebes exprimiert wird, jedoch nicht im eigentlichen Muskelgewebe. Daraufhin wurden auch diese Interaktionsstudien erfolglos abgeschlossen.

D Diskussion

Globine sind die am weitesten verbreiteten respiratorischen Proteine. Man findet sie in allen fünf Organismenreichen (Hardisson, 1998; Weber & Vinogradov 2001). Ein typisches Globin wird aus ca. 150 Aminosäuren gebildet, die 8 α -Helices (A-H) ausbilden und sich zu einer globintypischen 3 über 3 α -helikalen Tertiärstruktur zusammenlagern. In der hydrophoben Tasche dieser Struktur ist das für die Sauerstoffbindung verantwortliche Häm mit dem zentralen Eisenion koordiniert (Dickerson & Geiss 1983). Die Funktion der meisten cytoplasmatischen Globine ist die Versorgung der Zelle mit ausreichend Sauerstoff, um den aeroben Metabolismus aufrecht zu erhalten (Dickerson & Geiss, 1983; Weber & Vinogradov 2001; Wittenberg & Wittenberg, 2003).

Bei Vertebraten waren lange Zeit nur das Myoglobin des Muskels und Hämoglobin in den roten Blutkörperchen bekannt. Zusätzlich wurden von Burmester und Mitarbeitern zwei weitere Globine, Neuroglobin (2000) und Cytoglobin (2002), entdeckt.

Desweiteren wurde bei dem Insekt *Drosophila melanogaster* überraschender Weise ein weiteres cytoplasmatisches Globin nachgewiesen (Burmester & Hankeln, 1999). Da die Funktion dieser drei cytoplasmatischen Globine nicht gesichert ist, sollten diese Globine näher charakterisiert werden.

1 Mögliche Funktionen cytoplasmatischer Globine

Für cytoplasmatische Globine wurden in der Literatur bereits verschiedene Funktionen beschrieben (vergleiche **Abb. 39**). Die von mir untersuchten „neuen“ Globine könnten also folglich:

- a) wie Myoglobin in Muskelzellen als Sauerstoffspeicher dienen bzw. den Sauerstofftransport zu den Mitochondrien verbessern (Wittenberg & Wittenberg, 1990, 2003).
- b) als Sauerstoffsensor dienen, wie es bei einigen Globinen von Bakterien und Archaea beobachtet wurde (Freitas et al., 2003).
- c) der Regenerierung von NAD^+ dienen, um unter Hypoxie die Energiegewinnung durch die Glycolyse zu gewährleisten. Dies konnte für das Hämoglobin von Mais gezeigt werden (Sowa et al., 1998).
- d) bei der Entsorgung von reaktiven Sauerstoffverbindungen helfen. So konnte z.B. für menschliches HB eine Monooxygenase-Aktivität nachgewiesen werden (Mieyal, 1985).

- e) bei der Entsorgung von reaktiven Stickstoffverbindungen helfen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Myoglobin als NO-Dioxygenase fungiert und toxisches NO zu Nitrat umwandeln kann (Flögel et al., 2001).
- f) Sauerstoff für enzymatische Reaktionen liefern. So benötigt, neben vielen anderen Reaktionen, die NO-Synthase molekularen Sauerstoff zur Synthese von NO (Leone et al., 1991).

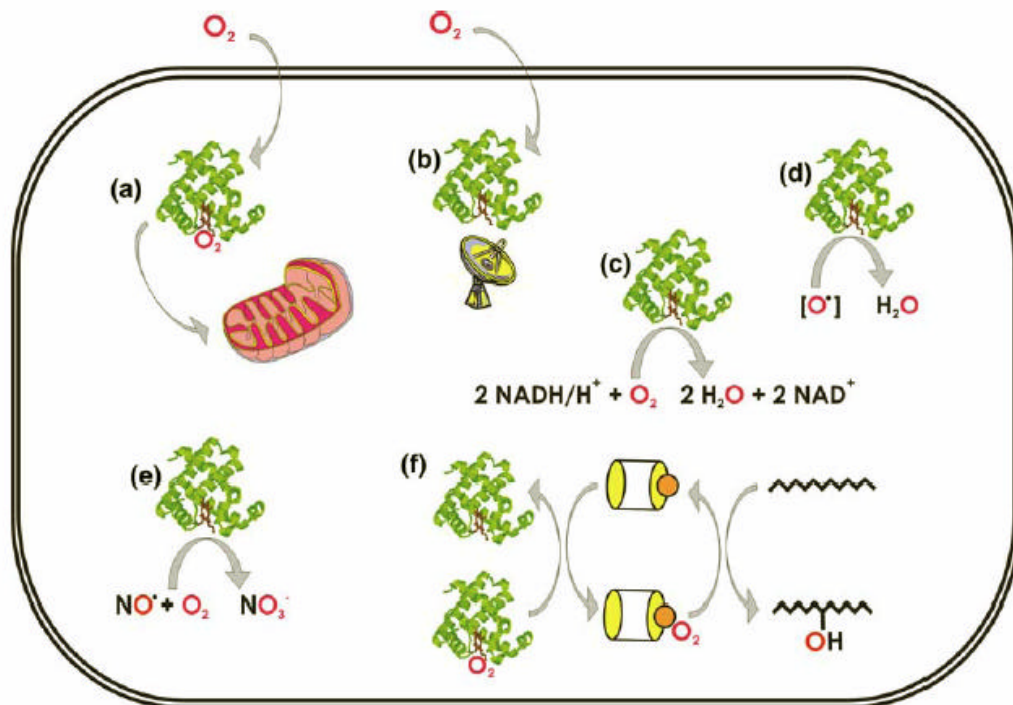


Abb. 39: Schematische Darstellung möglicher Funktionen von cytoplasmatischen Globinen.
a) Sauerstofftransporter; b) Sauerstoffsensor; c) Terminale Oxidase; d) detoxifikation von ROS; e) detoxifikation von NOS; f) Sauerstofflieferant für enzymatische Funktionen (aus Hankeln et al., 2005).

2 *Drosophila melanogaster* Hämoglobin

Überraschender Weise konnte bei *Drosophila melanogaster* das Vorhandensein eines Globins (DmeHb) nachgewiesen werden (Burmester & Hankeln, 1999). Das Insekt ist keinen hypoxischen Umweltbedingungen ausgesetzt ist, was bisher als notwendige Voraussetzung für das Vorkommen von Globinen bei Insekten angesehen wurde.

Das monomere *Drosophila*-Protein besteht aus 153 Aminosäuren mit einem Molekularmasse von 17 kDa. Es besitzt eine Sauerstoffaffinität von $P_{50} = 0,12$ Torr, was anderen intrazellulären Insektenglobinen, wie dem von *Gasterophilus intestinalis*, entspricht (Dewilde et al., 1998). Im Gegensatz zu allen bisher bekannten Insekten-Globinen ist das Eisen im Häm von *Drosophila* jedoch hexakoordiniert (Hankeln et al., 2002).

Die proteinkodierende Sequenz des *Drosophila*-Globins besteht aus drei Exons (Burmester & Hankeln, 1999), jedoch konnten Hankeln und Mitarbeiter (2002) zeigen, dass im 5' untranslatierten Bereich drei weitere Exons vorliegen. Durch alternatives „splicen“ resultieren daraus vier verschiedene Transkripte mit identischer kodierender Sequenz, jedoch unterschiedlichen 5' untranslatierten Bereichen. EST-Datenbanken aus verschiedenen Geweben bzw. unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigten, dass die verschiedenen Transkripte zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in verschiedenen Geweben zu finden sind. Dies konnte durch RT-PCR-Experimente bestätigt werden (Hankeln et al., 2002). Entweder liegt also eine unterschiedlich starke Expression zu verschiedenen Zeitpunkten vor, oder aber es kommt zu einer gewebespezifischen Expression der verschiedenen Spliceformen. Genauere Untersuchungen zu dieser Problematik liegen jedoch zurzeit nicht vor.

Der Westernblot mit Gewebe aus Larven und adulten Fliegen konnte keine entwicklungsstadienabhängige Verteilung des Proteins in diesen Phasen der Fliegenentwicklung zeigen (vergleiche **Abb. 18**). Es wurde in allen getesteten Geweben eine spezifische Bande bei 17 kDa detektiert. Als Ort der Globinsynthese in adulten Tieren konnten durch Immunperoxidaseuntersuchungen die Fettkörperzellen und Tracheen identifiziert werden (vergleiche **Abb. 19**). Die gewebsspezifische Verteilung wird durch in situ Hybridisierungsexperimente (Hankeln et al., 2002) bei Larven und adulten Tieren gestützt. Hier findet sich das DmeHb-mRNA Signal ebenfalls in Fettkörperzellen und Tracheen.

Die Sauerstoffaffinität des hexakoordinierten DmeHb ist im Bereich der anderer cytoplasmatischer Insektenglobine (Hankeln et al., 2002). Ebenso finden sich bei anderen Insekten wie z.B. der Diptere *G.intestinalis* (Dewilde et al., 1998; Weber & Vinogradov, 2001) gleiche Verteilungsmuster im Gewebe, wie ich sie auch bei *Drosophila* zeigen konnte

(vergleiche **Abb. 19**). Diese Daten und die nahe Verwandtschaft der Insektenglobine (Burmester & Hankeln, 1999) zueinander, deuten auf eine den anderen Insekten-Globinen vergleichbare Funktion hin. So ist anzunehmen, dass auch das *Drosophila*-Globin eine Funktion im Sauerstoffmetabolismus ausübt. Zum einen könnte das Globin dabei in den Tracheolen und Terminalzellen der Tracheen die Sauerstoffdiffusion aus der Luft in das umliegende Gewebe erleichtern. Zum anderen könnte es in den Fettkörperzellen, die Organe des adulten Tieres wie z.B. das Gehirn umgeben, eher die Funktion eines Sauerstoffspeichers haben. Somit gewährleistet es die Funktion von lebensnotwendigen, stoffwechselaktiven Geweben z.B. dem Gehirn. Bei Insekten, die unter hypoxischen Umweltbedingungen leben, wie z.B. die im Magen lebende Larve der Pferdebremse *Gastrophilus intestinalis* (Dewilde et al., 1998), gegenüber Insekten die „normoxischen“ Bedingungen ausgesetzt sind, kann man höhere Globin-Expressionsraten in Tracheen und Fettkörperzellen, finden. Auch könnte man annehmen, dass das Globin, wie sie bei einigen Insektengruppen zu finden ist, die Toleranz gegenüber vorübergehender Hypoxie oder sogar Anoxie verstärkt (Wegener, 1993). Die Embryonen und Larven von *Drosophila* zeigen z.B. eine überraschend starke Resistenz gegen künstlich herbeigeführte Hypoxie (Haddad et al., 1997; Wingrove & O'Farrell, 1999). Dies könnte den Larven das Überleben in Umgebungen mit geringen Sauerstoffkonzentrationen (faulende Früchte) ermöglichen (Hankeln et al., 2002). Das DmeHb könnte also mehrere Funktionen im Sauerstoffmetabolismus, Transport, Speicher und Schutz, gleichzeitig ausüben. Deshalb könnte man seine Funktion eher als die eines Sauerstoffpuffers bezeichnen, der dafür sorgt, dass der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe nicht zu stark schwankt.

Neben dieser Rolle im Sauerstoffmetabolismus, die mit anderen Insektenglobinen vergleichbar ist, gibt es jedoch noch andere denkbare Funktionen. So könnte DmeHb auch ein Sauerstoffsensoren sein, der z.B. das Wachstum der Tracheen reguliert (Jarecki et al., 1999). Jedoch konnten Sauerstoffsensoren mit einer Globindomäne bisher nur bei Archaea und Bakterien nachgewiesen werden (Freitas et al., 2003). Das Wachstum der Tracheen unter Hypoxie wird durch eine Signalkaskade gesteuert, in der NO eine Rolle spielt. Deshalb wäre es denkbar, dass der für die NO-Synthese notwendige Sauerstoff von DmeHb bereitgestellt wird (Wingrove & O'Farrell, 1999).

Eine Gemeinsamkeit aller genannten potentiellen Funktionen ist, dass sie die reversible Bindung von Sauerstoff an das Globin erfordern. Aufgrund der Hexakoordinierung des DmeHb ist die Sauerstoffbindung temperaturunabhängig (Uzan et al., 2004), und würde auch bei einem poikilothermen Tier wie *Drosophila* nicht von äußeren Temperaturschwankungen beeinflusst.

3 Neuroglobin

Neuroglobin ist ein neu entdecktes Globin der Vertebraten (Burmester et al., 2000). Obwohl seine Aminosäuresequenz nur in 20-25% mit der von Myoglobin bzw. Hämoglobin übereinstimmt, sind typische Merkmale monomerer Globine, wie die reversible Sauerstoffbindung und die 3 über 3 α -helikale Tertiärstruktur, konserviert.

Zu Beginn meiner Arbeit lagen bereits Expressionsanalysen zu Ngb mittels mRNA-Hybridisierungsexperimenten vor (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Ngb in Neuronen des zentralen und peripheren Nervengewebes, sowie einigen endokrinen Geweben exprimiert wird.

3.1 Neuroglobin wird verstärkt in der Retina exprimiert

Die Westernblot-Analysen an Mausgeweben (**Abb. 20**) zeigten, dass auch das Protein hauptsächlich in neuronalen Geweben wie z.B. dem Gehirn zu finden ist. Erstmals konnte nachgewiesen werden, dass Neuroglobin auch in der neuronalen Netzhaut (Retina) vorkommt. Auch war es mit Hilfe des Blots möglich durch Vergleich der Bandenintensitäten mit der von rekombinantem Ngb, die Konzentration von Ngb im Gewebe abzuschätzen. In der Retina liegt eine dem Myoglobin in Muskelzellen vergleichbare Ngb-Konzentration ($\sim 100 \mu\text{M}$) vor. Im Gehirn ist die durchschnittliche Konzentration mit $\sim 1 \mu\text{M}$ eher gering (Burmester et al., 2000). Neben der Tatsache, dass Ngb nicht in Leber, Muskel und Blut vorkommt (vergleiche C2.2.1), zeigt der Westernblot auch die Spezifität des Antikörpers. So konnte durch die fehlende Antikörperbindung in diesen Geweben auch eine Kreuzreaktion mit dem im Muskel vorkommenden Myoglobin bzw. dem im Blut vorhandenen Hämoglobin ausgeschlossen werden. Die hohe Konzentration des Globins in der Retina und die strukturierte, leicht im Mikroskop zu identifizierende Schichtung der Retina, veranlassten mich dazu, die Immunfluoreszenzuntersuchungen zur zellulären sowie subzellulären Verteilung von Ngb ausschließlich in diesem Gewebe durchzuführen. Im Gehirn wurden diese Untersuchungen parallel von der AG Hankeln durchgeführt (Wystub et al., 2003).

3.2 Zelluläre und Subzelluläre Lokalisation von Neuroglobin

In Immunfluoreszenz- (**Abb. 22B**) sowie Immunperoxidase- (**Abb. 22C**) Experimenten konnte Ngb verstärkt in den Photorezeptorzellen und zusätzlich noch in den beiden plexiformen Schichten sowie den Ganglienzellen nachgewiesen werden. Durch Immunfluoreszenz-Dopplemarkierungsexperimente (**Abb. 23**) mit anti-Ngb und anti-Arrestin, konnte die subzelluläre Verteilung von Ngb in Photorezeptorzellen aufgeklärt werden. Arrestin ist im Dunkeln exklusiv in den Innensegmenten und in der Präsynapse lokalisiert (Philp et al., 1987; McGinnis et al., 2002). Im Vergleich der beiden Fluoreszenzen zeigte sich

ein anti-Ngb Signal nur in dem apikalen Bereich der Innensegmente (Ellipsoid), sowie in den präsynaptischen Terminalen der Photorezeptoren.

Die Verteilung der Ngb-mRNA in der Mäuseretina unterscheidet sich von der des Proteins. Die mRNA ist wie das Protein in den Innensegmenten sowie der Ganglienzellschicht zu finden. Im Gegensatz zum Protein findet man die mRNA jedoch nicht in den plexiformen Schichten, sondern in den beiden nukleären Schichten. Folglich muss es nach der Translation zu einem massiven Proteintransport aus den nukleären in die plexiformen Schichten kommen. Dieser wurde bisher jedoch nicht näher untersucht.

Die Zellschichten in der Retina, in denen sich das Ngb-Protein befindet, sind auch die Bereiche für die Cringle et al. (2002) bei der Ratte die höchsten Sauerstoffumsatzraten errechnet haben.

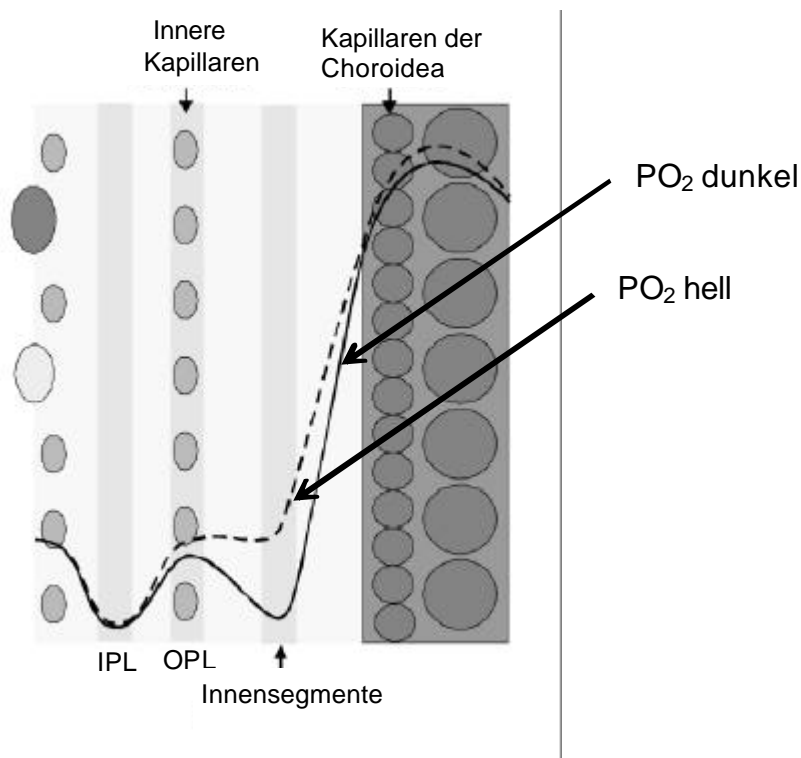


Abb. 40: Schematisches Modell der Sauerstoffverteilung in den verschiedenen Schichten der Retina. IPL, innere plexiforme Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht. Die Schichten mit dem höchsten Sauerstoffverbrauch sind grau schraffiert. Die Grafik wurde aus Cringle et al. (2002) modifiziert übernommen.

In der vaskularisierten Mäuseretina weisen die Photorezeptorzellen der Innensegmente und die neuronalen Verschaltungen in den plexiformen Schichten den höchsten Energiebedarf auf (Germer et al., 1998; Cringle et al., 2002, vergleiche **Abb. 40**). Ebenso ist in **Abb. 40** der niedrigere PO_2 in den Photorezeptorzellen dunkel adaptierter Retinae zu erkennen. Er resultiert aus dem nachts gesteigerten Energiebedarf, der nötig ist um den für die Lichtperzeption essentiellen Ionengradienten aufrecht zu erhalten (Cringle & Yu, 1996). Wie von uns vermutet, lassen sich in den Bereichen mit hohem Sauerstoffbedarf verstärkt

Mitochondrien finden (Carter-Dawson & LaVail, 1979; Tsacopoulos et al., 1998). Das Ngb und Mitochondrien in der Retina der Säuger tatsächlich colokalisiert sind, konnte von Anke Bentmann (Diplomarbeit, 2004) in Doppelmarkierungsexperimenten mit anti-Cytochrom c Antikörpern auf vaskulären Mäuseretinae gezeigt werden. Die offensichtliche Verknüpfung der Ngb-Funktion in der Retina mit dem Vorkommen von Mitochondrien wird weiter durch Studien von A. Bentmann an avaskulären Retinae bestätigt. Die nur über choroideale Gefäße der Aderhaut versorgte Meerschweinretina ist größten Teils hypoxisch bzw. sogar anoxisch (Cringle et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die äußeren Bereiche der Retina bis zu 94% des Gesamtsauerstoffverbrauchs dieses Organs ausmachen. Interessanterweise konnten von A. Bentmann auch nur in den Photorezeptorschichten Mitochondrien und Ngb nachgewiesen werden. Die Korrelation von Ngb- und Mitochondrien-Verteilung und die dem Myoglobin vergleichbaren Konzentrationen im Gewebe, lassen auf eine Sauerstofftransportfunktion von Neuroglobin in der Retina schließen.

Auch die Untersuchungen zur Verteilung von Ngb in der Retina der Regenbogenforelle (vergleiche C2.2.6) deuten auf eine Funktion im Sauerstoffmetabolismus hin. Desrochers et al. (1985) konnten an der avaskulären Forellenretina zeigen, dass die Sauerstoffdiffusion in der äußeren Retina ~3-4 mal so schnell abläuft wie in der inneren Retina. Dies könnte zum einen an der hohen Stoffwechselaktivität in den Photorezeptorzellen liegen, zum anderen könnte aber auch die hohe Ngb-Konzentration in den Innensegmenten für diesen gesteigerten Transport durch die Photorezeptorzellen verantwortlich sein. Für die Versorgung der inneren Retina mit genügend Sauerstoff würde dann die Diffusion ausreichen. Die Verteilung des Ngb in der Retina des Zebrafischs unterscheidet sich von der der Forelle. Sie entspricht der Ngb-Verteilung bei der Maus (vergleiche C2.2.2). Da jedoch zur Retina des Zebrafischs weder Untersuchungen zur Sauerstoffkonzentration noch zum Sauerstoffverbrauch vorliegen und es keine signifikanten morphologischen Unterschiede zur Retina der Forelle gibt, sind die verschiedenen Verteilungsmuster von Ngb in beiden Fischen zurzeit nicht zu erklären.

Studien zur Neuroglobinverteilung in Gehirnen von Nagetieren (Reuss et al., 2002) liefern ebenfalls Indizien, die auf eine Funktion des Ngb im Sauerstoffmetabolismus hinweisen. Jedoch spricht die niedrige Konzentration von Ngb im Gehirn (~1µM; Burmester et al., 2000) zunächst gegen eine „sauerstoffassoziierte Funktion“. Die von Reuss et al. (2002) durchgeführten in situ Hybridisierungsexperimente zeigen ein positives mRNA-Signal in einem Großteil der Neuronen. Im Gehirn sind nur Neuronen, nicht jedoch Gliazellen Ngb positiv. Da Somata und Synapsen jedoch nur einen kleinen Teil des Hirnvolumens ausmachen, ist zu vermuten, dass die lokale Ngb-Konzentration im Gehirn doch eher im Bereich der von Mb im Muskel liegt.

Die positiven Ngb-mRNA Funde in sehr stoffwechselaktiven endokrinen Geweben wie der Hypophyse, Epiphyse, Hoden und Nebenniere (Reuss et al., 2002) liefern ein weiteres Indiz für eine sauerstoffabhängige Funktion des Ngb. Das Signal resultiert hierbei aus intrinsischen Ganglien und nicht aus inervierenden Neuronen. Das heißt, dass die endokrinen Gewebe selbst Ngb produzieren. Die unterschiedliche Intensität des Signals in den einzelnen Organen korreliert sehr wahrscheinlich mit deren Stoffwechselaktivität und somit auch mit ihrem Sauerstoffverbrauch. Auch in den endokrinen Geweben scheint die Funktion von Ngb also mit dem Sauerstoffmetabolismus verknüpft zu sein.

Auch der Schutz von neuronalen Zellkulturen und Rattengehirnen vor künstlich herbeigeführter Ischämie durch Ngb (Sun et al., 2001, 2003), stützt die Sauerstoffversorgungsfunktion von Ngb. Jedoch gab es zur Regulation der Ngb-Expression unter Hypoxie bisher widersprüchliche Daten. So wurde von Sun et al. (2001) eine Hochregulation der Expression von Ngb in Zellkulturneuronen nach 16h bei Hypoxie um den Faktor 2,5 gezeigt. Jedoch konnten diese Ergebnisse von Mammen et al. (2002) in vivo an Gehirnen nicht bestätigt werden. Hier gab es keine Regulation von Ngb unter Hypoxie.

Meine Untersuchungen zur lichtabhängigen Expression von Ngb in Mäuseretina (vergleiche **Abb. 24**) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Ngb-Konzentrationen in hell und dunkeladaptierten Retinae, obwohl Cringle et al. (2002) zeigen konnten, dass die äußere Rattenretina im Dunkeln bis zu 50% mehr Sauerstoff verbraucht. Auch weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (AG Burmester) ergaben keine Hinweis auf eine signifikante Regulation von Ngb in Zellkultursystemen unter Hypoxie bzw. Anoxie (Daten bisher nicht veröffentlicht).

Auch konnten durch bioinformatische Sequenzanalysen von Wystub et al. (2004) in Säuger-Ngb keine konservierten HRE („hypoxia-responsive elements“) gefunden werden. Dies widerspricht einer starken Regulation von Ngb unter Hypoxie. Da die meisten Säugetiere nicht an Hypoxie angepasst sind, wäre dies auch nicht zu erwarten. Außerdem würde eine Hochregulation eines Proteins nach mehreren Stunden zum Schutz vor Sauerstoffmangel keinen Sinn machen, da bereits nach wenigen Minuten Neurone irreversibel geschädigt sind. Auch bringt eine solche Anpassung keine evolutiven Vorteile, da die Überlebenschancen eines Lebewesens nach z.B. einem Schlaganfall gegen Null gehen. Somit würden eventuelle Vorteile bei der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffverbindungen, die vermehrt nach Reperfusion des Gewebes nach einem Schlaganfall entsehen, durch eine erhöhte Ngb-Konzentration nicht zum tragen kommen.

Gegen eine Funktion im Sauerstoffmetabolismus spricht jedoch die sehr hohe Autooxidationsrate von Ngb (Dewilde et al., 2001). Das daraus resultierende Fe^{3+} kann kein Sauerstoff mehr binden. Es müsste also in Analogie zu Myoglobin zunächst wieder reduziert werden. Eine mit der Mb-Reduktase im Muskel vergleichbare Reduktase konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

Es zeigt sich, dass HN33 Zellen die Ngb in vitro überexprimieren eine höhere Überlebensrate aufweisen als untransfizierte HN33 Zellen (Sun et al., 2001). Dieser neuroprotektive Effekt von Ngb zeigt sich auch in vivo in Rattengehirnen, in denen die Ngb-Expression durch Antisenssonden ausgeschaltet wurde. Diese Gehirne weisen nur eine geringe Resistenz gegenüber Ischämie auf. Ob dieser neuroprotektive Effekt auf der Bereitstellung von Sauerstoff durch Ngb beruht, oder aber andere Mechanismen wie die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffverbindungen zu Grunde liegen, ist bisher nicht geklärt (siehe weitere Diskussion).

Ngb als Enzym (vergleiche **Abb. 39**)

Eine detoxifizierende Funktion von Ngb würde den neuroprotektiven Schutz bei erneuter Durchblutung von ischämischem Gewebe erklären (Sun et al., 2001, 2003). Dort werden vermehrt reaktive Sauerstoff- (ROS) bzw. Stickstoffverbindungen (NOS) gebildet, die durch ihre cytotoxischen Eigenschaften die Gewebe schädigen würden.

Eine NO-Detoxifikation wurde für Myoglobin im Muskel eindeutig nachgewiesen (Flögel et al., 2001). Ein vergleichbarer Mechanismus wurde von Herold et al. (2004) für Ngb postuliert. Jedoch ist die in vitro nachgewiesene Enzymfunktion nur bei NO-Konzentrationen im mM Bereich zu beobachten. In vivo konnten bisher jedoch nur NO-Konzentrationen von maximal wenigen 100 μ M nachgewiesen werden (Kanai et al., 2001).

Gegen eine NO detoxifizierende Funktion von Ngb sprechen auch Experimente mit HN33 Zellkulturen, die Ngb überexprimieren (Sun et al., 2001). In diesen Zellkulturen konnte keine besondere Resistenz gegen NO-Schäden beobachtet werden.

Ebenfalls gegen eine NO assoziierte Funktion sprechen die Ngb-mRNA Lokalisationsstudien von Reuss et al. (2002) an Rattengehirnen. Hier wurde keine Korrelation zwischen der Verteilung von Neuroglobin mRNA und NO-Synthase festgestellt.

Eine Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch Ngb wurde zwar schon in Erwägung gezogen (Pesce et al., 2002; Burmester et al., 2004), jedoch sprechen für diese Tatsache nur die bereits oben erwähnten indirekten Beweise der neuroprotektiven Funktion von Ngb (Sun et al., 2001, 2003). Meine Ngb Lokalisationsversuche in der Retina (C2.2.3) zeigen, dass Ngb in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen vorkommt, im Gegensatz zu ROS, das lichtinduziert verstärkt in den Aussensegmenten zu finden ist (Penn et al., 1987; Organisciak et al., 1989). Somit scheint eine Funktion von Ngb in der Detoxifikation von ROS in der Retina als unwahrscheinlich.

Ngb als O₂-Sensor (vergleiche **Abb. 39**)

Eine Funktion von Ngb als Sauerstoffsensoren ist unwahrscheinlich, da bisher nur bei Archäen und Bakterien Sauerstoffsensoren mit einer Globindomäne nachgewiesen werden konnten (Freitas et al., 2003). Diese benötigen jedoch neben der Globindomäne für ihre Funktionalität

noch eine Signaltransduktionsdomäne. Diese zusätzliche Domäne ist bei Vertebraten-Globinen jedoch nicht vorhanden.

Die mögliche Rolle von Fe³⁺-Ngb in der Signaltransduktionskaskade, die auf oxidativen Stress reagiert, wurde von Wakasugi et al. (2003) postuliert. Aufgrund einer angeblichen Sequenzähnlichkeit zu Regulatoren von G-Protein-vermittelten Signaltransduktionskaskaden, wurde angenommen, dass Ngb durch Unterbrechung des Signalweges die Resistenz von Zellkulturen gegenüber Hypoxie verstärkt. Jedoch sind die gefundenen Sequenzidentitäten zu gering, um daraus Rückschlüsse auf die Funktion ziehen zu können. Diese Ergebnisse sollten daher in vivo überprüft werden.

Die Interaktion von Ngb mit der beta 2 Untereinheit einer Na,K-ATPase-Ionenpumpe wurde von Xu et al., 2003 in Hefe Two-Hybrid- und Immunpräzipitations-Experimenten gezeigt. Peng et al. (1998) haben jedoch nachgewiesen, dass dieses Protein hauptsächlich in Astrogliazellen membranassoziiert vorliegt. Da Ngb jedoch ausschließlich cytoplasmatisch in Neuronen, nicht aber in Gliazellen (Laufs et al., 2004) zu finden ist, sind diese Interaktionsstudie unter Vorbehalt zu sehen.

Ngb als terminale Oxidase (vergleiche **Abb. 39**)

Theoretisch wäre es auch denkbar, dass Ngb als terminale Oxidase bei der Glykolyse unter Hypoxie eine Rolle spielt. Diese Funktion wurde weder für Ngb noch für andere Globine bisher untersucht.

Die Tatsache, dass im Gehirn der Laktat-Shuttle-Hypothese zufolge die Glykolyse primär in Astrogliazellen abläuft (Itoh et al., 2003) spricht gegen diese hypothetische Funktion. Das dort produzierte Laktat wird ausgeschleust und von Neuronen zur Energiegewinnung oxidiert. Das strikt in Neuronen vorkommenden Ngb kommt somit unter diesen Bedingungen nicht als terminale Oxidase in Frage. Man könnte sich höchstens einen gesteigerten Glukosemetabolismus bei Energiemangel vorstellen, der dann für eine solche Funktion von Ngb sprechen würde.

Obwohl viele Arbeitsgruppen mit Neuroglobin arbeiten ist es bisher nicht gelungen die genaue Funktion von Ngb aufzuzeigen. Es wurden viele Funktionen für Ngb postuliert von denen jedoch einige durch meine eigenen Experimente und die anderer Arbeitsgruppen ausgeschlossen werden können. So ist eine Funktion als Sauerstoffsensoren, als terminale Oxidase und auch die als detoxifizierendes Enzym unwahrscheinlich. Im Moment deutet der überwiegende Teil der Ngb-Untersuchungen und auch meinen eigenen Experimente auf eine Funktion im Sauerstoffmetabolismus von neuronalen Geweben hin. Jedoch sind weitere Experimente in dieser Richtung erforderlich um die Ngb Funktion abschließend zu verifizieren.

4 Cytoglobin

Cytoglobin (Cygb) ist neben Ngb ein weiteres neu entdecktes Globin der Vertebraten (Kawada et al., 2001; Burmester et al., 2002). Die größte Sequenzidentität weist Cygb zu Myoglobin auf (~30%). Trotz der großen Sequenzunterschiede sind die typische Tertiärstruktur der Globine mit den acht α -Helices und andere für die O₂-Bindung wichtige Strukturen konserviert. Cygb von Mensch und Maus unterscheiden sich nur in ~5% ihrer Aminosäuren. Damit gehört Cygb zu den am stärksten konservierten Proteinen, was so interpretiert werden kann, dass es im Stoffwechsel eine wichtige Funktion übernimmt.

Zu Beginn meiner Arbeit lagen Northern-Hybridisierungsdaten vor (Burmester et al., 2002), die belegen, dass die Cytoglobin-mRNA in allen untersuchten Geweben des Menschen vorkommt. Aufgrund dieser ubiquitären Verteilung wurde das Protein Cytoglobin genannt. Zeitgleich wurde das homologe Rattenprotein von Kawada und Mitarbeitern (2001) in den Sternzellen der Rattenleber identifiziert, wo es verstärkt unter fibrotischen Bedingungen exprimiert wird. Folglich wurde Cygb von dieser Arbeitsgruppe als „STAP“ („Stellate cell activation associated protein“) bezeichnet.

4.1 Fibroblastenspezifische Expression von Cytoglobin

Die Westernblot-Analyse (vergleiche C2.3.1) zeigte, dass auch das Cygb-Protein in den Geweben der Maus ubiquitär vorkommt. So lässt sich ein Cygb-Signal sowohl in neuronalen als auch in nichtneuronalen Geweben finden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass in den Cygb-mRNA positiven Geweben auch das Protein exprimiert wird.

Zur Aufklärung der zellulären und subzellulären Lokalisation von Cygb wurden Immunfluoreszenzexperimente zum einen mit den im Westernblot positiven Geweben, zusätzlich aber noch mit weiteren Geweben, wie Knochen, Knorpel und Haut, durchgeführt.

In Leber, Niere, Herz, Muskel, Darm, Sehne und Haut, konnte ich Cygb cytoplasmatisch, überwiegend in Fibroblasten des Bindegewebes detektieren (vergleiche C2.3.2). In diesen Experimenten konnte Cytoglobin auch in den Sternzellen der Leber nachgewiesen werden, was die Studie von Kawada et al. (2001), bestätigt. Neben Fibroblasten und Sternzellen waren bei meinen Immunfluoreszenzuntersuchungen positive Cygb-Signale auch in Osteoblasten des Knochen und Chondroblasten des Knorpels zu finden. Nach Rogers (1983) entwickeln sich beide Zelltypen aus Fibroblasten. Die ontogenetische Herkunft der Lebersternzellen wird zu Zeit noch diskutiert (Eng & Friedman, 2000). Sicher ist jedoch, genau wie bei Fibroblasten, der mesenchymale Ursprung der Sternzellen. Aus dieser ontogenetischen Verwandtschaft lässt sich ableiten, das Cytoglobin in den untersuchten Geweben nicht ubiquitär sondern exklusiv in Fibroblasten und verwandten Zellen wie Sternzellen, Osteo- und Chondroblasten vorkommt. Diese Verteilung im Bindegewebe

konnte von Nakatani und Mitarbeitern (2004), bis auf die Lokalisation von Cytoglobin in der Haut, in einer unabhängigen Studie bestätigt werden.

Meinen Experimenten zur Lokalisation von Cygb, die eine cytoplasmatische Verteilung in Fibroblasten und ontogenetisch verwandten Zellen zeigen konnte, widerspricht jedoch die Veröffentlichung von Geuens et al. (2003), in der Cygb exklusiv als nukleäres Protein nachgewiesen wurde. Jedoch zeigen die von Kawada et al. (2001) und mir, mit unabhängig voneinander hergestellten Antikörpern, durchgeführten Experimente nur ein cytoplasmatisches Signal in Fibroblasten und ontogenetisch verwandten Zellen, jedoch nicht in Hepatocyten, wie dies Geuens und Mitarbeiter (2003) postuliert hatten. Ausserdem konnte von Kawada, mittels biochemischen Methoden, auch bei isolierten Hepatocyten kein Cygb nachgewiesen werden. Dies widerspricht der von Geuens et al. postulierten ubiquitären Verteilung in allen Zelltypen. Die Expression des Proteins in Sternzellen hingegen ließ sich von ihm an isolierten Zellen bestätigen.

Gegen die Daten von Geuens et al. (2003) sprechen ebenfalls die eigenen Experimente, die von mir, mit dem in der genannten Veröffentlichung verwendeten Cygb-Antikörper durchgeführt wurden (vergleiche C2.3.2.10). In einem parallel durchgeführten Immunfluoreszenzexperiment auf Mäuseleber (vergleiche C2.3.2.10) zeigte sich für beide Antikörper ein cytoplasmatisches Signal in Sternzellen und Fibroblasten.

Auch Kalkulationen nach der Reinhardts-Methode (Reinhardt & Hubbard, 1998) bei denen sich eine 94%ige Wahrscheinlichkeit ergab, dass Cygb ein cytoplasmatisches Protein ist, sprechen gegen eine nukleäre Lokalisation des Globins, da dieser Wert mit dem von Myoglobin, dessen cytoplasmatische Lokalisation gesichert ist, vergleichbar ist. Desweiteren konnte T. Laufs mit einem Cygb-GFP Fusionprotein durchgeführten Experiment zeigen, dass kein Transport des Fusionsproteins in den Zellkern stattfindet (Schmidt et al., 2004).

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen mit unabhängig voneinander hergestellten Antikörper, ein direkter Vergleich des Antikörpers von Geuens und Mitarbeitern, der Versuch mit dem Cygb-GFP Fusionsprotein, biochemische Untersuchungen an isolierten Sternzellen, sowie theoretische Kalkulationen lassen also auf ein cytoplasmatisches Vorkommen von Cygb in Sternzellen und Fibroblasten schliessen. Es scheint als wären die Daten von Geuens et al. eher ein Artefakt, dass sich eventuell durch die für die Immunfluoreszenz verwendeten harschen Fixierungsmethoden erklären lassen.

4.2 Mögliche Funktion von Cytoglobin im Bindegewebe

Nakatani und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass bis auf die Cygb-positiven Zellen in der Haut, alle Zellen auch immunpositiv für Hsp47 sind. Es handelt sich hierbei um ein kollagenspezifisches Chaperon. Alle Cygb-positiven Zelltypen besitzen also eine offensichtliche Gemeinsamkeit: sie produzieren Kollagen. Bei der Synthese von Kollagen

wird molekularer Sauerstoff zur Hydroxylierung des Prokollagens durch die Prolyl-4-hydroxylase benötigt (Pihlajaniemi et al., 1991; Kivirikko & Myllyharju, 1998). Diese Hydroxylierung bewirkt eine Stabilisierung der charakteristischen Dreifach-Helix im Kollagen. Daraus könnte man schlussfolgern, dass Cygb eine Funktion bei der Kollagensynthese übernimmt. Dabei ist der Grad der Hydroxylierung bei der Kollagenproduktion vom vorhandenen Sauerstoff abhängig (Yen et al., 1979). Cygb könnte also direkt Sauerstoff an die Prolylhydroxylase liefern, um die Kollagensynthese unter Sauerstoffmangelbedingungen zu gewährleisten. Allerdings spricht die niedrigere O₂-Affinität der Prolylhydroxylase gegen diesen Mechanismus (Hirsilä et al., 2003). Jedoch könnte in Analogie zum Myoglobin, das im Muskel die Sauerstoffdiffusion zu den Mitochondrien erleichtert (Wittenberg & Wittenberg, 2003), Cygb aber auch die O₂-Diffusion zum Ort der Kollagensynthese hin verbessern.

Gestützt wird diese Hypothese durch meine Untersuchungen zur Verteilung von Cygb im Knochen und Knorpel (vergleiche C2.3.2.8). Hier zeigt sich eine entwicklungsabhängige Expression von Cygb. So findet man in den aktiven, kollagensezernierenden Chondroblasten und Osteoblasten ein starkes anti-Cygb-Signal. In den differenzierten, inaktiveren Chondrocyten und Osteocyten ist jedoch nur ein sehr schwaches Cygb-Immunfluoreszenz-Signal zu erkennen.

So deutet die verstärkte Expression von Cygb in Sternzellen von fibrotischer Leber, wie sie Kawada et al. (2001) zeigen konnte, ebenfalls auf eine kollagenabhängige Funktion von Cygb hin, da es in fibrotischer Leber, sowie bei Virusinfektionen und in der Wundheilung zu einer Aktivierung der Sternzellen (Reeves & Friedman, 2002) und gleichzeitig zu einer verstärkten Kollagensynthese kommt (Arthur, 2000; Nieto et al., 2002). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Kollagen-mRNA und -Protein unter Hypoxie, sowohl in vitro als auch in vivo gesteigert ist (Falanga et al., 1993; Ostadal et al., 1995; Takahashi et al., 2000; Horino et al., 2002; Nieto & Friedman, 2002). Eine hypoxieabhängige Regulation der Cygb-Expression konnte auch von Fordel et al., (2004) gezeigt werden. Die Stärke der Expression wird dabei durch HIF („hypoxia inducible factor) reguliert. Dies konnte mit Hilfe von HIF Knockout Mäusen, die eine erniedrigte Cygb-Expression aufwiesen, gezeigt werden. Hinweise auf eine Expressionskontrolle durch HIF konnten auch Wystub und Mitarbeitern (2004) finden. Bei Sequenzanalysen an Cygb entdeckten sie konservierte Bereiche im Gen, die auf eine hypoxiegesteuerte Transkriptionskontrolle durch HIF („hypoxia inducible factor) hindeuten. Neben diesen konservierten Sequenzbereichen (HRE, „hypoxia-responsive elements“) konnten noch Sequenzmotive gefunden werden, die mRNA unter Hypoxie stabilisieren. (HIPS, „hypoxia inducible mRNA stabilization sequences).

In Kooperation mit der israelischen Arbeitsgruppe von A. Avivi und T. Hankeln konnte gezeigt werden, dass auch die Cygb-mRNA in Rattenleber und -herz unter Hypoxie um den Faktor 2,5 hochreguliert wird (Schmidt et al., 2004). Für Kollagen wurde ebenfalls eine gesteigerte Expression unter Hypoxie nachgewiesen (Falanga et al., 1993; Takahashi et al.,

2000). So könnte Cygb also unter Sauerstoffmangelbedingungen dafür sorgen, dass für die Kollagensynthese, die unter diesen Bedingungen verstärkt abläuft, genügend Sauerstoff zur Verfügung steht. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass in vitro unter reduzierenden Bedingungen, in Analogie zum Ngb, in Cygb eine interne Disulfidbrücke reduziert werden kann und so vermehrt Sauerstoff freigesetzt wird (Hamdane et al., 2003). Da sich unter Hypoxie vermehrt NADH/H⁺ anreichert, könnte dieser Mechanismus auch in vivo zur Spaltung der Disulfidbrücken führen und so zusätzlichen O₂ zur Verfügung stellen. Jedoch ist der Effekt nicht so stark wie beim Ngb. Die Sauerstoffaffinität des Cygb würde sich nur um den Faktor 2 erniedrigen.

4.3 Cytoglobin auch in neuronalen Geweben

Wie oben bereits erwähnt zeigten meine Westernblotanalysen Cygb-Signale ebenfalls in Gehirn und Retina (vergleiche C2.3.1). Die daraufhin durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen an Gefrierschnitten des Augenbechers der Maus bestätigten dieses Ergebnis (vergleiche C2.3.2.9). Zum einen war ein cytoplasmatisches Cygb-Signal in Fibroblasten nichtneuronaler Bereiche wie der Aderhaut (Choroidea) und des Ziliarkörpers (processus ciliaris) zu beobachten. Zum anderen konnte ich Cygb auch in der Netzhaut (Retina) nachweisen, die neuronalen Ursprungs ist. Starke Cygb-Signale konnten hier in der Ganglienzellschicht und der inneren nukleären Schicht, schwächere in den beiden plexiformen Schichten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Fibroblasten und ontogenetisch verwandten Zelltypen verteilt sich Cygb in den Neuronen auf Cytoplasma und Zellkern. In den beiden nukleären Schichten sind nur einige Neuronen Cygb positiv. Da es im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich war diese Zellen genauer zu charakterisieren, lassen sich aus dieser Verteilung zurzeit nur schwer Rückschlüsse auf die Funktion von Cygb ziehen. Jedoch ist anzunehmen das Cytoglobin und Neuroglobin in der Retina unterschiedliche Funktionen übernehmen. Dies lässt sich aus dem gleichzeitigen Vorkommen beider Proteine in der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht ableiten. Ein Vorkommen von Proteinen mit derselben Funktion in einem Kompartiment ist wohl auszuschließen, da es dem Organismus keinen Vorteil bringen würde. Jedoch konnten bisher keine Doppelmarkierungsexperimente durchgeführt werden, um eine Kolo-kalisation beider Proteine zu verifizieren, da die funktionierenden Antikörper gegen beide Globine in Kaninchen hergestellt wurden.

Das Vorhandensein von Kollagen in neuronalem Gewebe konnte bisher nicht gezeigt werden. Dies kann als Hinweis darauf genommen werden, dass Cygb hier eine andere Funktion ausübt als im Bindegewebe. So könnte Cygb in neuronalen Geweben die Sauerstoffdiffusion zu Enzymen, die O₂ benötigen, gewährleisten (Schmidt et al., 2005). Ein solches Enzyme, wie z.B. die NO-Synthase, konnte schon in Zellkernen nachgewiesen

werden (Giordano et al., 2002). Jedoch ist es vorstellbar, dass Cygb eine andere, noch unbekanntere Rolle im Organismus übernimmt.

4.4 Andere Funktionen von Cytoglobin?

Von Burmester und Mitarbeitern (2002) vorgeschlagen, dass Cygb in der Sauerstoffversorgung der Mitochondrien eine Rolle spielt. Meine Ergebnisse sprechen jedoch gegen eine solche Funktion, da für nichtneuronale Gewebe gilt, dass weder Fibroblasten noch Sternzellen einen besonders aktiven Stoffwechsel besitzen und damit auch keinen überdurchschnittlichen Energiebedarf haben.

Ebenso unwahrscheinlich scheint eine Funktion bei der Detoxifikation von ROS (vergleiche **Abb. 39**). Für Cygb wie auch für Ngb gilt, dass es nicht in den Retinaschichten vorkommt, in denen ROS vermehrt produziert werden. Dies ist in der Retina das Aussensegment, das unter Lichteinwirkung verstärkt ROS produziert (Penn et al., 1987; Organisciak et al., 1989). Aber auch meine Ergebnisse für nichtneuronale Gewebe widersprechen einer ROS-abhängigen Funktion, da weder Fibroblasten noch Sternzellen besonders empfindlich für ROS sind.

Eine Funktion von Cygb als O₂-Sensor erscheint auf Grund meiner Daten ebenfalls unwahrscheinlich. Zum einen konnten bisher O₂-Sensoren mit einer Globindomäne nur bei Bakterien nachgewiesen werden (Freitas et al., 2003), zum anderen muss die Expression eines solchen Sensors nicht reguliert werden. Die Cygb-Expression wird jedoch unter Hypoxie um den Faktor 2,5 hochreguliert (Schmidt et al., 2003).

E Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Dissertation untersuchte ich die intrazelluläre Lokalisation des Hämoglobins von *Drosophila melanogaster*, sowie von Neuroglobin und Cytoglobin der Vertebraten. Obwohl alle drei Globine erst kürzlich entdeckt wurden, liegen bereits Daten über ihre Struktur, ihre biochemischen Eigenschaften und die Lokalisation der mRNA vor. Ihre Funktionen konnten bisher jedoch nicht eindeutig geklärt werden.

Das Globin von *Drosophila melanogaster* konnte mittels Westernblot sowohl in Larven als auch adulten Fliegen nachgewiesen werden. Ebenso war es mir möglich, mittels Immunperoxidaseuntersuchungen die Tracheen, die Terminalzellen der Tracheolen sowie die Fettkörperzellen als Ort der Globinexpression in *Drosophila* zu identifizieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass dieses Globin eine Funktion als Sauerstoffpuffer, der sowohl Sauerstoff speichert als auch transportiert, hat. Damit würde das *Drosophila* Globin eine zu anderen Insektenglobinen vergleichbare Funktion übernehmen.

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Neuroglobin auch in der neuronalen Netzhaut von Säugern und Fischen vorkommt. Des Weiteren konnte Neuroglobin in der Retina zellulär sowie subzellulär lokalisiert werden. In der avaskulären Mäuseretina wurde Neuroglobin neben den Innensegmenten der Photorezeptorzellen, auch noch in den beiden plexiformen Schichten sowie in der Ganglienzellschicht gefunden. Die gezeigte Kollokalisierung dieses intrazellulären Globins mit Mitochondrien und somit auch mit den Orten des höchsten Sauerstoffbedarfs in der Retina deutet auf eine Funktion im Sauerstofftransport zu den Mitochondrien hin. Des Weiteren könnte Neuroglobin auch als Sauerstoffspeicher dienen, der es Neuronen ermöglicht, kurzfristige hypoxische Bedingungen unbeschadet zu überstehen. Andere mögliche Funktionen wie z.B. die als Detoxifizierer von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindungen, als Sauerstoffsensor, sowie als terminale Oxidase erscheinen durch die gezeigten Daten eher unwahrscheinlich.

Die bisherige Annahme, dass Cytoglobin ein ubiquitär exprimiertes Protein ist, konnte von mir nicht bestätigt werden. Für nichtneuronale Gewebe konnte gezeigt werden, dass Cytoglobin lediglich auf das Cytoplasma von Fibroblasten und ontogenetisch verwandte Zelltypen wie Osteoblasten, Chondroblasten und Sternzellen beschränkt ist. Möglicherweise hat Cytoglobin dort eine Funktion in der Kollagensynthese. Ferner wird Cygb cytoplasmatisch und nukleär in einigen Neuronen der Retina und des Gehirns exprimiert. Dort könnte Cygb z.B. nukleäre Enzyme wie die NO-Synthase mit Sauerstoff versorgen. Andere Funktionen scheinen aufgrund meiner Daten im Moment unwahrscheinlich.

F Literatur

- Arthur, M. J. (2000) Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G245-249
- Awenius, C., Hankeln, T. and Burmester, T. (2001) Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 418-421
- Benton, M. J. (1990) Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates. *J Mol Evol* **30**, 409-424
- Bergstrom, G. (1977) Partial characterization of haemoglobin of the bug, *Bueno confusa*. *Insect Biochem* **7**, 313-316
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R. and Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**, 317-339
- Blaxter, M. L. (1993) Nemoglobins: Divergent nematode globins. *Parasitol Today* **9**, 353-360
- Bolognesi, M., Bordo, D., Rizzi, M., Tarricone, C. and Ascenzi, P. (1997) Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog Biophys Mol Biol* **68**, 29-68
- Brunori, M. (2001) Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends Biochem Sci* **26**, 209-210
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B. and Hankeln, T. (2002) Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* **19**, 416-421
- Burmester, T. and Hankeln, T. (1999) A globin gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* **16**, 1809-1811
- Burmester, T. and Hankeln, T. (2004) Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News Physiol Sci* **19**, 110-113
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S. and Hankeln, T. (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**, 520-523
- Carter-Dawson, L. D. and LaVail, M. M. (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* **188**, 245-262
- Cringle, S. and Yu, D. Y. (1996) Light-induced changes in retinal oxygen consumption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 473-475
- Cringle, S., Yu, D. Y., Alder, V., Su, E. N. and Yu, P. (1996) Oxygen consumption in the avascular guinea pig retina. *Am J Physiol* **271**, H1162-1165
- Cringle, S. J. and Yu, D. Y. (2002) A multi-layer model of retinal oxygen supply and consumption helps explain the muted rise in inner retinal PO₂ during systemic hyperoxia. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **132**, 61-66
- Cringle, S. J., Yu, D. Y., Yu, P. K. and Su, E. N. (2002) Intraretinal oxygen consumption in the rat in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1922-1927

-
- Cringle, S. J. and Yu, D. Y. (2004) Intraretinal oxygenation and oxygen consumption in the rabbit during systemic hyperoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 3223-3228
- de Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. and Bolognesi, M. (2004) Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination. *J Mol Biol* **336**, 917-927
- de Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. and Bolognesi, M. (2004) Mapping protein matrix cavities in human cytoglobin through Xe atom binding. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 1217-1221
- Desrochers, P. E., Pratt, K. A., Fromm, P. O. and Hoffert, J. R. (1985) Oxygen diffusion in the trout retina. *Exp Eye Res* **41**, 607-618
- Deutscher, M. P. (1990) Maintaining protein stability. *Methods Enzymol* **182**, 83-89
- Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, M. L., Van Houte, K., Pesce, A., Griffon, N., Kiger, L., Marden, M. C., Vermeire, S., Vanfleteren, J., Esmans, E. and Moens, L. (1998) Structural, functional, and genetic characterization of Gastrophilus hemoglobin. *J Biol Chem* **273**, 32467-32474
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzat, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R. and Moens, L. (2001) Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem* **276**, 38949-38955
- Dickerson, R. E., and Geis, I. (1983) Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology. Publ. Co., Menlo Park, Calif. (Benjamin/Cummings, Ed.)
- Dixon, B. and Pohajdak, B. (1992) Did the ancestral globin gene of plants and animals contain only two introns? *Trends Biochem Sci* **17**, 486-488
- Eng, F. J. and Friedman, S. L. (2000) Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G7-G11
- Fabb, S. A., Cheong, M. F., Lee, B. T. O. and Martin, J. A. (1990) A sex-influenced protein in *Chironomus* (Diptera). *Insect Biochem* **20**, 135-140
- Falanga, V., Martin, T. A., Takagi, H., Kirsner, R. S., Helfman, T., Pardes, J. and Ochoa, M. S. (1993) Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* **157**, 408-412
- Flögel, U., Merx, M. W., Godecke, A., Decking, U. K. and Schrader, J. (2001) Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 735-740
- Fordel, E., Geuens, E., Dewilde, S., Rottiers, P., Carmeliet, P., Grooten, J. and Moens, L. (2004) Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. **319**:342-8
- Freitas, T. A., Hou, S. and Alam, M. (2003) The diversity of globin-coupled sensors. *FEBS Lett* **552**, 99-104

-
- Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, M., Hamdane, D., Marden, M. C., Hankeln, T. and Burmester, T. (2004) Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding. *J Biol Chem* **279**, 24116-24122
- Germer, A., Biedermann, B., Wolburg, H., Schuck, J., Grosche, J., Kuhrt, H., Reichelt, W., Schousboe, A., Paasche, G., Mack, A. F. and Reichenbach, A. (1998) Distribution of mitochondria within Muller cells--I. Correlation with retinal vascularization in different mammalian species. *J Neurocytol* **27**, 329-345
- Geuens, E., Brouns, I., Flamez, D., Dewilde, S., Timmermans, J. P. and Moens, L. (2003) A globin in the nucleus! *J Biol Chem* **278**, 30417-30420
- Giardina, B., Ascenzi, P., Clementi, M. E., De Sanctis, G., Rizzi, M. and Coletta, M. (1996) Functional modulation by lactate of myoglobin. A monomeric allosteric hemoprotein. *J Biol Chem* **271**, 16999-17001
- Giordano, A., Tonello, C., Bulbarelli, A., Cozzi, V., Cinti, S., Carruba, M. O. and Nisoli, E. (2002) Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett* **514**, 135-140.
- Goodman, M., Pedwaydon, J., Czelusniak, J., Suzuki, T., Gotoh, T., Moens, L., Shishikura, F., Walz, D. and Vinogradov, S. (1988) An evolutionary tree for invertebrate globin sequences. *J Mol Evol* **27**, 236-249
- Haddad, G. G., Sun, Y., Wyman, R. J. and Xu, T. (1997) Genetic basis of tolerance to O₂ deprivation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10809-10812
- Hagner-Holler, S., Schoen, A., Erker, W., Marden, J. H., Rupprecht, R., Decker, H. and Burmester, T. (2004) A respiratory hemocyanin from an insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 871-874
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L. and Marden, M. C. (2003) The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. *J Biol Chem* **278**, 51713-51721
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T. L., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., Sanctis, D. D., Marden, M. C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A. and Burmester, T. (2005) Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J Inorg Biochem* **99**, 110-119
- Hankeln, T., Jaenicke, V., Kiger, L., Dewilde, S., Ungerechts, G., Schmidt, M., Urban, J., Marden, M. C., Moens, L. and Burmester, T. (2002) Characterization of *Drosophila* hemoglobin. Evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects. *J Biol Chem* **277**, 29012-29017
- Hardison, R. (1998) Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J Exp Biol* **201**, 1099-1117
- Hardison, R. C. (1996) A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5675-5679

-
- Herold, S., Fago, A., Weber, R. E., Dewilde, S. and Moens, L. (2004) Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *J Biol Chem* **279**, 22841-22847
- Hirsilä, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K. I. and Myllyharju, J. (2003) Characterization of the Human Prolyl 4-Hydroxylases That Modify the Hypoxia-inducible Factor. *J. Biol. Chem* **278**: 30772-30780
- Horino, Y., Takahashi, S., Miura, T. and Takahashi, Y. (2002) Prolonged hypoxia accelerates the posttranscriptional process of collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Life Sci* **71**, 3031-3045
- Ilan, E. a. D., E. (1979) Structural diversity of arthropod extracellular haemoglobins. *Comp Biochem Physiol B Biochem* **63**, 303-308
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E. and Sokoloff, L. (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4879-4884
- Jarecki, J., Johnson, E. and Krasnow, M. A. (1999) Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by branchless FGF. *Cell* **99**, 211-220
- Kanai, A. J., Pearce, L. L., Clemens, P. R., Birder, L. A., VanBibber, M. M., Choi, S. Y., de Groat, W. C. and Peterson, J. (2001) Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14126-14131
- Kawada, N., Kristensen, D. B., Asahina, K., Nakatani, K., Minamiyama, Y., Seki, S. and Yoshizato, K. (2001) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **276**, 25318-25323
- Kendrew, J. C. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci Am* **205**, 96-110
- Kivirikko, K. I. and Myllyharju, J. (1998) Prolyl 4hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol* **16**, 357-368
- Kugelstadt, D., Haberkamp, M., Hankeln, T. and Burmester, T. (2004) Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 719-25.
- Kundu, S., Trent, J. T., 3rd and Hargrove, M. S. (2003) Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci* **8**, 387-393
- LaCount, M. W., Zhang, E., Chen, Y. P., Han, K., Whitton, M. M., Lincoln, D. E., Woodin, S. A. and Lebioda, L. (2000) The crystal structure and amino acid sequence of dehaloperoxidase from *Amphitrite ornata* indicate common ancestry with globins. *J Biol Chem* **275**, 18712-18716
- Lamy, J. N., Green, B. N., Toulmond, A., Wall, J. S., Weber, R. E. and Vinogradov, S. N. (1996) Giant Hexagonal Bilayer Hemoglobins. *Chem Rev* **96**, 3113-3124

-
- Laufs, T. L., Wystub, S., Reuss, S., Burmester, T., Saaler-Reinhardt, S. and Hankeln, T. (2004) Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neurosci Lett* **362**, 83-86
- Lebioda, L., LaCount, M. W., Zhang, E., Chen, Y. P., Han, K., Whitton, M. M., Lincoln, D. E. and Woodin, S. A. (1999) An enzymatic globin from a marine worm. *Nature* **401**, 445
- Leone, A. M., Palmer, R. M., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1991) Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* **266**, 23790–23795
- Lieb, B., Altenhein, B., Markl, J., Vincent, A., van Olden, E., van Holde, K. E. and Miller, K. I. (2001) Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4546-4551
- Liochev, S. I., Kuchumov, A. R., Vinogradov, S. N. and Fridovich, I. (1996) Superoxide dismutase activity in the giant hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Arch Biochem Biophys* **330**, 281-284
- Mammen, P. P., Shelton, J. M., Goetsch, S. C., Williams, S. C., Richardson, J. A., Garry, M. G. and Garry, D. J. (2002) Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J Histochem Cytochem* **50**, 1591-1598.
- Manning, A. M., Trotman, C. N. and Tate, W. P. (1990) Evolution of a polymeric globin in the brine shrimp *Artemia*. *Nature* **348**, 653-656
- Markl, J. D., H. (1992) Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* **13**, 325-376
- McGinnis, J. F., Matsumoto, B., Whelan, J. P. and Cao, W. (2002) Cytoskeleton participation in subcellular trafficking of signal transduction proteins in rod photoreceptor cells. *J Neurosci Res* **67**, 290-297
- McLysaght, A., Hokamp, K. and Wolfe, K. H. (2002) Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat Genet* **31**, 200-204
- Mieyal, J. (1985) Monooxygenase activity of hemoglobin and myoglobin. *Rev Biochem Toxicol* **7**, 1-66
- Miller, P. L. (1964) Possible function of haemoglobin in *Anisops*. *Nature* **201**, 1052
- Miller, P. L. (1966) The function of haemoglobin in relation to the maintenance of neutral buoyancy in *Anisops pellucens* (Notonectidae, Hemiptera). *J Exp Biol* **44**, 529-543
- Minning, D. M., Gow, A. J., Bonaventura, J., Braun, R., Dewhirst, M., Goldberg, D. E. and Stamler, J. S. (1999) *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature* **401**, 497-502
- Moens, L., Vanfleteren, J., Van de Peer, Y., Peeters, K., Kapp, O., Czeluzniak, J., Goodman, M., Blaxter, M., and Vinogradov, S. (1996) Globins in nonvertebrate species: dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. *Mol Biol Evol* **13**, 324-333

-
- Nieto, N., Friedman, S. L. and Cederbaum, A. I. (2002) Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* **35**, 62-73
- Noren, S. R. and Williams, T. M. (2000) Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **126**, 181-191
- O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **10**, 4007-4021
- Ordway, G. A. and Garry, D. J. (2004) Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* **207**, 3441-3446
- Organisciak, D. T., Wang, H. M., Xie, A., Reeves, D. S. and Donoso, L. A. (1989) Intense-light mediated changes in rat rod outer segment lipids and proteins. *Prog Clin Biol Res* **314**, 493-512
- Ostadal, B., Kolar, F., Pelouch, V. and Widimsky, J. (1995) Ontogenetic differences in cardiopulmonary adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* **44**, 45-51
- Penn, J. S., Naash, M. I. and Anderson, R. E. (1987) Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. *Exp Eye Res* **44**, 779-788
- Perutz, M. F. (1986) A bacterial hemoglobin. *Nature* **322**, 405
- Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. and Bolognesi, M. (2003) Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure (Camb)* **11**, 1087-1095
- Pesce, A., Nardini, M., Dewilde, S., Ascenzi, P., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L. and Bolognesi, M. (2002) Human neuroglobin: crystals and preliminary X-ray diffraction analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1848-1850
- Philp, N. J., Chang, W. and Long, K. (1987) Light-stimulated protein movement in rod photoreceptor cells of the rat retina. *FEBS Lett* **225**, 127-132
- Pihlajaniemi, T., Myllyla, R. and Kivirikko, K. I. (1991) Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis. *J Hepatol* **13 Suppl 3**, S2-7
- Reeves, H. L. and Friedman, S. L. (2002) Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* **7**, d808-826
- Reinhardt, A. and Hubbard, T. (1998) Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res* **26**, 2230-2236
- Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T. and Hankeln, T. (2002) Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience* **115**, 645-656
- Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T. and Burmester, T. (2005) A Globin Gene of Ancient Evolutionary Origin in Lower Vertebrates: Evidence for Two Distinct Globin Families in Animals. *Mol Biol Evol* **22**, 12-20

-
- Rogers, A. W. (1983) *Cells and Tissues - An Introduction to Histology and Cell Biology*. Academic Press, New York
- Royer, W. E., Jr., Hendrickson, W. A. and Chiancone, E. (1989) The 2.4-Å crystal structure of *Scapharca* dimeric hemoglobin. Cooperativity based on directly communicating hemes at a novel subunit interface. *J Biol Chem* **264**, 21052-21061
- Schmidt, M., Giessel, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U. and Burmester, T. (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem* **278**, 1932-1935
- Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J. C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T. and Burmester, T. (2004) Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **279**, 8063-8069
- Schmidt, M., Laufs, T., Reuss, S., Hankeln, T. and Burmester, T. (2005) Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye. *Neurosci Lett* **374**, 207-211
- Sowa, A. W., Duff, S. M. G., Guy, P. A., and Hill, R. D. (1998) Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10317-10321
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y. and Greenberg, D. A. (2001) Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic- ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15306-15311
- Sun, Y., Jin, K., Peel, A., Mao, X. O., Xie, L. and Greenberg, D. A. (2003) Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3497-3500
- Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T. and Miura, T. (2000) Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem* **275**, 14139-14146
- Terwilliger, N. B. and Terwilliger, R. C. (1978) Oxygen binding domains of a clam (*Cardita borealis*) extracellular hemoglobin. *Biochim Biophys Acta* **537**, 77-85
- Toulmond, A. (1973) Tide-related changes of blood respiratory variables in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Respir Physiol* **19**, 130-144
- Toulmond, A. (1975) Blood oxygen transport and metabolism of the confined lugworm *Arenicola marina* (L.). *J Exp Biol* **63**, 647-660
- Trent, J. T., 3rd and Hargrove, M. S. (2002) A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem* **277**, 19538-19545
- Trewitt, P. M., Boyer, D. R. and Bergtrom, G. (1986) Characterization of maternal haemoglobins in the eggs and embryos of *Chironomus thummi*. *J Insect Physiol* **32**, 963-965
- Tsacopoulos, M., Poitry-Yamate, C. L., MacLeish, P. R. and Poitry, S. (1998) Trafficking of molecules and metabolic signals in the retina. *Prog Retin Eye Res* **17**, 429-442

-
- Uzan, J., Dewilde, S., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L., Hamdane, D., Marden, M. C. and Kiger, L. (2004) Neuroglobin and other hexacoordinated hemoglobins show a weak temperature dependence of oxygen binding. *Biophys J* **87**, 1196-1204
- Vandergon, T. L., Riggs, C. K., Gorr, T. A., Colacino, J. M. and Riggs, A. F. (1998) The mini-hemoglobins in neural and body wall tissue of the nemertean worm, *Cerebratulus lacteus*. *J Biol Chem* **273**, 16998-17011
- Van Holde, K. E. and Miller, K. I. (1995) Hemocyanins. *Adv Protein Chem* **47**, 1-81
- Vinogradov, S. N., Machlik, C. A. and Chao, L. L. (1970) The intracellular hemoglobins of a polychaete. Some properties of the hemoglobins of *Glycera dibranchiata*. *J Biol Chem* **245**, 6533-6538
- Wakasugi, K., Nakano, T. and Morishima, I. (2003) Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem* **278**, 36505-36512
- Weber, R. E. (1965) On the Haemoglobin and Respiration of *Chironomus* Larvae With Special Reference to *C. Plumosus Plumosus* L. (PhD thesis). Leiden, The Netherlands, Univ. of Leiden.
- Weber, R. E. and Vinogradov, S. N. (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* **81**, 569-628
- Weber, R. E. a. B., J. (1985) Blood and erythrocrurin (extracellular hemoglobin) from the giant earthworm *Megascolides australis*: respiratory characteristics and evidence of CO₂ facilitation of O₂ binding. *Mol Physiol* **7**, 93-106
- Wells, R. M. and Jokumsen, A. (1982) Oxygen binding properties of hemoglobins from antarctic fishes. *Comp Biochem Physiol B* **71**, 469-473
- Wells, R. M. G., Hudson, M. J. and Brittain, T. (1981) Function of the hemoglobin and the gas bubble in the backswimmer *Anisops assimilis* (Hemiptera: Notonectidea). *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* **142**, 515-522
- Wessel, D. and Flugge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**, 141-143
- Wingrove, J. A. and O'Farrell, P. H. (1999) Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. *Cell* **98**, 105-114
- Wittenberg, J. B. (1992) Functions of cytoplasmic hemoglobins and myohemerythrin. *Adv Comp Environ Physiol* **13**, 60-85
- Wittenberg, J. B. and Wittenberg, B. A. (1990) Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 217-241
- Wittenberg, J. B. and Wittenberg, B. A. (2003) Myoglobin function reassessed. *J Exp Biol* **206**, 2011-2020
- Wystub, S., Ebner, B., Fuchs, C., Weich, B., Burmester, T. and Hankeln, T. (2004) Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet Genome Res* **105**, 65-78

-
- Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T. and Reuss, S. (2003) Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci Lett* **346**, 114-116
- Xu, W. L., Wang, C. L., Liao, Z. Y., Zhang, Y. L., Yu, L. H., Meng, F. W., Wang, X. X., Yin, Z. Y., Qian, L. J. and Zhang, C. G. (2003) [Identification of interaction and interaction domains between neuroglobin and Na(+), K(+)-ATPase beta2 subunit]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **35**, 823-828
- Yen, E. H., Sodek, J. and Melcher, A. H. (1979) The effect of oxygen partial pressure on protein synthesis and collagen hydroxylation by mature periodontal tissues maintained in organ cultures. *Biochem J* **178**, 605-612
- Yu, D. Y. and Cringle, S. J. (2002) Outer retinal anoxia during dark adaptation is not a general property of mammalian retinas. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **132**, 47-52
- Yu, D. Y. and Cringle, S. J. (2004) Low oxygen consumption in the inner retina of the visual streak of the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H419-423

Eidestattliche Erklärung

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

Mainz, den

2005

Marc Schmidt