

Untersuchungen zur  
Expression und Lokalisation der respiratorischen Proteine  
Neuroglobin (Ngb) und Cytoglobin (Cygb)  
in Säugern

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz

vorgelegt von  
Tilman Lambert Laufs  
geb. in Mainz

Mainz, 2010





---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Sauerstoff und Metabolismus in der Säugerentwicklung .....	1
1.2	Atmungsproteine .....	4
1.3	Die molekulare Struktur der Globine .....	7
1.4	Hämoglobin.....	9
1.5	Myoglobin .....	14
1.6	Neuroglobin .....	15
1.7	Cytoglobin.....	18
1.8	Ngb und Cygb: Mögliche Funktionen.....	20
1.9	Die Entstehung von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/NOS) .....	23
1.10	Entwicklung des Nervensystems in Säugetieren am Beispiel von Maus und Ratte.....	26
1.11	Krebs und Tumorgenese .....	31
1.12	Zielsetzung der Arbeit .....	37
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>40</b>
2.1	Geräte, Materialien und Chemikalien.....	40
2.2	Verwendete Primer .....	42
2.3	Verwendete Software .....	43
2.4	Verwendete Antikörper .....	43
2.5	Molekularbiologische Methoden .....	44
2.5.1	Übernachtskultur .....	44
2.5.2	Plasmidpräparation .....	44
2.5.3	Alkoholische DNA Standardfällung.....	44
2.5.4	Natriumacetat-Fällung.....	45
2.5.5	DNA Restriktion .....	45
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.5.7	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen durch Gelelution .....	46
2.5.8	Ligation.....	46
2.5.9	Elektrokompetente Bakterien.....	46
2.5.10	Transformation .....	47
2.5.11	Isolierung positiver Klone durch $\alpha$ -Komplementation .....	47
2.5.12	Quantifizierung doppelsträngiger DNA (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989) .....	48
2.5.13	Glycerinstocks .....	48
2.5.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	48
2.5.15	Sequenzierung.....	48
2.5.16	Auswertung der Sequenzdaten .....	49
2.5.17	RNA-Isolierung nach der GITC-Methode (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	49
2.5.18	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA .....	49

---

2.5.19	Formaldehyd-Gelelektrophorese.....	50
2.5.20	cDNA-Synthese über reverse Transkription.....	50
2.6	Quantitative <i>Realtime-PCR</i> .....	51
2.6.1	QuantiTect Probe PCR Kit.....	51
2.6.2	„QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ SYBR Green Assay.....	52
2.6.3	Berechnungen und Formeln zur qPCR.....	53
2.6.3.1	Kopienzahl.....	53
2.6.3.2	PCR-Effizienz.....	54
2.6.4	Normalisierung.....	54
2.6.5	Normalisierung von cDNA mit PicoGreen.....	56
2.6.6	Validierung der RT-PCR-Assays.....	57
2.7	<i>In situ</i> – Hybridisierung.....	60
2.7.1	Herstellung von 8%-igem Paraformaldehyd (PFA).....	60
2.8	<i>Northern Blot</i> mit Hilfe eines „Cancerarrays“.....	61
2.8.1	Radioaktive Sondenmarkierung per <i>Random Primed Oligo Labeling</i> .....	61
2.8.2	<i>Strippen</i> des Blots.....	63
2.9	ELISA.....	63
2.10	Western-Blot.....	64
2.10.1	Probenvorbereitung für die Proteinbestimmung.....	64
2.10.2	Proteinextraktion für Western Blot.....	65
2.10.3	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	65
2.10.4	Glycin-SDS-PAGE,Western Blot mit anschließendem ECL-Nachweis.....	66
2.10.4.1	Gel gießen: für 1 mm dicke Gele (Herstellung von SDS Gelen).....	66
2.10.4.2	Pipettierschema Acrylamidgele.....	67
2.10.4.3	Proben auftragen: (SDS Gelelektrophorese).....	67
2.10.4.4	Coomassie-Färbung:.....	68
2.10.4.5	Silber-Färbung.....	68
2.10.4.6	Blot.....	69
2.10.4.7	Ponceau S-Färbung.....	69
2.10.4.8	Detektion: ECL-Nachweis.....	70
2.10.4.9	Rezepte SDS-Page und Western.....	70
2.10.5	Strippen von Nitrocellulose-Membranen.....	72
2.11	Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	73
2.11.1	Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei Eukaryontenzellkulturen.....	73
2.11.2	Kultivierung der Zelllinien.....	73
2.11.3	Inaktivieren von Fötalem Kälberserum Albumin (FCS).....	73
2.11.4	Passagieren der Zelllinien.....	73
2.11.5	Beschichten der Deckgläschen.....	74
2.11.6	Kultivierung der Zelllinien auf Deckgläschen.....	74

---

2.11.7	Fixierung und Aufbewahrung von Kulturzellen .....	74
2.11.8	Herstellung primärer hippocampaler Zellkulturen .....	75
2.11.8.1	Präparation der hippocampalen Region .....	75
2.11.8.2	Vereinzeln und Auszählen der Primärkultur .....	76
2.11.8.3	Kultivierung der primären hippocampalen Zellen .....	76
2.11.9	Transfektion von Zelllinien mit pEGFP .....	77
2.11.9.1	pGFP- Funktionsprinzip .....	77
2.11.10	Wegfrieren einer Zelllinie .....	78
2.12	Herstellung von monoklonalen Antikörpern .....	79
2.12.1	Makrophagenisolierung .....	79
2.13	Die Produktion von mAk in Kulturüberständen .....	80
2.13.1	Reklonierung von Hybridomzelllinien .....	80
2.13.1.1	Herstellung eines <i>Feederlayers</i> .....	80
2.13.1.2	Steriles Präparieren einer weiblichen Milz .....	81
2.13.1.3	Ausplattieren der Milzzellen .....	81
2.13.1.4	Auszählen und Ausplattieren der Hybridomzellen .....	81
2.13.2	Cytozentrifugen-Präparat .....	82
2.14	Immunhistologische Methoden .....	82
2.14.1	Aufreinigung polyklonaler Antikörper .....	82
2.14.2	Nachweis der Proteinexpression auf immunologischer Basis .....	83
2.14.3	Indirekte Doppel-Immun-Fluoreszenzfärbung .....	84
2.14.4	DAPI-Färbung im Anschluß an indirekter Immunfärbung .....	85
2.14.5	Einbetten der Zellkulturpräparate .....	86
2.15	Mikroskopie und Fotodokumentation .....	86
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>88</b>
3.1	Quantitative Messung der Globin-Expression während der Entwicklung des Säugergehirns .....	88
3.1.1	Validierung der Assays für die quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR) .....	88
3.1.2	mRNA-Expressionsanalyse im Verlauf der Entwicklung des Säugergehirns .....	88
3.1.3	Quantifizierung der Protein-Expression von <i>Cygb</i> während der Entwicklung des Säugergehirns .....	96
3.1.4	Quantifizierung der Protein-Expression von <i>Ngb</i> während der Entwicklung des Säugergehirns .....	97
3.2	Immunhistologische Detektion der <i>Ngb/Cygb</i> Expression in Neuronen .....	100
3.2.1	Detektion der <i>Ngb</i> -Expression .....	101
3.2.2	Detektion der <i>Cygb</i> -Expression .....	105
3.3	Nachweis von NGB in immortalisierten Zellkulturlinien .....	108
3.4	Intrazelluläre Lokalisierung von NGB und CyGB mittels GFP-Fusionskonstrukten .....	110
3.5	Veränderung der Globinexpression unter dem Einfluss von oxidativem Stress .....	116

---

3.5.1	Quantifizierung der <i>Ngb</i> m-RNA nach Behandlung mit verschiedenen Paraquatkonzentrationen.....	118
3.5.2	Quantifizierung der <i>Cygb</i> -mRNA nach Behandlung mit verschiedenen Paraquatkonzentrationen.....	121
3.5.3	Quantifizierung der mRNA Expression von Antioxidanz-Enzymen in neuronalen Primärkulturen nach einer Behandlung mit verschiedenen Paraquatkonzentrationen. .....	122
3.6	Expression von <i>NGB</i> und <i>CyGB</i> in Krebsgewebe.....	124
3.6.1	Hybridisierung des Human Cancer Profiling Arrays mit einer <i>NGB</i> -Sonde .....	124
3.6.2	Hybridisierung des Human Cancer Profiling Arrays mit einer <i>CyGB</i> -Sonde.....	125
3.7	Herstellung von monoklonalen anti-NGB Antikörpern aus der Maus. ....	127
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>131</b>
4.1	Zelluläre und Intrazelluläre Lokalisation von Neuroglobin .....	131
4.2	Zelluläre und Intrazelluläre Lokalisation von <i>Cygb</i> .....	133
4.3	Intrazelluläre Lokalisation von <i>Ngb</i> und <i>Cygb</i> als GFP-Fusionsprotein.....	134
4.4	<i>Ngb</i> während der Entwicklung des Säugerhirns .....	136
4.5	<i>Cygb</i> während der Entwicklung des Säugerhirns.....	142
4.6	<i>Ngb</i> - und <i>Cygb</i> -Expression nach Paraquat-induziertem oxidativem Stress.....	143
4.7	Expression von NGB in Tumorgewebe.....	145
4.8	Cytoglobin: ein mögliches Tumorsuppressorgen?.....	147
4.9	Interpretation der Ergebnisse bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen <i>Ngb</i> .....	151
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>152</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>154</b>
6.1	Veröffentlichungen .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>179</b>
7.1.1	qPCR auf Tumorgewebe, Koslowski .....	179

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Charakterisierung der beschriebenen Vertebratenglobine .....	6
Abbildung 1-2 Die Häm-Gruppe in hexa- und pentakoordinierten Globinen.....	7
Abbildung 1-3 Die Quartärstruktur der Globine .....	8
Abbildung 1-4 Menschliches Hämoglobingencluster .....	9
Abbildung 1-5 Die kooperative Bindung des Hämoglobins und der Bohr-Effekt .....	10
Abbildung 1-6 Reaktionen von NO und Hämoglobin in arteriellen Kapillaren .....	11
Abbildung 1-7 Mögliche Funktionen intrazellulärer Globine. ....	21
Abbildung 1-8 Entstehung reaktiver oxigener Spezies .....	24
Abbildung 1-9 Die Primäre Neurulation .....	26
Abbildung 1-10 Die Entstehung der Hirnregionen .....	27
Abbildung 1-11 Die Hirnentwicklung der Ratte im zeitlichen Verlauf.....	29
Abbildung 1-12 Modell zur Tumorgenese .....	32
Abbildung 1-13 HIF-1 $\alpha$ bei der hypoxieinduzierten Tumorprogression. ....	34
Abbildung 1-14 Der Prozess der Angiogenese in Tumorgewebe.....	36
Abbildung 1-15 NGB mRNA in Situ Färbung.....	37
Abbildung 2-1: Berechnungsbeispiel .....	55
Abbildung 2-2: Validierung Ngb RT-PCR.....	57
Abbildung 2-3: Eichgerade der NGB-Plasmidstandards eines NGB-TaqMan Laufes. ....	57
Abbildung 2-4: Schmelzkurven der Amplikons von NGB-Plasmidstandards und cDNAs.....	58
Abbildung 2-5: Schmelzkurve mit Primer-Dimeren. ....	59
Abbildung 2-6: Schmelzkurve der 18s-Plasmide .....	59
Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des Cancer Profiling Arrays (Clontech).....	62
Abbildung 2-8: Plattenbelegung .....	63
Abbildung 2-9 Aufbau von Gelkammer und Blot.....	67
Abbildung 2-10: Verwendete GFP-Vektoren der Firma CLONTECH Laboratories.....	78
Abbildung 3-1: NGB-Assay aller untersuchter Entwicklungsstadien.....	90
Abbildung 3-2: <i>Ngb</i> Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus .....	91
Abbildung 3-3: <i>Cygb</i> Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus.....	92
Abbildung 3-4: Histon <i>H2a</i> -Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus.....	93
Abbildung 3-5: <i>NF-L</i> -Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus .....	94
Abbildung 3-6 <i>NSE</i> -Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus .....	95
Abbildung 3-7: Cytoglobin und $\beta$ -Actinexpression in den Maus-Entwicklungsstadien MF15, MF19, T1 und Adult. ....	96
Abbildung 3-8: Quantifizierung der CyGB Expression .....	97
Abbildung 3-9: Neuroglobin und $\beta$ -Actinexpression in den Maus-Entwicklungsstadien MF15, MF19, T1 und Adult. ....	98
Abbildung 3-10 Quantifizierung der NGB Expression .....	99
Abbildung 3-11: Doppelfärbung mit anti-Ngb und anti-NeuN.....	102

---

Abbildung 3-12: Doppelfärbung mit anti-Ngb und anti-GFAP. ....	103
Abbildung 3-13: Doppelfärbung auf histologischem Schnitt .....	104
Abbildung 3-14: Doppelfärbung mit anti-Cygb und anti-GFAP .....	106
Abbildung 3-15: NGB-Immunfluoreszenz auf immortalisierten Zellkulturlinien .....	108
Abbildung 3-16: Testtransfektion mit leerem pEGFP-Vektor .....	110
Abbildung 3-17: Transfektion dreier Zelllinien mit pEGFP-Vektor und einkloniertem Globin .....	111
Abbildung 3-18: Westernblot anti-GFP Nachweis .....	112
Abbildung 3-19: Transfektion dreier Zelllinien mit pEGFP-Vektor, <i>Spacer</i> und Globin .....	113
Abbildung 3-20: Transfektion von HeLa-Zellen mit pEGFP-Vektor und Globin mit (+) und ohne (-) <i>Spacer</i> .....	114
Abbildung 3-21: Quantitative Bestimmung der <i>18s</i> -mRNA in allen Paraquatproben .....	117
Abbildung: 3-22: Quantitative Bestimmung der <i>Ngb</i> -mRNA im Kortex und Cerebellum .....	118
Abbildung: 3-23: <i>Ngb</i> -mRNA nach Behandlung mit Paraquat, Cerebellum .....	119
Abbildung: 3-24: Veränderte Darstellung der <i>Ngb</i> -mRNA Konzentration .....	120
Abbildung: 3-25: <i>Ngb</i> -mRNA nach Behandlung mit Paraquat, Kortex .....	120
Abbildung: 3-26: Quantitative Bestimmung der <i>Cygb</i> -mRNA im Cerebellum und Kortex. ....	121
Abbildung: 3-27: Quantifizierung der <i>Cu/Zn SOD</i> mRNA nach Behandlung mit Paraquat. ....	122
Abbildung: 3-28: Quantifizierung der <i>GPx</i> mRNA nach Behandlung mit Paraquat. ....	123
Abbildung 3-29: <i>NGB</i> -Nachweis auf Cancer Profiling Array (Clontech) .....	124
Abbildung 3-30: <i>CyGB</i> -Nachweis auf Cancer Profiling Array (Clontech) .....	126
Abbildung 3-31: Cytospinpräparate Immunglobulin produzierender Hybridomzellen .....	128
Abbildung 3-32: Färbemuster des Klons 9G3/3B9 nach der Vergrößerung des Volumens auf 1000ml. ....	130
Abbildung 4-1: Die Expression der <i>Ngb</i> - und <i>Cygb</i> -mRNA im zeitlichen Verlauf der Entwicklung des Säugerhirns .....	137

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Geräte, Materialien und Chemikalien. ....	40
Tabelle 2-2 In dieser Arbeit verwendete Primer und TaqMan-Sonde. ....	42
Tabelle 2-3 In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper .....	43
Tabelle 2-4 In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper .....	43
Tabelle 3-1: qPCR-Assays mit Gen, Nachweismethode und Quelle .....	88
Tabelle 3-2: Probenzahl pro Entwicklungsstadium .....	89
Tabelle 3-3: Die mRNAs pro Zelle und die Faktoren der relativen Regulation der einzelnen Gene zu ihrem Grundwert im Stadium MF10. ....	92
Tabelle 3-4: Neurone aus dem Kortex, Ratte .....	116
Tabelle 3-5: Neurone aus dem Cerebellum, Maus .....	116
Tabelle 3-6: Charakterisierte monoklonale HsaNGB-Primärantikörper.....	127
Tabelle 3-7: Reklonierte Subklone und ihre Charakterisierung. ....	129
Tabelle 4-1: Regulation von Ngb in der Literatur .....	139



# 1 Einleitung

## 1.1 Sauerstoff und Metabolismus in der Säugerentwicklung

Vor etwa 600 Millionen Jahren bildete sich die Ozonschicht, die eine Entwicklung photosynthesebetreibender Organismen und somit eine Anreicherung von Sauerstoff in der Atmosphäre von zuvor ca. 2% auf den heutigen O<sub>2</sub>-Gehalt von 21% ermöglichte. Die vor ca. 450-500 Millionen Jahren entstandenen Vertebraten haben im Laufe der Evolution zur Sauerstoffversorgung des Körpers ein komplexes Gefäßsystem ausgebildet. Bei den Vertebraten strömt die Luft nicht mehr wie bei den Insekten direkt durch Tracheen in den Körper, sondern wird von O<sub>2</sub>-Bindeproteinen aufgenommen, die im Blutplasma vorliegen. Das sauerstoffreiche Blut wird von der Lunge über das Herz in Arterien und Arteriolen zum O<sub>2</sub>-konsumierenden Gewebe transportiert. Aus der Peripherie des Gewebes wird das Blut über das venöse Gefäßsystem zurück zum Herzen und weiter zur Lunge befördert. Im arteriellen Blut sinkt der O<sub>2</sub>-Gehalt auf 12%, und innerhalb der Gewebe stehen noch etwa 3% O<sub>2</sub> zur Verfügung (GUYTON UND HALL, 1996).

Im Säugerhirn besteht eine durchschnittliche O<sub>2</sub>-Konzentration von 1,6%, wobei es auch hier zu regionalen Schwankungen zwischen 0,1% und 5,3% kommt (SILVER UND ERECINSKA, 1998). Diese Werte gelten für adulte Säuger. Bei Embryonen ist die O<sub>2</sub>-Versorgung zu Beginn ihrer Entwicklung weitaus schlechter, da sie anfangs noch über kein Blut-Kreislauf-System verfügen und O<sub>2</sub> zunächst allein durch Diffusion aufnehmen. In der Maus beginnt die Entwicklung des vom Mesoderm abgeleiteten blutbildenden Systems am Embryonaltag 6,5. Am Embryonaltag 9 wird ein primitiver kapillarer Plexus gebildet, der ein erstes Zirkulieren von Blutzellen ermöglicht. Die kernlosen Erythrocyten treten etwa am Embryonaltag 12 auf (BICHET ET AL., 1999).

Der O<sub>2</sub>-Partialdruck beträgt in der Inspirationsluft ca. 160 mm Hg (Torr), in den Alveolen ca. 100 Torr, im arteriellen Blut 95 Torr und im venösen Blut ca. 40 Torr. Der O<sub>2</sub>-Partialdruck des Säugerfötus liegt mit 25-40 Torr weit unter den adulten Werten. BARCROFT (1946; zitiert in SINGER, 1999) vergleicht die O<sub>2</sub>-Versorgung des Fötus mit einem Aufenthalt auf 6000-8000 Meter Höhe, was beinahe dem Mount Everest entspräche. Im fötalen Gehirn beträgt die O<sub>2</sub>-Spannung nur noch weniger als die Hälfte des normalen Wertes im erwachsenen Gehirn (PARER, 1993; zitiert in BICKLER und DONOHOE, 2002). Diese niedrigen O<sub>2</sub>-Partialdrücke würden bei einem adulten Säuger eine unmittelbare Hypoxie auslösen. Embryonen und

Föten haben dagegen Mechanismen entwickelt, die sie relativ resistent gegen Sauerstoffmangel machen. Es konnte gezeigt werden, dass neonatale Ratten 50 Minuten in einer reinen Stickstoff-Atmosphäre überleben können, wohingegen adulte Ratten nach 3-5 Minuten ersticken (FAZEKAS ET AL., 1941; zitiert in SINGER, 1999). Weiterhin wurde ein mehr oder weniger starker Abfall der Hypoxietoleranz im Verlauf des postnatalen Lebens beobachtet (GLASS ET AL., 1944; BRITTON ET AL., 1945; ADOLPH, 1969; alle zitiert in SINGER, 1999).

Ein *in vitro* Kultivierungsmodell für Zellverbände ohne kapillare Sauerstoffversorgung stellen embryonale Stammzellen dar, die sich zu einem Aggregat zusammengelagert haben. An diesen *Embryoid bodies* (EB) konnte GASSMANN in Experimenten viele Aspekte der murinen Embryogenese rekapitulieren und zeigen, dass zu hohe O<sub>2</sub>-Konzentrationen zu einer langsameren Entwicklung führen (GASSMANN ET AL., 1996). Erklärt wird dieses Phänomen mit einem Einfluß auf den Master-Transkriptionsfaktor Hif-1 $\alpha$ , der über den O<sub>2</sub>-Gehalt im Organismus gesteuert wird und die Expression vieler Gene wie EPO (Erythropoetin; Review: JELKMANN, 1992) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor; Review: PLATE ET AL., 1994) regelt. Hif-1 $\alpha$  wird bei Normoxie in einer O<sub>2</sub>-abhängigen Reaktion durch eine Prolylhydroxylase hydroxyliert und schließlich von Proteasomen degradiert. Unter Hypoxie kann Hif-1 $\alpha$  nicht hydroxyliert werden und wandert in den Zellkern ein, wo es mit Hif-1 $\beta$  dimerisiert und den aktiven Transkriptionsfaktor Hif-1 bildet (Review: HOCHACHKA UND RUPERT, 2003). Die hypoxieabhängige Expression des Hif-1-Proteins ist demnach ein direkter Indikator für einen vorhandenen O<sub>2</sub>-Mangel. Während der murinen Gehirnentwicklung zwischen Fötaltag 15 (MF15) und Postnataltag 3 (T3) ist die Hif-1 $\alpha$ -Expression um ein Vielfaches höher als im adulten Gehirn. Innerhalb der Perinatalstadien bei der Maus ist zusätzlich ein markanter Anstieg der Expression am Postnataltag 0 um den Faktor 10 im Vergleich zum Adultstadium und Faktor 2 im Vergleich zu Fötaltag 19 (MF19) zu beobachten. Schon am Postnataltag 3 schwächt er sich wieder signifikant um den Faktor 7-8 im Vergleich zum Adultstadium ab (MADAN ET AL., 2002). Die Autoren schließen daraus, dass Säuger spezielle adaptive Mechanismen entwickelt haben, die eine während der Ontogenese und um die Geburt herum auftretende Hypoxie kompensieren.

Ist die O<sub>2</sub>-Zufuhr eines Organismus gebremst bzw. gestoppt, führt dies dazu, dass in den Zellen nicht mehr ausreichend ATP gebildet werden kann, um das Membranpotential aufrecht zu erhalten. Die wenig effiziente anaerobe Glykolyse (Milchsäuregärung) vermag die ATP-Nachfrage nur für wenige Minuten (im Fall des Hirns) bzw. Stunden (Muskel) zu befriedigen (BOUTILIER 2001). Na<sup>+</sup> strömt vermehrt in die Zelle ein, während K<sup>+</sup> ausströmt. Eine Depolarisation der Mitochondrien-, ER- und Plasmamembranen ist die Folge.

Unkontrollierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Zustrom, hervorgerufen durch die depolarisierten Ionenkanäle, führt zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Phospholipasen und Proteasen. Durch den Zusammenbruch des osmotischen Gegengradienten schwellen die Zellen an, Membranen reißen und es kommt zum Absterben der Zelle (HOCHACHKA 1986).

Neugeborene Säuger begegnen diesem Problem mit einer adaptiven Herabsetzung der Membranpermeabilität (*ion channel arrest*) und vermindern so die Energieverluste bei dem Bestreben, das Ionengleichgewicht durch ATPasen aufrecht zu erhalten (HOCHACHKA 1986). Während einer bestehenden Anoxie konnte eine starke Reduktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Aktivität über die Zellmembran gemessen werden, ohne dass anschließend eine Störung des elektrochemischen Potentials, der zellulären Ionenmenge oder der ATP-Konzentration nachgewiesen werden konnte (BUCK ET AL., 1993; BUCK AND HOCHACHKA, 1993; LUTZ AND NILSSON, 1997; BICKLER AND BUCK, 1998; WEST AND BOUTILIER, 1998; DONOHOE ET AL., 2000).

Ein weiterer Grund für die höhere Hypoxietoleranz ist die unterschiedliche Reaktion des Kreislaufs auf eine  $\text{O}_2$ -Mangelversorgung. Während bei einem adulten Säuger der Sauerstoffverbrauch eine feste, vom Angebot unbeeinflusste Größe darstellt, zeigen Säuger in der Perinatalperiode einen hypoxischen Hypometabolismus, der eine temporäre, aktive Drosselung des Energieumsatzes ohne Zeichen einer Sauerstoffschuld ermöglicht. Die Abwehrreaktion eines Erwachsenen führt zu einer Tachykardie und Blutdruckanstieg, was den Energieumsatz zusätzlich erhöht. Ein Fötus bzw. Neugeborenes reagiert umgehend mit einer bradykarden Kreislaufzentralisation, durch die die Durchblutung auf die lebenswichtigen Organe beschränkt wird und eine ökonomische Ausnutzung des verbleibenden Sauerstoffs ermöglicht (SINGER 2002). Die Beobachtung, dass nach einer Hypoxie die Laktatazidose<sup>1</sup> bei Neugeborenen weit geringer ausfällt, als dies aufgrund der Stoffwechselrate vor Beginn der Asphyxie zu erwarten gewesen wäre, deutet auf eine Verminderung des Stoffwechsels während der  $\text{O}_2$ -Unterversorgung hin (SIDI ET AL., 1983; FAHEY ET AL., 1989). Auslöser hierfür könnte die Azidose selbst sein, indem sie die für neugeborene Säuger beschriebene chemische Thermogenese im mitochondrienreichen braunen Fettgewebe unterdrückt. Hierdurch kühlen hypoxische, azidotische Neugeborene

---

<sup>1</sup> Die Laktatazidose ist eine Form der metabolischen Azidose, ausgelöst durch anaerobe Stoffwechselfvorgänge, bei der ein Abfall des pH-Wertes im Blut durch die Anhäufung von saurem Laktat bedingt ist. Von einer Laktatazidose spricht man in Abgrenzung zur metabolischen Azidose anderer Ursache, wenn der pH-Wert erniedrigt ( $< 7,36$ ) und gleichzeitig die Laktatkonzentration erhöht ist ( $> 5\text{mmol/l}$ ).

schneller aus, diese Hypothermie zeigt aber für eine begrenzte Zeit einen protektiven Effekt (Singer et al., 1997; Hill 1959; Wood et al., 1996).

## 1.2 Atmungsproteine

Vor etwa 2,9 Mrd. Jahren existierten die ersten aerob-phototrophen Vorläufer der heutigen Cyanobakterien und Chloroplasten. Dies war der Beginn der Evolution des aeroben Stoffwechsels. Die Etablierung einer stabilen Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre ermöglichte die Entwicklung der aeroben Energiegewinnung durch die Atmungskette. Der steile Redoxgradient zwischen organischen Verbindungen als Elektronen-Donoren und Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor bildete die treibende Kraft für eine schnelle Zunahme an Biomasse (SCHLEGEL, 1992).

Einzeller waren die ersten Eukaryoten, die Sauerstoff für den oxidativen Abbau von organischen Stoffen nutzten. Die aerobe Atmungskette an den Mitochondrien der Eukaryoten-Zellen erfordert einen permanenten Gasaustausch ( $O_2$ -Aufnahme und  $CO_2$ -Abgabe) zwischen der Zelle und ihrer Umgebung. Bei eukaryotischen Einzellern (Protozoen) und einfachen Vielzellern, wie Coelenteraten oder Plathelminthen, gelangt ausreichend  $O_2$  durch Diffusion in und  $CO_2$  aus der Zelle. Bei komplexeren Metazoen hingegen, die ein geringeres Oberflächen/Volumen-Verhältnis aufweisen, reicht die Diffusion nicht mehr aus. Landlebende Arthropoden entwickelten daher für den  $O_2$ -Transport zu den Geweben ein fein verzweigtes Netzwerk aus Tracheen und Tracheolen. Vertebraten dagegen entwickelten ein Kreislaufsystem. Diese Evolution des  $O_2$ -Transports über Flüssigmedien ermöglichte zwar den Transport über größere Distanzen, jedoch konnte erst durch die Evolution spezieller  $O_2$ -bindender Proteine die geringe Löslichkeit des  $O_2$  in Wasser überwunden werden. Hierdurch wurde es möglich,  $O_2$  nicht nur über größere Distanzen, sondern auch in größeren Mengen zu transportieren, was gleichzeitig eine Zunahme der Körpermasse über die der Insekten hinaus ermöglichte (WEHNER, GEHRING, 1995). Während der Evolution sind vier Klassen von  $O_2$ -Bindeproteinen für den Transport und die Speicherung von Sauerstoff entstanden. Alle vier Klassen benötigen zur reversiblen  $O_2$ -Bindung Metall-Ionen.

**Hämerythrine:** Hämerythrine sind mono- oder oligomere Proteine (KLIPPENSTEIN, 1980), die über ein Eisen-Ion-Dimer reversibel  $O_2$  binden können (KURTZ, 1999; WIRSTAM, 2003). Sie werden in den vier marinen Tiergruppen Anneliden, Brachiopoden, Sipunculiden und Priapuliden exprimiert (MANGUM, 1992).

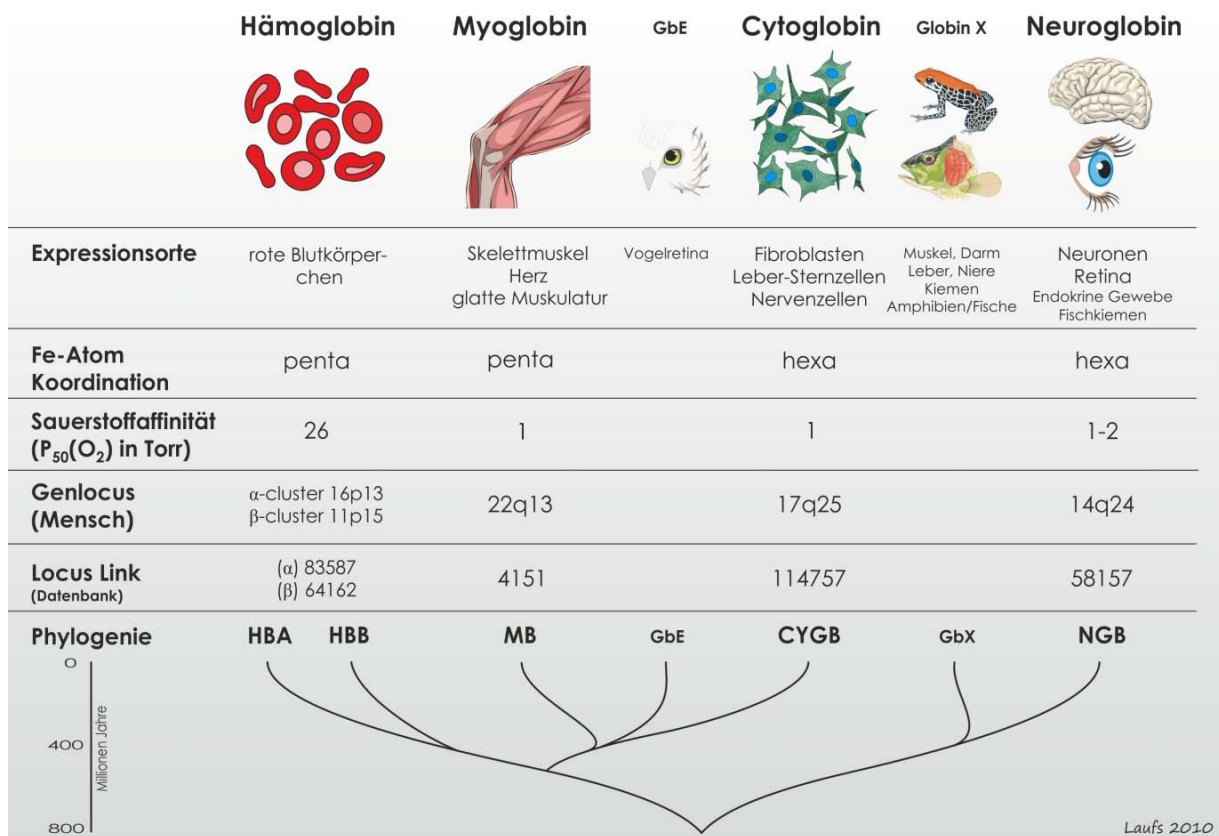
**Hämocyanine:** Hämocyanine sind kupferhaltige Proteine. Im aktiven Zentrum befinden sich zwei Kupferatome, die durch Histidin-Reste koordiniert vorliegen (LINZEN ET AL., 1985; VAN HOLDE UND MILLER, 1982). In der  $O_2$ -gebundenen Oxyform sind Hämocyanine blau gefärbt, in der Desoxyform sind sie farblos. Hämocyanine findet man gelöst in der Hämolymphe bei Arthropoden und Mollusken, wobei angenommen wird, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche, konvergent entstandene Hämocyanin-Familien handelt (VAN HOLDE UND MILLER, 1995; BURMESTER, 2001).

**Chlorocruorine:** Chlorocruorine sind eisenhaltige Proteine, die in den marin lebenden Polychaeten vorkommen. In oxygenierter Form verleihen sie der Hämolymphe eine grüne Farbe (VINOGRADOV, 1985).

**Globine:** Globine sind kleine, eine Häm-Gruppe enthaltende respiratorische Proteine. Sie sind die am weitesten verbreiteten  $O_2$ -Bindeproteine in der Tierwelt und kommen zudem in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Protisten vor (HARDISON, 1996). In Vertebraten sind mittlerweile sieben Globin-Typen bekannt. **Hämoglobin** (Hb) kommt ausschließlich im Blut in den Erythrozyten vor. Hier nimmt es in den Lungen  $O_2$  auf und transportiert ihn zu allen stoffwechselaktiven Organen (MILLIKAN, 1937). Zusätzlich verfügt Hb über eine Nitritreduktase-Funktion, die unter Hypoxie zu einer Gefäßerweiterung führt (GLADWIN ET AL., 2008). **Myoglobin** (Mb) hat seine klassische Hauptaufgabe in der Versorgung mit  $O_2$  und dessen Speicherung im Muskel, weist dazu aber auch eine Dioxygenase-Aktivität auf, bei der reduziert  $Mb(Fe^{2+})$  unter Oxidation zu  $Met-Mb(Fe^{3+})$  aus dem in höheren Mengen toxischen NO und  $O_2$  das ungiftige Nitrat ( $NO_3^-$ ) bildet. Mit Hb hat Myoglobin die Nitritreduktase-Funktion unter hypoxischen Bedingungen gemein (WITTENBERG, 1970; FLÖGEL ET AL., 2001; GLADWIN ET AL., 2008).

**Neuroglobin** (Ngb) kommt hauptsächlich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervengewebes, sowie in endokrinen Gewebe vor (BURMESTER ET AL., 2000). **Cytoglobin** (Cygb) wird hauptsächlich in Fibroblasten und verwandten Zelltypen aller Organe exprimiert (BURMESTER ET AL., 2002; TRENT UND HARGROVE, 2002; KAWADA ET AL., 2001).

2005 wurde die Globin-Familie der Vertebraten nochmals erweitert: **GlobinX** (GbX) ist bis dato in Fischen und Fröschen nachgewiesen worden. Die geringste phylogenetische Distanz weist es zu Neuroglobin auf, ist jedoch wohl nicht ausschließlich in Nervengeweben



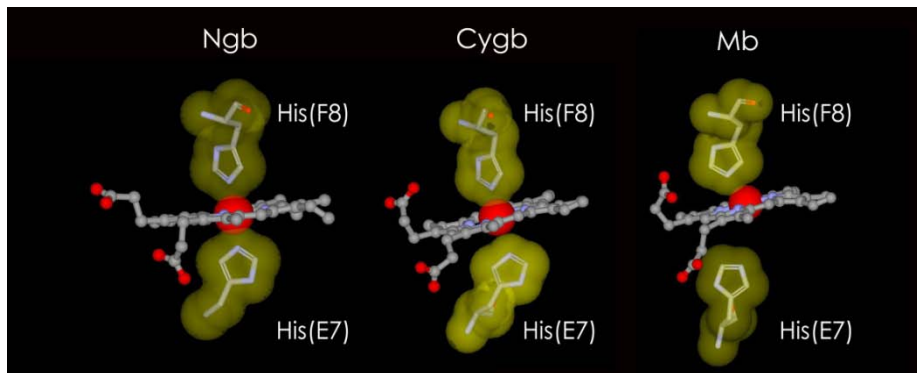
**Abbildung 1-1 Charakterisierung der beschriebenen Vertebratenglobine**

Die Abbildung fasst die wichtigsten Expressionsorte, biochemische und phylogenetische Eigenschaften zusammen. Zusätzlich ist die phylogenetische Position der oben erwähnten Globine GbX und GbE mit ihren Expressionsorten eingefügt. Verändert nach HANKELN ET AL., 2004.

exprimiert (ROESNER ET AL. 2005; FUCHS ET AL., 2005.). Vor einigen Jahren wurden zwei weitere Vertreter der Globinfamilie erstmals beschrieben. **GbE** ist bislang nur in der Retina von Vögeln nachgewiesen worden. Phylogenetisch gruppiert es am ehesten mit Cytoglobin, mit dem es in der Retina koexprimiert wird (KUGELSTADT ET AL. 2004). **GlobinY** wurde zuerst im Ovar, der Niere und dem Auge im Frosch gefunden (FUCHS ET AL., 2005). Genomanalysen zur beta-Globin-Evolution bei Säugern und Vögeln wiesen GbY auch in einem Monotrem, dem Schnabeltier, nach (PATEL ET AL., 2008). Während FUCHS GbY im Frosch phylogenetisch zu keinem anderen Globin assoziiert, postuliert PATEL für das Schnabeltier-GbY eine Homologie zu Cygb (FUCHS ET AL., 2005; PATEL ET AL., 2008; HARDISON, 2008). Ihre Funktionen sind weitgehend unbekannt.

### 1.3 Die molekulare Struktur der Globine

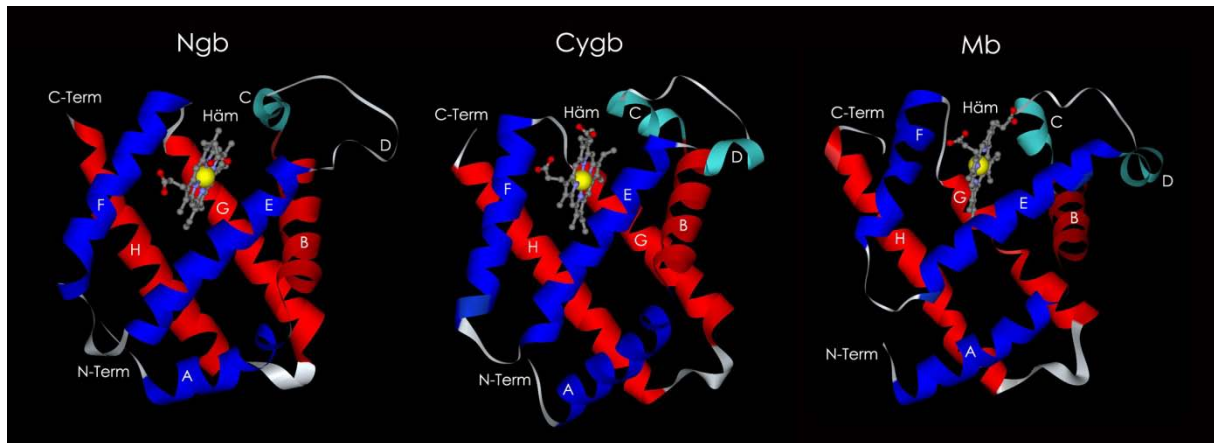
Alle Vertreter der Globinfamilie weisen eine typische Faltung auf, die es dem Protein ermöglicht  $O_2$  reversibel zu binden. Erstmals konnte die Tertiärstruktur anhand von Röntgenstruktur-Analysen des Myoglobins entschlüsselt werden (KENDREW, 1961). Sie zeigt ein Polypeptid, das aus acht Helices (A-H) und fünf nichthelikalischen Bereichen aufgebaut ist. Die Außenhülle der Globine wird von polaren Aminosäure-Resten gebildet, während die Innenseite eine unpolare Tasche bildet, in der die prosthetische Hämgruppe liegt. In deren Innern befindet sich ein Eisenatom, das von zwei in die Tasche ragenden, polaren Histidinen koordiniert wird. Diese allen Globinen eigene „3-Helix-über-3-Helix“-Struktur wird als  $\alpha$ -helikaler Sandwich bezeichnet. Hierbei bilden immer die Helices A, E und F die obere und die Helices B, D und H die untere Sandwichhälfte (HOLM UND SANDER, 1993).



**Abbildung 1-2 Die Häm-Gruppe in hexa- und pentakoordinierten Globinen**

In hexakoordinierten Globinen wie Ngb und Cygb geht in Deoxy-Zustand die sechste Koordinationsstelle des Eisenatoms eine stabile Bindung mit dem distalen Histidin E7 ein. In pentakoordinierten Globinen wie Hb und Mb liegt diese sechste Stelle des Eisenatoms im Deoxy-Zustand frei bzw. bindet ein Wassermolekül. Die Darstellung der Hämgruppen erfolgte mithilfe von Accelrys DS Visualizer v1.6. Es liegen die Strukturdaten von Q9NPG2/1OJ6 (Ngb), Q8WWM9/1UMO (Cygb) und P02144/2MM1 (Mb) der Protein-Datenbank ExPasy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) zugrunde.

Das Häm besteht aus einem Protoporphyrin IX (Tetrapyrrolring), das als Zentralatom ein Eisen ( $Fe$ ) trägt. Dieses Eisen kann in zwei verschiedenen Oxidationsstufen auftreten, der Ferroform ( $Fe^{2+}$ ) und der Ferriform ( $Fe^{3+}$ ). Im Zentrum des Porphyrinringes wird das Eisenatom von vier Stickstoff-Atomen koordiniert, während die fünfte Koordinationsstelle stets von einem senkrecht zur Hämebene stehenden „proximalen“ Histidin F8 (der achte AS-Rest der F-Helix) besetzt wird. Die Belegung der sechsten Koordinationsstelle ist in der oxygenierten Form stets ein  $O_2$ -Molekül. In der Deoxyform bei „pentakoordinierten“ Globinen nimmt ein Wassermolekül die sechste Koordinationsstelle ein.



### Abbildung 1-3 Die Quartärstruktur der Globine

Die Färbung der Helices verdeutlicht die 3-über-3- $\alpha$ -helikale Sandwichstruktur. Die Darstellung der Hämgruppen erfolgte mithilfe von Accelrys DS Visualizer v1.6. Es liegen die Strukturdaten von Q9NPG2/1OJ6 (Ngb), Q8WWM9/1UMO (Cygb) und P02144/2MM1 (Mb) der Protein-Datenbank ExPasy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) zugrunde.

Bei hexakoordinierten Globinen besetzt im deoxygenierten Zustand immer das distale Histidin E7 die sechste Koordinationsstelle.

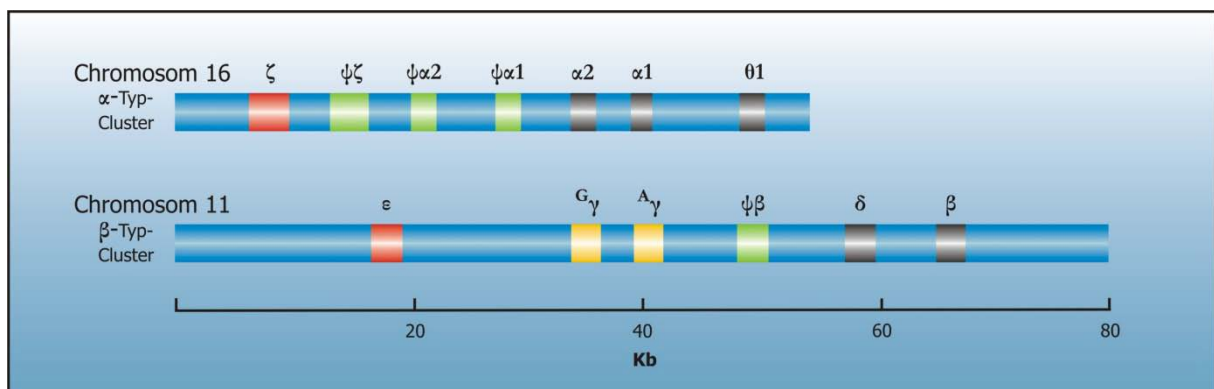
Bis zur Entdeckung des Neuroglobins (BURMESTER ET AL., 2000) und des Cytoglobins (BURMESTER ET AL., 2002), waren hexakoordinierte Globine nur von Pflanzen (HUNT ET AL., 2001; ARREDONDO-PETER ET AL., 1998), Protisten (COUTURE ET AL., 1999) und Cyanobakterien (SCOTT ET AL., 2002; COUTURE ET AL., 2000; HVITVET ET AL., 2001), jedoch nicht im Tierreich bekannt (COUTURE ET AL., 2001; DEWILDE ET AL., 2001; TRENT UND HARGROVE, 2002). Die Bindung eines  $O_2$ -Liganden setzt in hexakoordinierten Globinen die Verdrängung des distalen Histidins E7 voraus. Hierbei konnte z.B. eine Temperatur-Unabhängigkeit der Hexakoordination auf die Affinität der Liganden nachgewiesen werden (TRENT UND HARGROVE, 2002; HAMDANE ET AL., 2003).

In pentakoordinierten Globinen verhindert das distale Histidin sterisch eine Interaktion des gebundenen  $O_2$ -Moleküls mit der Hämgruppe eines benachbarten Globinmoleküls. Würde diese Aktion nicht verhindert, könnte es zu einer Oxidation des Ferrohäms zu Ferrihäm kommen, welches zu keiner  $O_2$ -Bindung mehr befähigt wäre. Zusätzlich erschwert das distale Histidin E7 die Bindung des hochaffinen Kohlenmonoxids an das Häm des pentakoordinierten Globins (HUA ET AL., 2010).

## 1.4 Hämoglobin

Hämoglobin (Hb) befindet sich im geschlossenen Blutkreislauf der Vertebraten in den Erythrocyten (rote Blutkörperchen) und transportiert Sauerstoff (O<sub>2</sub>) von den Lungen zu den stoffwechselaktiven Organen und von dort Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) zurück zu den Lungen, wobei jedes Erythrocyt 3x10<sup>8</sup> Hb-Moleküle enthält. Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass Hämoglobin ein kugelförmiges, tetraedisch gepacktes Protein von 5,5 nm Durchmesser ist (DICKERSON UND GREIS, 1983). Die vier Untereinheiten werden von zwei α- und zwei β-Ketten gebildet, wobei je eine α-Kette in Kontakt mit zwei β-Ketten steht und umgekehrt. Diese werden von nichtkovalenten Kräften zusammengehalten, wobei an der Außenseite des Proteins Taschen entstehen, die die Hämgruppe enthalten. Da das Hämoglobin als Tetramer aus vier Untereinheiten besteht, die jeweils eine Hämgruppe tragen, vermag ein Erythrocyt 12x10<sup>8</sup> O<sub>2</sub>-Moleküle zu transportieren.

Hämoglobin liegt beim Menschen in zwei paralogen, durch Duplikation entstandenen Subfamilien vor. Die Proteinketten der α-Globin-Subfamilie sind 141 AS lang, die Proteinketten der β-Globin-Subfamilie umfassen eine Länge von 146 AS. Das Cluster der α-Globin-Subfamilie ist beim Menschen auf dem Chromosom 16 lokalisiert und beinhaltet vier funktionelle Gene (ζ, zwei α und θ) und drei Pseudogene (ψζ, und zwei ψ α). Das Cluster der β-Globin-Subfamilie ist beim Menschen auf dem Chromosom 11 lokalisiert. Es beinhaltet fünf funktionelle Gene (ε, zwei γ, δ und β) und ein Pseudogen (ψ β) (LEWIN, 2000).



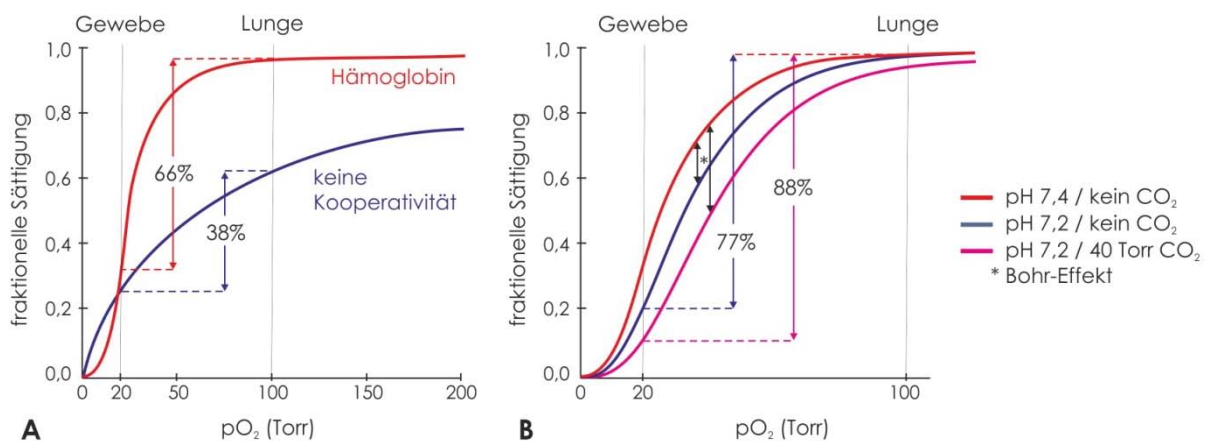
**Abbildung 1-4 Menschliches Hämoglobincluster**

Gezeigt ist die Anordnung der Globingene im α- und β-Globincluster. Die Expressionsreihenfolge während der Embryonalentwicklung verläuft von 5' nach 3'. Embryonale Gene sind rot, fetale gelb, adulte schwarz und Pseudogene grün dargestellt.

Hämoglobin liegt als Heterotetramer vor, das nicht immer aus zwei α und zwei β Untereinheiten gebildet wird. Man unterscheidet zwischen HbA, was 98% des Hbs ausmacht und aus zwei α und zwei β-Globin-Proteinen besteht, und HbA<sub>2</sub>, das anstelle der β-Globine

zwei  $\delta$ -Globine besitzt (LEWIN, 2000). Während der Embryogenese ändert sich die Hb-Zusammensetzung gemäß des sich wandelnden Sauerstoffbedarfs des Fötus. So kommt es im wachsenden Organismus zu einer fortlaufenden Änderung der Hb-Zusammensetzung. So werden zunächst drei Varianten des Prohämoglobins (HbP) parallel exprimiert (*Gower 1*, *Gower 2*, *Portland*). Im weiteren Verlauf wird das HbE allmählich durch das Fötale Hämoglobin (HbF) ersetzt und erst nach der Geburt wird das HbA gebildet (LEWIN, 2000; STRYER, 1995).

Die Sauerstoffaufnahme und Abgabe erfolgt bei Hämoglobin kooperativ. Dieser Vorgang ist mit strukturellen Veränderungen im Molekül verbunden, das dabei vom Tense (T)-Zustand mit niedriger  $O_2$ -Affinität in die oxygenierte Relaxed (R)-Form mit hoher  $O_2$ -Affinität, aber geringer Bindungskapazität für  $CO_2$ , Protonen und organische Phosphate übergeht (MONOD ET AL., 1965). Die zwischen den vier Untereinheiten bestehenden allosterischen Wechselwirkungen ermöglichen, dass nach Bindung des ersten  $O_2$  die Bindung weiterer  $O_2$ -Moleküle erleichtert wird. Dies führt zu einem sigmoidalen Dissoziationskurvenverlauf der  $O_2$

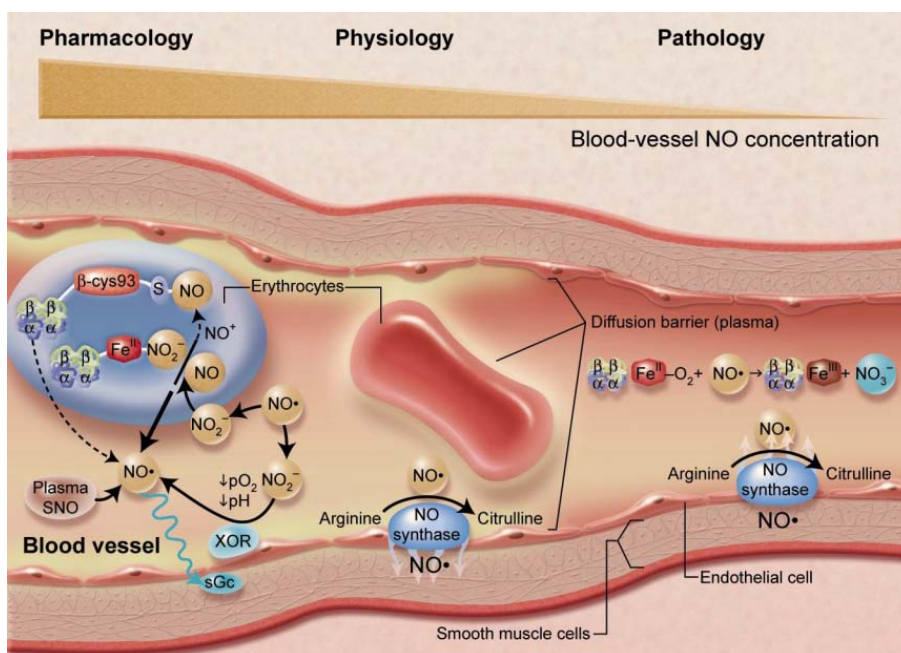


**Abbildung 1-5 Die kooperative Bindung des Hämoglobins und der Bohr-Effekt**

Die Kooperativität zwischen den  $O_2$ -Bindungsstellen des Hämoglobins führt, im Vergleich zu einem nichtkooperativen Protein, zu einer verstärkten  $O_2$ -Freisetzung in das Gewebe (A). Der Bohr-Effekt beschreibt die Auswirkung von pH-Wert und  $CO_2$ -Konzentration auf die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Sinkt der pH-Wert von 7,4 (rote Kurve) auf 7,2 (blaue Kurve), so führt das zu einer  $O_2$ -Freisetzung aus Oxyhämoglobin. Wird zudem der  $CO_2$ -Partialdruck von 0 auf 40 Torr erhöht (violette Kurve), so wird die Freisetzung nochmals verstärkt (B). ( $pO_2$ : Sauerstoffpartialdruck; nach STRYER, 2003)

Bindung. Die Affinität zu Sauerstoff liegt für adultes Hämoglobin bei 26 Torr. Dieser Wert ermöglicht es in  $O_2$ -reichen Regionen des Körpers wie z.B. den Alveolen, in denen Partialdrücke um 100 Torr vorliegen,  $O_2$  aufgrund der höheren Affinität aufzunehmen. In Bereichen des Körpers mit wenig  $O_2$ , wie z.B. den Blutgefäßen, herrschen etwa 20 Torr vor. Hier ist die  $O_2$ -Affinität des Hb nicht stark genug, um  $O_2$  zu halten, so dass es ihn an die Umgebung abgibt. Die  $O_2$ -Affinität wird als P50-Wert angegeben, was gleichbedeutend mit

dem  $O_2$ -Partialdruck ist, bei dem das Hämoglobin zu 50% mit Sauerstoff gesättigt ist. Je geringer der  $P_{50}$ -Wert also ist, desto höher die Affinität. Der Bohr-Effekt, eine weitere physiologische Eigenschaft, macht Hb zu einem idealen  $O_2$ -Transporteur. So wird bei Zunahme von  $CO_2$  und pH-Absenkung die Affinität des Hb zum  $O_2$  vermindert. Die  $O_2$ -Dissoziationskurve verschiebt sich nach rechts. In stoffwechselaktiven Gewebsregionen wird so aufgrund des dort niedrigen  $O_2$ -Partialdrucks, der erhöhten  $CO_2$  Bildung und der damit verbundenen  $H^+$ -Erhöhung Sauerstoff leichter an seine Umgebung abgegeben. Im Gegensatz dazu nimmt Hämoglobin in respiratorischen Organen, wo der  $O_2$ -Partialdruck höher und die  $H^+$ -Konz. niedrig ist,  $O_2$  leichter auf (STRYER, 2003).



**Abbildung 1-6 Reaktionen von NO und Hämoglobin in arteriellen Kapillaren**

Unter physiologischen Bedingungen (Bildmitte) diffundiert von der NO-Synthase gebildetes NO in umliegende glatte Muskelzellen und aktiviert die Guanylat-Cyclase. Diese bildet cGMP, welches über die Aktivierung der Protein-Kinase G eine Entspannung der glatten Muskulatur und somit eine Gefäßerweiterung zur Folge hat. Interaktion von NO mit Hämoglobin ist durch Diffusionsbarrieren auf die Membranen der roten Blutkörperchen und den umfließenden Plasmastrom begrenzt. Bei Hämolyse (rechts im Bild) reagiert freies Oxy-Hämoglobin mit NO unter Bildung von Met-Hb und Nitrat. Der dadurch verminderte NO-Gehalt führt zu einer Verengung der Blutgefäße. Unter erhöhtem NO Gehalt (links im Bild) kommt es bei Reaktion mit Sauerstoff zur Bildung von Nitrit ( $NO_2^-$ ) und Nitrat ( $NO_3^-$ ). Nitrit kann mit dem Cystein 93 des Hämoglobins reagieren, wobei eine Thiol-Bindung entsteht. Es können geringe Mengen an SNO-Hb entstehen, deren physiologische Funktion aber kontrovers diskutiert wird. Nitrit kann in die roten Blutkörperchen gelangen und dort durch Reaktionen mit Hämoglobin und Ascorbat zu NO reduziert werden. Im Plasma kann Nitrit durch die endotheliale Xanthin-Oxidoreduktase (XOR) wieder zu NO reduziert werden. Vorherrschende Reaktion aber ist die von NO mit Oxy-Hb zu Met-Hb und Nitrat, was zu einer Verminderung des NO-Gehalts führt (rechts). Die anderen Reaktionen führen zu einem Erhalt des NO-Gehalts, was der Modulation physiologischer Funktionen dient. (SCHECHTER AND GLADWIN 2003).

Die relativ niedrige Affinität von Hb wird unter anderem durch die Bindung mit dem organischen Phosphat 2,3-Biphosphoglycerat (BPG) erreicht. Die Erythrocyten enthalten stöchiometrisch zu den Hb-Molekülen BPG, das durch die Bindung an Deoxyhäm die Affinität von einem Torr auf 26 Torr erniedrigt. Diese BPG-Bindungseigenschaften fehlen bei den  $\gamma$ - und  $\beta$ -Ketten des Prohämoglobins und des fötalen Hämoglobins, weshalb das HbP und HbF eine höhere  $O_2$ -Affinität besitzt als das HbA der Mutter. Hierdurch wird eine Abgabe des  $O_2$  vom HbA der Mutter auf das HbP bzw. HbF des Kindes ermöglicht.

Hämoglobin ist der  $O_2$ -Lieferanten des gesamten Organismus. Daher ist seine Adaptation an  $O_2$ -Mangel für die Erhaltung der  $O_2$ -Homöostase im Blut und in allen Geweben fundamental. Als Anpassung an chronische Hypoxie regelt der Organismus das Hormon Erythropoietin (EPO) über die HIF-vermittelte Transduktionskaskade herauf. Hierbei wird EPO über die Blutbahn zum Knochenmark transportiert und interagiert dort mit den Rezeptoren der blutbildenden Stammzellen. Dieser Stimulus führt zu deren Proliferation, zur Hämoglobinsynthese und zur Synthese der in die Hämbiosynthese involvierten Enzyme (PODKOLODNAYA ET AL., 2000). Die Folge ist eine erhöhte Hämoglobin-Konzentration im Blut (BEALL ET AL., 1998; zitiert in KUWAHIRA ET AL., 1999), die auch unter relativ geringen alveolären  $O_2$ -Partialdrücken eine ausreichende  $O_2$ -Versorgung der stoffwechselaktiven Gewebe sichert. Auf eine kurzzeitige, akute Hypoxie reagiert der Organismus mit einer selektiven Neuverteilung des Blutflusses und versucht, die  $O_2$ -Versorgung der Organe durch erhöhte Atmungs- und Herzschlagfrequenz zu sichern (ADACHI ET AL., 1976; KUWAHIRA ET AL., 1993). Setzt man Mäuse einer periodisch auftretenden Hypoxie aus, so führt dies zu einer reversiblen Erhöhung der Hämoglobin-Konzentration (KUWAHIRA ET AL., 1999).

Vor 150 Jahren wurde erstmals publiziert, dass an das Eisenatom der Hämgruppe nicht nur  $O_2$  und  $CO_2$ , sondern auch Stickstoffmonoxid (NO) mit hoher Affinität bindet und dabei physiologische Auswirkungen auf den Gefässwiderstand hat (HERMANN 1865). Das Hämoglobin der Erythrozyten versorgt demnach das Gewebe nicht nur mit Sauerstoff sondern transportiert auch NO zum hypoxischen Gewebe und bedingt dadurch eine Vasodilatation.

**Stickstoffmonoxid (NO)** entsteht endogen in einer von der Stickstoffsynthase (NOS) katalysierten Reaktion. Hierbei wird L-Arginin unter  $O_2$ -Verbrauch in L-Citrullin und NO aufgespalten (MARLETTA, 1993). Aufgrund seines chemisch reaktiven freien Radikals, zählt NO zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS). NO dient im Körper als sekundärer Botenstoff bei der Muskel-Relaxation (siehe Abbildung 1-6). Es dient weiterhin im Nervensystem als Neurotransmitter oder kann die Aktivierung der Blutplättchen inhibieren (DAVIS ET AL., 2001). In hoher Konzentration kann NO toxisch wirken, da es die Cytochrom-c-Oxidase der Atmungskette reversibel inhibiert (CLEETER ET AL., 1994).

Bindet Hämoglobin das NO, so entsteht möglicherweise S-Nitrosohämoglobin (SNO-Hb). Diese Bindung erfolgt an zwei Cysteinen (Cys93) in den beiden  $\beta$ -Ketten des oxygenierten Hämoglobins (ISBELL ET AL., 2008). Gibt das Hb im Gewebe seinen Sauerstoff ab und verändert dabei seine Struktur von der R- in die T-Form, führte dies zu einer Destabilisierung der SNO-Hb-Bindung und einer Freisetzung des vasoaktiven NOs (STAMLER ET AL., 1997; GOW AND STAMLER 1998). Diese Hypothese wurde jüngst durch eine transgene Maus mit fehlendem Cys93 in Frage gestellt. Das Tier zeigte keine phenotypische Veränderungen im Bereich der Blutdruckregulation, Ausdauer oder Reaktion auf hypoxische Zustände (ISBELL ET AL., 2008). Hämoglobin besitzt auch eine Nitritreduktase-Funktion. Im deoxygenierten Zustand reduziert Hb Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) unter Bildung von methHb zu NO. Doch wird angenommen, dass NO durch die NO-Dioxygenasefunktion (NOD) des Hämoglobins umgehend eine weitere Reaktion mit oxygeniertem Hb eingehen könnte und zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) weiter reagieren würde (GLADWIN ET AL., 2005; JEFFERS ET AL., 2005). Dies setzte aber voraus, dass unter Hypoxie ausreichend oxygeniertes Hb vorhanden wäre. BASU schlägt daher vor, dass Nitrit in einer ersten Reaktion mit Deoxyhämoglobin und einem Proton ( $\text{H}^+$ ) zu NO und methHb ( $\text{HbFe}^{3+}$ ) reagiert. Parallel dazu reagiert Nitrit auch direkt mit methHb, wobei als Zwischenprodukt das hochreaktive  $\text{NO}_2^\bullet$  entsteht, was umgehend mit einem weiteren NO Molekül zu  $\text{N}_2\text{O}_3$  umgesetzt wird (BASU ET AL., 2007; RODKEY 1976). Im Vergleich zu NO ist  $\text{N}_2\text{O}_3$  stabiler, lipophil und kann aus den Erythrozyten herausdiffundieren, um später wieder als NO und  $\text{NO}_2^\bullet$  zur Vasodilatation beizutragen (ESPEY ET AL., 2001). Hierdurch würde auch die Hemmung der NO-Umsatzrate durch die in den Erythrozyten gebundenen Hämoglobine aufgehoben, da die Zellmembranen eine physikalische Barriere darstellen. Zellfreies Oxy-Hämoglobin setzt NO 500-1000-fach schneller zu Nitrat um. Dies geschieht so schnell, dass NO ohne den Schutz der Zellmembranen noch vor der Entfaltung seiner physiologischen Wirkung inaktiviert werden könnte (AZAROV ET AL., 2005; GLADWIN AND KIM-SHAPIRO 2008; VAUGHN ET AL., 2000).

## 1.5 Myoglobin

Myoglobin (Mb) ist ein pentakoordiniertes Monomer von 153 AS und einem Molekulargewicht von 16,9 kDa (STRYER, 1995). Das Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 22 und wird im Herz-, den Skelettmuskeln und der glatten Muskulatur des Darms exprimiert (QIU ET AL., 1998). Die Sauerstoffaffinität liegt bei einem Torr. Dieser Wert ermöglicht dem Mb die Übernahme des vom Hb herbeitransportierten Sauerstoffs. Die Hauptaufgabe von Mb liegt in der Speicherung von O<sub>2</sub> im Muskel, um ihn in Zeiten erhöhten Bedarfs oder Mangels an die aerob stoffwechselaktiven Mitochondrien abzugeben (MILLIKAN, 1937). In tieftauchenden Meeressäugern konnte eine um das 10-fache erhöhte Mb-Konzentration nachgewiesen werden, verglichen mit einem Landsäugetier gleicher Größe (KOOYMAN UND PONGANIS, 1998; KANATOUS ET AL., 1999). Seehunde vermögen während eines ausgedehnten Tauchgangs den Stoffwechsel auf die zentralen Organe zu beschränken. Messungen des Oxidationszustandes des Myoglobins vor und nach dem Tauchgang zeigten, dass nachher bis zu 94% des Mb im Muskel in deoxygenierter Form vorlagen (GUYTON ET AL., 1995; DAVIS UND KANATOUS, 1999; KANATOUS ET AL., 2002). Ein Aufenthalt in sauerstoffarmer Umgebung führt zu einer Erhöhung des Myoglobingehalts im Muskel. So können z.B. Bergsteiger während der Akklimatisierung bzw. Sportler durch Höhentraining unter Bedingungen mit geringeren O<sub>2</sub>-Partialdrücken die Mb-Menge im Muskel um bis zu 70% steigern (VOGT ET AL., 2001).

Die Möglichkeit, ob Myoglobin auch als intrazellulärer O<sub>2</sub>-Transporter fungieren könnte (WITTENBERG, 1959), ist nicht endgültig geklärt. Hierbei wird von einer Diffusion vom sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zu den Zellmitochondrien ausgegangen. Myoglobin würde in oxygenierter Form vom SR zu den Mitochondrien und in deoxygenierter Form von den Mitochondrien zurück zum SR diffundieren („*facilitated oxygen diffusion*“) (WITTENBERG ET AL., 1970, 1987, 2003). Dieser Hypothese steht ein Diffusionskoeffizient von  $1,2 \times 10^{-7}$  entgegen, der zu klein erscheint, um Myoglobin eine effektive Funktion als O<sub>2</sub>-Transporter zuzuschreiben (JÜRGENS ET AL., 2000). Experimente an Myoglobin-*Knockout*-Mäusen haben gezeigt, dass Myoglobin kein essentielles Protein darstellt (GARRY ET AL., 1998; GÖDECKE ET AL., 1999). Das Fehlen von Mb konnte von den Mäusen zum einen durch physiologische Veränderungen wie eine erhöhte Dichte an Blutgefäßen und eine Steigerung der Konzentration von Hämoglobin kompensiert werden. Auf molekularer Ebene waren in ko-Mäusen die Proteine Hif1 $\alpha$  und Hif2 (*hypoxia inducible factors*), sowie das Cytokin VEGF (*vascular endothelial growth factor*) in ihrer Expression stark erhöht, was normalerweise unter hypoxischen Bedingungen der Fall ist. Zusätzlich wurde in den Myoglobin-*Knockout*-

Mäusen eine starke Erhöhung der NO-Konzentration nachgewiesen (FLÖGEL ET AL., 2001). Die physiologischen Eigenschaften von NO wurden unter 1.4 Hämoglobin ausführlich beschrieben. Myoglobin weist in der Oxyform eine Dioxygenasefunktion auf. Oxygeniertes Myoglobin überträgt O<sub>2</sub> auf giftiges NO und generiert dadurch unschädliches Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), was über den Harnstoffzyklus abgebaut wird. Dabei entsteht oxidiertes Met-Myoglobin, was zu Fe<sup>2+</sup>-Mb reduziert werden muss. Mb ist damit indirekt an der Regulation der oxidativen Phosphorylierung beteiligt (WITTENBERG UND WITTENBERG, 2003; FLÖGEL ET AL., 2001). Unter Hypoxie besitzt Mb eine Nitritreduktase-Funktion, die Nitrit zu NO umsetzt, wodurch Myoglobin zu einer Gefäßerweiterung und verstärkten Durchblutung beiträgt (GLADWIN ET AL., 2008).

## 1.6 Neuroglobin

Vor einigen Jahren wurde bei Datenbanksuchen ein neues Globin entdeckt, das aufgrund der prädominanten Expression im Nervensystem Neuroglobin (*NGB*) genannt wurde (BURMESTER ET AL., 2000). Strukturanalysen zeigten, dass *NGB* die klassische Globinfaltung aufweist (PESCE ET AL., 2002). Bei NGB handelt es sich um ein monomeres, hexakoordiniertes Globin mit einer Größe von 17 kDa und einer Länge von 151 Aminosäuren (453 bp) (COUTURE ET AL., 2001; DU ET AL., 2003; KRIEGL ET AL., 2002; TRENT ET AL., 2001; UNO ET AL., 2004).

Zu den paralogen Globinen Hämoglobin und Myoglobin weist NGB lediglich eine Identität von 25% bzw. 21% auf, wobei die essentiellen Aminosäuren jedoch stark konserviert sind. Die Sauerstoffaffinität (P<sub>50</sub>) von Ngb *in vitro* liegt bei 1 bis 2 Torr (BURMESTER ET AL., 2000; DEWILDE ET AL., 2001; PESCE ET AL., 2002) und unter physiologischen Bedingungen bei bis zu 7,5 Torr (FAGO ET AL., 2004).

Im menschlichen Genom befindet sich das *NGB*-Gen auf dem Chromosomenabschnitt 14q24 (BURMESTER ET AL., 2000). Zwischen Mensch und Maus liegt eine sehr hohe Sequenzidentität auf Ebene der Aminosäuren von 94% vor. *NGB* kommt als orthologes Gen sowohl in Säugern, Vögeln, Reptilien, Amphibien als auch in Fischen vor (BURMESTER ET AL., 2004).

Expressionsuntersuchungen mit Hilfe von mRNA *in situ* Hybridisierung und polyklonalen Antiseren konnten ein cytoplasmatisches Vorkommen von Ngb im peripheren und zentralen

Nervensystem, im endokrinen System und in der Retina nachweisen (BURMESTER ET AL., 2000; HANKELN ET AL., 2004; REUSS ET AL., 2002; SCHMIDT ET AL., 2003; WYSTUB ET AL., 2003).

Die Retina ist das Organ, in dem die höchste Ngb-Expression nachgewiesen wurde. Der Gehalt liegt in der Retina der Maus bei 50-100  $\mu\text{M}$  und damit rund 100 mal so hoch wie im Gesamthirn (SCHMIDT ET AL. 2003). Die Verteilung der Ngb-Expression entspricht der Verteilung der Cytochrom-c-Oxidase bzw. den Mitochondrien und somit der Segmente mit dem höchsten Sauerstoffkonsum (Ganglienzellen, innere und äußere plexiforme Schicht, Innensegmente der Photorezeptorzellen). Hier könnte Neuroglobin an der *facilitated oxygen diffusion* von der Zellmembran zu den Mitochondrien hin beteiligt sein. Dafür spricht die Lokalisation des Neuroglobins im apikalen Abschnitt der inneren Segmente, in denen auch die Mitochondrien akkumulieren (BENTMANN ET AL., 2005). Hier konnte mit Hilfe von Antikörperfärbungen gezeigt werden, dass in den Sehzellen ein intrazellulärer Transport von Neuroglobin in das innere Segment der Sehzellen stattfindet (SCHMIDT ET AL., 2003). Neben der Expression in Schichten mit Mitochondrienvorkommen, ist die zelluläre Verteilung von Ngb stark an Kapillaren gebunden. Hier könnte Ngb mit seiner höheren  $\text{O}_2$ -Affinität als Hb in den Kapillaren, aber einer niedrigeren Affinität als die Cytochrom-c-Oxidase der Atmungskette in den Mitochondrien eine Sauerstoff-Transportfunktion übernehmen.

Einen weiteren Hinweis für eine Beteiligung von Ngb am oxidativen Stoffwechsel liefert die avaskuläre Retina der Meerschweinchen. Bei diesen Vertretern der Nagetiere befinden sich Mitochondrien nur in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen, dem Bereich, der für 90% des  $\text{O}_2$ -Konsums verantwortlich ist (CRINGLE ET AL., 2002). Die avaskuläre Retina wird nur über choroideale Gefäße der Aderhaut versorgt und ist größtenteils hypoxisch bzw. anoxisch (CRINGLE ET AL., 1996). Der Innenbereich der Retina ist frei von Kapillaren. Ngb ist bei der avaskulären Retina, so wie auch die Mitochondrien, auf die Innensegmentenschicht beschränkt. Die Expression korreliert damit direkt mit der Region, die 90% des Sauerstoffs konsumiert (CRINGLE ET AL., 1996; BENTMANN ET AL., 2005).

Die Neuronen des Olivenkomplexes gehören im Hirn zu den metabolisch konstitutiv aktivsten (FISCH, 1970). Expressionsuntersuchungen des oberen Olivenkomplexes konnten durch quantitative PCR-Analysen belegen, dass die *Ngb*-mRNA bis zu 2,3-fach höher exprimiert wird, als in der unmittelbaren Gehirnumgebung (HILL UNPUBL. 2003). Ein hoher Metabolismus bedeutet auch einen hohen Verbrauch von Sauerstoff. Falls Ngb im Nervengewebe eine ähnliche Funktion wie Myoglobin im Muskelgewebe übernimmt, ist von einer erhöhten Ngb-Expression auszugehen. Gehirnbereiche mit vergleichsweise starkem Stoffwechsel, wie die Kerne des auditorischen Systems bilden da eine Analogie zum Beispiel der Retina (SCHMIDT ET AL., 2003). Die konstitutiv erhöhte Ngb-Expression in der hypoxieresistenten Blindmaus

*Spalax ehrenbergi* weist ebenfalls auf eine Funktion des Ngb bei der O<sub>2</sub>-Versorgung hin (AVIVI ET AL., IN DRUCK).

Ob sich die Expression von Ngb unter Sauerstoffmangel verändert, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Hierbei variierten die Zeiten zwischen fünf Stunden und zwei Wochen und die O<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 6% bis 12%. FORDEL konnte im Maushirn nach 48 Stunden bei 7% O<sub>2</sub> einen mRNA-Zuwachs von 70% nachweisen, der nach 12 Stunden bei 7% O<sub>2</sub> im Auge sogar einen Zuwachs von 200% aufwies (FORDEL ET AL., 2007). LI setzte Ratten für 2 Wochen einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 10% aus. Hierbei konnte maximal ein mRNA-Zuwachs von 150% und ein Proteinzuwachs von 100% nachgewiesen werden (LI ET AL., 2006). Eine unterbrochene Hypoxie, bei der sich hypoxische Phasen mit normoxischen Phasen abwechseln, schwächten die gemessenen Zuwachsraten ab (LI ET AL., 2006). Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (UNPUBL.) sowie Publikationen von HUNDAHL und MAMMEN konnten weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene eine deutliche hypoxieinduzierte Neuroglobinregulation nachweisen (HUNDAHL ET AL., 2005; MAMMEN ET AL., 2006).

Eine Regulation von Neuroglobin in *in vitro*-Experimenten, bei denen Zellen für einen kurzen Zeitraum einer Hypoxie ausgesetzt werden, konnte auch nicht von allen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. SUN zeigte, dass die *Ngb*-Expression in einer primären kortikalen Zellkultur unter 24-stündigem O<sub>2</sub>-Entzug etwa 2-fach verstärkt wird. Dies war auch bei Zugabe von Chemikalien (300 µM Cobaltchlorid, CoCl<sub>2</sub> oder 100 µM Deferoxamin, Dfx), die die Expression hypoxieinduzierbarer Gene steigern, der Fall. Andere Stressoren, in diesem Fall Staurosporin und Natrium-Nitroprussid, zeigten keine derartige Wirkung (SUN ET AL. 2001). Bei Staurosporin handelt es sich um einen starken Inhibitor der Klasse der ATP-abhängigen Protein-Kinasen. Natrium-Nitroprussid ist eine potente NO-freisetzende Substanz. Verschiedene Publikationen zeigten eine erhöhte mRNA Expression von 150% bis 500%, wobei die Unterschiede auf unterschiedliche Zelllinien und abweichende Versuchsbedingungen zurückzuführen sind. Die Ergebnisse lassen auf eine induzierbare Überexpression von Neuroglobin durch Hypoxie schließen (FORDEL ET AL., 2004; RAYNER ET AL., 2006; SCHMIDT-KASTNER ET AL., 2006; SUN ET AL., 2001). Hypoxieexperimente *in vivo* unserer Arbeitsgruppe hingegen konnten eine *Ngb*-Hochregulierung unter hypoxischen Bedingungen nicht bestätigen. Vielmehr kam es zu einer leichten Herunterregulation auf mRNA-Ebene (UNPUBL.).

*Hypoxia-responsive-elements* (HRE) bestehen aus konservierten Konsensusmotiven von HIF1α und können bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck die Transkription eines Gens stärken. Sie befinden sich im Bereich des 5'-Promotors und Enhancers bzw. jenseits des 3'-Bereiches der UTR (untranslatierte Region), wo sie in kurzen Intervallen von etwa 50bp auftreten. Im

Bereich des Neuroglobins wurden mehrere HIF1 $\alpha$ -Motive gefunden, doch wiesen diese keine konservierten HREs auf (WYSTUB ET AL., 2004). Dies spricht ebenfalls gegen eine starke hypoxieinduzierte Ngb-Regulation *in vivo*.

SUN untersuchte neben der Regulation von Ngb auch, ob Ngb einen protektiven Effekt unter Hypoxie aufweist. Eine Reduktion der Ngb-Expression mittels antisense-RNA verstärkte in Zellkultur hypoxiebedingte Schäden, wohingegen diese Schädigungen durch eine verstärkte Ngb-Expression verringert werden konnten (SUN ET AL. 2001). Im Rattenmodell konnte auch die Wirkung von Ngb *in vivo* nach einem Schlaganfall gezeigt werden. Nach künstlicher fokaler Ischemie, wurde bei einer Ratte durch Injektion eines fluoreszenzmarkierten Ngb-Antisense-Oligonukleotids die Ngb-mRNA inhibiert, um die Translation des Proteins zu verhindern. Eine zweite Ratte wurde als Kontrolle mit einem fluoreszenzmarkierten Ngb-Sense Oligonukleotid behandelt. Anschließend angefertigte Paraffinschnitte der Gehirne zeigten in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung in den Gehirnen mit der inaktivierten Ngb-RNA weit schwerere Schäden als in den Kontroll-Gehirnen (SUN ET AL. 2003). Auch eine adenoviral hervorgerufene Ngb-Überexpression führte zu einer 30%-igen Reduktion der Schäden durch Ischämie (KHAN ET AL., 2006). Mendoza konnte eine Milderung der Zellschäden auch an endokrinen Zellen zeigen. Isolierte Zellen der Langerhansschen Inseln aus Ngb-überexprimierenden Mäusen zeigten eine erhöhte Überlebensrate, verglichen mit Wildtypzellen (MENDOZA ET AL., 2005). Ngb ist demnach eine neuroprotektive Funktion unter O<sub>2</sub>-Mangel bzw. nach Sauerstoff-Stress während der Reperfusion zuzuweisen.

## 1.7 Cytoglobin

Cytoglobin wurde gleichzeitig von drei verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt (BURMESTER ET AL., 2002; TRENT UND HARGROVE, 2002 als Histoglobin; KAWADA ET AL., 2001 als STAP). Der Name bezieht sich auf die ubiquitäre Expression der mRNA in allen Organen (BURMESTER ET AL., 2002). Es wird in Fibroblasten, hepatischen Sternzellen, Chondroblasten und Osteoblasten exprimiert (KAWADA ET AL., 2001; SCHMIDT ET AL., 2004). Die Lokalisation in diesen nichtneuronalen Zelltypen ist zytoplasmatisch (SCHMIDT ET AL., 2004). Andere immunhistologische Studien zeigten kontroverse Ergebnisse (GEUENS ET AL., 2003), die jedoch vermutlich auf artifiziellen Färbungen von Zellkernen beruhen. Desweiteren konnte CyGB in

einer neuronalen Subpopulation des zentralen und peripheren Nervensystems sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden (SCHMIDT ET AL., 2004).

Bei Säugern weist CyGB eine Länge von 190 AS auf und ist beim Menschen auf Chromosom 17, bei der Maus auf Chromosom 11 lokalisiert. Bei Fischen besteht CyGB aus nur 174 AS, bei Amphibien aus 179 AS, ist damit aber immer noch im Vergleich zu Ngb, Hb und Mb relativ verlängert (FUCHS ET AL., 2005, FUCHS ET AL., 2006). Die N-terminale Verlängerung beruht bei Säugern auf einem Duplikationsereignis der ersten 21 Nukleotide. Die Entstehung der C-terminalen Verlängerung, die zum lediglich 10 AS langen Exon 4 führt, ist ungeklärt und fehlt bei Fischen und Amphibien komplett (BURMESTER ET AL., 2002, FUCHS ET AL., 2005, FUCHS ET AL., 2006). Cytoglobin gehört zu den hexakoordinierten Globinen. (BURMESTER ET AL., 2002, TRENT UND HARGROVE, 2002). Die für die reversible Bindung des Sauerstoffs bzw. die Globin-Häm-Bindung wichtige proximale HisF8-Position, die distale HisE7-Position und die PheCD1-Position sind wie bei den anderen Globinen vorhanden.

Die Arbeitsgruppe von KAWADA entdeckte CyGB in den Sternzellen von fibrotischer Rattenleber und benannten es „stellate cell activation-associated protein“ (STAP) (KAWADA ET AL., 2001). Auf Proteinebene wiesen sie während der Fibrosierung der Sternzellen neben einer erhöhten Expression von CyGB auch eine Erhöhung für den PDGF-Rezeptor- $\beta$ , N-CAM und  $\alpha$ -Actin nach. Durch diesen Zusammenhang vermuteten sie, dass CyGB während der fibrogenen Umwandlung der Sternzellen zu myofibroblasten-ähnlichen Zellen eine wichtige Rolle zukommt (PARADIS ET AL., 2001). Der Nachweis einer Peroxidase-Aktivität des Proteins ließ eine Schutzfunktion für Sternzellen gegen auftretende Peroxide während der Fibrosierung annehmen.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Expression von *Cygb* vermutlich unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors „Hypoxie-induzierter Faktor 1“ (HIF-1) steht und somit Hypoxie-induziert ist (FORDEL ET AL., 2004; WYSTUB ET AL., 2004; MAMMEN ET AL., 2006; FORDEL ET AL., 2007b). Sauerstoffkonzentrationen von 9% für eine Dauer von 44 Stunden führte bei Ratten in Herz und Leber zu einer Expressionserhöhung im Vergleich zu einer normoxischen Kontrollgruppe um etwa 250% (SCHMIDT ET AL., 2004). FORDEL konnte, nachdem Mäuse für 48 Stunden bei 12% Sauerstoffgehalt gehalten wurden, einen Zuwachs an *Cygb* mRNA von annähernd 300% im Muskel und 550% in der Leber messen (FORDEL ET AL., 2004). Im Maushirn überstieg der mRNA-Anstieg auch nach einer Woche bei 10% O<sub>2</sub> nicht die 80% (FORDEL ET AL., 2004). LI konnte unter Mittel- und Langzeit-Hypoxie keine signifikante Expressionsteigerung von *Cygb* im Rattengehirn nachweisen (LI ET AL., 2006). *In vitro* wiederum zeigte die Zelllinie neuronaler Abstammung HN33 nach 48 Stunden bei 1% Sauerstoff eine 500%-igen Anstieg der mRNA-Expression (FORDEL ET AL., 2004). Versuche mit

Ischemie und Reperfusion führten zu keiner wesentlichen Steigerung der *Cygb* mRNA-Expression (EIGENE ARBEITSGRUPPE UNPUBL.). Die Annahme einer hypoxieinduzierbaren Regulation von *Cygb* wird durch den Nachweis zweier HREs im 5'-Bereich und zwei im 3'-Bereich des Gens gestützt (WYSTUB ET AL., 2004).

## 1.8 Ngb und Cygb: Mögliche Funktionen

Obwohl die beiden Globine Ngb und Cygb nun etwa seit einem Jahrzehnt erforscht werden, sind die definitiven physiologischen Funktionen unbekannt und mehrere Hypothesen kommen in Betracht:

### 1) O<sub>2</sub>-Speichermolekül oder intrazelluläres O<sub>2</sub>-Transportmolekül

Ähnlich dem Myoglobin im Muskel könnten Ngb und Cygb als O<sub>2</sub>-Speicher fungieren und zusätzlich den O<sub>2</sub>-Transport von der Zellmembran zu den Mitochondrien erleichtern (WITTENBERG AND WITTENBERG, 1987; WITTENBERG AND WITTENBERG, 2003).

### 2) Sensorprotein

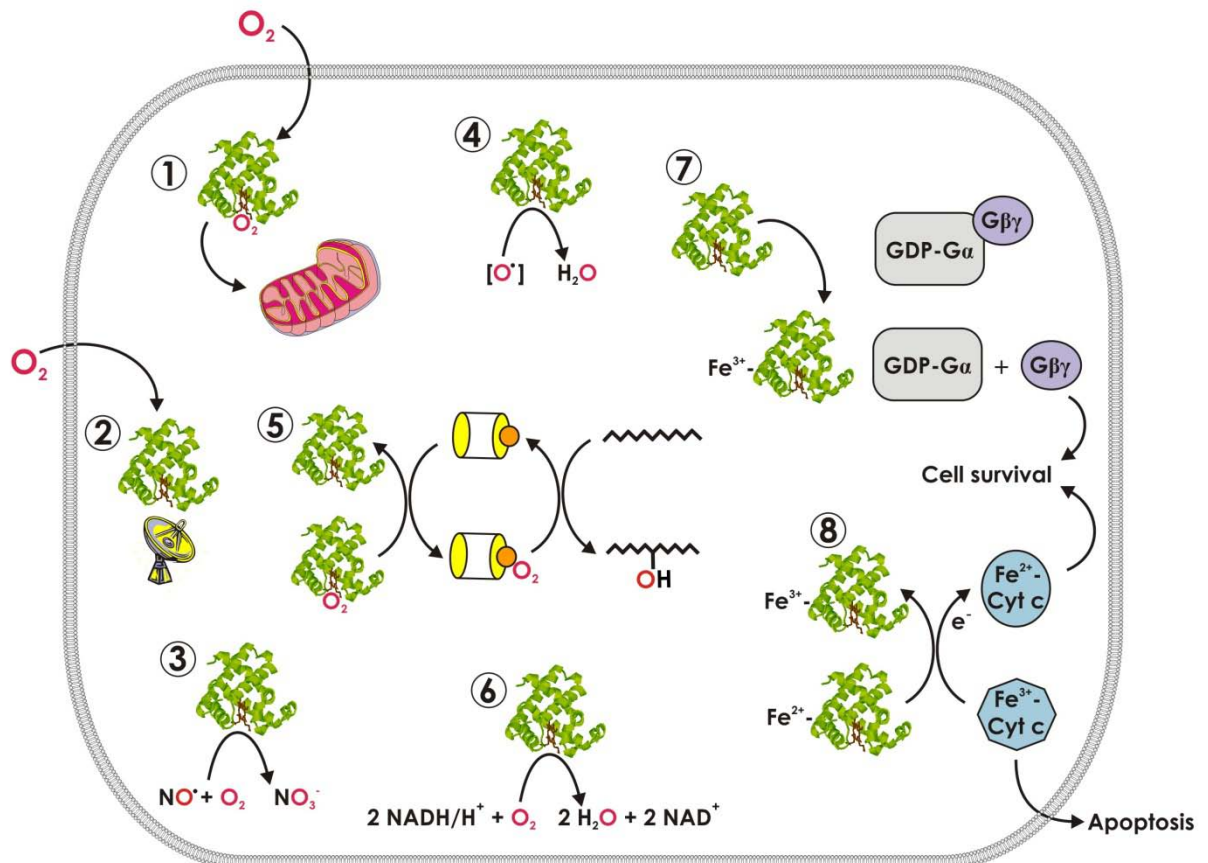
Hexakoordinierte Globine können bei der Ligandenbindung größere Tertiärstrukturänderungen eingehen, was ein Signal in einer Signaltransduktionskaskade darstellen könnte. Eine Konformationsänderung dieser Art wurde am Beispiel des Reishämoglobins riceHB1 beobachtet (HARGROVE ET AL., 2000; KRIEGL ET AL., 2002). Bei Archaeoglobinen und Bakterienglobinen wurde dieser Vorgang schon beschrieben (FREITAS ET AL., 2004; HOU ET AL., 2001).

### 3) NO-Dioxygenasen

Die beiden Proteine könnten als NO-Dioxygenase ähnlich den bakteriellen Flavohämoglobinen schädliches NO in harmloses Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) umwandeln (HAUSLADEN ET AL., 2001; KUNDU ET AL., 2003). Vergleichbar wurde dieser Vorgang für Myoglobin an *Myoglobin*-Knockout-Mäusen beschrieben (FLÖGEL ET AL., 2001)

#### 4) Detoxifizierung von ROS und RNS

Ngb und Cygb könnten bei der Entgiftung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies eine Rolle spielen, wie sie beispielsweise nach Ischämie/Reperfusion vermehrt anfallen (HEROLD ET AL., 2004). Auch dem Myoglobin wird diesbezüglich eine Schutzfunktion zugeschrieben (FLÖGEL ET AL., 2004).



**Abbildung 1-7 Mögliche Funktionen intrazellulärer Globine.**

1) O<sub>2</sub>-Transport zu den Mitochondrien, 2) O<sub>2</sub>-Sensor, 3) Entgiftung von NO und 4) ROS, 5) O<sub>2</sub>-Lieferant für enzymatische Reaktionen, 6) Regeneration von NAD<sup>+</sup>, 7) Einfluss auf die Signaltransduktion der G-Proteine, 8) Apoptoseschutz durch die Reduktion von Cytochrom-c. Verändert nach HANKELN ET AL., 2004; BURMESTER & HANKELN, 2009.

#### 5) O<sub>2</sub>-Lieferant für enzymatische Prozesse

Molekularer Sauerstoff wird in der Zelle für viele enzymatische Reaktionen benötigt. Hierfür könnten Ngb und Cygb mit ihren O<sub>2</sub>-Bindungsfähigkeiten als O<sub>2</sub>-Lieferant fungieren. Beispiele sind die NO-Synthase, die molekularen O<sub>2</sub> zur Bildung von NO benötigt oder die Prolyl-4-Hydroxylase. Sie benötigt bei der Kollagenbildung größere Mengen an O<sub>2</sub> für die posttranslationale Modifizierung von Kollagen und HIF-1α (LEONE ET AL., 1991; PIHLAJANIEMI ET AL., 1991).

**6) NADH-Oxidase**

Für Hämoglobine in nicht-symbiotisch lebenden Pflanzen konnte gezeigt werden, dass diese Globine bei Hypoxie als terminale Oxidasen die Regenerierung von  $\text{NAD}^+$  übernehmen können. Dadurch halten sie die glykolytische ATP-Gewinnung in Gang (SOWA ET AL., 1998), was für einige Bakterienglobine seit den Neunzigern bekannt ist (DIKSHIT ET AL., 1992; ERMLER ET AL., 1995). Dies korreliert mit dem von SAWAI für Cygb beschriebenen Redoxpotential im Bereich des Cytochroms  $b_5$  (SAWAI ET AL., 2003).

**7) G-Protein-vermittelte Signaltransduktion**

WAKASUGI postuliert einen möglichen Einfluss von Ngb auf die Signaltransduktion der G-Proteine: durch die Assoziation von oxidiertem Met-Ngb *in vitro* mit der GDP-bindenden Form der  $\alpha$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen kommt es zur Freisetzung der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten (WAKASUGI ET AL., 2003; WAKASUGI AND MORISHIMA, 2005; WATANABE AND WAKASUGI, 2008). Eine derartige Interaktion *in vivo* ist bisher noch nicht bewiesen.

**8) Cytochrom-C und Apoptosehemmer**

Ngb kann *in vitro* das mitochondriale Cyt c effektiv reduzieren. Dieser Elektronentransfer könnte Cyt c, das von Mitochondrien in stoffwechselaktiven oder unter oxidativem Stress stehenden Zellen freigesetzt wird, reduzieren. Eine Bildung des Apoptosoms ist zumindest *in vitro* nur durch oxidiertes Cyt c möglich (PAN ET AL., 1999), und so könnte die Reduktion des  $\text{Fe}^{3+}$  Cyt c durch  $\text{Fe}^{2+}$  Ngb die ungewollte Auslösung des mitochondrialen Apoptose-Weges verhindern und die protektive Eigenschaft von Ngb erklären (FAGO ET AL., 2006; RAYCHAUDHURI ET AL., 2010).

## 1.9 Die Entstehung von Reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/NOS)

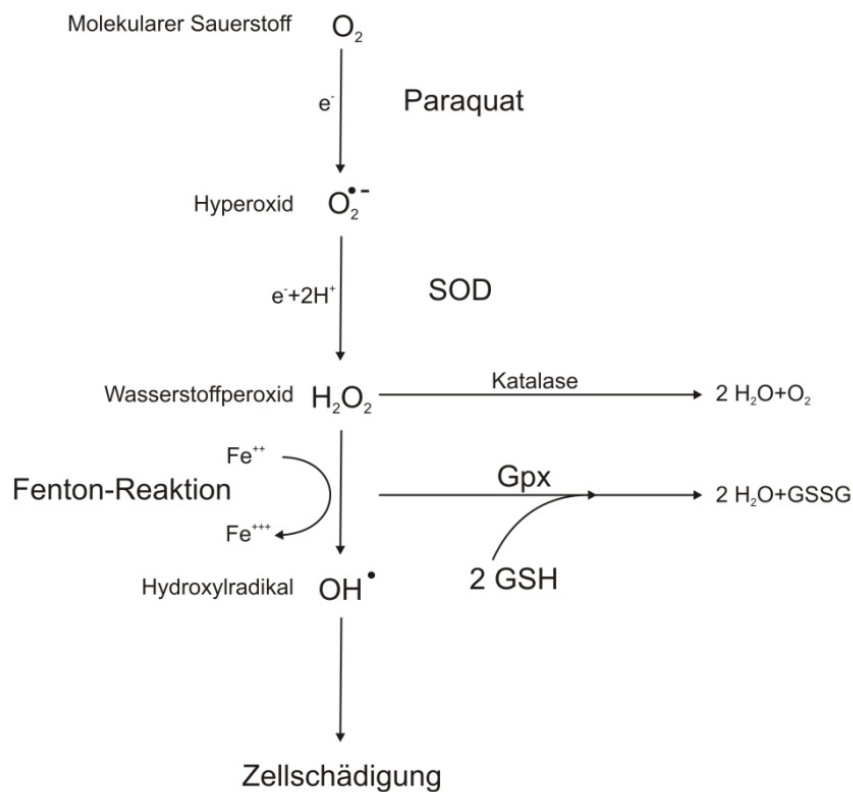
Zur Energiegewinnung aerober Organismen wird molekularer Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette benötigt. Als Nebenprodukt entstehen dabei reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Hierunter fallen Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale ( $OH^{\cdot}$ ). In niedriger Konzentration übernehmen die ROS die Aufgabe eines sekundären Botenstoffs, der in der Zelle die Aktivität von Phosphatasen, Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren reguliert und auch Einfluss auf die zelluläre Homöostase nimmt. (Dröge, 2002; VALKO ET AL., 2007). Desweiteren werden darüber Genexpression, Zellwachstum und Apoptose gesteuert (MARTINDALE AND HOLBROOK, 2002; SEN AND PACKER, 1996; SUZUKI ET AL., 1999). ROS entsteht permanent in geringem Maße in der Zelle, doch führen meist exogene Einflüsse wie Nikotin, ultraviolettes Licht (UV-A, UV-B) und andere Umweltgifte zu hohen Konzentrationen, die dann zytotoxische Auswirkungen haben (CHURCH UND PRYOR, 1985; RILEY, 1994; MASAKI ET AL., 1995; SHEN ET AL., 1996). Viele Erkrankungen wie Krebs, Parkinson, Alzheimer, ALS und Diabetes werden mit hohen ROS-Konzentrationen assoziiert (ZHANG ET AL., 1999; HUANG ET AL., 2004; NIEDOWICZ UND DALEKE, 2005). Auch der Prozess der Zellalterung wird mit ROS in Verbindung gebracht (HARMAN, 1956).

Über die Mengen an ROS, die während des Stoffwechsels entstehen gibt es vielfältige Angaben. BOVERIS UND CHANCE, (1973), gehen davon aus, dass etwa 1-2% des verbrauchten  $O_2$  zu  $O_2^{\cdot-}$  statt zu  $H_2O$  reduziert werden. KOWALTOWSKI UND VERCESI, (1999) publizierten, dass 1-6% des  $O_2$  infolge unvollständiger Reduktion zu  $O_2^{\cdot-}$  umgewandelt würden. Einigkeit besteht darin, dass mit etwa 92% der freien Radikale die Mitochondrien den Hauptentstehungsort darstellen, gleichzeitig aber auch am ehesten von diesen geschädigt werden können (ANTON ET AL., 2005, CADENAS, 2004; GENOVA ET AL., 2004). Die Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  geschieht in der Atmungskette der Mitochondrien an Komplex I und III (BOVERIS ET AL., 1976).

Ein pathologischer Zustand des Organismus, in dem vermehrt ROS entsteht, ist z.B. der nach einer Reoxygenierung von Gewebe. Dies kann bei Ischämie, die meist mit einer Unterversorgung an Sauerstoff einhergeht, der Fall sein (CHAN, 1996; LEI ET AL., 1997).

Ein Beispiel für die Entstehung von ROS durch zelluläre, oxidative Enzyme ist die Xanthin-Oxidase/Dehydrogenase (BARBER ET AL., 2006). Sie katalysiert die Endschritte des Purinkatabolismus. Die Oxidase-Isoform des Enzyms überträgt bei der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin die erhaltenen Elektronen auf  $O_2$  und bildet dadurch  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$  (HILLE UND NISHINO, 1995). Weitere Enzyme, die zur Bildung von Hyperoxid beitragen

können, sind die Aldehyd-Oxidase, Dihydroorotat-Dehydrogenase und verschiedene Flavin-Dehydrogenasen (BABIOR, 1978). Zur experimentellen Erzeugung erhöhter Hyperoxidsmengen *in vivo* kann man sich des Herbizids Paraquat bedienen. Der Elektronendonator Paraquat entzieht z.B. dem Photosystem I ein Elektron und wird dadurch zum Paraquat-Radikal. Dieses gibt sein überschüssiges  $e^-$  an ein  $O_2$ -Molekül ab, wodurch Hyperoxid entsteht.  $O_2^{\bullet-}$  kann spontan oder von SOD (Superoxid-Dismutase) katalysiert zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  dismutieren (BOVERIS UND CHANCE, 1973; HALLIWELL, 1992).  $H_2O_2$  ist selbst nur wenig reaktiv, kann aber in der sogenannten Fenton-Reaktion durch eine weitere Reduktion an freien, reduzierten Eisen- und Kupferionen ( $Fe^{2+}$  und  $Cu^{1+}$ ) zu Hydroxydionen ( $OH^\bullet$ ) und hochreaktivem  $OH^\bullet$  reduziert werden (KARIHTALA UND SOINI, 2007).



### Abbildung 1-8 Entstehung reaktiver oxigener Spezies

Das Paraquat-Radikal gibt sein überschüssiges  $e^-$  an ein  $O_2$ -Molekül ab, wodurch Hyperoxid entsteht, das chemisch sehr reaktiv und zerstörerisch auf ungesättigte Fettsäuren reagiert. SOD kann das Hyperoxid spontan zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  dismutieren.  $H_2O_2$  ist selbst nur wenig reaktiv, kann aber in der sogenannten Fenton-Reaktion durch eine weitere Reduktion an freien, reduzierten Eisen- oder Kupferionen ( $Fe^{2+}$  und  $Cu^{1+}$ ) zu hochreaktivem  $OH^\bullet$  reduziert werden, was wiederum eine starke Zelltoxizität aufweist.

Der durch freie Radikale verursachte oxidative Stress wird unter normalen physiologischen Bedingungen durch endogene Schutzmechanismen entschärft. Der Organismus verfügt hierfür über spezielle Schutzenzyme. Die Gruppe der Superoxid-Dismutasen (SOD) katalysiert die Dismutation von  $O_2^{\bullet-}$  zu  $H_2O_2$  und  $O_2$ . Für diese Reaktion gibt es keine alternativen

Enzyme. Zur Gruppe der SOD gehören die zytoplasmatische Kuper-Zink-SOD (CuZnSOD/SOD1), die mitochondriale Mangan-SOD (MnSOD/SOD2) sowie die Extrazelluläre SOD (ESOD/SOD3) (BARONDEAU ET AL., 2004; BORGSTAHL ET AL., 1992; MCCORD ET AL., 1988; KARIHTALA ET AL., 2007; TAINER ET AL., 1988).

Die schnelle Umwandlung von  $H_2O_2$  ist enorm wichtig, da dieses sonst mit reduzierten Metall-Ionen (u.a. Fe, Cu, Co, Ni) reagieren und es somit zur Bildung von hochtoxischen Hydroxylradikalen kommen kann. Eben diese Fenton-Reaktion ist für die größte Menge an zellulären Hydroxylradikalen verantwortlich (KARIHTALA UND SOINI, 2007). In der Zelle frei vorliegende Metalle werden zudem durch die Proteine Transferrin, Albumin, Lactoferrin und Ferritin gebunden, wodurch diese nicht mehr als Katalysatoren für die Fenton-Reaktion (siehe Abbildung 1-8) zur Verfügung stehen (HALLIWELL UND GUTTERIDGE, 1990; COZZI ET AL., 2000; ORINO UND WATANABE, 2007).

Das entstandene  $H_2O_2$  kann durch die Katalase, Glutathion-Peroxidase oder Peroxiredoxine zu Wasser umgewandelt und somit entsorgt werden. Katalasen, die hauptsächlich in Peroxisomen vorkommen, dismutieren  $2H_2O_2$  zu  $2H_2O$  und  $O_2$ . Die Enzyme werden in drei Gruppen aufgeteilt, je nachdem ob sie Häm-Gruppen enthalten oder Mangan-haltige Katalasen sind (CHELIKANI ET AL., 2004; BOON ET AL., 2007; LOEW 1900).

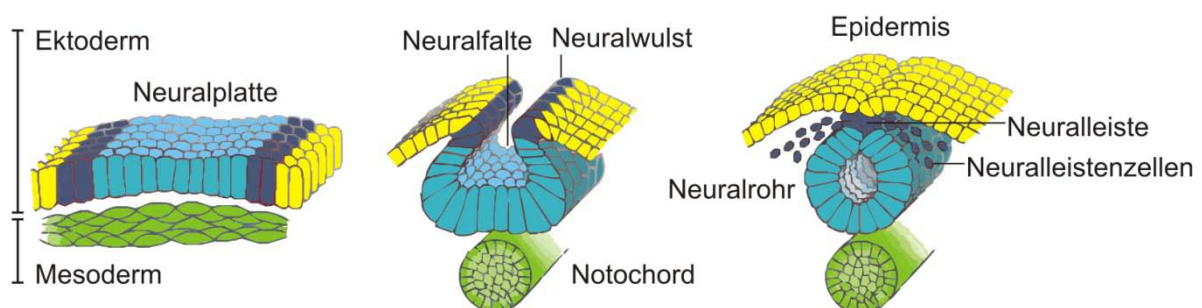
Glutathion-Peroxidasen (GPX) katalysieren die Reduktion von  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  bei gleichzeitiger Oxidation von monomerem Glutathion (GSH) zu dimerem Glutathion-Disulfid (GS-SG) (MULLER ET AL., 2007; RAN ET AL., 2007; MILLS ET AL., 1957). Peroxiredoxine (Prxs), auch Thioredoxin-Peroxidasen genannt, reduzieren  $H_2O_2$  unter Oxidation eines im Reaktionszentrum liegenden Cysteins (RHEE ET AL., 2005; CLAIBORNE ET AL., 1999).

Nichtenzymatische Komponenten mit antioxidativem Charakter sind Vitamin E und C, Karotine, Glutathion, Harnsäure, Taurin und Flavonoide. Entweder dienen diese Stoffe als Kofaktoren für die oben genannten Enzyme oder sie interagieren direkt mit den ROS (SARDESAI, 1995; CALABRESE UND CANADA, 1989; BRIGELIUS-FLOHE, 1999; DROGE, 2002; FREITAS ET AL., 2002; KARIHTALA UND SOINI, 2007). Ein Beispiel für die direkte Interaktion ist Vitamin C, welches unter Reduktion der freien Radikalen zu Dehydroascorbinsäure oxidiert wird (STRYER ET AL., 2003).

## 1.10 Entwicklung des Nervensystems in Säugetieren am Beispiel von Maus und Ratte

Die Gastrulation (von griech.: *gaster*, Magen) beginnt, wenn der Embryo aus etwa 1000 Zellen besteht. In ihrem Verlauf werden drei Zellschichten gebildet. Die durch Einstülpung entstandene innere Auskleidung der primären Leibeshöhle ist das Entoderm, aus dem später der Verdauungstrakt entsteht. Darüber liegt das Mesoderm, von dem sich das Blutgefäßsystem, das Skelett, die Exkretionsorgane, wie die Niere, das Gonadensoma und die Muskeln ableitet. Die abschließende Schicht, das Ektoderm, bildet alle Epidermiszellen und ihre Derivate aus. Der axiale Bereich des Ektoderms, das Neuroektoderm, bildet das Nervensystem.

Das Neuroektoderm entsteht im Zuge der neuralen Induktion, bei der das Mesoderm mit Hilfe molekularer Signale in Wechselwirkung mit dem Ektoderm tritt. In jenen Zellen des Ektoderms, die von den molekularen Signalen erreicht werden, wird eine neurale Determinierung ausgelöst. Bei der Embryonalentwicklung der Maus bildet sich aus dem Neuroektoderm am Embryonaltag 8 die Neuralplatte (BUSE ET AL., 1991). Die Krümmung der Neuralfalte wird im Zuge der Determinierung verstärkt, bis die Neuralwülste Kontakt miteinander aufnehmen, zur Neuralleiste fusionieren und abgeschnürt werden.



### Abbildung 1-9 Die Primäre Neurulation

Zu Beginn der Neurulation wölbt sich die Neuralplatte ein. Durch die Invagination entsteht die Neuralfalte mit den beiden Neuralwülsten (dunkelblau). Im Zuge stärkerer Einfaltung berühren sich die gegenüberliegenden Neuralwülste und verschmelzen zur Neuralleiste. Die Epidermis schließt sich darüber. Die Neuralfalte bildet das Neuralrohr, aus dem das zentrale Nervensystem (ZNS) entsteht. In der Folgezeit wandern die Zellen der Neuralleiste ab, aus ihnen entsteht das periphere Nervensystem (PNS). Gut zu erkennen ist, dass sowohl die Epidermis (gelb), wie auch alle neuronalen Zellen (blau), aus der gleichen Zellschicht, dem Ektoderm, entstehen. Das unter dem Neuralrohr gelegene Notochord (Chorda dorsalis) wird vom Mesoderm gebildet. Verändert nach 2006 ELSEVIER, INC.

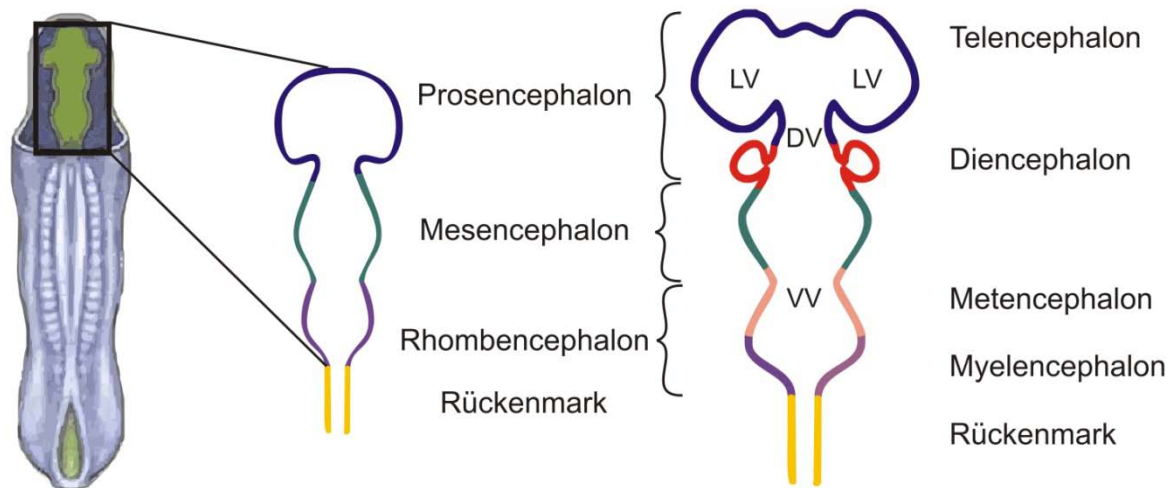
Die Neuralfalte bildet nun das Neuralrohr. Bis zum Embryonaltag 9,5 ist dieser Vorgang abgeschlossen. Die Neuralleistenzellen wandern aus und bilden das periphere Nervensystem (PNS). Sie sind Vorläuferzellen verschiedener Komponenten des Nervensystems, wie z.B. die sensorischen Ganglien der spinalen und cranialen Nerven, wie auch der Schwannschen Zellen, Neuroglia, die im peripheren Nervensystem die Nerven umschließen und die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung erhöhen (RICE ET AL., 2000).

Das Neuralrohr hingegen bildet in der weiteren Entwicklung das zentrale Nervensystem (ZNS) aus.

Entlang der anterior-posterior Achse gliedert sich das Neuralrohr früh in vier Bereiche auf.

Anterior entsteht das Prosencephalon, das Vorderhirn, während sich der posteriore Teil in das Mesencephalon, das Mittelhirn und das Rhombencephalon, das Rautenhirn, unterteilt, welches in das Rückenmark ausläuft (KAUFMAN ET AL., 1999).

In der weiteren Entwicklung untergliedert sich das Prosencephalon in das embryonale Telencephalon (Endhirn), das die Anlagen des cerebralen Kortex, des Hippocampus und der Basalganglien enthält, und das embryonale Diencephalon (Zwischenhirn), das die Anlagen des Thalamus und Hypothalamus enthält. An das Mesencephalon (Mittelhirn) schließen sich die vom Rhombencephalon abstammenden Gehirnteile Metencephalon (Hinterhirn) und Myelencephalon (Nachhirn) an.

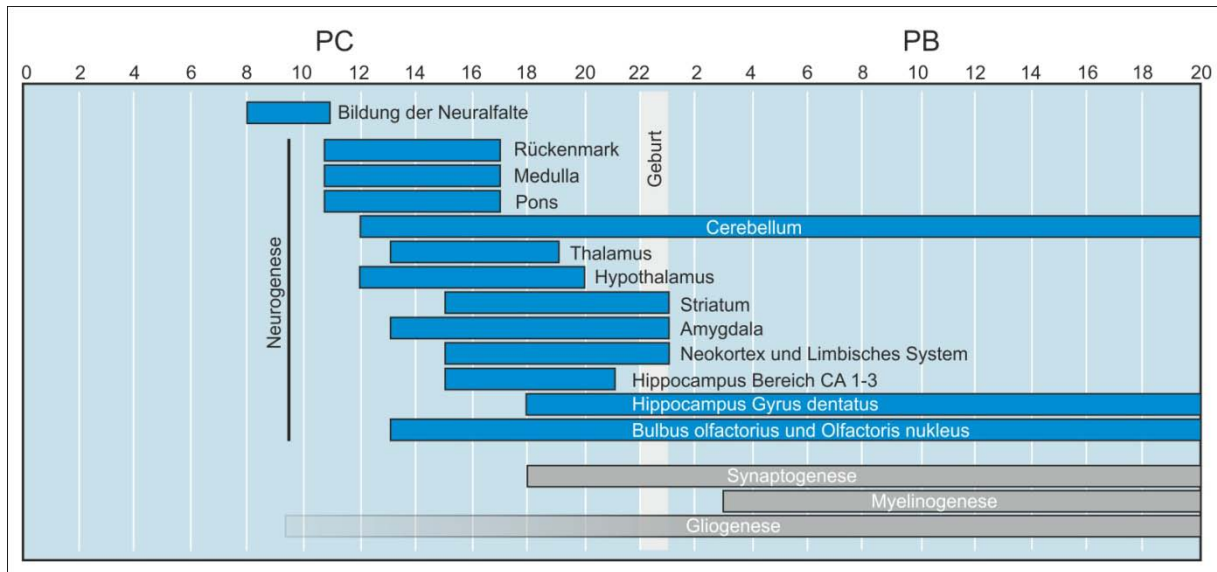


**Abbildung 1-10 Die Entstehung der Hirnregionen**

Das Gehirn entsteht am rostralen Pol des Embryos. Anfangs ist die Struktur mit drei Bläschen zu vergleichen, dem Prosencephalon (Vorderhirn), dem Mesencephalon (Mittelhirn) und dem Rhombencephalon (Rautenhirn), das in das Rückenmark ausläuft. Später entstehen aus dem Prosencephalon das Telencephalon (Endhirn), in dessen Hohlraum die beiden Lateralventrikel (LV) liegen und das Diencephalon (Zwischenhirn), in dem der Dritte Ventrikel (DV) lokalisiert ist. Das Rhombencephalon gliedert sich auf in das Metencephalon (Hinterhirn) mit dem Vierten Ventrikel (VV) und das Myelencephalon (Nachhirn). Verändert nach PURVES ET AL., 1997.

Der sich posterior davon erstreckende Teil des Neuralrohres bildet das Rückenmark (PURVES ET AL., 1997). Die weitere Hirnentwicklung wird in Abbildung 1-11 beispielhaft an der Entwicklung der Ratte dargestellt. Die Zeit von der Befruchtung bis zur Geburt dauert bei der Ratte 21-22 Tage (bei der Maus 20-21 Tage). Die Ausbildung der Neuralfalte beginnt bei der Ratte mit dem Tag 8 und ist bis Tag 11 abgeschlossen (PURVES ET AL., 1997).

Vor Beginn der Neurogenese beginnt um Tag neun die Gliogenese, die über die gesamte Zeit der Neurogenese fortläuft. Hierbei werden Gliazellen aus Glioblasten in der Keimzone des ZNS gebildet. Glioblasten und Neuroblasten entstammen beide dem Neuroektoderm. Die erste Generation von Gliazellen stellen die Radialgliazellen dar. Sie bilden ab PC15 (*Post Conception*) mit ihren Fortsätzen Leitschienen, entlang derer die neu gebildeten Neurone und Gliazellen in ihr Zielgebiet wandern. Hierbei verläuft ein kurzer Fortsatz vom Zellkörper zum Ventrikelrand, während der andere, längere Fortsatz zur pialen Oberfläche zieht (RAKIC, 1972; MISSON ET AL., 1988). Erst Postnatal, am Ende der zweiten Woche bildet sich das Gerüst der Radialgliazellen zurück und diese wandeln sich zu multipolaren Astrozyten um (LEVINE UND GOLDMAN; 1988; ZERLIN ET AL., 1995; Götz und Huttner, 2005). Die Initiation der Neurogenese im sich entwickelnden Hirn findet von caudal nach rostral statt. Es beginnt mit dem Rückenmark und den Teilen des Hinterhirns, wie dem Myelencephalon und dem Metencephalon, das aus der Pons, einem Teil des späteren Stammhirns und Cerebellum, das für die spätere Motorik und das Erlernen von Bewegungsabläufen verantwortlich ist, besteht. Erst danach folgen das Mesencephalon und das Diencephalon mit dem Thalamus und dem Hypothalamus. Der Hypothalamus, der im Bereich des zukünftigen Zwischenhirns liegt, ist erstmals am Tag PC12,5 sichtbar. Er entsteht durch die Aufspaltung des Diencephalons in den Hypothalamus, den Epithalamus und den Thalamus, der den größten Teil des Zwischenhirns bildet und eine starke Verbindung zur Großhirnrinde (Kortex) aufweist (KAUFMAN ET AL., 1999). An den Tagen PC14-15 kommt es zum Einwachsen der Axone in die *Eminentia mediana* (E.m.), sie gilt als wichtigste Nahtstelle zwischen dem Nerven- und Hormonsystem. Morphologisch sind der Hypothalamus und die E.m. in der dritten postnatalen Woche komplett (FISHER ET AL., 1976). Das Telencephalon ist in der Entwicklung die letzte der Hirnregionen, die ausgebildet wird. Es umfasst die cerebralen Strukturen wie Basalganglien, die Amygdala, die für Angst und Einschätzung von Situationen benötigt wird und den cerebralen Kortex. Er enthält den Neokortex, das limbische System, die hippocampalen Regionen sowie den Riechkolben (*bulbus olfactorius*). Am Tag PC15 beginnt die Bildung des Neokortex, des stammesgeschichtlich jüngsten Teils des Kortex.



### Abbildung 1-11 Die Hirnentwicklung der Ratte im zeitlichen Verlauf

Dargestellt ist der Zeitraum vom Tag der Befruchtung (PC0) bis zum Tag 20 nach der Geburt (PB20). Die Neurogenese beginnt nach der Bildung der Neuralfalte mit dem Rückenmark, der Medulla und der Pons. Die Ausbildung des Cerebellums, des Bulbus olfactorius und Teilen des Hippocampus dauern bis weit in das jugendliche Stadium hinein. Die Gliogenese beginnt zeitgleich zur Neurogenese, doch sind zu Beginn lediglich Radialgliazellen vorhanden. Der exponentielle Zuwachs von Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen findet hauptsächlich zwischen PC17 und PB7 statt. Verändert nach BAYER ET AL., 1993.

Ihm gegenüber stehen ältere Hirnareale wie z.B. der Hippocampus, der zum Bereich des Archikortex gezählt wird, dessen Bereiche 1-3 des Ammonshorns in der Neurogenese zeitgleich angelegt werden. Der *Gyrus dentatus* des Hippocampus folgt drei Tage später.

Die Neurogenese im Cerebellum, im *Gyrus dentatus* des Hippocampus sowie im *Bulbus olfactorius* erstreckt sich weit in die Zeit nach der Geburt, partiell bis zum adulten Tier (GOULD ET AL., 1999; KORNACK ET AL., 2001)

Die Migration der Neuronen findet schon während der Neurogenese entlang der Radialgliazellen statt und ist jeweils nach wenigen Tagen beendet. Der Prozess der Differenzierung startet dagegen erst nach einer kurzen Ruhephase (BAYER ET AL., 1993).

Ab PC17 werden in der Subventrikularzone (SVZ) Astrozyten gebildet. Der größte exponentielle Zuwachs findet hierbei postnatal bis zum Ende der ersten Woche statt. Nach dem Auswandern aus der SVZ bilden sie nach ihrer Ausdifferenzierung das Zellgerüst der Grauen Substanz (SKOFF, 1990; GRESSENS ET AL., 1992; LEVISON ET AL., 1993).

Die Synaptogenese, die für die Verschaltung der Neuronen und deren Aktivität Voraussetzung ist, beginnt ab dem Tag PC18 im Bereich des Mittelhirns, in der *Substantia nigra*. Der größte Anteil der Synapsen wird erst nach der Geburt ausgebildet (LAUDER ET AL., 1975; SUTOR ET AL., 1995; SWANN ET AL., 1990). Die Myelinogenese startet bei der Ratte erst nach der Geburt und dauert wie die Synaptogenese und Gliogenese bis weit in das

Jungadult-Stadium hinein. Gliazellen behalten auch nach der Ausdifferenzierung ihre Teilungsfähigkeit und proliferieren nach Erreichen ihrer Zielgebiete weiter. Die Folge ist eine starke postnatale Zellvermehrung (SKOFF ET AL., 1994; ZERLIN UND GOLDMAN, 1997). In spezifischen Regionen des ZNS, wie der ventrikulären Subependymalzone und der subgranulären Zone des Hippocampus verbleiben spezifische Astroglia auch im postnatalen und adulten Hirn als sich langsam teilende neuronale Stammzellen (Alvarez-Buylla et al., 2001; DOETSCH, 2003; DOETSCH ET AL., 1999; SERI ET AL., 2001; SERI ET AL., 2004)

Verglichen mit der neuronalen Entwicklung eines menschlichen Fötus kommt die Ratte verfrüht auf die Welt. Stellt man die neunmonatige Entwicklungszeit des menschlichen Fötus dem der Ratte gegenüber, so verlängert sich dieser Zeitraum bis zur dritten Woche nach der Geburt (BAYER ET AL., 1993).

## 1.11 Krebs und Tumorgenese

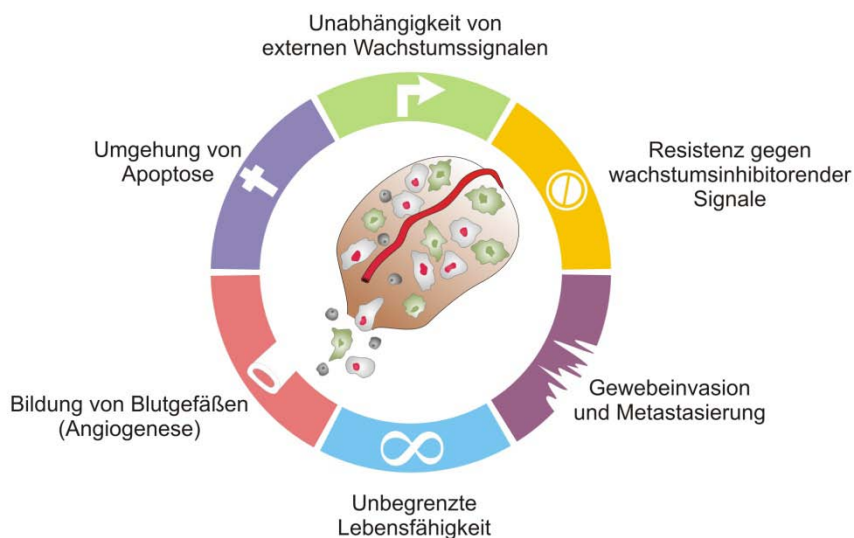
Ein Gewebe besteht aus einem Zellverband differenzierter Zellen, die mit ähnlichen Eigenschaften eine gemeinsame Funktion erfüllen. Hierbei sind die Proliferation und der Metabolismus der einzelnen Zellen meist auf ihre benachbarten Zellen gleichen Zelltyps abgestimmt. Teilt sich eine einzelne Zelle ungehemmt weiter und unterliegt sie nicht mehr den Regeln des sie umgebenden Gewebes, so spricht man bei dem entstehenden Zellklumpen von einem Tumor. Bleiben diese in ihrer Zahl wachsenden entarteten Zellen in einem kompakten Zellverband an ihrem Ursprungsort, so ist es ein benigner Tumor. Dieser kann meist, wenn er bei der Entdeckung noch keinen mechanischen Schaden verursacht hat, komplett entfernt und der Patient geheilt werden.

Beginnt dieser Zellverband Zellen zu streuen, die nun im ganzen Körper neue Tumore bilden können, so handelt es sich um einen malignen Tumor (Krebs). Diese Zellen verfügen nicht nur über eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit, sie verändern auch ihre Zelloberfläche und extrazelluläre Matrix, sodass sie sich von ihren Nachbarzellen lösen, sich vom Primärtumor trennen und in andere Gewebe eindringen können. Bei den dort entstehenden Sekundärtumoren handelt es sich um Metastasen, die meist schwer zu lokalisieren sind und nur noch durch energiereiche Strahlung oder durch chemische Behandlung (Chemotherapie) einzudämmen sind. Bei den chemischen Substanzen handelt es sich meist um starke, zellteilungshemmende Wirkstoffe, deren Wirkung mit einer großen Schädigung des umliegenden Gewebes einhergeht.

Krebs kann ohne äußeren Einfluss spontan entstehen, aber auch durch chemische, physikalische und biologische Umwelteinflüsse induziert werden. Nach heutigem Wissen wird die maligne Transformation vor allem durch Punktmutationen in den Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen ausgelöst (WEINBERG, 1996). Die meisten Protoonkogen-kodierten Proteine spielen wichtige Rollen in der Signaltransduktion, der Wachstumskontrolle und dem Zellzyklus normaler Zellen. Eine Mutation in diesen Genen führt zur Entstehung von Onkogenen. Onkogene kodieren Proteine, die für den Verlust der Wachstumskontrolle und die Umwandlung normaler Zellen in maligne Zellen verantwortlich sind. Die Transformation einer normalen Zelle in eine Krebszelle ist häufig zusätzlich noch mit dem Funktionsverlust einer oder mehrerer Tumor-Suppressorgene verbunden. Tumor-Suppressorgene kodieren für Proteine, die das Zellwachstum einschränken und verhindern, dass die Zelle in einen malignen Zustand übergeht. Zu dieser Gruppe gehören Transkriptionsfaktoren und Regulatoren des Zellzyklus und der Signalwege.

Die von humanen Tumorarten schrittweise durch Mutationen erworbenen Eigenschaften werden in Abbildung 1-12 zusammengefasst. Charakteristisch für den Prozess der Transformation ist die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation bzw. die verminderte Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen. Keine normale Zelle kann in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren proliferieren. Eine Krebszelle aber ist weitestgehend autark in Bezug auf exogene Stimuli. Auch Apoptose, induziert durch interne als auch durch externe Signale, wird in einer transformierten Zelle unterbunden. Die Apoptose verhindert unter anderem, dass Zellen mit einem irreparablen genetischen Schaden weiterhin proliferieren. Wird dieser programmierte Zelltod nun unterbunden, teilen sich die malignen Zellen ungehemmt weiter. Die Folge ist eine lokale Sauerstoff-Unterversorgung des Gewebes. In soliden Tumoren existieren heterogen verteilte Regionen, in denen der  $O_2$ -Partialdruck chronisch an null heranreicht, wobei sie in direkter Nachbarschaft zu normal versorgtem Gewebe vorkommen (HÖCKEL AND VAUPEL, 2001).

Ein Weg proliferierender Krebszellen, die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten, ist die Angiogenese. Dieser Vorgang ist sehr wichtig, um die anwachsenden Zellmassen zu versorgen.



**Abbildung 1-12 Modell zur Tumorgenese**

Verändert nach HANAHAH UND WEINBERG, 2000

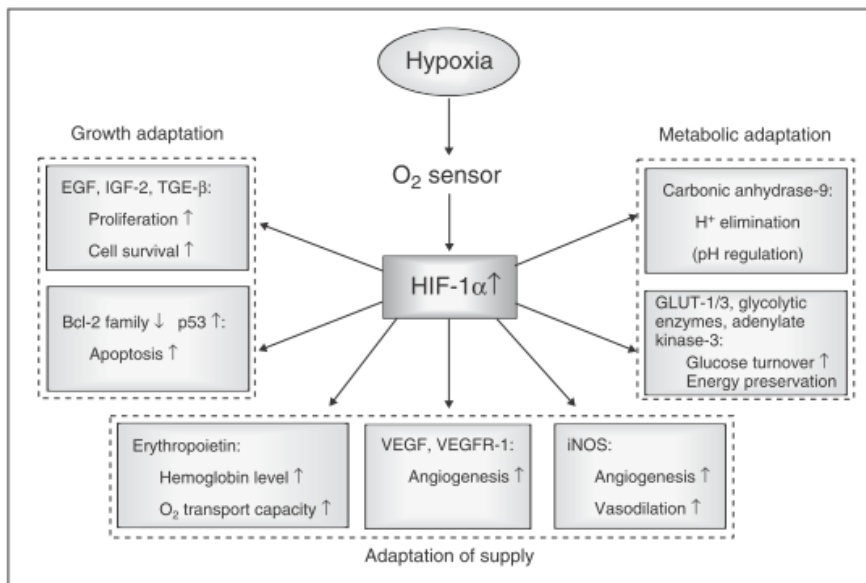
Dabei ist 1953 erstmals beschrieben worden, dass die Sauerstoffversorgung des Gewebes auch Auswirkungen auf den Erfolg einer Bestrahlungstherapie hat (GRAY ET AL., 1953). Hierbei hat eine  $O_2$ -Unterversorgung nicht nur negative Auswirkungen auf weitere Therapien, zum Beispiel mit Zytostatika, wie Cyclophosphamid und Carboplatin (TEICHER ET

AL, 1990; LITTLEWOOD ET AL., 2001). Sie spielt auch eine ausschlaggebende Rolle in der Ausbildung der Malignität (VAUPEL ET AL., 1991; HÖCKEL ET AL., 1991). Mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode kann über den  $pO_2$ -Wert einer Tumorzelle eine Charakterisierung der Tumorphoxie und eine Einschätzung der klinischen Relevanz vorgenommen werden. Hierbei gelten Regionen mit  $pO_2$ -Werten unter 2,5mmHg in menschlichen soliden Tumoren als hypoxisch und maligne, wobei in gesundem Gewebe die kritische Grenze des Sauerstoffpartialdrucks mit 45-50mmHg angegeben wird (VAUPEL ET AL., 2001; HÖCKEL AND VAUPEL, 2001). Untersuchungen der Gewebeoxygenierung in Korrelation zu ihrem Hämoglobinwert an Patienten mit Plattenepithelkarzinomen und Kopf-Hals-Tumoren zeigten, daß Tumorgewebe bei starker Anämie ( $<11\text{g/dl Hb}$ ) anfällig für Hypoxie ist. Der  $pO_2$ -Wert lag bei milder Anämie bzw. gesundem Gewebe bei 13-15mmHg, während stark anämische Bereiche nur einen  $pO_2$ -Wert von 5mmHg aufwiesen. Zum Vergleich gemessenes Muskelgewebe zeigte keine Schwankungen im  $pO_2$ -Wert. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die schwache Vaskularisierung in malignem Tumorgewebe den  $O_2$ -Mangel nicht durch verminderten, vaskulären Widerstand und dadurch erhöhten Blutfluß kompensieren kann (BECKER ET AL., 2000; VAUPEL ET AL., 2003).

Hypoxie kann sich auf Tumorgewebe in zwei Art und Weisen auswirken. Der  $O_2$ -Mangel kann zu unkontrolliertem Wachstum oder aber zur Verlangsamung der Proliferation bzw. zur Apoptose und Nekrose führen. Der Mangel kann aber auch als Faktor für hypoxieinduzierte Veränderungen am Proteom und Genom dienen, der zur Ausbildung einer malignen Progression und erhöhten Resistenz gegen Bestrahlungs- und Chemotherapien führt (HÖCKEL ET AL., 2001; VAUPEL ET AL., 2001). Schon Hypoxiephasen von 6-8h können zu abweichender Genexpression sowie posttranskriptionellen und posttranslationalen Veränderungen im Tumorzellproteom führen (VAUPEL ET AL., 2002; HÖCKEL ET AL., 2001; HÖCKEL AND VAUPEL, 2001). Hypoxie kann auch das Verharren des Zellzyklus am G1/S Punkt bewirken. Hierfür wird eine durch HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Aktivierung der Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 verantwortlich gemacht (GODA ET AL., 2003). Dieser Weg ist unabhängig von p53, das sich unter Hypoxie anreichert und seinerseits eine Apoptoseinduktion über Apaf-1 und die Kaspase-9 einleitet (SOENGAS ET AL., 1999). Auch p53-unabhängig kann Apoptose von Mitgliedern der BLC-2-Protein-Familie vermittelt werden. Diese unterschiedlichen Auswirkungen sind ein Grund für Beobachtungen wie späteres Wiederauftreten des Tumors, schlummernde Mikrometastasen und reduziertes Wachstum in großen Tumoren (PREHN ET AL., 1991; DEMICHELI ET AL., 1994; HOLMGREN ET AL., 1995).

Zusätzlich kann Hypoxie auch zur Ausbreitung des Tumors über Anpassung an verminderte Ernährung, erhöhter Proliferation, lokaler Invasion oder auch Metastasenbildung beitragen.

Ein Schlüssel ist hierbei der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$ , dessen Konzentration mit sinkendem pO<sub>2</sub> in der Zelle ansteigt (VAUPEL ET AL., 2002; HÖCKEL AND VAUPEL, 2001). Der Transkriptionsfaktor aktiviert weit über 30 Gene, die zum Teil direkt in die O<sub>2</sub>-Versorgung involviert sind. So steigert Erythropoitin die Erythrozytenbildung, VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) führt zur Angiogenese, was besonders wichtig vor dem Hintergrund erscheint, dass ein Tumor jenseits einem Millimeter Durchmesser, nicht ohne ausreichende Blutversorgung weiterwachsen kann (FOLKMAN, 1995). Weitere regulatorische Wirkungen von HIF-1 $\alpha$  sind in Abbildung 1-13 dargestellt.



**Abbildung 1-13 HIF-1 $\alpha$  bei der hypoxieinduzierten Tumorprogression.**

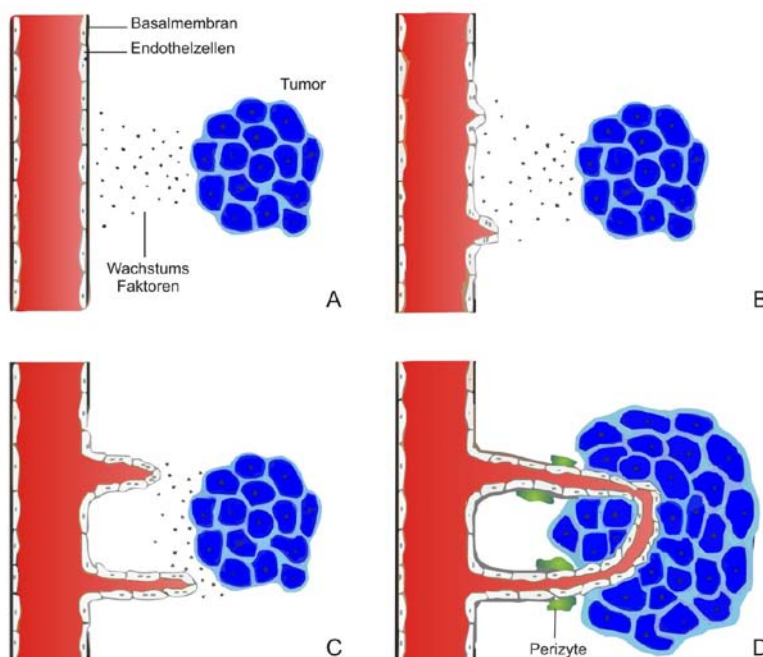
Die von HIF-1 $\alpha$  regulierten Genprodukte spielen eine ausschlaggebende Rolle in der Tumorentwicklung, seiner Aggressivität und metabolischen Anpassung und tragen wohl auch zur Therapieresistenz hypoxischer Tumore bei. EGF: Epidermal growth factor; GLUT: Glukose Transporter; IGF-2: Insulin-like growth factor-2; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; TGE- $\beta$ : Transforming growth factor-beta; VEGFR-1: VEGF Rezeptor. VEGF (VAUPEL ET AL. 2002)

In normal mit Sauerstoff versorgtem Gewebe wird ein Glukosemolekül über die Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt, was dann über den Citratzyklus zu einer Energieausbeute von bis zu 32 ATP aus der Atmungskette per oxidativer Phosphorylierung führt. Hat eine Zelle keinen ausreichenden Sauerstoff zur Verfügung, kommen sowohl Atmungskette als auch Citratzyklus schnell zum Erliegen. Die Energiegewinnung läuft nur noch anaerob durch die Glykolyse ab. Diese kann nur durch die Oxidierung der entstandenen Reduktionsäquivalente in Form von NADH+H<sup>+</sup> aufrechterhalten werden. Dies geschieht durch die Vergärung des Pyruvats zu Laktat. Viele Tumore stellen ihren Stoffwechsel generell auf anaerobe Gärung um, sogar wenn genügend O<sub>2</sub> verfügbar ist und obgleich die Energieausbeute bei nur 2 ATP aus einem Molekül Glukose liegt. Dieses Phänomen der „anaeroben Glykolyse“, bzw.

Warburg-Effekt, wird als eine Folge maligner Transformation in Verbindung mit onkogenen Veränderungen angesehen (WARBURG ET AL., 1924, DANG, 2007, DEBERARDINIS, 2008). Hier könnte Ngb unter anaeroben Bedingungen durch seine Fähigkeit, NADH zu NAD<sup>+</sup> zu regenerieren, die intrazelluläre ATP-Produktion durch den Glykolysestoffwechsel unterstützen (BURMESTER ET AL., 2004). WALENTA UND MUELLER-KLIESER konnten zeigen, dass die Laktatproduktion eines Tumors direkt mit seiner Malignität korreliert, wobei Tumore mit hohen Laktatkonzentrationen, verglichen mit Tumoren mit niedrigeren Laktatkonzentrationen, einen höheren Malignitätsgrad und eine höhere Aggressivität aufweisen (WALENTA UND MUELLER-KLIESER, 2004). Hierbei kann Laktat auch die antionkogenen Aktivitäten dendritischer Zellen und T-Zellen inhibieren und mit der Immunabwehr interagieren (GOTTFRIED ET AL.; 2006; FISCHER ET AL., 2007). QUENNET konnte *in vitro* nachweisen, dass Tumore mit hohen Laktatkonzentrationen eine signifikant höhere Resistenz gegen Bestrahlungen zeigten, unabhängig von deren Oxygenierungszustand (QUENNET ET AL., 2006). Ionisierende Strahlung und die meisten chemotherapeutischen Wirkstoffe induzieren über die Entwicklung von ROS (*Reactive Oxygen Species*) DNA-Schäden. Pyruvat und andere Zwischenprodukte der Glykolyse können ROS detoxifizieren, wobei Pyruvat nicht nur als Antioxidanz agieren kann, sondern auch zelluläre antioxidative Mechanismen wie die Erhöhung des Glutathion/Glutathiondisulfid-Verhältnisses beeinflussen kann (BRAND 1997, LIN ET AL. 2003). Über Decarboxylierung kann Pyruvat durch den Verbrauch von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Acetat umgesetzt werden (SALAHUDEEN ET AL. 1991). Hierbei wird das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Zelle neutralisiert und damit eine Fenton-Reaktion verhindert, die zur Bildung von Hydroxylradikalen führt, die wiederum oxidativen Schaden an DNA, Lipiden und Proteinen auslösen können (SATTLER ET AL., 2009). Eine weitere, den Redoxstatus der Zelle beeinflussende Reaktion von Pyruvat ist die kompetitive Bindung an die Alpha-Ketoglutarat-Bindestelle der Prolyl-Hydroxylase 2. Dieses Enzym hydroxyliert unter normoxischen Bedingungen die Prolylreste 402 und 564 der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit, wodurch diese mit Hilfe des Proteins von-Hippel-Lindau (pVHL) der proteasomalen Degradation durch ein 28S-Proteasom zugeführt werden. Somit hat die Pyruvat-Bindung einen direkten stabilisierenden Einfluß auf HIF-1 $\alpha$  (PUGH UND RATCLIFFE, 2003; LU ET AL., 2002; SONVEAUX ET AL., 2008). So kann Pyruvat nicht nur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entgiften, sondern auch HIF-1 $\alpha$  stabilisieren und Therapieresistenz und maligne Progression beeinflussen. Laktat ist bei der Entschärfung von ROS weniger effektiv als Pyruvat, doch ist das Potential für die Detoxifizierung von Superoxid und Hydroxylradikalen nachgewiesen worden (GROSSARD ET AL., 2000). Die geringere Wirkung des einzelnen Moleküls wird durch Konzentrationen innerhalb der Zellen von 30-

40mM kompensiert, wobei die Konzentration von Pyruvat nur im Bereich von 0,2-2,0mM liegt (ROSLIN ET AL. 2003; SATTLER ET AL. 2009; TABATABAEI ET AL. 2008).

Zur Steigerung der Sauerstoffversorgung vermag der unkontrolliert wachsende maligne Tumor auch neue Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen zu bilden (Angiogenese, Neovaskularisierung) (FOLKMAN ET AL., 1971, FOLKMAN 1995). Hierbei schüttet der Tumor angiogeneseauslösende Wachstumsfaktoren wie VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) aus. Diese führen zur Aktivierung der Endothelzellen der Blutgefäße. Proteinase wie die Kollagenase führen zur Auflösung der Basalmembran. Plasminogenaktivator senkt lokal die Blutgerinnung. Die Endothelzellen beginnen mit der Migration und Proliferation in die Richtung des angiogenen Stimulus. Die Extrazelluläre Matrix wird von umgebenden Matrix-Metalloproteinasen den neuen Zellen angepasst und unreife Blutgefäße werden von einer neuen Basalmembran ausgekleidet. Haben die Kapillaren den Tumor erreicht, verschmelzen die Enden. Diese Anastomose schließt den Kreislauf. In der Regel stellt die ausreichende Versorgung des Tumors mit Sauerstoff einen direkten Stimulus zu verstärktem Wachstum dar (GIANNIS UND RÜBSAM, 1997; JAIN ET AL., 1997).



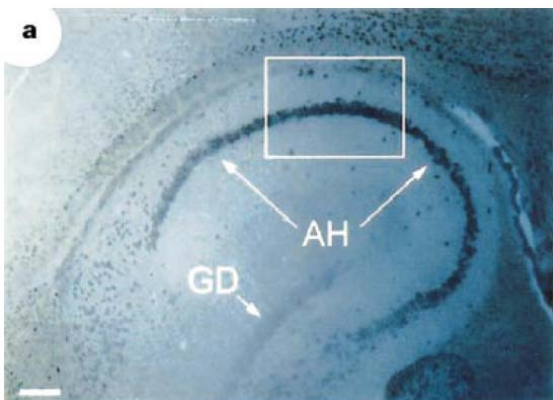
**Abbildung 1-14 Der Prozess der Angiogenese in Tumorgewebe.**

Wachstumsfaktoren aktivieren die Endothelzellen (A), Proteinase degradieren die Basalmembran des Blutgefäßes (B), Migration und Proliferation der Endothelzellen in Richtung des Angiogenese-Stimulus. Matrix-Metalloproteinase bilden eine neue extrazelluläre Matrix (C), Bildung einer neuen Basalmembran um die unvollständigen Blutgefäße und Verschmelzen der Enden, um den Blutkreislauf zu schließen (D). Die Vaskularisierung stellt wieder einen Wachstumsstimulus für den Tumor dar. Die Perizyten stützen die Kapillaren und regeln den Durchfluß. Verändert nach WERNERT ET AL., 1999.

## 1.12 Zielsetzung der Arbeit

Im Vorfeld dieser Arbeit war nichts über den Zeitpunkt bekannt, wann Neuroglobin und Cytoglobin erstmals in der Entwicklung des Säugergehirns auftreten. Zu klären war dabei, ab wann die Globine erstmals nachweisbar sind. Als frühester Zeitpunkt einer Untersuchung sollte hier der Fötaltag 10 dienen, um eine ausreichende Gewebemenge bei der Präparation zu erhalten. Von diesem Zeitpunkt an sollte der Verlauf der mRNA- und Protein-Expression quantifiziert werden. Dahinter stand die Frage, ob die Globinmenge über die Entwicklung zu bzw. abnimmt oder gar mit entwicklungspezifischen Begebenheiten korreliert ist. Ein wichtiger Zeitpunkt in der Entwicklung ist der Moment der Geburt. Wie unter 1.1 beschrieben, weisen neugeborene Säuger eine signifikante Hypoxietoleranz auf. Eines der beiden Globine könnte in diesem Fall einen O<sub>2</sub>-Speicher darstellen und so für eine überbrückende Versorgung der Neurone im Hirn der Neugeborenen sorgen. Wenn es zu diesem Zeitpunkt zu einer verstärkten Proteinexpression kommt, dann ist auch zu untersuchen, wie sich die Expression in der Folgezeit nach der Geburt mit zunehmender Entwicklung verhält.

Nur wenige Informationen gab es über die Funktion und das räumliche Expressionsmuster von Neuroglobin und Cytoglobin vor. Als erstes galt es, die Zellen zu klassifizieren, welche NGB und CyGB exprimieren. *In situ* Hybridisierungen aus der ersten Veröffentlichung zu NGB (BURMESTER ET AL., 2000) zeigten vor allem einen starken NGB mRNA-Nachweis in der CA2-CA3 Region des Hippocampus (Cornu ammonis) der adulten Maus (Abbildung 1-15).



**Abbildung 1-15 NGB mRNA in Situ Färbung**

Die Abbildung aus BURMESTER ET AL., 2000 zeigt erstmals einen NGB mRNA *in situ*-Nachweis im Säugerhirn (Maus). Deutlich ist die stark ausgeprägte Färbung in der Hippocampusregion CA2-CA3 des Ammonshorn zu erkennen.

Es sollte daher eine Primärkultur hippocampaler Rattenföten Tag 17/18 angelegt werden. In diesem Wachstumsstadium sind die Nervenzellen noch ausreichend flexibel, um nach dem Dissoziieren erneut Neurite zu bilden, eine Fähigkeit, die mit zunehmendem Alter verloren

geht (ALKONDON ET AL., 1994). Auf den kultivierten Primärkulturen sollte zum einen ein Nachweis von Ngb und Cygb auf Proteinebene stattfinden und erstmals geklärt werden, ob sich die Proteinexpression auf die Neurone beschränkt oder ob auch die sie umgebenden Gliazellen Neuro- und Cytoglobin exprimieren.

Als Ergänzung sollten Standardzelllinien auf ihre Expression der Globine untersucht werden. Die Linien GAMG und DKMG stammen von Glioblastomen und sind somit glialen aber auch neuroektodermalen Ursprungs. Die von einem Phäochromozytom der Nebennierenrinde abstammende Zelllinie PC-12 wurde gewählt, da diese Zellen durch Gabe von NGF (*neuronal growth factor*) stimuliert werden können, neuritenähnliche Ausläufer zu bilden. Die beiden Zelllinien N2a und SH-SY5Y sind neuroblastomalen Ursprungs und somit die einzigen rein neuronalen Zellen.

Weiterhin ergab sich die Frage nach der intrazellulären Lokalisation der Globine. Hierzu sollte eine Fusionsexpression der Globine mit eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) in Zellkultur zeigen, ob Neuro- und Cytoglobin an distinkten Zellorganellen wie den Mitochondrien verstärkt auftreten, was z.B. für eine Funktion als O<sub>2</sub>-Lieferant sprechen würde. Für diesen Test sollten die CDS-Regionen beider Globine sowohl N- als auch C-terminal mit eGFP fusioniert werden. Die entsprechenden Fusions-Konstrukte in den Vektoren pEGFP-N1/C1 sollten in drei verschiedenen eukaryotischen Zelllinien (HeLa, Vero, N2a) transfiziert werden. Die Lokalisation der Globine in der Zelle sollte anhand der GFP-Fluoreszenz detektiert werden.

Als Proteine mit der Fähigkeit O<sub>2</sub> binden zu können, stellte sich die Frage, ob die Expression beider Globine im Gewebe verändert wird, sobald diese unter oxidativem Stress leiden. Sauerstoff hat durch die auftretenden *Reactive Oxygen Species* (ROS) starken Einfluss auf den Organismus. Auch für den Schutz der Neuronen vor Sauerstoffradikalen könnten die Globine potentielle Kandidaten darstellen. Um dies zu klären sollten Primärkulturen vom Kortex der Ratte und vom Cerebellum der Maus mit dem Kontaktherbizids Paraquat behandelt und per qRT-PCR die Genexpression quantifiziert werden. Weiter sollte die gemessene mRNA-Expression mit der von den bekannten Antioxidanz-Enzymen Cu/Zn Superoxid Dismutase (SOD) und Glutathion Peroxidase (GPx) verglichen werden.

Tumorgewebe zeichnet sich durch schnelles und unkontrolliertes Wachstum aus, was eine schlechte Durchblutung zur Folge hat. Die Vaskularisierung ist stets schwächer ausgeprägt als in dem sie umgebenden, gesunden Gewebe. Um festzustellen, ob der Körper der

insuffizienten Versorgung mit Sauerstoff durch eine Steigerung der Expression von Neuro- oder Cytoglobin begegnet, sollte die Expression von Neuroglobin und Cytoglobin in diversen Tumorentitäten und entsprechenden Normalgeweben untersucht werden. Verwendung sollte hierfür ein Tumorarray der Firma Clontech mit 241 Paaren normalisierter cDNA von verschiedenen Tumoren und dem dazugehörigen Normalgewebe einzelner Patienten finden.

Als weiteres technisches Ziel dieser Arbeit sollte durch die Generierung monoklonaler Antikörper gegen Neuroglobin der Nachschub etablierter Antikörper für die Immunhistochemie gesichert werden. Hierfür sollten Mäuse mit dem humanen NGB-Peptid bzw. rekombinant exprimierten Protein immunisiert werden. Im Anschluß sollten die entnommenen B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Hybridomzellen fusioniert werden, ihre IgG-Produktion überprüft und die positiven Klone rekloniert werden. Darauf sollte das Kultur-Volumen eines stark IgG-exprimierenden Klon zur Antikörperproduktion vergrößert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

**Tabelle 2-1 Geräte, Materialien und Chemikalien.**

Alle für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Materialien mit ihrem Hersteller oder Vertreter.

Gerät / Material / Chemikalie	Hersteller / Vertreter
10x PCR-Puffer	Sigma, Deisenhofen
3-Aminopropyl-triethoxysilane (Organosilan)	Sigma, Deisenhofen
96-well-optische Platte	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose MEE0	Genterprise, Mainz
Äthanol abs.	Roth, Karlsruhe
B-27 Supplement (50 x)	Invitrogen, Karlsruhe
BAS-1800 Phosphor-Imager	FujiFilm, Düsseldorf
<i>Big Dye Terminator</i> Version 2.0	Genterprise, Mainz
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Brutschrank Queue Stabilterm	Nunc® GmbH, Roskilde, Dänemark
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cycler	Biozym, Hamburg
<i>Cytospin</i> (Cytozentrifuge)	Shandon, USA
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat)	Sigma, Deisenhofen
Deckgläschen, 12 mm	Menzel Gläser, Braunschweig
Deckgläschen: 24 x 32 mm und 18 x 18 mm	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Applichem, Darmstadt
Diafilm <i>Scanner</i>	Nikon, Düsseldorf
Dimethylsulfoxide (DMSO) für die Zellkultur	ICN Biomedicals, USA
Di-Natrium-hydrogen-phosphat-dihydrat	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Peqlab, Erlangen
Dulbecco 's modified eagle medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco's MEM/Nut Mix F-12	Gibco BRL, Eggenstein
Elvanol	Sigma, Deisenhofen
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin Y	Sigma, Deisenhofen
Epifluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Filme (Kleinbild) Kodak Ectachrome 400	Kodak Limited, England
Flowbench UVF 6.18S	BDK Luft-und Reinraumtechnik, S.-Genkingen
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Roche, Mannheim
Fötale Rinderserum (FBS)	Gibco BRL, Eggenstein
Gefriermikrotom	Slee, Mainz
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidinisothio-cyanat (GITC)	Roth, Karlsruhe

Hämatoxylin nach Mayer	Sigma, Deisenhofen
HbSS-Puffer (10 x)	GibcoBR <sup>L</sup> , Eggenstein
Hochkantküvette	Roth, Karlsruhe
Hybridoma-SFM	Gibco BRL, Eggenstein
Inverses Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kupferstücke (Pfennige/Cents)	Europäische Zentralbank, Frankfurt
L-Glutamine 200MM	Gibco BRL, Eggenstein
Licht-/Epifluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
MÄthanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdi-hydrogen-phosphat-dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Lauryl-Sulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarkosin (Sarcosyl)	Roth, Karlsruhe
Nylonmembran, positiv geladen	Roche, Mannheim
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Objektträger (76x26mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Penicillin	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphate Buffer Saline (PBS) nach Dulbecco	Biochrom KG, Berlin
Photometer	Pharmacia, Erlangen
Poly-L-Lysin für die Zellkultur	Sigma, Deisenhofen
QuantiTect Probe PCR kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR kit	Qiagen, Hilden
Rapid PCR Purification Kit	Concert
RNase AWAY	Molecular Bio Products
RNase- und DNase-freie Spitzen	Sörenson
Rotihistol	Roth, Karlsruhe
Rotilabo Versandboxen für Objektträger	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Sterilisator Heraeus Function Line	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
Streptomycin	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Taq-Polymerase	Sigma, Deisenhofen
Teflon Spray	Roth, Karlsruhe
Tissue Tec	Slee, Mainz
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Solution (10x)	Sigma, Deisenhofen
Tween-20®	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25 ml)	Nunc® GmbH, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6+24+96-well)	Nunc® GmbH, Roskilde, Dänemark

## 2.2 Verwendete Primer

Tabelle 2-2 In dieser Arbeit verwendete Primer und TaqMan-Sonde.

Gen		Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3')	Amplikon Länge	Quelle
Bezeichnung	Acc.-No.				
18srRNA	V01270	18srRNAforHuMaRa	ACG GAA GGG CAC CAC CAG GA	127	Bar <i>et al.</i> ,03
		18srRNArevHuMaRa	CAC CAC CAC CCA CGG AAT CG		
β-actin	NM_001457.1	β-actin p2	CCA GAC AGC ACT GTG TTG		
		β-actin p3	CTG AGA GGG AAA TCG TGC		
Col1A1	NM_000088.2	Col1A1forHuMuRa	TGG YGA GAG AGG TGA ACA AGG	252	T.Laufs
		Col1A1revHuMuRa	CAC CCT TRG CAC CAT CGT TGC		
CyGB	NM_134268.3	CGBfor107	CCA ACT GCG AGG ACG TGG	80	T.Laufs
		CGBrev187	ACT GGC TGA AGT ACT GCT TGG C		
CyGB-C1	NM_134268.3	HuLucCGB-Cfor-Xho	TGAC CTC GAG CT ATG GAG AAA GTG CCA GGC GAG ATG	595	T.Laufs
		HuCGBrev-XbaI	AGTC TCTAGA TTA CGG CCC CGA AGA GGG CA		
CyGB-C1 +Spacer	NM_134268.3	HuLucCGB-Cfor-Xho	TGAC CTC GAG CT GGT GCA GCT CCA GGT GCT ATG GAG AAA GTG CCA GGC GAG ATG	613	T.Laufs
		HuCGBrev-XbaI	AGTC TCTAGA TTA CGG CCC CGA AGA GGG CA		
CyGB-N1	NM_134268.3	HuLucCGB-Nfor-Xho	TGAC CTC GAG ATG GAG AAA GTG CCA GGC GAG ATG	595	T.Laufs
		HuLucCGB-Nrev-Kpn	TGAC GGT ACC GT CGG CCC CGA AGA GGG CAG TGT G		
CyGB-N1 +Spacer	NM_134268.3	HuLucCGB-Nfor-Xho	TGAC CTC GAG ATG GAG AAA GTG CCA GGC GAG ATG	613	T.Laufs
		HuLucCGB-Nrev-Kpn	TGAC GGT ACC GT AGC ACC TGG AGC TGC ACC CGG CCC CGA AGA GGG CAG TGT G		
GPx	NM_030826	GPxRatMusFor	GGA CAY CAG GAG AAT GGC AAG A	144	T.Laufs
		GPxRatMusRev	CAG GAA GGT AAA GAG CGG GTG		
H2a	NM_013549.1	HistH2aForMus	GTC GTG GCA AGC AAG GAG	182	Robert <i>et al.</i> ,02
		HistH2aRevMus	GAT CTC GGC CGT TAG GTA CTC		
HPRT	NM_013556.1	HPRTmus_for_qPCR	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G	355	T.Laufs
		HPRTmus_rev_qPCR	GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT		
LMNB1	NM_005573.2	LaminB1forhumqPCR	ACT GAC CTC ATC TGG AAG AAC C	394	Robert <i>et al.</i> ,02
		LaminB1revhumqPCR	CAA AAC TTT CAG TGT CAA AAA GG		
NGB	NM_021257.3	OPCRNgbFordeg	GAA GCA YCG GGC AGT G	81	F.Gerlach
		OPCRNgbRevdeg	AGR CAC YTC TCC AGC ATG TAS AG		
NGB Sonde	NM_021257.3	<i>minor groove binder</i>	6-FAM-CTC AGC TCC TTC TCG ACA GT-NFQ		Gerlach / Laufs
NGB	NM_021257.3	NgbHumBamForpcDNA3.1	TGAC G'GA TCC ATG GAG CGC CCG GAG CCC GA	476	T.Laufs
		NgbHumXhoRevDNA3.1	TGAC C'TC GAG TTA CTC GCC ATC CCA GCC TC		
NGB-C1	NM_021257.3	HuLucNGB-Cfor-Xho	TGAC CTC GAG CT ATG GAG CGC CCG GAG CCC GAG CTG	478	T.Laufs
		NGB-BamH1hum	AGTC GGA TCC TTA CTC GCC ATC CCA GCC TC		
NGB-C1 +Spacer	NM_021257.3	HuLucNGB-Cfor-Xh	TGAC CTC GAG CT GGT GCA GCT CCA GGT GCT ATG GAG CGC CCG GAG CCC GAG CTG	496	T.Laufs
		NGB-BamH1hum	AGTC GGA TCC TTA CTC GCC ATC CCA GCC TC		
NGB-N1	NM_021257.3	HuLucNGB-Nfor-Xho	TGAC CTC GAG ATG GAG CGC CCG GAG CCC GAG CTG	478	T.Laufs
		HuLucNGB-Nrev-Bam	TGAC GGA TCC CG CTC GCC ATC CCA GCC TCG ACT		
NGB-N1 +Spacer	NM_021257.3	HuLucNGB-Nfor-Xho	TGAC CTC GAG ATG GAG CGC CCG GAG CCC GAG CTG	496	T.Laufs
		HuLucNGB-Nrev-Bam	TGAC GGA TCC CG AGC ACC TGG AGC TGC ACC CTC GCC ATC CCA GCC TCG ACT		
NGB Exon1	NM_021257.3	Ngb ex 1 F11	CGG CAC GTG CGG TGA CG	176	T.Laufs
		Ngb ex 1 R11	GTG AGG GCT ACA CGA GCG C		
NGB Exon2	NM_021257.3	Ngb ex 2 F2	GAG TCA GCT GTG GTT TGC AG	350	T.Laufs
		Ngb ex 2 R2	CTG GAA GGG AGT AAG ACT AG		
NGB Exon3	NM_021257.3	Ngb ex 3 F2	TTG GAG AAC TGA GGG TCC TAC T	362	T.Laufs
		Ngb ex 3 R	CCG CAG CCC TGG TTA TCT AAG		
NGB Exon4	NM_021257.3	Ngb ex 4 F	TGC TCA GGA AGC ATG GAC TCA	350	T.Laufs
		Ngb ex 4 R	GAG CCT GGG CTA CAA CAG ATA		
NF-L	NM_010910.1	NF-Lformus1077	AGA AGC ACG AAG AGC GAG AT	136	T.Laufs
		NF-Lrevmus1213	ACC AGG CTC AGT TTC ACC AG		
NSE	NM_013509.2	OPCR NSE mus for	ACA AGG CTG GCT ACA CGG	192	T.Laufs
		OPCR NSE mus rev	GGT CTC CAT TGA AGA CCC AT		

## 2.3 Verwendete Software

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>  
 Chromas 1.55 <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>  
 GeneDoc 2.6 <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>  
 Lasergene Sequence Analysis Software der Firma DNASTAR Inc.  
 ABI Prism 7000 SDS Software  
 Adobe Photoshop CS4  
 CorelDRAW X4

## 2.4 Verwendete Antikörper

**Tabelle 2-3 In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper**

Antikörper (primär)	Wirt	Hersteller	Anwendung
anti-Ngb-TB1, polyclonal Mmu Peptid 55-70	Kaninchen	Eurogentec, Belgien	Immunfluoreszenz / Zellkultur
anti-Ngb-TB5a, polyclonal Mmu Peptid 46-61	Kaninchen	SeqLab Göttingen	Immunfluoreszenz / GFP-Zellen
anti-Ngb-N, polyclonal Hsa Peptid 55-70	Kaninchen	Sigma, Deisenhofen	Western
anti-Cygb-2M, polyklonal Hsa Peptid 66-80	Kaninchen	Eurogentec, Belgien	Immunfluoreszenz / Primär./GFP
anti-Cygb-1N, polyklonal Hsa Peptid 2-16	Kaninchen	Eurogentec, Belgien	Western
anti-Cygb-3V, polyklonal Hsa Peptid 92-106	Kaninchen	Eurogentec, Belgien	Immunfluoreszenz / Primär./GFP
anti-GFAP, monoklonal	Maus	Chemicon	Immunfluoreszenz
anti- neuN, monoklonal	Maus	Chemicon	Immunfluoreszenz
anti-beta Actin, monoklonal C11 Peptid	Kaninchen	Sigma, USA	Western

**Tabelle 2-4 In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper**

Antikörper (sekundär)	gegen IgG von	Hersteller
Cy3-markierter anti- Kaninchen-IgG-Ak, F(ab) <sub>2</sub>	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, West Grove
FITC-markierter anti- Maus-IgG- Ak, F(ab) <sub>2</sub>	Maus	Dianova, Hamburg
ECL-anti-Maus IgG-Ak, HRP-gekoppelt	Maus	Amersham-GE Healthcare, Freiburg
ECL-anti-Kaninchen IgG-Ak, HRP-gekoppelt	Kaninchen	Amersham-GE Healthcare, Freiburg

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Übernachtkultur

LB-Medium

	pro Liter
<u>Trypton:</u>	10 g
<u>Hefeextrakt:</u>	5 g
<u>NaCl:</u>	5 g
<u>H<sub>2</sub>O:</u>	1 l
lösen, abfüllen, autoklavieren	

Je nach Resistenzgen des verwendeten Plasmids wurde das entsprechende Antibiotikum in 4 ml LB-Medium gegeben. Dann wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und 12-16 Stunden lang bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Eingesetzte Konzentrationen:

Ampicillin 100  $\mu$ g/ml d.h. 10ml von Stammlsg.(10mg/ml)

Tetracyclin 15  $\mu$ g/ml

Chloramphenicol 100  $\mu$ g/ml

### 2.5.2 Plasmidpräparation

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen beruhte auf dem Prinzip der alkalinen Lyse nach SAMBROOK *et al.* 1989. Um DNA hoher Qualität zu erhalten, wurde der E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit 1 der Firma PeqLab (Biotechnologies GmbH, Erlangen) verwendet, in dem die DNA über Silikasäulchen gereinigt wird.

### 2.5.3 Alkoholische DNA Standardfällung

Dialysepuffer 10x

NaCl	3 mol/l	175,3gr
Tris	0,25 mol/l	30,28gr
Na <sub>2</sub> EDTA	0,1 mol/l	37,24gr
ad 1 l pH 7.6, autoklavieren		

Um DNA von Salzen, Nukleinsäurebruchstücken und Enzymresten zu reinigen und in einem definierten Volumen wieder aufnehmen zu können, wurde eine Alkohol-Fällung durchgeführt. Hierfür wurden der DNA zwei Volumen -20°C kalten Äthanol absolut und 1/10 Volumen Dialysepuffers zugegeben, gut gemischt und für 20 Minuten bei -20°C gefällt. Danach wurde

sie 30 Minuten lang bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 4 Volumen 70%-igen, eiskalten Äthanol ersetzt, nochmals für 10 Minuten zentrifugiert und wiederum verworfen. Das entstandene Pellet wurde nun 10 Minuten mit einer Vakuumpumpe getrocknet und konnte darauf wieder in einem definierten Volumen *A. bidest* eluiert werden.

#### 2.5.4 Natriumacetat-Fällung

Für <u>Natriumacetat</u> 4,5 M; pH 5,2	100ml
MG 82,02 mol/l ohne H <sub>2</sub> O	36,91g
MG 136,08 mol/l Na.ac.*3H <sub>2</sub> O	61,24g

in wesentlich weniger Wasser durch Erwärmen lösen und pH-Wert mit Essigsäure konz. einstellen.

Um im Gegensatz zur Fällung mit Dialysepuffer auch kleinste DNA-Fragmente aus einer Lösung fällen zu können, wie es zum Beispiel bei der Aufreinigung eines Sequenzieransatzes vonnöten ist, wurde eine Alkohol-Fällung mit Natriumacetat durchgeführt. Die Durchführung ist mit der Standardfällung (siehe 2.4.3) identisch, es wurde lediglich der Dialysepuffer durch NaAcetat ersetzt.

#### 2.5.5 DNA Restriktion

Die Restriktion von DNA wurde unter den von den Enzymherstellern empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei Einsatz von zwei oder mehr Restriktions-Endonukleasen gleichzeitig wurde die Restriktion in Gegenwart von 1x One-Phor-All Buffer PLUS der Firma Pharmacia durchgeführt. Die für die Herstellung der pEGFP-Konstrukte notwendigen Restriktionen wurden sequentiell durchgeführt. Die Zwischenprodukte wurden jeweils auf einem Agarose-Testgel auf die vollständige Linearisierung des Plasmids hin überprüft.

#### 2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

1x TBE-Puffer: 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 1,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA

Ethidiumbromidlösung: 100 ml 10x E-Puffer; 1 ml EtBr (5 mg/ml) ad. 1 l VE-Wasser

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl zum Identifizieren als auch zum Separieren und Aufreinigen von DNA-Fragmenten nach einer Restriktion genutzt. Abhängig von der

aufgetragenen DNA-Fragmentgröße wurde eine Agarose-Konzentration zwischen 0,8 und 3,0% eingesetzt.

Das Gel wurde in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (5 mg/l) für fünf Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA anhand des interkalierenden Ethidiumbromids auf einem UV-Illuminator bei 312nm sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

### **2.5.7 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen durch Gelelution**

Dialyseschlauch: (Medicell International Ltd, London) Porengröße 12-14000 Dalton. Schlauch mit Siedesteinchen in 5% Natriumcarbonatlsg. 2x für 10min aufkochen, dazwischen mit *A. dest* spülen, in 10mM EDTA (3,72g/l) bei 4°C aufbewahren.

Zur Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einen etwa 5cm langen Dialyseschlauch überführt, der mit 300µl 1x TBE gefüllt war. Der Dialyseschlauch wurde mit Hilfe eines „Spektrum-Clips“ luftblasenfrei verschlossen und in einer mit 1x TBE gefüllten Elektrophorekammer so fixiert, dass das Gelstück innerhalb des Dialyseschlauchs auf der Anodenseite quer zur Stromrichtung lag. Je nach Molekulargewicht wurde für 0,5 – 2h eine Spannung von 100mA angelegt. Um die in den Dialyseschlauch gewanderte DNA in dem Puffer zu lösen, wurde der Strom eine Minute lang umgepolt. Anschließend wurde die DNA durch zusätzliches Kneten vom Schlauch gelöst. Der die DNA enthaltende Puffer ist entnommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt worden. Nach dem Fällen der DNA wurde das Pellet in *A. bidest* (ca. 25µl) gelöst und 1/10 des Eluats auf einem Agarosegel zur Konzentrationsbestimmung aufgetragen.

### **2.5.8 Ligation**

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren wurde die DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 verwendet (WILSON and MURRAY, 1979). Die Ligation wurde in einem möglichst kleinen Volumen und mit einem Überschuss an Insert-DNA zur Vektor-DNA durchgeführt (WEISS *et. al.*, 1986b; ARMSTRONG *et. al.* 1983).

### **2.5.9 Elektrokompetente Bakterien**

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde am Vortag ein Glycerinstock des Bakterienstammes *Escherischia coli* RRIΔM15 (RÜTHER, 1982) auf einer Agaroseplatte ohne

Antibiotikum ausgestrichen, um am Folgetag aus einer Kolonie eine 20 ml Übernachtskultur anzusetzen (ohne Antibiotikum). Später wurde als *recA*<sup>-</sup>-Stamm K12-DH10B zur Verhinderung von Rekombination der Integrate verwendet.

Die Übernachtskultur wurde als Vorkultur verwendet, aus der nun 2 ml in 500 ml LB-Medium überführt wurden. Nach 2 h wurde zum ersten Mal mit einem Photometer bei 600 nm die optische Dichte bestimmt. Wenn diese  $OD_{600}=0,6-0,8$  betrug, wurden die Bakterien in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C für 20 Minuten mit 5000 rpm abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 100 ml eiskaltem *A. bidest* durch vorsichtiges Schwenken gelöst, auf zwei Becher verteilt und wieder 20 Minuten bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert. Dieser Löse- und Zentrifugationsschritt wurde zur besseren Aufreinigung ein weiteres Mal wiederholt, worauf das Pellet in einem eiskalten Gemisch aus 100 ml *A. bidest* und 10% Glycerin gelöst wurde, um anschließend wieder für 20 Minuten bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert zu werden. Nun wurde das Bakterienpellet in 1-2 ml eiskaltem *A. bidest* 10%Glycerin durch vorsichtiges Pipettieren gelöst, in 50 µl Portionen aliquotiert und direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80°C.

Um die Qualität der hergestellten kompetenten Bakterien zu testen, wurde eine Transformation mit einer definierten Menge pUC18 Vektor-DNA durchgeführt. Bei 1 µg eingesetzter Vektor-DNA sollte die Transformationsrate etwa bei  $10^5$  bis  $10^6$  Kolonien liegen.

### 2.5.10 Transformation

Die Transformation des gefällten Ligationsansatzes erfolgte per Elektroporation. Zuvor wurde eine Transformationsküvette für ½ h mit UV-Licht bestrahlt, um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden. Dann wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes mit einem Aliquot kompetenter Bakterien gemischt und in die auf Eis stehende Küvette gefüllt. Nach 1 Minute wurde die abgetrocknete Küvette in das Elektroporationsgerät überführt und die Transformation mit einem 2500 Volt Elektroschock beendet. Die Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Ruhephase konnten verschiedene Mengen der transformierten Bakterien (ca. 100-200 µl) auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen werden.

### 2.5.11 Isolierung positiver Klone durch $\alpha$ -Komplementation

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurden Plasmide verwendet, die eine Identifizierung rekombinanter Konstrukte über  $\alpha$ -Komplementation ermöglichten. Diese Methode ist erstmals

von Ullman, JACOB und MONOD (1967) beschrieben worden. Hierzu wurden X-Gal- und IPTG-enthaltende Agarplatten verwendet. Ausplattierte Klone, die kein Insert trugen, verfügten über ein intaktes  $\beta$ -Galaktosidase-Gen und konnten X-Gal zu Galaktose und einem blauen Indigo Farbstoff umsetzen. Bei Klonen mit Insert war der ORF des Gens deletiert oder so weit auseinandergeschoben, dass X-Gal nicht umgesetzt werden konnte und diese durch ihre weiße Färbung klar zu identifizieren waren (SAMBROOK *et. al.*, 1989).

#### **2.5.12 Quantifizierung doppelsträngiger DNA (SAMBROOK *et al.*, 1989)**

Die Extinktion wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz  $E = \epsilon \times c \times d$  ( $E$  = Extinktion;  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient, der für DNA 42  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  beträgt;  $c$  = Konzentration,  $d$  = Schichtdicke der Küvette, die 1 cm beträgt) in die Konzentration umgerechnet:  $c = E / \epsilon \times d$ . Außerdem musste noch der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

#### **2.5.13 Glycerinstocks**

Zur dauerhaften Lagerung wurden Bakterien in Glycerinstocks weggefroren. Hierfür wurde 2-fach konzentriertes LB-Medium in gleichem Volumen mit Glycerin gemischt, zu je 1 ml aliquotiert und nochmals autoklaviert. Diese Stocks wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Aus einer Übernachtskultur wurde 100 $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension entnommen, zu 1 ml LB/Glycerin gegeben und bei  $-20$  bzw  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.5.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist ein von MULLIS (1986; Saiki *et al.*, 1988) entwickeltes Verfahren zur Amplifizierung von DNA. Sie wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Detaillierte Temperatur- und Zeitprofile sind den benutzten Primern beigefügt. Die Konzentration der Primer und die der dNTPs betrug 10 pmol in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$ . Es wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt, in der das Volumen der eingesetzten *Template*-DNA durch *A. bidest* ersetzt wurde.

#### **2.5.15 Sequenzierung**

Um die Basenabfolge eines DNA-Bereiches zu entschlüsseln, wurde mit einer auf der DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) beruhenden, jedoch mehrfach modifizierten (Prober *et al.*, 1987; Carothers *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1992) Kettenabbruchmethode

gearbeitet und anschließend auf einem denaturierenden Acrylamidgel oder per Kapillarsequenzierer aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Sequenzierung auf einem Acrylamidgel wurde die DNA mit Na-Acetat gefällt (siehe 2.5.4) und in 10µl *A. bidest* resuspendiert. Das Auftrennen und Auslesen der Sequenzierung wurde zunächst selbst und später von der Firma GENTERprise GmbH, Mainz, durchgeführt.

#### **2.5.16 Auswertung der Sequenzdaten**

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte computergestützt mit Hilfe der *Lasergene Sequence Analysis Software* der Firma *DNA STAR Inc.* Zur Erstellung von *Alignments* wurde vor allem mit dem Programm *SeqMan* gearbeitet, nachdem die Sequenzen zuvor mit Hilfe des Programms *Chromas* (Firma *Technolysium Pty Ltd*) editiert worden waren.

#### **2.5.17 RNA-Isolierung nach der GITC-Methode (Sambrook *et al.*, 1989)**

Die RNA-Isolierung nach SAMBROOK wurde anfangs verwendet, jedoch nach Problemen bei der anschließenden RT-PCR durch die Präparation über Silikasäulchen mit dem *RNeasy Mini Kit* und dem *RNeasy Midi Kit* der Firma Qiagen ersetzt.

Die erhaltene RNA wurde photometrisch auf ihre Konzentration und Reinheit untersucht und anschließend auf einem Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, da nur so Degradation der RNA und Verunreinigung mit genomischer DNA detektiert werden können.

#### **2.5.18 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA**

Die gewonnene RNA wurde photometrisch bei 260 nm auf ihre Konzentration und Reinheit untersucht. Um Schwankungen der Messwerte statistisch auszugleichen, wurde jede Probe fünfmal gemessen.

Die Extinktion wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz  $E = \epsilon \times c \times d$  ( $E$  = Extinktion;  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient, der für RNA 40 µg/µl beträgt;  $c$  = Konzentration,  $d$  = Schichtdicke der Küvette, die 1 cm beträgt) in die Konzentration umgerechnet:  $c = E / \epsilon \times d$ . Außerdem musste noch der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

Die Reinheit der RNA konnte anhand eines Vergleichs der optischen Dichte ( $OD = 1/E$ ) bei 260 nm mit der OD bei 280 nm (Absorptionsbereich der Proteine) bestimmt werden. Betrug der Quotient  $OD\ 260/280$  1,7 – 2,1, so konnte von reiner RNA gesprochen werden.

### 2.5.19 Formaldehyd-Gelelektrophorese

DEPC-Wasser: 100-1000 µl DEPC ad. 1 l VE-Wasser; ü.N. 37°C; autoklavieren

Formaldehyd-Gel: 0,5g Agarose; 5 ml 10x MOPS-Puffer; 7,5 ml Formaldehyd 35% [v/v]

Loading buffer: 10 ml Formamid (deion.); 3,5 ml Formaldehyd 35% [v/v]; 2 ml 5x MOPS-Puffer

10 x MOPS-Puffer: 0,2 M 3-N-Morpholin-Propan-Sulfonsäure (MOPS); 0,05 M Natriumacetat; 0,01 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH7

RNA-Dye: 50% [v/v] Glycerol; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 0,4% [v/v] Bromphenolblau; in DEPC-Wasser

Eine elektrophoretische Auftrennung von RNA muss wegen ihrer Neigung zu Sekundärstrukturen unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Formaldehyd bildet Schiff'sche Basen aus, die die Bildung von Sekundärstrukturen der RNA verhindern.

Zuerst wurden 0,5 g Agarose zusammen mit 37,5 µl DEPC-Wasser aufgeköcht. Anschließend wurden 5 ml 10 x MOPS-Puffer hinzugegeben. Nach Abkühlen auf 60°C in einem Wasserbad wurden 7,5 ml 35%iges [v/v] Formaldehyd hinzugegeben, was einem Volumen von 5,5% [v/v] entspricht. Das Gel wurde unter RNase-freien Bedingungen im Abzug gegossen. Auf das auspolymerisierte Gel wurde jeweils ca. 1 µg RNA aufgetragen. Die jeweilige Menge an RNA wurde zuvor mit dem dreifachen Volumen an RNA-Probenpuffer und 1 µl Ethidiumbromid (5 µg/µl) versetzt, aufgeköcht und danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde noch 1/10 des Gesamtvolumens an RNA-Dye, der Bromphenolblau und Glycerin enthält und als Marker der Lauffront dient, hinzugegeben. Das Gel wurde bei 20 mA laufen gelassen und zur Dokumentation auf einem UV-Tisch abfotografiert.

### 2.5.20 cDNA-Synthese über reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde die *Superscript II RNase H Reverse Transkriptase* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet und 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

1 µl Oligo dT-*Primer* (500 µg/ml), 1 µl 10mM dNTP-Mix und 13 µl RNA / Wasser wurden 5 Minuten lang auf 65°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl *First strand buffer* und 2 µl DTT wurde der Ansatz 2 Minuten lang bei 42°C im *Thermocycler* inkubiert. Danach wurde 1 µl *Superscript II Reverse Transkriptase* hinzupipettiert. Der Reaktionsmix wurde im *Thermocycler* für 50 Minuten auf 42°C erhitzt, wonach eine Erhöhung der

Temperatur auf 70 °C für 15 Minuten folgte, um die Reaktion durch Denaturierung der Reversen Transkriptase zu stoppen.

Im Anschluss wurde 1 µl der hergestellten cDNA in einer PCR mit β-Actin Primern (siehe Tabelle unter 2.3.4) eingesetzt und auf einem 1,2%-igen Agarosegel getestet.

## 2.6 Quantitative *Realtime-PCR*

Bei der quantitativen *Realtime-PCR* handelt es sich um eine modifizierte Form der von MULLIS (1986) entwickelten PCR, bei der die entstehenden Amplifikate fluoreszenzmarkiert werden. Als Matrize dienen cDNAs, die durch reverse Transkription gleicher Mengen Gesamt-RNAs aus jeweiligen Geweben generiert wurden. Am Ende eines jeden Zyklus wird die proportional zur DNA ansteigende Fluoreszenz detektiert und kann anschließend über eine Grafik und anhand von parallel mitgeführten Verdünnungsstandards quantifiziert und absoluten DNA-Mengen gleichgesetzt werden. Die Fluoreszenzmarkierung wurde für das NGB-Gen mit einer *Taqman Minor groove Sonde* durchgeführt, während für alle anderen untersuchten Gene keine spezifischen Sonden zur Verfügung stand. Hier wurde das *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* der Firma Qiagen verwendet.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit dem *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* gearbeitet. Um Pipetierfehler zu vermeiden, wurde stets mit einem Mastermix und Duplikaten bzw. Triplikaten einer Probe gearbeitet. Vor jedem Pipettierschritt wurde gut gevortext. Zusätzlich enthalten beide *QuantiTect* Kits einen internen Standard. Hierbei handelt es sich um den Farbstoff ROX. Dieser liegt bei korrekter Aufteilung der Duplets/Triplets in jedem Reaktionsgefäß in gleicher Konzentration vor. Detektiert das Gerät einen Unterschied in der ROX-Fluoreszenz, so wird dies mit der Fluoreszenz der Sondenmarkierung bzw. des SYBR-Greens verrechnet. So können Konzentrationsunterschiede der Reagenzien bis zu einem gewissen Grad angeglichen werden.

### 2.6.1 *QuantiTect Probe PCR Kit*

Zur Quantifizierung des NGB-Gens stand eine spezifische *Taqman Minor Groove Binder Sonde* (MGB-Sonde) zur Verfügung, die in Kombination mit dem *QuantiTect Probe PCR Kit* von Qiagen eingesetzt wurde. Die spezifische Ngb-Sonde lagert sich dabei an die einzelsträngige DNA an. Sie besitzt eine 5´-Fluoreszenzmarkierung (Fluoreszenzfarbstoff: 6-FAM) und einen 3´-*Dark Quencher*. Der *Dark Quencher* absorbiert wegen seiner räumlichen

Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff dessen Energie durch „Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“, so dass die gesamte Fluoreszenz in Form von Wärme und nicht von Lichtquanten abgegeben wird. Die Bindung zwischen der Sonde und dem spezifischen Bereich der Einzelstrang-DNA wird durch ein an den N-Terminus der Sonde gebundenes DPI<sub>3</sub> (*Dihydrocylopyrroloindol-Tripeptid*) stabilisiert, das sich in die kleine Furche der DNA einlagert (*minor groove binder*, MGB; Kutuyavin *et al.*, 2000). Durch dieses angehängte DPI<sub>3</sub> kann die MGB-Sonde im Gegensatz zur herkömmlichen *TaqMan*-Sonde (etwa 30 Basen) aus noch weniger Nukleotiden (18-20 Basen) generiert werden, woraus eine noch höhere Spezifität resultiert. Im Fall von *Ngb* konnte ein kurzer, stark konservierter Bereich gefunden werden, der einen speziesübergreifenden Gebrauch der *Taqman*-Sonde für Mensch, Maus und Ratte erlaubt. Dieser Bereich überspannt eine Exon/Intron-Grenze, damit Verunreinigen durch genomische DNA nicht detektiert werden können.

Während der Replikation wird die an die Einzelstrang-DNA gebundene Sonde durch die doppelstrang-spezifische (HEID *et al.*, 1996) 5´-3´-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* abgedaut, so dass der *Dark Quencher* vom Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM separiert wird. Erst jetzt werden von dem angeregten Fluoreszenzfarbstoff Lichtquanten abgestrahlt, die nach jedem Replikationszyklus vermehrt im Ansatz vorliegend, detektiert und quantifiziert werden können.

Da die *Ngb*-*Taqman*-Sonde bei diesem Verfahren sehr spezifisch ist, konnte ein Zweischnitt-PCR-Protokoll verwendet werden, bei dem sowohl die spezifische Anlagerung der *Primer* als auch die Elongation durch die *Taq*-Polymerase bei der gleichen Temperatur vonstatten gehen.

Die Erstellung einer Dissoziationskurve war nicht nötig, da die Spezifität der Messung durch die Verwendung der Sonde erzielt wird.

### 2.6.2 „*QuantiTect SYBR Green PCR Kit*“ *SYBR Green Assay*

Bei allen untersuchten Genen, für die keine funktionierende *TaqMan* Sonde zur Verfügung stand, wurde die Quantifizierung mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Diese Methode nach MORRISON *et al.* (1998; *Review*: Bustin, 2000) macht sich die Eigenschaft von *SYBR Green I* zunutze, mit jeder doppelsträngigen DNA eine Bindung einzugehen. Da dies jedoch unspezifisch geschieht, wurde im Anschluss jeder Quantifizierungsreaktion eine Dissoziationskurve durchgeführt. Erschien dort mehr als ein *peak*, so ließ das auf Primerdimere bzw. unspezifische Amplifikate schließen, die eine andere Länge bzw. anderen GC-Gehalt aufweisen. Um genomische DNA-Amplifikationen des

Zielgens zu vermeiden, sollte einer der beiden Primer auf einer Exon/Intron-Grenze liegen, so dass er auf genomischer DNA keine spezifische Bindung eingehen kann.

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte normalerweise am Ende eines jeden Zyklus nach Ablauf der Elongation bei 72°C, um bei einer Temperatur zu messen, bei der Primerdimere schon denaturiert vorliegen, somit kein SYBR Green mehr binden kann. Bei Auftreten eines weiteren unspezifischen Amplifikats, das auch durch eine erhöhte Annealingtemperatur nicht zu vermeiden war, konnte die Detektionstemperatur bis auf 5°C unter die Schmelztemperatur des Zielamplifikats angehoben werden.

### 2.6.3 Berechnungen und Formeln zur qPCR

#### 2.6.3.1 Kopienzahl

Um eine absolute Quantifizierung der Amplifikate durchzuführen, mussten die eingesetzten Standards genau berechnet werden. Als Standards wurden Plasmide eingesetzt, in die zuvor das zu amplifizierende Gen oder die entsprechende Zielsequenz des Amplikons kloniert worden war. Die Basenanzahl von Plasmid und Integrat wurden addiert und die Plasmidkonzentration photometrisch bestimmt. Geht man von einem durchschnittlichen Basenpaargewicht von 660Da (=660 g/mol) aus, lässt sich die Anzahl der Moleküle folgendermaßen bestimmen: Anzahl Moleküle pro ng (= 10<sup>-9</sup>g):

$$\frac{\text{Avogadro'sche Zahl [Molekül pro Mol]}}{\text{durchschnittl. Basenpaargewicht [Da]} \times \text{Plasmidlänge [Bp]} \times 10^9}$$

$$\text{Anzahl Kopien} = \frac{6,022 \times 10^{23}}{\text{Mol} \times 660 \text{ Da} \times x \times 10^9}$$

$$\text{Anzahl Kopien} / \mu\text{l} = \text{Konzentration} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) \times \frac{\text{Moleküle}}{\text{ng}}$$

Die Standards wurden in den Versuchen in seriellen 10-fach Verdünnungen zwischen 10<sup>2</sup> und 10<sup>7</sup> Moleküle pro Ansatz gemessen. Bei der anschließenden Auswertung mit der *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection Software v1.2.3* wurde zunächst zur Bestimmung des Hintergrundrauschens in einer linearen Ansicht eine sog. *Baseline* und danach der Schwellenwert (= *Threshold*) zu Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation gesetzt. Daraus ergaben sich Schnittwerte der Fluoreszenzkurven mit dem *Threshold*, die sog. Ct-Werte („*Threshold cycle*“) die jeder (amplifizierten) Probe eine Zyklenzahl zuweisen (siehe Abbildung 2-2). Die Expression der Gene wurde relativ zu einem Vergleichsgewebe (hier

MF9/10) gemessen. Um Herauf- bzw. Herunterregulationen graphisch darzustellen, wurden Säulendiagramme mit Hilfe des Computerprogramms *Microsoft Excel* erstellt.

### 2.6.3.2 PCR-Effizienz

Die PCR-Effizienz wurde über die Steigung der Eichgeraden berechnet. Die Abweichungen der Einzelmesswerte der Standards von der Geraden – der  $R^2$ -Wert – sollten dabei möglichst gering ausfallen ( $R^2 \geq 0,99$ ). Die Effizienz (E) der PCR ergab sich aus der Formel:

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Ein Wert von 1,98 entsprach dabei einer PCR-Effizienz von 98%, ein Wert von Zwei einer 100%-igen Effizienz, also exakt einer Verdoppelung der PCR-Produkte pro Zyklus (siehe Abbildung 2-3).

### 2.6.4 Normalisierung

Zur Normalisierung wurde ein externes Kontrollgen, das *Housekeeping* Gen mit dem zu untersuchenden Gen verrechnet, um Schwankungen in der Qualität der cDNA bzw. Pipettierfehler beim Ansatz des PCR-Laufes rechnerisch zu minimieren.

Der Gebrauch eines *Housekeeping* Gens setzte voraus, dass dieses Gen nicht differenziell reguliert war. So musste für jedes Organ und jeden physiologischen Zustand sowie Entwicklungsstand in Voruntersuchungen geklärt werden, ob sich ein Gen als *Housekeeping* Gen eignete oder aber reguliert vorlag. War ein Gen gefunden, wurden zwei getrennte Läufe in der q-PCR durchgeführt. Multiplexläufe waren schon deshalb nicht möglich, weil nur eine MGB-Sonde vorhanden war und *SYBR-Green* aufgrund der unspezifischen Bindung kein Multiplex zulässt.

Verrechnet wurden die absoluten Werte der *MeanQuantity*, die mit Hilfe der *Software* des *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* ermittelt wurden. Zunächst wurden der Mittelwert aller Proben eines Entwicklungsstadiums und seine Standardabweichung errechnet. Diese Mittelwerte konnten nun durch den Mittelwert des *Housekeeping* Gens dividiert werden. Für jedes weitere Entwicklungsstadium wurde der Bruch des Normalzustandes durch die Mittelwerte des jeweils regulierten Gewebes dividiert bzw. umgekehrt multipliziert. Die errechnete Standardabweichung wurde in die Angleichung an

das *Housekeeping* Gen mit einbezogen, diente innerhalb eines Genes als Kontrolle und war für den Student-T-Test vonnöten, mit dem die statistische Signifikanz der erhaltenen Daten abgesichert wurde.

<u>Testgewebe</u> Kalibrator	z.B.	<u>Gewebe MF13 bis Adult</u> Gewebe MF10	
<u>ZielGen</u> Houskeeping Gen	z.B.	<u>NGB</u> H2A	Einbeziehen des Housekeeping Gens (HKG)
Testgewebe		$\frac{\text{ZielGen(P)}}{\text{HKG(P)}}$	MF10 = <u>N</u> orm MF13 bis Adult = <u>P</u> robe
Kalibrator		$\frac{\text{ZielGen(N)}}{\text{HKG(N)}}$	
$\rightarrow \frac{\frac{\text{ZielGen(P)}}{\text{HKG(P)}}}{\frac{\text{ZielGen(N)}}{\text{HKG(N)}}} \rightarrow \frac{\text{ZielGen (P)} \times \text{HKG (N)}}{\text{HKG (P)} \times \text{ZielGen (N)}} \rightarrow \frac{\text{NGB (P)} \times \text{H2A (N)}}{\text{H2A (P)} \times \text{NGB (N)}}$			
$\frac{\text{NGB(MF13bisAd)} \times \text{H2A MF10}}{\text{H2A(MF13bisAd)} \times \text{NGB MF10}} \rightarrow \text{MF10 wird als Grundexpression angesehen, zu der}$			
die anderen Proben in Relation angegeben werden.			

**Abbildung 2-1: Berechnungsbeispiel**

Gezeigt ist die Bestimmung der gemeinsamen Standardabweichung für Werte, die zuvor aus dem Zielgen und dem Kontrollgen errechnet wurden

$$= F \sqrt{\frac{\text{StdHSK}}{\text{HSK}} \times 2 + \frac{\text{StdZielGen}}{\text{ZielGen}} \times 2}$$

F = Faktor der Regulation

In Excel ist die Formel folgendermaßen einzugeben: =F\*wurzel(((x/y)\*2)+((a/b)\*2))

Zur Berechnung des *Standard Error of Mean* (SEM), also der Standardabweichung der Mittelwerte, wird die nach qBASE errechnete Standardabweichung nochmals durch die Wurzel der Probenzahl für den jeweiligen Wert geteilt.

$$= \frac{\text{Std}}{\sqrt{N}}$$

Eingabe in Excel: =Std/wurzel(N)

### 2.6.5 Normalisierung von cDNA mit PicoGreen

Um die cDNA-Synthese quantitativ überprüfen zu können und auftretende Schwankungen aufzudecken, konnte eine PicoGreen-Messung durchgeführt werden.

PicoGreen interkaliert nur in gelöste, doppelsträngige DNA, nicht aber in RNA und kann dort in Form von Fluoreszenz gemessen und quantifiziert werden (SAMBROOK *et al.*, 1989). Diese Fluoreszenz nimmt hierbei proportional zur DNA-Konzentration zu, beginnend bei der niedrigsten noch messbaren Verdünnung (1ng/ml). Lediglich bei sehr hoher DNA-Konzentration verläuft die Fluoreszenzanreicherung nicht mehr linear, sondern wird in zunehmendem Maße schwächer. Dieses Phänomen wird als „Signal Quenching“ bezeichnet. Dieser Bereich muss durch Verdünnungsreihen ausgelotet werden.

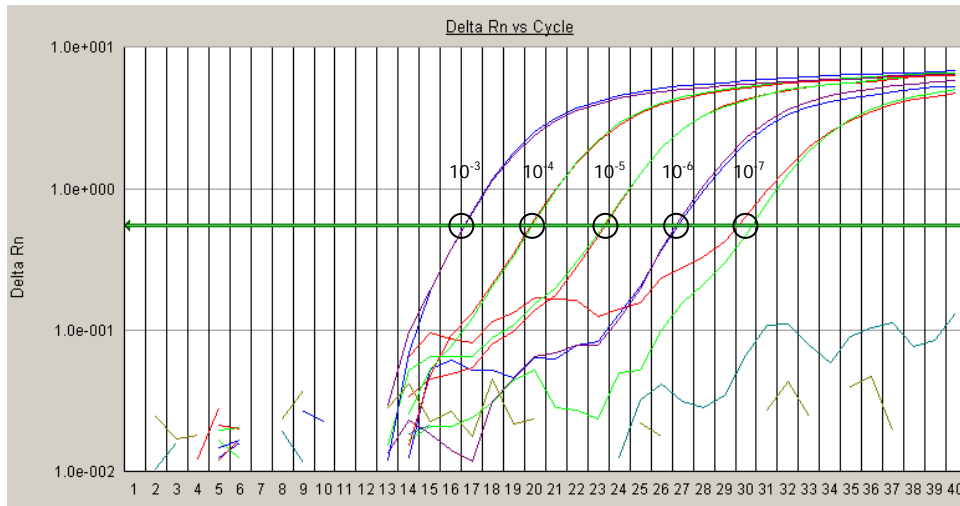
In dieser Arbeit wurde die PicoGreen-Messung nur stichprobenweise und zum Überprüfen von in der Q-PCR gemessenen Regulationen durchgeführt. Benutzt wurde das TBS-380 Mini-Fluorometer der Firma Turner BioSystems, Kalifornien, USA.

Alle Arbeitsschritte wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, da sich PicoGreen bei direkter Bestrahlung mit Licht zersetzt. PicoGreen wurde als konzentrierte Stocksolution bei -20°C gelagert. Als Arbeitslösung wurde PicoGreen 1:200 in 1xTE-Puffer verdünnt.

Vor jedem Gebrauch mußte das Mini-Fluorometers geeicht werden. Dies geschah mit TE-Puffer, in dem auch die zu messenden cDNAs verdünnt wurden. Mit ihm wurde der Nullwert gesetzt. Zusätzlich wurde ein Plasmid bekannter Konzentration eingesetzt, um das Gerät auf einen festen ng/ml-Wert zu eichen. Nachdem die cDNAs auf Raumtemperatur und gut gevortext waren, wurden sie 1:200 in TE-Puffer gelöst und wieder gründlich gevortext. Alle Eichungen und Messungen fanden in einer 1:1 Verdünnung mit der PicoGreen Arbeitslösung und einem Gesamtvolumen von 60 µl statt. Nach dem Vortexen wurde das Gemisch in eine Einweg-Glasküvette pipettiert und für 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit konnte das PicoGreen in die DNA interkalieren. Anschließend fand die Messung der Fluoreszenz bei 520 nm statt (480 nm).

### 2.6.6 Validierung der RT-PCR-Assays

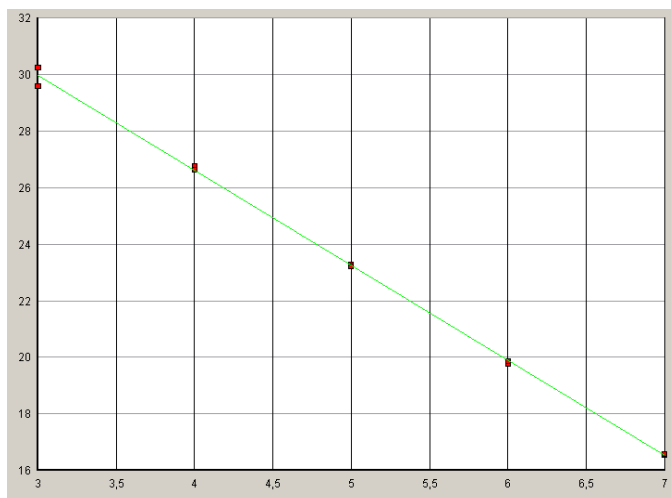
Der gezeigte *Amplification Plot* soll exemplarisch die Messungen anhand des Ngb-Assays darstellen (Abb. 3.12).



#### Abbildung 2-2: Validierung Ngb RT-PCR

Darstellung der Amplifikation von NGB-Plasmidstandards (107 bis 103 Moleküle) und Leerkontrollen (NTCs) im NGB Assay. Die grüne Linie ist der Threshold (Schwellenwert), der an den Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation gesetzt wird. Die Kreise markieren die Schnittpunkte der Steigungskurven mit dem Threshold, die Ct-Werte (Threshold cycle). Diese Werte weisen jeder Probe eine Zyklenzahl zu.

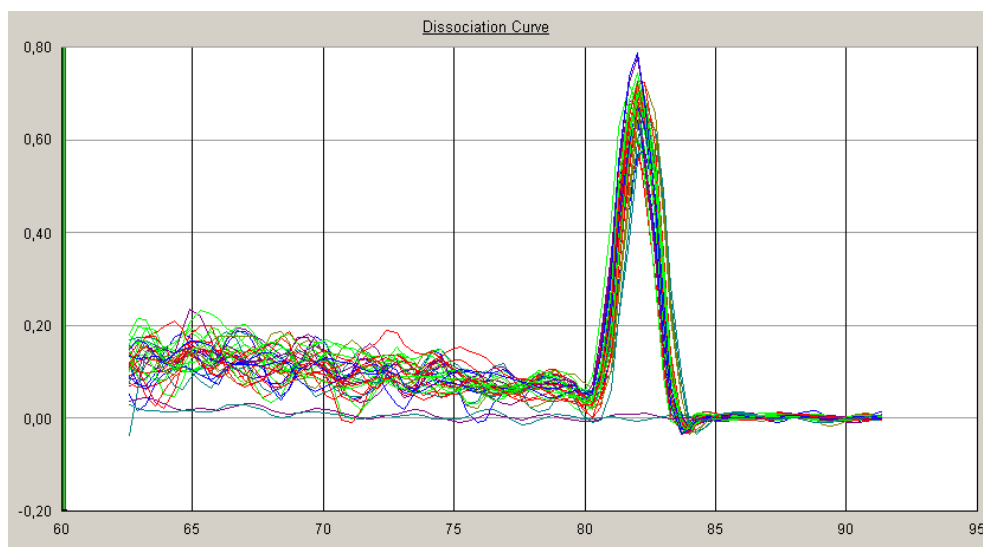
Aus den Ct-Werten der Standards lässt sich die Standardkurve errechnen. Sie dient der Berechnung der absoluten Matrizenmolekülzahlen und der PCR-Effizienz, hier in Abbildung 3.13 gezeigt. Die Effizienz der Amplifikation dieses Laufes betrug 98%, der  $R^2$ -Wert (Quadrat des Korrelationskoeffizienten nach Pearson) lag bei 0,998. Der Schnittpunkt der Eichgeraden mit der y-Achse lag bei einem (berechneten) Ct-Wert von 40,04.



#### Abbildung 2-3: Eichgerade der NGB-Plasmidstandards eines NGB-TaqMan Laufes.

Die Ct-Werte (y-Achse) sind gegen den Logarithmus der Molekülanzahl aufgetragen (x-Achse). Die Steigung von  $-3,35$  entspricht einer PCR-Effizienz von 98,4% ( $E = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}}$ ).

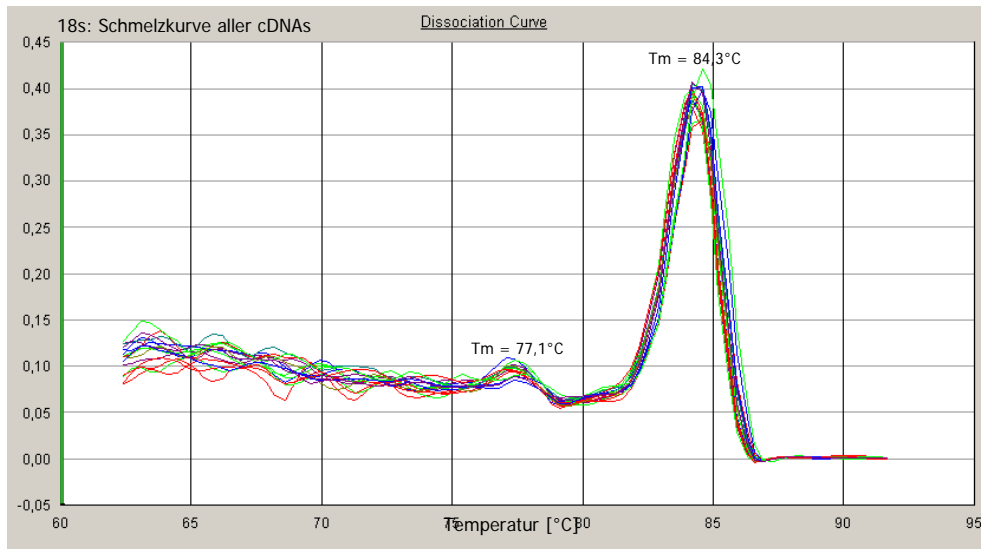
Eine Schmelzkurvenanalyse zeigt, ob sich während der PCR unspezifische Amplifikate und Primer-Dimere gebildet haben. Bei der Durchführung des NGB-*Assays* war dies nicht vonnöten, da die TaqMan-Sonde nur NGB-Amplifikate spezifisch detektierte. Als Beispiel wird die Schmelzkurve eines NSE-Laufes gezeigt. In Abbildung 3.14 zeigen alle Kurven nur einen deutlichen *Peak* beim Amplikon-spezifischen  $T_m$ -Wert von  $82,1^\circ\text{C}$ . Unten sind die beiden Kurven der *no template control* (NTC) zu sehen, die keinen Ausschlag erzeugen. Verläuft die Schmelzkurve nicht so eindeutig und zeigt sie Ausbildungen von Primer-Dimeren oder



**Abbildung 2-4: Schmelzkurven der Amplikons von NGB-Plasmidstandards und cDNAs.**

Es gab pro Probe nur einen spezifischen *Peak* bei  $81,9^\circ\text{C}$ , also nur ein spezifisches Amplikon. Unten verlaufen die NTCs, sie zeigen keinerlei Ausschlag.

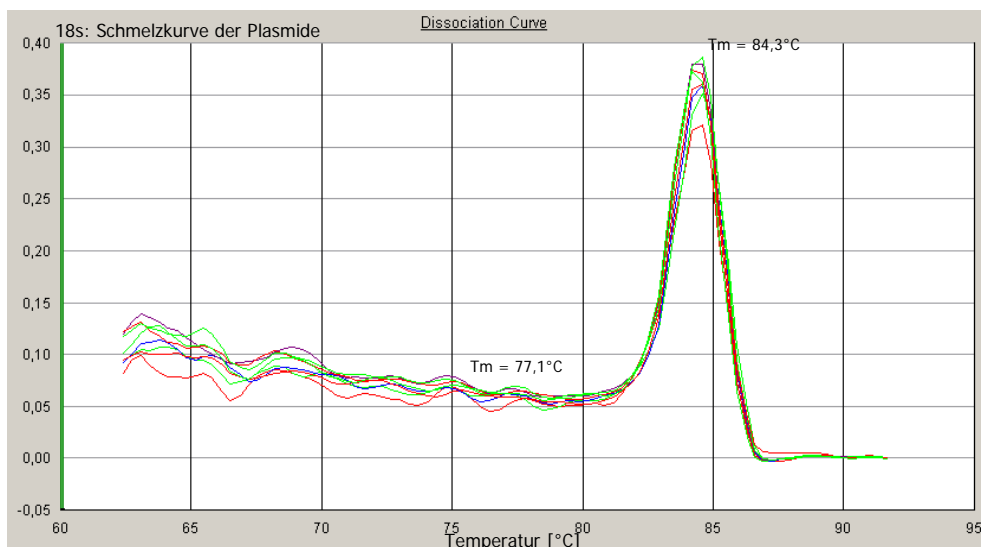
unspezifischen Amplifikaten, lässt sich die Detektionstemperatur, also die Temperatur, bei der nach jedem Zyklus die Fluoreszenzmessung vorgenommen wird, erhöhen. Dies ist nur möglich, wenn das unspezifische Amplifikat einen kleineren  $T_m$ -Wert hat als das spezifische Amplikon. Unspezifische Amplika sollten aber komplett vermieden werden, da sie die Effizienz der PCR beeinträchtigen, indem sie in Konkurrenz zur Amplifikation des untersuchten Gens stehen. In Abbildung 3.15 ist der *Assay* zur Untersuchung der 18s-mRNA-Expression gezeigt. Hier traten bei einem  $T_m$  von  $77,1^\circ\text{C}$  Primer-Dimere auf, die durch die Erhöhung der Detektionstemperatur vom vorinstallierten  $T_m$  von  $76^\circ\text{C}$  auf  $80^\circ\text{C}$  aus der Messung herausfielen. Möglich wird das durch die Eigenschaft des SYBR<sup>®</sup> Greens, nur in gebundener Form in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA von Licht anregbar zu sein. Sind aber die Primer-Dimere auf Grund der hohen Temperatur schon geschmolzen, so können sie auch kein SYBR<sup>®</sup> Green mehr binden und werden nicht als vermeintliche Amplifikate detektiert.



**Abbildung 2-5: Schmelzkurve mit Primer-Dimeren.**

Bei dem Assay zur Amplifikation der 18s-mRNA traten Primer-Dimere auf. Durch ein Anheben der Detektionstemperatur auf 80°C schmolzen die Dimere bereits vor Erreichen dieses Wertes und wurden nicht mit einberechnet.

Die Abb. 3.16 zeigt die Schmelzkurve der amplifizierten Plasmidstandards. Zu beachten ist, dass die *Validierung* des Assays nur mit Hilfe der Standards nicht alle Probleme eines Assays aufzeigen kann. Die Bildung von Primer-Dimeren trat nur mit cDNAs als Template (Abb. 3.15), nicht aber in Schmelzkurven der Standardplasmide auf (Abb. 3.16).



**Abbildung 2-6: Schmelzkurve der 18s-Plasmide**

Bei der Schmelzkurve der 18s-Plasmide traten im Vergleich zu den cDNAs keine Primer-Dimere auf.

## 2.7 *In situ* – Hybridisierung

### 2.7.1 Herstellung von 8%-igem Paraformaldehyd (PFA)

Für die Herstellung von PFA wurden 500ml einer 16%-igen PFA-Lösung mit 500ml einer 2x PBS-Lösung gemischt. Unter einem Abzug auf einem Magnetrührer wurden 80g PFA in 500ml *A. dest* gelöst. Dies bedurfte ca. einer Stunde und konnte durch Erhitzen auf 60°C etwas beschleunigt werden. In die entstandene Lösung wurde tropfenweise 1N NaOH zugegeben, bis die bis dahin trübe Lösung klar wurde. Durch Vereinigen der beiden Lösungen ergab sich eine 8%-ige PFA Lösung in 1x PBS, deren pH-Wert noch auf 7,2 eingestellt wurde. Diese Stammlösung war portioniert mehrere Monate bei -20°C lagerbar.

<u>4% PFA:</u>	4% [w/v] in 1 x PBS, pH 7,4
<u>PBT:</u>	PBS + 2 mg/ml BSA + 0,1% Tween-20
<u>Puffer 1:</u>	100 mM Tris/HCl ; 150 mM NaCl; pH 7,5
<u>PTW:</u>	1 x PBS + 0,1% Tween-20
<u>2 x SSC:</u>	0,3 M NaCl; 0,03 M Na <sub>3</sub> -Citrat; 0,1% DEPC; pH 7,0
<u>2 x SSC/FA:</u>	50% [v/v] 4 x SSC; 50% [v/v] Formamid
<u>Blocking/Puffer 2:</u>	Puffer 1 mit 1% [w/v] Blocking-Reagenz
<u>anti-Dig-AP-Konjugat:</u>	1:100 in Blocking / Puffer 2
<u>NBT-Puffer:</u>	100 mM Tris/HCL; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 9,5
<u>NBT/BCIP-Substartlsg.:</u>	45 µl NBT-Lsg, 35 µl BCIP-Lsg in 10 ml NBT-Puffer
<u>Eindeckmittel:</u>	(50% [v/v] Glycerin in PBS)

Der Nachweis der mRNAs erfolgte durch nicht-radioaktive *In situ*-Hybridisierung über Digoxigenin-markierte ssDNA-Sonden.

Die aufgetauten Gewebeschnitte wurden zunächst für 10 min in 4% PFA bei Raumtemperatur fixiert und danach zweimal für 5 Minuten in PTW und einmal in PBS gewaschen. Die Digoxigenin-markierten Sonden (*sense* und *antisense*) wurden in 4x SSC / Formamid im Verhältnis 1:25 verdünnt. 70µl der jeweiligen Sonde wurden direkt auf die Schnitte pipettiert und diese mit einem Deckglas möglichst luftblasenfrei abgedeckt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei einer Hybridisierungstemperatur von 42°C im Wasserbad. Nach der Über-Nacht-Inkubation wurden die Objektträger mit 2x SSC gewaschen, bis die Deckgläser abschwammen. Danach wurden die Schnitte erst 3x für 5 min in 2x SSC bei 55°C, dann 20 Minuten in 0,1 x SSC bei 60°C gewaschen. Nun wurde für eine halbe Stunde

die RNA mit einem RNase A-Mix (63µl RNase A (10mg/ml) in 25ml 2xSSC) bei 37°C in einer feuchten Kammer verdaut. Anschließend wurde einmal mit 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen und abschließend in PBT gespült. Vor der Antikörperreaktion wurden die Schnitte für 15 Minuten in Blockingpuffer (P2) inkubiert. Die Blockierungslösung wurde vom Objektträger gewischt, ohne das Gewebe zu beschädigen. Die Nachweisreaktion erfolgte mit AP (Alkalische Phosphatase)-konjugierten Maus-anti-Digoxigenin-F<sub>(ab)</sub>-Fragmenten. Dazu wurden pro Schnitt 100µl der verdünnten anti-Digoxigenin-F<sub>(ab)</sub>-Fragmente (Boehringer Ingelheim 1:100 in P2) auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Die Gefrierschnitte wurden zweimal für 5 min in PBT gewaschen. Zur Substratreaktion erfolgte nach Waschen für 5 min in NBT-Puffer (P3) eine Inkubation von je 100µl NBT / BCIP-Substratlösung (1:5 in P3) im Dunkeln in der feuchten Kammer, bis eine bläuliche Färbung sichtbar wurde (ca. 20-35 min). Abschließend wurde die Reaktion durch fünfminütiges Waschen in 1x PBS gestoppt und mit 1-2 Tropfen PBS/Glycerin [v/v] eingedeckt. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Deckgläser mit Nagellack versiegelt.

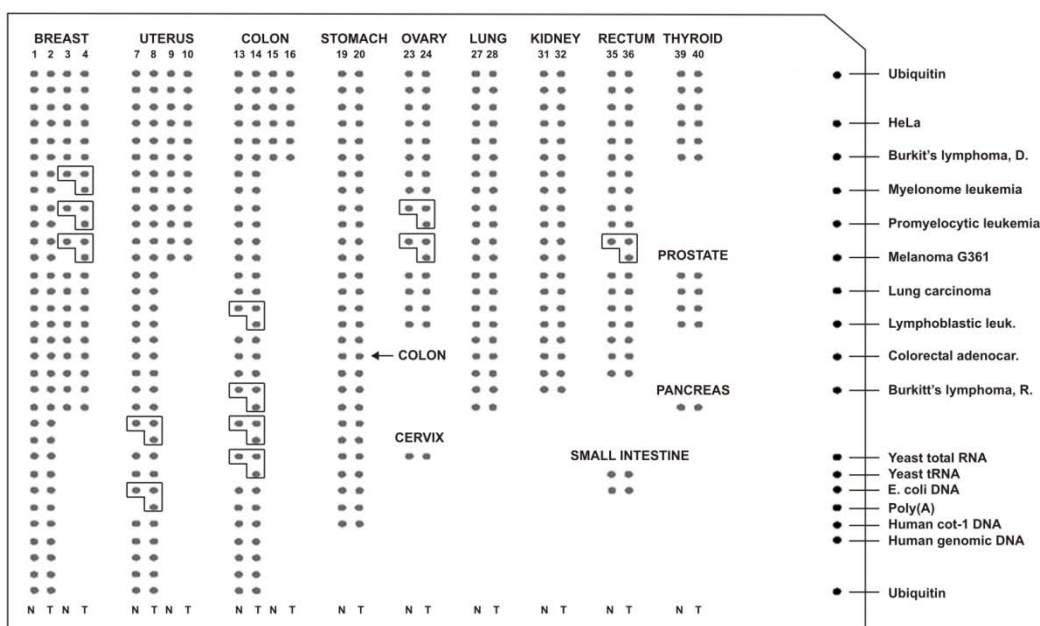
## **2.8 Northern Blot mit Hilfe eines „Cancerarrays“**

### **2.8.1 Radioaktive Sondenmarkierung per *Random Primed Oligo Labeling* nach Feinberg und Vogelstein (1983)**

Die radioaktive Markierung der Sonde wurde wie folgt vorgenommen: 10µg DNA wurden zu einem Gesamtvolumen von 11µl mit *A. bidest* aufgefüllt und je ein µl dGTP, dCTP und dTTP zupipettiert. Nach Zugabe von 2µl Hexa-Nukleotidmix, der als Startpunkt der Neusynthese eines DNA-Stranges durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I diente, wurde das Gemisch bei 100°C für 10 Minuten im Wasserbad denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Von nun an mussten alle weiteren Schritte im Isotopenlabor vorgenommen werden. Zunächst musste der Blot prähybridisiert werden. Hierfür wurde die Membran für 30 Minuten bei 65°C in 10ml Hybridisierungslösung inkubiert. Für diese Lösung wurden 20ml *Express-Hyb* (Clontech, CA, USA) auf 60°C erhitzt, mit 1,5mg Rinderthymus carrier-DNA, die vorher 5 Minuten denaturiert und auf Eis gestellt wurde, gemischt und gemeinsam auf Eis abgekühlt. Zu dem DNA-Mix wurden 3µl (35 uCi)  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP und 1µl Klenow-Enzym zugegeben, gut gemischt, abzentrifugiert und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Oligo-Labeling durch eine Standardfällung von nicht eingebauten Hexa-

Nukleotiden gereinigt. 160µl *A. bidest*, 20µl Dialysepuffer und 400µl eiskalter EtOH abs. wurden zum Markierungsansatz gegeben, zunächst für 30 Minuten bei -20°C gefällt und anschließend für 30 Minuten bei 13 000 rpm kühl zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgehoben, und die Radioaktivität des Überstandes und des Pellets wurden gemessen. Hierbei sollte sich weitgehend alle Radioaktivität im Pellet befinden. Das Pellet wurde in 100µl *A. bidest*, 80µl Carrier-DNA und 50µl 20x SSC aufgenommen, für 5 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die denaturierte Sonde wurde mit 10ml Hybridisierungslösung versetzt und anstelle der Prähybridisierungslösung zum Blot gegeben. Dieser wurde über Nacht bei 65°C unter ständigem Drehen hybridisiert.



**Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des Cancer Profiling Arrays (Clontech).**

Der Blot verfügt über 241 Paare normalisierter cDNA von Tumoren (T) und dem dazugehörigen Normalgewebe (N) einzelner Patienten. Umrandete Boxen beinhalten neben dem Normal- und Tumorgewebe noch eine Metastasenprobe des Patienten. Rechts sind Negativ- und Positivkontrollen aufgetragen, die neben einigen Krebszelllinien noch Hefe, E.coli und menschliche, genomische DNA aufweisen. (CATALOG #: 7841-1)

Am nächsten Tag wurde die radioaktive Hybridisierungslösung abgegossen, für weitere Versuche weggefroren, und der Blot viermal in 200ml auf vorgewärmter Lösung 1 (2x SSC, 0,5% SDS) unter ständigem Drehen bei 65°C gewaschen. Es folgte ein 30-minütiger Waschschrift in 200ml vorgewärmter Lösung 2 (0,2 SSC, 0,5% SDS) bei 65°C und ein letztes Waschen bei Raumtemperatur in 200ml 2x SSC, um das SDS komplett zu entfernen. Ohne den Blot austrocknen zu lassen, wurde er in Folie eingeschweißt und zur Belichtung einer *Phosphor Imager*-Platte bzw. eines Röntgenfilms genutzt.

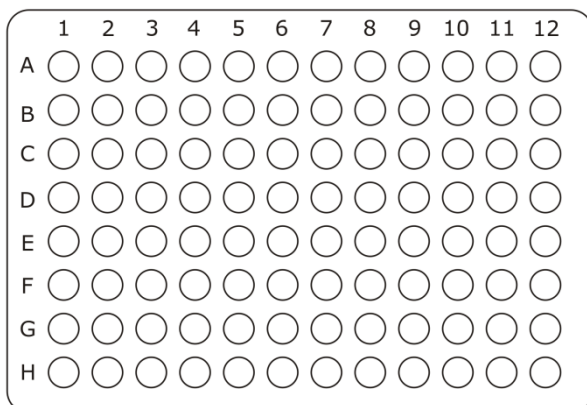
### 2.8.2 *Strippen des Blots*

Um den Blot wiederverwenden zu können, wurden die hybridisierten Sonden wieder abgewaschen (*stripfen*). Hierfür wurde der Blot für 10 Minuten in 0,5%-igem SDS gekocht und anschließend für weitere 10 Minuten in der Lösung abgekühlt. Sofern im Anschluss daran noch Radioaktivität messbar war, wurde dieser Schritt wiederholt. War die Radioaktivität abgewaschen, wurde der Blot wieder in Folie eingeschweißt und bei -20°C gelagert.

## 2.9 ELISA

Die ELISA-Methode wurde zum Nachweis von anti-Ngb im Serum von Hamster und Maus verwendet, die zuvor mit rekombinantem NGB immunisiert worden waren,

ELISA-Platte : Greiner # 655081 96well F-Bottom, Mikrodon, high.binding



#### Abbildung 2-8: Plattenbelegung

In Reihe 11 ist die Leerkontrolle, es wird kein rekombinantes Protein gecoated. In Reihe 12 befindet sich der *Blank*, es wird mit rekombinantem Protein gecoated aber es wird kein anti-NGB aufgebracht.

Zunächst wurden die Reihen 1-10 und 12 gecoated. Hierfür wurden 1µg/ml rekombinantes Protein in PBS gelöst. Von dieser Verdünnung wurden pro well 50µl ü.N. bei 4°C inkubiert. Nachdem die Platte dreimal mit PBS/0,05% Tween gewaschen wurde, konnten die freien Bindungsstellen mit 150µl/well PBS/1%BSA zur Blockierung bei RT inkubiert werden. Durch Ausklopfen wurde die Blockierungslösung entfernt. Die Probenauftragung erfolgte anhand einer 1:2 Titrationsreihe. Hierfür wurden in die Reihen eins bis zehn 50µl PBS/1%BSA vorgelegt. In Reihe elf wurden 100µl einer 1:2000-Verdünnung (Serum 1:20) vorgelegt. Aus

dieser Verdünnung wurden nun 50µl entnommen und in Reihe 1 überführt. Aus Reihe 1 wurden 50µl in Reihe 2 gegeben und so fort.

Reihe 12 wurde mit 50µl PBS/1%BSA befüllt und die Platte für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen folgte die Detektion mit einem Maus-anti-Rabbit IgG AK (Biotinyliert) [Dianova# 211-065-109] in einer 1:5000 Verdünnung für eine ¾ Stunde bei RT.

Nach zweimaligem Waschen konnten die gebundenen IgGs mit einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:2000 in PBS/1%BSA) eine ¾ Stunde bei RT markiert werden.

Es folgten drei Waschschritte, bevor durch eine Farbreaktion die Menge der IgGs nachgewiesen werden konnte. Hierfür wurde ein Substrat aus Substratpuffer und Paraphenyl-Diamin mit 1µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und 50µl in jedes *well* gegeben. Bei einem Farbumschlag in den ersten Reihen wurde die Reaktion mit Stoplösung beendet und die Konzentration photometrisch bei 490nm gemessen.

Substrat:	1mg/ml OPD in Substratpuffer (OPD: ParaphenylDiamin) 1µl/ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) 50µl/well
STOP-Lsg:	1m H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50µl/well
Substratpuffer:	0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M tri-Na-Citrat pH 5,0
Waschpuffer:	1xPBS / 0,05% Tween

## 2.10 Western-Blot

### 2.10.1 Probenvorbereitung für die Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinexpression im Verlaufe der Entwicklung des Säugerhirns wurde die Befruchtung der Balb/c Mäuse zeitlich abgestimmt und die Embryonen und Föten an den Entwicklungstagen 15 und 19 entnommen. Aufgrund der geringen Größe wurde im Stadium F15 das Hirn nicht vollständig freipräpariert. Dies war erst in Stadium F19 möglich. Eine weitere Probengruppe stellten Jungtiere am ersten Tag nach der Geburt (T1) dar. Für das Adultgewebe wurden die Muttertiere verwendet, das Hirn auf der Medianebene geteilt und die Hälften einzeln weiterverarbeitet.

### 2.10.2 Proteinextraktion für Western Blot

Der modifizierte Ripa-Puffer (2.10.4.9) wurde auf 100°C erhitzt. Das Gewebe wurde grob auf Eis zerkleinert und pro 100mg ca. 1ml Ripa zugegeben. Daraufhin wurde das Gewebe mit einem Sonifizierer möglichst komplett zerkleinert. Hierbei wurde die Probe immer wieder auf Eis gekühlt.

Anschließend wurde eine Stunde bei 14000 rpm und 8°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppi überführt und dieser nochmals 45min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1µl proteinase-inhibitor-cocktail (roche) zugegeben. Der Proteinextrakt wurde in 1µg-Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.10.3 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinquantifizierung nach Bradford beruht auf der Absorptionsänderung des Farbstoffs Coomassie-Blau von 465nm auf 595nm nach unspezifischer quantitativer Bindung an basische Aminosäuren (BRADFORD M., 1976). Zur genauen Quantifizierung der Proteinmenge wurde mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe eine Eichgerade erstellt.

Die BSA-Verdünnungsreihe wurde ausgehend von einer 400µg/ml Stammlösung angesetzt.

Pipettierschema:

BSA (µg/ml)	µl aus BSA-Verdünnung	µl H <sub>2</sub> O <sub>odd</sub>
0	-	110
20	40 µl aus 100 µg/ml	160
30	45 µl aus 100 µg/ml	105
40	80 µl aus 100 µg/ml	120
50	60 µl aus 100 µg/ml	60
60	120 µl aus 100 µg/ml	80
80	160 µl aus 100 µg/ml	40
100	200 µl aus 400 µg/ml	600

Durchführung

Die Proben wurden für die Messung 1:20 und 1:40 verdünnt.

#### Pipettierschema

1:20 10 µl Pr. + 190 µl H<sub>2</sub>O<sub>odd</sub>

1:40 5 µl Pr. + 195 µl H<sub>2</sub>O<sub>odd</sub>

Je 50µl der Standard-Verdünnungsreihe und der Probenverdünnungen wurden in die *wells* der Mikrotiterplatte gegeben; Wenn es die Anzahl der Proben zuließ, wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zwei Teile Roti®-Quant (5x) wurden mit 5,5 Teilen H<sub>2</sub>O dd verdünnt und je 200µl zu den vorgelegten Standards und Proben pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei OD590 gemessen. Für die Verrechnung ( Bestimmung der Proteinmenge) mußte nun die OD595 für jede Probe gegen die eingesetzte Proteinmenge auftragen werden.

#### **2.10.4 Glycin-SDS-PAGE,Western Blot mit anschließendem ECL-Nachweis**

##### **2.10.4.1 Gel gießen: für 1 mm dicke Gele (Herstellung von SDS Gelen)**

Die Glasplatten wurden mit Äthanol 70% gereinigt und nach Anleitung des Herstellers zusammengebaut und in den Gelgießstand geklemmt. Die gewünschte Gelkonzentration für das Trenngel wurde ausgewählt und nach Pipettierschema zusammenpipettiert. (Nach Zugabe von TEMED und APS wurde wegen der beginnenden Polymerisation das Gel umgehend gegossen. Das Trenngel sollte bis etwa bis 1,5 cm unter den Rand gehen. Der Rest der Gellösung verblieb im Falcon und diente der Kontrolle der Auspolymerisierung.WEG) Das Trenngel wurde mit Isopropanol 60% überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (etwa 30 min) wurde das Isopropanol entfernt. Nach Spülen mit H<sub>2</sub>O dd wurde die Gelfront mit Filterpapierstreifen getrocknet. Die Sammelgel-Lösung wurde zusammenpipetiert, auf die Trenngelfront gegeben und der Kamm eingestzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel direkt beladen oder konnte in feuchtem Küchentuch eingewickelt in einer Plastiktüte bei 4°C gelagert werden.

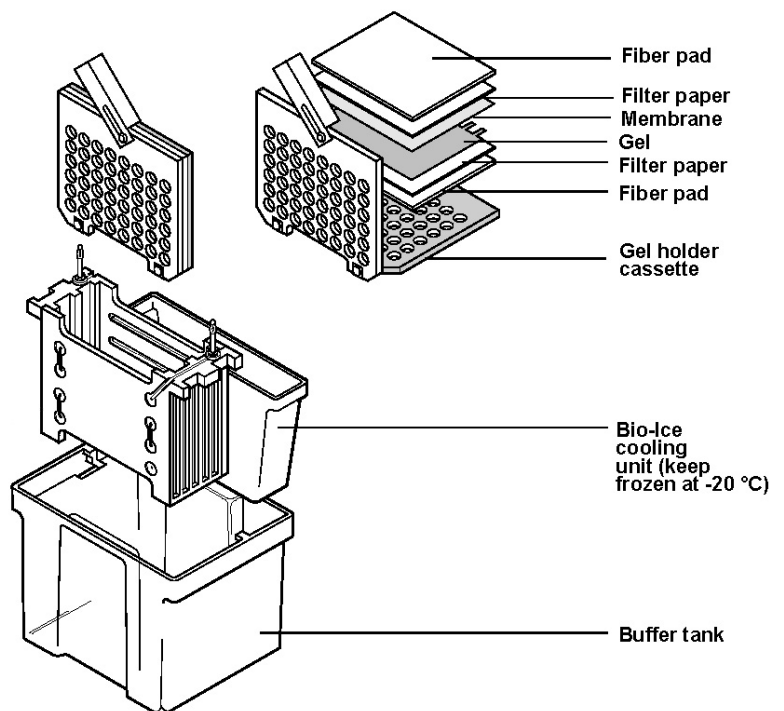
### 2.10.4.2 Pipettierschema Acrylamidgele

TG=Trenngel, SG=Sammelgel **Mengen für 2 Gele** (normal TG12% u SG4%)

	6% TG	8% TG	10% TG	12% TG	15% TG	20% TG	4% SG	6% SG
30% Acrylamid mit BIS (0,8%)	1600 µl	2134 µl	2666 µl	4000 µl	5000 µl	5334 µl	800 µl	800 µl
4 x Trenngel-puffer	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2500 µl	2500 µl	2000 µl	-----	-----
4 x Sammelgel-puffer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1500 µl	1000 µl
dd H <sub>2</sub> O	4354 µl	3820 µl	3288 µl	3300 µl	2500 µl	-----	3600 µl	2177 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	8 µl	8 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	30 µl	30 µl

### 2.10.4.3 Proben auftragen: (SDS Gelelektrophorese)

Vor dem Auftragen wurde die Proteinlösung 1:1 mit Lämmli-Puffer (2x) versetzt, die Proben für 3 min bei 95°C aufgeköcht und auf Eis gestellt. Das Gel wurde nach Anleitung in die Laufkammer eingesetzt, diese mit Elektrophoresepuffer befüllt, die Proben aufgetragen und die Kammer an die Stromquelle angeschlossen. Bei Eintritt der Laufmittelfront in das Trenngel wurde die Spannung von bisher 110V auf 200V erhöht. Nach dem Lauf wurde das Gel in Blotpuffer äquilibriert. (Für den Blot wurden die Nitrocellulosemembran der Porengröße 0,2µm und sechs Lagen Filterpapier zurechtgeschnitten.)



**Abbildung 2-9 Aufbau von Gelkammer und Blot**  
Gezeigt ist der schematische Aufbau der Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell von Bio-Rad.

#### 2.10.4.4 Coomassie-Färbung:

Die Detektionsgrenze dieser irreversiblen Färbemethode liegt bei 0,5-2 µg Protein pro Bande. Das Gel wurde mit Coomassie-Lösung übergossen, 15 min auf dem Taumelschüttler geschüttelt und im Anschluß die Lösung zurück in die Flasche gegeben. Nach zwei kurzen Waschschritten mit Entfärberlösung wurden die Waschintervalle von erst 5 min auf eine Stunde erweitert. Ein weiterer Waschschriff wurde über Nacht durchgeführt.

Das Gel konnte in der Entfärbe-Lösung aufbewahrt werden. Vor einem möglichen Trocknen des Gels sollte dieses intensiv gewässert werden, da die Essigsäure zu einem Reißen der Gele führt.

##### **Coomassie Färbelösung:** (1000 ml)

0,1% Coomassie R 250 (1 g)  
10% Essigsäure (100 ml Eisessig)  
50% EtOH (500 ml)  
mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1000 ml auffüllen

##### **Entfärberlösung für Coomassie:** (1000 ml)

7,5% Essigsäure (75 ml Eisessig)  
25% EtOH (250 ml EtOH)  
mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1000 ml auffüllen

#### 2.10.4.5 Silber-Färbung

Die Detektionsgrenze liegt bei dieser Methode bei unter einem ng pro Bande. Hierzu wurde das Gel in EtOH 50% für 15 min fixiert, anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> abgespült und 15 min unter leichtem Schütteln in der Färbelösung gefärbt. Das Gel wurde darauf in H<sub>2</sub>O überführt 5 min gewaschen und im Anschluß in die Entwicklerlösung gegeben und inkubiert, bis deutliche Banden zu sehen waren. Dann wurde die Reaktion umgehend durch Überführen in Stopperlösung beendet, das Gel dort 2 min geschwenkt und weitere 10 min in der Lösung belassen. Daraufhin konnte es getrocknet oder in Stopperlösung aufbewahrt werden.

##### **Färbelösung:** (Direkt vor Gebrauch ansetzen!)

Lösung A: 0,8 g AgNO<sub>3</sub> in 50 ml Erlenmeier geben, in 4 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen

Lösung B: 2,1 ml 1N NaOH in einen 100 ml Erlen geben, + 1,6 ml NH<sub>3</sub>, mischen

Lösung A wird langsam in Lösung B gegeben, dabei den Kolben schwenken. Es bildet sich ein brauner Niederschlag, der sich aber wieder löst. (Falls nicht, vorsichtig mit NH<sub>3</sub> nachtitrieren).

Erlenmeier bis zur 100 ml-Marke mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen.

Entwickler: (Direkt vor Gebrauch ansetzen!)

250 mg Zitronensäure in 250 ml Erlenmeier geben, mit H<sub>2</sub>O auf 250 ml auffüllen.

Zitronensäure lösen lassen.

0,8 ml Formaldehyd zugeben (37%), mischen.

Stopperlösung:

50% Äthanol oder Methanol

10% Essigsäure

#### **2.10.4.6 Blot**

Nachdem das Gel ca. 15 min und die Membran 5 min in Tank-Blotting-Buffer äquilibriert war, konnte mit dem Blotaufbau nach Anleitung, siehe Abbildung 2-9, begonnen werden. Vor dem Zusammensetzen wurden auch die Fiber-Pads und das Filterpapier jeweils mit Tank-Blotting-Buffer getränkt und die Blotklemme mit dem Eisblock in die Kammer eingesetzt. Der Transfer wurde bei 100V und 350mA für eine Stunde durchgeführt.

Nachdem das System auseinanderggebaut war, konnte der Proteintransfer durch eine Ponceau-S-Färbung (siehe 2.10.4.7) der Membran überprüft werden. Das Gel wurde verworfen oder mittels Comassie-Färbung die Menge im Gel verbliebener Proteine bestimmt.

Die Membran wurde nun für eine Stunde in 5% (w/v) NFDM in PBS Tween (0,1%) blockiert.

Im Anschluss wurde die Membran in Blockinglösung mit primärem Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 2x kurz mit PBST gespült, einmal für 15 min und noch 3x für 5 min in PBST gewaschen, bevor die Inkubation mit sekundärem Antikörper (ECL rabbit oder mouse IgG, HPR-Linked) für eine Stunde bei RT in PBST erfolgte. Darauf wurde wieder 2x kurz mit PBST gespült, einmal für 15 min und noch 3x für 5 min in PBST gewaschen. Nun konnte die Detektion in der Dunkelkammer durchgeführt werden.

#### **2.10.4.7 Ponceau S-Färbung**

Hierfür wurde der Blot mit Ponceau-S-Lösung übergossen und 15 min auf dem Taumelschüttler geschüttelt.

Die Ponceau-S-Lösung wurde abgeschüttet und die Membran wurde 2x kurz und 2x 5 min mit VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Banden sollten nun deutlich sichtbar sein.

Eine vollständige Entfärbung fand beim Blocken in NFDM statt.

#### **Ponceau-S-Färbelösung:**

0,2 g Ponceau

1 ml Eisessig

ad 100 ml mit VE-Wasser auffüllen

lagern bei 4°C und lichtgeschützt

### 2.10.4.8 Detektion: ECL-Nachweis

In der Dunkelkammer wurde die ECL Lösung zusammenpipettiert wie folgt

4 ml Reagenz A  
 + 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37%  
 + 400  $\mu$ l Reagenz B

und für 2min auf der abgetropften Membran inkubiert. Nach dem Abgießen der ECL Lösung wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Expositions-kammer eingelegt. Nach abgeschlossener Filmexposition wurde der Blot in PBS überführt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.10.4.9 Rezepte SDS-Page und Western

#### Ripa-Puffer, modifiziert (für Extrakte)

10 mM Tris	0,121 g
1 mM CaCl <sub>2</sub>	0,0147 g
0,5% NP-40	0,5 ml
0,5% Desoxycholinsäure	0,5 g
0,1% SDS	0,1 g
150 mM NaCl	0,876 g
10 mM NaF	0,042 g
25 mM $\beta$ -Glycerophosphat	0,612 g

pH 7,4, auf 100 ml  
 aliquotieren, -20 od -80°C

#### 2 x Lämmli-Puffer

125 mM Tris	757 mg	od. 6,25 ml 1 M	
4% SDS	2 g	od. 20 ml 10% ige	
20% Glycerol	10 ml		
10% $\beta$ -MercaptoÄthanol	5 ml		
2 mM EDTA	29 mg	od. 0,2 ml 0,5 M	⇒
0,04% Bromphenolblau	0,02 g		

pH 6,8 mit HCl  
 ad 50 ml mit Bidest

#### SDS-Trenngelpuffer 4x

1,5 M Tris	90,9 g
0,4% SDS	2,0 g

ad 500 ml, pH 8,8

**SDS-Sammelgelpuffer 4 x**

0,5 M Tris	15,13 g
0,4% SDS	1,0 g

ad 250 ml, pH 6,8

**10 x Elektrophoresepuffer**

250 mM Tris	151,37 g
1,92 M Glycin	720,96 g
1% SDS	50 g

pH 8,4, ad 5 l

**Tank Blotting Buffer**

		4 l
Tris	3,029 g	15 g
Glycin	11,261 g	56 g
20% Äthanol	200 ml (noch nicht zugeben, da flüchtig)	
ad 1 l		ad 4 l

pH sollte ohne Einstellen ca. pH 8,3 betragen

**Non Fat Dry Milk für ECL**

Non Fat Dry Milk	2,5 g
------------------	-------

in 50 ml PBS/Tween

**PBS 1x für ECL**

	<b>5x</b>
11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	57,5 g
2,96 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,8 g
5,84 g NaCl	22,2 g

pH 7,5, ad 1000 ml

**PBST**

PBS für ECL + 0,1% Tween 20

1 ml Tween auf 1 l PBS

**ECL-Detektion Reagenzien**

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

Lösung B 11 mg p-Hydroxycoumarinsäure  
10 ml DMSO  
dunkel, RT

### 2.10.5 Strippen von Nitrocellulose-Membranen

Um auf einem Blot einen weiteren Nachweis mit einem anderen Antikörper durchzuführen, wurden die Antikörper-Reste des vorherigen Nachweises entfernt. Hierfür wurde die Membran für 30 min bei 50°C unter leichtem Schwenken in Stripping-Puffer inkubiert und im Anschluß 2x 10 min in TBS-T (oder PBS-T, je nach vorher verwendetem Puffersystem) gewaschen. Nun wurde wieder mit 5% (w/v) NFDM in PBS Tween (0,1%) blockiert und weiter wie unter 2.10.4.6 verfahren.

#### Rezept Stripping-Puffer:

62mM Tris, pH 6,7  
2% SDS  
100mM  $\beta$ -MercaptoÄthanol

Für 100ml Stripping-Puffer:

0,757g Tris  
2g SDS  
0,7813g  $\beta$ -MercaptoÄthanol  
ad 100ml VE-H<sub>2</sub>O

## 2.11 Zellbiologische Arbeitsmethoden

### 2.11.1 Zu beachtende Arbeitsbedingungen bei Eukaryontenzellkulturen

Alle Arbeitsschritte der Präparation und Zellkultivierung erfolgten unter einer Sterilbank mit sterilisierten Geräten, steril filtrierten, autoklavierten oder bereits steril gekauften Substanzen, um eine Kontamination der Eukaryontenzellen mit Bakterien, Pilzen oder Mycoplasmen zu vermeiden.

### 2.11.2 Kultivierung der Zelllinien

Zelllinie	Medium
neuronale Primärkultur	Dulbecco's MEM / Nut Mix F12
Hybridomazellen	Hybridoma-SFM
alle weiteren Zelllinien außer DK-MG	Dulbecco's Mod Eagle Medium
DK-MG	RPMI 1640 Medium

Die Zellen wurden in 25 ml-Zellkulturflaschen mit 7 ml Medium kultiviert. Alle 3-4 Tage, wenn etwa 70-80% der Zellen konfluent waren, wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 verdünnt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Begasungs-Brutschrank bei 37°C.

### 2.11.3 Inaktivieren von Fötalem Kälberserum Albumin (FCS)

Diese Denaturierung ist unbedingt vor Gebrauch des Serums in der Zellkultur durchzuführen. Das bei -20°C gelagerte FCS wurde über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und darauf auf Raumtemperatur erwärmt. In einem auf exakt 56°C vorgewärmten Wasserbad wurde das FCS für 30 Minuten inkubiert, wobei es alle fünf Minuten leicht geschwenkt wurde. Darauf wurde es aliquotiert und kühlte langsam im Kühlschrank ab. Das FCS wurde bei -20°C gelagert.

### 2.11.4 Passagieren der Zelllinien

Medium: 10% [v/v] FCS; 200 U/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin;  
in DMEM-Medium

1 x PBS: 0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,00115 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,0065 M  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in *A. dest.*

1 x Trypsinlsg.: 10 x Trypsin/EDTA-Lösung 1:10 in 1 x PBS

Zum Passagieren der Kulturzellen in 25 ml-Zellkulturflaschen wurde zunächst das Medium abgesaugt. Danach wurde mit 1-2 ml 1 x PBS kurz gewaschen. Durch Zugabe von 1ml Trypsinlösung lösten sich die Zellen innerhalb von 1-2 min Inkubation bei 37°C vom Flaschenboden ab. Zugabe von 4 ml Medium inhibierte die enzymatische Wirkung des Trypsins. Die Zellsuspension wurde 1:4 verdünnt und in einer frischen Zellkulturflasche ausplattiert ausgesät.

### 2.11.5 Beschichten der Deckgläschen

Poly-L-Lysin-Lösung: 10 µg Poly-L-Lysin / ml *A. dest.*

In jedes Loch (*well*) einer 24-*well*-Platte wurde ein hitzesterilisiertes Glasplättchen gelegt und 20 Minuten lang mit 0,7 ml poly-L-Lysin (10 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit gründlich abgesaugt, da poly-L-Lysin toxisch wirkt. Die Plättchen sind mit einer abgeflämmten Nadel mittig positioniert worden und konnten anschließend 2 h trocknen.

### 2.11.6 Kultivierung der Zelllinien auf Deckgläschen

Medium: 10%[v/v] FCS; 200U/ml Penicillin, 50U/ml Streptomycin; in DMEM-Medium

Die Zellsuspension aus den Kulturflaschen wurde auf eine Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml mit Medium verdünnt und je 1 ml Suspension in einem *well* der 24-*well*-Platte auf ein Deckglas gegeben. Nach 4 Tagen wurden die Zellen fixiert.

### 2.11.7 Fixierung und Aufbewahrung von Kulturzellen

PFA (4%): 4% [w/v] PFA in 1 x PBS, pH 7,4

1 x PBS: 0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,00115 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,0065 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in *A. dest.*

Die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen wurden in Paraformaldehyd (PFA 4%) überführt, für 10 Minuten fixiert und anschließend zweimal in 1 x PBS gewaschen. In frischen 24-*well*-Platten wurden die Zellen in 1 x PBS bei 4°C gelagert.

## 2.11.8 Herstellung primärer hippocampaler Zellkulturen

(modifiziert nach ALKONDON und ALBUQUERQUE, 1993)

Alle im folgenden verwendeten Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz gezüchtet. Hippocampale Primärkulturen wurden aus CD-Ratten des Stadiums Fötaltag 19 (RF19) angelegt.

Da die Zellen nach Abschluss der Wachstumsphase immunhistologisch untersucht werden sollten, ohne die Zellen vom Untergrund lösen zu müssen und dabei die morphologischen Merkmale zu zerstören, wurden Glasplättchen in den *wells* untergelegt. Auf diesen waren die Zellen transportabel und das Glas ermöglichte, im Gegensatz zu Kunststoff, nach der Antikörperfärbung eine Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zellen setzen sich nicht gerne auf Glas ab, sondern bevorzugen organische Oberflächen, wie z.B. den Kunststoff der *well*-Platten. Um den Zellen ein Festsetzen zu erleichtern, wurde das Glas mit Poly-L-Lysin beschichtet.

### 2.11.8.1 Präparation der hippocampalen Region

1 x HbSS-Puffer: HbSS-Puffer (10 x) 1:10 in *A. dest*

Zur Herstellung einer hippocampalen Primärkultur wurden die Hippocampi fötaler Ratten, Tag 18/19, verwendet. Alle Präparationsschritte wurden in einem separaten Raum zur Zellkultur mit sterilem Besteck und sterilen Puffern durchgeführt.

Ein trächtiges Muttertier wurde mit CO<sub>2</sub> betäubt, durch Überstrecken des Kopfes devitalisiert und auf dem Rücken liegend fixiert. Die Ventralseite wurde mit EtOH (70%) durchtränkt. Am Unterbauch wurden nacheinander Haut und Bauchfell vorsichtig aufgeschnitten und die Darmschlingen beiseite geschoben. Die beiden langen Uterushörner, die im Durchschnitt je sechs bis sieben hintereinander aufgereichte Placenta-Anlagen mit Föten enthielten, wurden herausgenommen. Sie wurden in sterilem HBSS-Puffer aufgeschnitten, um die Föten mitsamt ihrer Fruchtblasen zu entnehmen. Auf Höhe des Mutterkuchens konnte die Fruchtblase eingeschnitten werden, ohne den Fötus zu verletzen. Der Schnitt wurde so weit fortgeführt, bis der Fötus herausfiel. Mit einer großen Pinzette wurde ein Fötus auf Brusthöhe gehalten und mit einer spitzen Schere das Rückenmark unterhalb des Hinterhauptlochs (*Foramen magnum*) durchtrennt. Nun wurde ein erster Schnitt unterhalb der noch knorpeligen Schädeldecke vom *F.magnum* bis zum Nasenrücken geführt. Dem folgten zwei Schnitte rechts und links unterhalb der Ohren vom *F.magnum* in Richtung Augen. Die beiden

entstandenen „Lappen“ ließen sich mit einer Pinzette nach vorne klappen, wodurch das Gehirn freigelegt wurde. Das Gehirn wurde mit einer gebogenen, stumpfen Pinzette durch Unterheben entnommen und in eine auf Eis stehende Petrischale mit HBSS-Puffer überführt. Durch einen kleinen sagitalen Schnitt wurden die beiden Vorderhirn-Hemisphären voneinander getrennt und von schräg hinten einzeln vom Hirnstamm abgeschnitten. An der Schnittfläche war erstmals der Hippocampus sichtbar. Dieser wurde nach Entfernen der Meningen vorsichtig herauspräpariert.

### 2.11.8.2 Vereinzeln und Auszählen der Primärkultur

1 x Trypsinlösung: 10 x Trypsin-EDTA-Lösung 1:10 in DMEM

Alle weiteren Schritte wurden in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Mit einem Skalpell oder einer feinen Schere wurden die Hippocampi zerkleinert und im Anschluss 30 Minuten in 1x Trypsin bei 37°C inkubiert. Die Proteasefunktion des Trypsins lockert den Zellverband auf und macht eine spätere Vereinzelnung der Zellen möglich. Der entstandene Zellklumpen wurde vorsichtig mit einer großen Pipette eingesogen und in 5 ml Zell-Medium gegeben, in dem er langsam nach unten sank. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nun wurden die Zellen in 2 ml Medium aufgenommen und mit z.T. über dem Bunsenbrenner verengten Pasteurpipetten dissoziiert.

Das Auszählen einer 1:10 Verdünnung der Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $1-2 \times 10^5$  Zellen in einer 24-*well*-Platte mittig auf Glasplättchen ausplattiert.

### 2.11.8.3 Kultivierung der primären hippocampalen Zellen

<u>Medium:</u>	Dulbecco's MEM / Nut Mix F12	(für neuronale Primärkultur)
	B-27 Supplement	2%[v/v]
	L-Glutamin	2,0 mmol
	200 U/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin	

Pro *well* in einer 24-*well*-Platte wurden 50 µl Zellsuspension (entspricht einer Dichte von  $1-2 \times 10^5$  Zellen) mittig auf die Glasplättchen pipettiert. Anschließend konnten die Zellen ü.N. im Inkubator allmählich absinken.

Am nächsten Tag sollten die Zellen vereinzelt liegen und keine Aggregate gebildet haben. Nun wurden die *wells* mit 1 ml Medium sehr vorsichtig aufgefüllt.

Alle zwei bis drei Tage wurde die Hälfte des Mediums durch auf 37°C vorgewärmtes, frisches ersetzt.

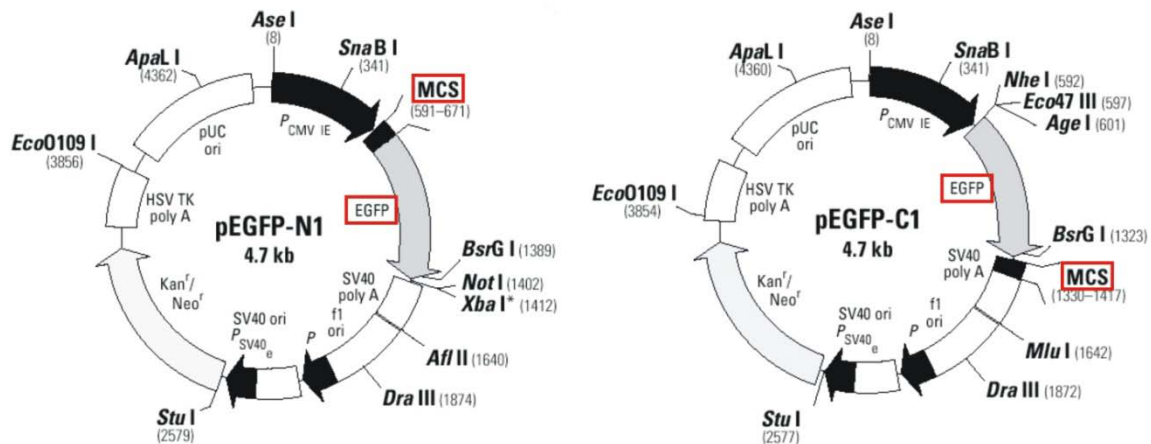
Nach sieben Tagen konnten die ersten Kulturen fixiert werden, da die Neuronen weitgehend alle Axone und Dendriten ausgebildet hatten. Mit 14 Tagen war das Maximum an Neuritenwachstum erreicht. Die Fixierung und Lagerung erfolgte wie unter 2.11.7 beschrieben.

### **2.11.9 Transfektion von Zelllinien mit pEGFP**

Die Transfektion wurde mit FuGENE™ Transfection Reagent der Firma Roche in 3cm Petrischalen mit Glasboden gemäß Protokoll durchgeführt, nach 12 Stunden fotografiert und für eine anschließende Antikörperanfärbung fixiert. Die Transfektion wurde mit Unterstützung von Jez Simpson am EMBL (European Molecular Biology Laboratory) in Heidelberg durchgeführt.

#### **2.11.9.1 pGFP- Funktionsprinzip**

Zur intrazellulären Lokalisation der beiden Globine wurde die GFP-Methode verwendet (CHALFIE *et al.*, 1994). Hierbei wird die cDNA des zu untersuchenden Gens in einem Expressionsvektor direkt vor bzw. hinter ein Gen ligiert, das für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert. Dieses Protein stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und besteht aus 238 Aminosäuren. Die hier verwendete Variante ist 27 kDa groß, und seine Extinktion liegt bei 488 nm bei einem Emissionsmaximum von 510 nm. Transfiziert



**Abbildung 2-10: Verwendete GFP-Vektoren der Firma CLONTECH Laboratories.**

Sie unterscheiden sich in der Anordnung der *multiple cloning site* (MCS) zum fluoreszenzkodierenden Gen (EGFP). Bei dem pEGFP-N1 Vektor ist die MCS N-terminal positioniert, während sie bei dem pEGFP-C1 Vektor am C Terminus des Gens liegt.

man dieses Plasmid in eine eukaryotische Zelle, führt das zu einer Überexpression des GFP-Gens und des einklonierten Gens. Da die beiden direkt hintereinander liegenden Gene vom selben Promotor transkribiert werden, müssen die Gene im gleichen Leserahmen liegen und das vordere Gen darf über kein Stoppcodon verfügen.

Neu: Die Globingene und das GFP-Gen liegen in beiden Plasmid-Varianten innerhalb eines Leserahmens direkt hintereinander und werden nicht durch ein Stoppcodon unterbrochen. Ausgehend von dem CMV-Promotor des Plasmids wird ein Transkript erstellt, von dem ein Fusionsprotein beider Gene translatiert wird (NgB-GFP, CyGB-GFP, GFP-NgB, GFP-CygB).

Die Proteine werden auch in einem Stück zusammenhängend translatiert. Besitzt das zu untersuchende Protein ein Signalpeptid, so lässt es sich in der Zelle anhand des anhaftenden grün fluoreszierenden Proteins lokalisieren.

### 2.11.10 Wegfrieren einer Zelllinie

Gefriermedium            jeweiliges Zellmedium inkl. Antibiotika, FCS (2x)

Dimethylsulfoxide (DMSO)    10% [v/v]

Zur Lagerung wurde eine Zelllinie in flüssigem Stickstoff weggefroren. Hierfür wurde ein Einfriermedium angesetzt, das die doppelte Menge FCS des normalen Zellmediums und 10% [v/v] DMSO enthielt. DMSO wirkt toxisch auf die Zellen, verhindert aber ein Platzen der Zellen beim langsamen Abkühlungsprozess. Eine zu 80% konfluent gewachsene Zellkultur in

einer 25 ml Flasche wurde wie zur Passage (siehe 2.11.4) gelöst. Die Zellsuspension konnte nun in ein 15 ml Falcon überführt und für 2 Minuten bei 180 g und 4°C zentrifugiert werden. Das Medium wurde abgesogen und das Zellpellet durch vorsichtiges Pipettieren in 5,4 ml Gefriermedium aufgenommen. Da nun die vitalen Zellen mit dem DMSO in Kontakt kamen, musste die Suspension zügig auf drei Kryoröhrchen à 1,8 ml verteilt und auf Eis gestellt werden. Über Nacht konnten die Zellen in einer Styroporbox bei -80°C komplett durchfrieren und am nächsten Tag in den flüssigen Stickstoff überführt werden.

## **2.12 Herstellung von monoklonalen Antikörpern**

Zur Gewinnung von monoklonalen Maus-Antikörpern gegen Neuroglobin wurden in der AG Burmester, Zoologie, J.G. Universität Mainz, verschiedene Antigene zur Immunisierung vorbereitet:

- 15meres Peptid (H<sub>2</sub>N-CLSSPEFLDHIRKVML-CONH<sub>2</sub>, AS: 55-70), an KLH gekoppelt
- rekombinantes Hsa NGB
- rekombinantes Hsa NGB an KLH gekoppelt

Die Immunisierung und Fusion wurde von Prof. Dr. Sigrid Saaler-Reinhardt, Institut für Physiologische Chemie, J.G.-Universität Mainz, durchgeführt und ist im Anhang detailliert beschrieben.

### **2.12.1 Makrophagenisolierung**

Die Makrophagen wurden einem nicht zu fetten BALB/c Mauseweibchen entnommen. Die Präparation fand wegen der Infektionsgefahr mit Mycoplasmen in einem von der Zellkultur abgesonderten Raum in einer sterilen Werkbank statt. Die devitalisierte Maus wurde auf dem Rücken liegend an den Vorderbeinen fixiert und das Fell mit 70% Äthanol desinfiziert. Nachdem das Fell auf der Bauchseite entfernt war, wurde seitlich in die Bauchdecke ein kleiner Schnitt gesetzt, durch den der Bauchraum mit einer Pipette dreimal mit je 1ml 1xPBS gespült wurde. Dies wurde auf der gegenüberliegenden Bauchseite wiederholt. Das aus dem Bauchraum aufgesogene PBS wurde in einem auf Eis stehenden Falcon gesammelt. Die darin enthaltenen Makrophagen wurden gezählt und anschließend zentrifugiert. Aus einem adulten Tier erhält man 1-5x10<sup>6</sup> Makrophagen, die in einer Dichte von 1x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät wurden.

Die Makrophagen können als *Feederlayer* für schlecht wachsende Klone verwendet werden, für eine Fusion oder zur Herstellung von konditioniertem Medium. Zur Konditionierung lässt man das Kulturmedium für 5-7 Tage auf den Makrophagen, was zu einer Anreicherung des Mediums mit Wachstumsfaktoren führt. Nach dem Absaugen und Zentrifugieren kann es aliquotiert und bei -20°C weggefroren werden. In ein 24er-*well* gibt man davon 1-2 Tropfen in eine 25ml Kulturflasche ½ ml.

## 2.13 Die Produktion von mAk in Kulturüberständen

Die bei der Fusion erhaltenen Hybridomzelllinien sollten für die Produktion monoklonaler Antikörper vermehrt werden. Bevor man das Volumen erhöhen konnte, mussten folgende Kriterien erfüllt werden:

1. Die Hybridomzelllinie muss monoklonal sein. Dies ist nur sichergestellt, wenn sie mindestens einmal rekloniert wurde.
2. Die Zelllinie muss homogen sein. Um zu überprüfen, ob annähernd 100% der Zellen Antikörper produzieren, werden Cytozentrifugen-Präparate angefertigt.
3. Die Immunreaktivität des Antikörpers muss im ELISA und durch Immunfluoreszenz und auf Gewebeschnitten nachgewiesen sein.

### 2.13.1 Reklonierung von Hybridomzelllinien

Bei einer Reklonierung wird jeweils eine einzige Zelle in ein *well* ausgesät und kultiviert. Bei der daraus entstehenden Zellpopulation kann man von einer 100%-igen Homogenität ausgehen. Da eine einzelne Zelle das Medium nicht konditionieren könnte und die Hybridomzellen besser in Gesellschaft wachsen, wurde einen Tag vor der Reklonierung ein *Feederlayer* aus Milzzellen ausgesät. Die Milzzellen sind um ein Vielfaches kleiner als die Hybridomzellen, so dass sie leicht von der zu klonierenden Hybridomzelle zu unterscheiden sind.

#### 2.13.1.1 Herstellung eines *Feederlayers*

Medium:           Hybridoma-SFM  
                           FBS (fetal bovine serum) 10% [v/v]  
                           L-Glutamin 2,0 mmol  
                           200 U/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin

### 2.13.1.2 Steriles Präparieren einer weiblichen Milz

Hierfür wurde einer weiblichen BALB/c Maus die Milz steril entnommen. Die devitalisierte Maus wurde auf dem Rücken liegend an den Vorderbeinen und dem rechten Hinterbein fixiert. Der Bauchraum wurde sorgfältig eröffnet und der Schnitt zur linken Seite verlängert. Hinter/unter dem linken Leberlappen befand sich die Milz. Mit einer Pinzette ließ sie sich anheben und basal durchtrennen. Das anhaftende Fettgewebe wurde vollständig entfernt und die Milz in Zellmedium überführt.

### 2.13.1.3 Ausplattieren der Milzzellen

Über ein Becherglas wurde ein autoklaviertes Nylonnetz mit einer Porenweite von 60µm gespannt. Die Milz wurde in kleine Stücke geschnitten und mit einem Stößel aus dem Inneren einer sterilen 5ml Spritze durch die Gaze passiert. Zum Spülen der Gaze wurden 10ml Medium ohne Zusätze verwendet und die zerriebenen Zellen nochmals durch mehrmaliges Resuspendieren in einer Pasteurpipette vereinzelt. 500µl dieser Milzellsuspension wurden zu 9,5ml Kulturmedium gegeben und dieser Ansatz zu je 100µl auf 96er *well* Platten verteilt. Dieser Verdünnung der Milzzellen liegt die Annahme zugrunde, dass man bei einer Milzpräparation ca.  $1 \times 10^8$  Zellen erhalte, so dass dann  $5 \times 10^4$  Milzzellen pro 96er *well* vorliegen. Die Zellen konnten sich nun über Nacht in der 96 *well*-Platte absetzen.

### 2.13.1.4 Auszählen und Ausplattieren der Hybridomzellen

Die gut gewachsenen Hybridomzellen eines 24er *wells* wurden vorsichtig ab gespült und gezählt. Die Zellen wurden so weit verdünnt, dass sich 100 Zellen in 1ml Medium befanden. Von dieser Zellsuspension wurde z.B. 1ml zu 9ml Medium gegeben und zu je 100µl auf die 96-*well* Platten mit dem am Vortag vorgelegten *Feederlayer* verteilt. Statistisch lag nun in jedem *well* eine Hybridomzelle vor. Je nach Homogenität des Klons wurden 50, 100 und 200er Verdünnungen ausplattiert.

Nach 1-3 Tagen hatten sich um die einzelnen Zellen kleine Kolonien gebildet. Jedes *well* mit nur einem Klon und Tochterzellen wurde markiert.

Nach 5-6 Tagen wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig abgesogen und durch neues ersetzt, wobei ein Aufwirbeln der Zellen erwünscht wurde.

War ein *well* zu mehr als 80% konfluent, so wurden die Zellen mit einer Pipette gründlich ab gespült und in ein 24er *well* überführt. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Das

„*Urwelt*“ wurde als *backup* auch wieder mit Medium aufgefüllt. Auf den 24er Platten wurden nur das erste und vierte *well* belegt, da der Klon beim nächsten Splitten auf *well* 2 und 3 erweitert wurde.

### 2.13.2 Cytozentrifugen-Präparat

Um die Homogenität der Zellkultur zu überprüfen, wurden  $1-2 \times 10^5$  Hybridomzellen in 200-300  $\mu$ l Medium aufgenommen und mit einer Cyto-Zentrifuge (SHANDON) bei 2000U/min 5min. auf einen fettfreien Objektträger aufgeschleudert. Das Präparat wurde nach dem Trocknen für 2 min. in Aceton bei RT fixiert und wieder trocken gelassen. Nun konnte es bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren werden. Die IgG-produzierenden Zellen konnten mit einem fluoreszierenden anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper markiert werden. Hierzu wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen durch eine Prähybridisierung mit 50  $\mu$ l PBS+10%FCS für 5min. blockiert. Nach einem Waschschrift in 1xPBS konnten die Zellen in einer dunklen, feuchten Kammer mit anti-Maus-IgG für 30 min inkubiert werden. War der Antikörper in 1xPBS abgewaschen, wurden die Zellen in Glycerol/p-Phenylendiamin (2.14.4) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

## 2.14 Immunhistologische Methoden

### 2.14.1 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

1x PBS: 10x PBS 1:10 in VE-Wasser

10x PBS: 1,3 M NaCl; 0,07 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ad. 1 l VE-Wasser; pH 7,4

Glycinpuffer: 100 mM, pH 2,5-3,0

Tris: 1M Tris, pH 9,5

$\text{NaN}_3$ -Lösung: 1mM  $\text{NaN}_3$  in 1x PBS

Die Antikörperaufreinigung der anti-NGB-Antikörper bzw. anti-CyGB-Antikörper enthaltenden Kaninchen-Antiseren erfolgte mittels einer Peptid-Säulenaufreinigung aus dem *Sulfo Link Kit* der Firma Pierce. Bei dem über Schwefelbrücken an die Säule gekoppelten Peptid handelte es sich um rekombinantes Ngb bzw. Cygb. Nachdem die im Kühlschrank aufbewahrte Säule (Vol.: 1,2 ml) auf Raumtemperatur gebracht worden war, wurde sie mit 6 ml 1x PBS pH 7,4 equilibriert. Anschließend wurde 1 ml Antiserum, das den gewünschten Antikörper enthielt, auf die Säule geladen. Sobald sich das Antiserum in die Gelmatrix

eingelagert hatte, wurden zusätzlich 0,2 ml 1x PBS dazugegeben. Auf die nun vollständig beladene Gelmatrix wurde ein weiterer Milliliter PBS gegeben. Die Säule wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Antiserum inkubiert. Danach wurde das Serum mit 16 ml 1x PBS von der Säule gewaschen. Der Antikörper wurde mit 6 ml 100 mM Glycinpuffer pH 2,5–3,0 eluiert und in 1 ml-Fraktionen gesammelt, die durch Zugabe von 50 µl 1 M Tris pH 9,5 neutralisiert wurden. Die Fraktionen wurden photometrisch bei OD<sub>280</sub> gemessen. Die Antikörper befanden sich in den Fraktionen mit der höchsten Extinktion, die typischerweise in der 4.-6. Fraktion gemessen wurde. Den ausgewählten Fraktionen wurde zur Stabilisierung 10 µl 1mM Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)-Lösung zugegeben, was einer Endkonzentration von 0,01mM NaN<sub>3</sub> entspricht. Abschließend wurde die Säule mit 16 ml 1x PBS von Proteinresten gereinigt, mit Aufbewahrungspuffer (NaN<sub>3</sub>-Lösung) equilibriert und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **2.14.2 Nachweis der Proteinexpression auf immunologischer Basis**

Bei der indirekten Immunhisto-Fluoreszenzfärbung binden Primärantikörper innerhalb eines Gewebes an ihre Epitope. Um die Primärantikörper detektieren zu können, wird ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper verwendet. Der Zweitantikörper bindet spezifisch an die F<sub>c</sub>-Fragmente der Antikörper aus einer bestimmten Spezies und kann somit verschiedene Primärantikörper, die in der gleichen Spezies generiert wurden, nachweisen. Dieser Nachweis erfolgt nach Anregung bei der für den Fluoreszenzfarbstoff spezifischen Wellenlänge mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

Zum Nachweis der Expression zweier verschiedener Proteine innerhalb des gleichen Schnittes wurden im Rahmen dieser Arbeit Doppelfärbungen durchgeführt. Zuerst wurde eine indirekte Immunfärbung mit einem der polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen durchgeführt (Tabelle 2-3 In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper). Dieser Antikörper wurde im Anschluss mit dem rot fluoreszierenden, Cy3-markierten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper detektiert (Tabelle 2-4 In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper). Anschließend wurde eine weitere Färbung mit einem Primärantikörper aus der Maus durchgeführt (Tabelle 2-3 In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper). Die Detektion des zweiten Primärantikörpers erfolgte mit Hilfe des grün fluoreszierenden, FITC-markierten anti-Maus-IgG-Antikörpers (Tabelle 2-4 In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper), der die F<sub>c</sub>-Fragmente des primären Antikörpers erkennt.

### 2.14.3 Indirekte Doppel-Immun-Fluoreszenzfärbung

**Erste Indirekte Immunfluoreszenzfärbung:** (mit polyklonalen anti-Ngb- und anti-Cygb-Antikörpern). Nach dreimaligem Waschen (einmal kurz, zweimal 10 Minuten) in 1xPBS wurden die Schnitte 20 Minuten lang mit PBS/FCS 10% [v/v] bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer präinkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurden die Objektträger rund um die Gehirnschnitte mit einem Kosmetiktuch abgewischt. Von den in PBS/FCS 10% [v/v] verdünnten Primärantikörpern wurden jeweils 70 µl auf die Schnitte pipettiert. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer im Kühlschrank (4°C) über Nacht mit dem Primärantikörper (polyklonaler anti-Ngb- bzw. anti-Cygb-Antikörper aus dem Kaninchen) inkubiert.

Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit Hilfe eines Cy3-markierten anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörpers. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in 1x PBS wurden sie mit 70 µl in PBS/FCS 10% verdünntem Sekundärantikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte eine Stunde lang bei Raumtemperatur in einer feuchten, dunklen Kammer. Anschließend wurde wieder dreimal in 1x PBS gewaschen, um ungebundene Immunglobuline zu entfernen.

**Zweite Indirekte Immunfluoreszenzfärbung:** (mit monoklonalem anti-GFAP-Antikörper) Vor der Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (monoklonaler anti-GFAP-Antikörper aus der Maus; (Tabelle 2-3 In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper), mußten die Gefrierschnitte für 10 Minuten bei -20°C in Methanol fixiert werden. Diese für den GFAP Antikörper vorgeschriebene Fixierung führte bei den Globinnachweisen zu starken Artefakten und wurde daher erst zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden pro Schnitt 70 µl des in PBS/FCS 10% [v/v] verdünnten Primärantikörpers aufgetragen. Nachdem die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, erfolgten drei Waschschrte in 1xPBS. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur in einer feuchten, dunklen Kammer für eine Stunde mit einem FITC-markierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (Tabelle 2-4 In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper) inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Immunglobuline wurden die Schnitte dreimal in 1x PBS gewaschen.



### 2.14.5 Einbetten der Zellkulturpräparate

Bei Zellkulturen, die auf Deckgläschen gewachsen waren, wurde auf einen Objektträger ein Tropfen Einbettmedium vorgelegt und mit Nagellack versiegelt. Um die Fluoreszenz möglichst intensiv und lange aufrechtzuerhalten, wurden die Schnittpräparate bei 4°C im Kühlschrank, vom Licht abgeschirmt, gelagert.

### 2.15 Mikroskopie und Fotodokumentation

Die indirekten Immun-Fluoreszenzfärbungen der hippocampalen Primärkulturen wurden an einem Stereomikroskop (Firma Zeiss: Axiophot) der AG Saaler-Reinhardt (Institut für physiologische Chemie) ausgewertet und photographisch dokumentiert. Die pEGFP-transfizierten Zellen wurden am EMBL Heidelberg mit einem Konfokalmikroskop der Firma Zeiss digital erstellt und mit Photoshop nachkolloriert mit Ausnahme der pEGFP/Antikörper-Doppelfärbungen, die auch mit dem Axiophot erstellt wurden. Mit Hilfe der Epifluoreszenzeinrichtung des Mikroskops und dreier verschiedener Filter konnten die Präparate ausgewertet werden. Um die mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat)-markierten Bereiche innerhalb der Präparate zu betrachten, wurde ein Filter, der alle Wellenlängen außer 495 nm absorbiert, verwendet. Da diese Wellenlänge im grünen Bereich des Spektrums liegt, zeigen Strukturen, die vom FITC-markierten Sekundärantikörper detektiert wurden, eine grüne Fluoreszenz. Um die Fluoreszenz von Cy3 (Indigocarbo $\text{cyanin}$  3) betrachten zu können, wurde ein Filter ausgewählt, der durchlässig für Licht der Wellenlänge 530-570 nm ist. Dieser Teil des Spektrums ist rot, was folglich zu einer roten Färbung aller durch Cy3 markierter Strukturen führt. Die Zellkerne der Gewebeschnitte waren mit DAPI angefärbt worden, was durch Licht der Wellenlänge 300-380 nm angeregt wird. Je nach Art des Filters kann der Fluoreszenz eine unterschiedliche Farbe zugewiesen werden, da alle Wellenlängen unterhalb von 400 nm im ultra-violetten Bereich sind und somit im für den Menschen nicht sichtbaren Spektrum liegen.

Alle indirekten Fluoreszenzfärbungen der Primärkulturen und der pEGFP/Antikörperdoppelfärbungen wurden mit einem 40x Öl-Immersionsobjektiv betrachtet. Bereiche, die in Hinsicht auf die Themenstellung interessant waren, wurden hintereinander mit den drei verschiedenen Filtern abfotografiert. Die Filme wurden von der Firma Prisma als Farbdiasitive entwickelt. Mit Hilfe eines Diascanners (Nikon Coolscann 4000) der Firma Nikon wurden die Fotos gescannt.

Die Dokumentation der HE-Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops der Firma Zeiss aus der AG Technau. Es wurde stets ein 10x Objektiv verwendet. Das Mikroskop enthält eine Digitalkamera, so dass alle angefertigten Fotos in digitalisierter Form vorlagen. Die Bearbeitung aller verwendeten Fotos erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop CS3.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Quantitative Messung der Globin-Expression während der Entwicklung des Säugergehirns

##### 3.1.1 Validierung der Assays für die quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR)

Vor dem Einsatz der Proben in der qRT-PCR wurde die Funktionalität aller *Assays* getestet. Für *NGB* stand eine *minor groove binder* TaqMan-Sonde zur Verfügung, alle weiteren Gene wurden mit SYBR® Green quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden Plasmide vorgegebener Kopiezahlen (Plasmidstandards), Leerkontrollen (NTCs – *No Template Controls*) und cDNA-Proben eingesetzt. Eine Übersicht aller Primer-Sequenzen ist in Tabelle 2-2 zu finden.

**Tabelle 3-1: qPCR-Assays mit Gen, Nachweismethode und Quelle**

Gen	Nachweis	Quelle
Neuroglobin ( <i>Ngb</i> )	TaqMan Sonde	Gerlach / Laufs
Cytoglobin ( <i>Cygb</i> )	SYBR® Green	Gerlach / Laufs
Histon <i>H2a</i>	SYBR® Green	ROBERTS ET AL., 2002
Neurofilament light ( <i>NF-L</i> )	SYBR® Green	Laufs
Neuronenspezifische Enolase ( <i>Nse</i> )	SYBR® Green	Laufs

Die *NGB*- (und *CyGB*-) *Primer* einschließlich der Sonden wurden zusammen mit Frank Gerlach (Diplomarbeit 2002 „Molekulare Charakterisierung der Globingene Neuroglobin und Cytoglobin bei *Spalax ehrenbergi*“) entwickelt und sowohl für TaqMan®-Sonden- wie auch SYBR® Green-*Assays* verwendet. Die weiteren *Assays* wurden selbst erstellt und getestet.

##### 3.1.2 mRNA-Expressionsanalyse im Verlauf der Entwicklung des Säugergehirns

Die Analyse der Expression beider Globine während der Entwicklung des Mäuse-Nervensystems wurde bereits in der Diplomarbeit von H. WITAN immunhistologisch durchgeführt (WITAN 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die mRNA Expression während der Entwicklung quantitativ untersucht werden. Hierzu wurden Föten verschiedener Entwicklungsstadien präpariert. Das früheste präparierte Fötalstadium war MF10 (10,5-11 p.c.). Bei diesen Tieren wurde die komplette craniale Region zur RNA-Extraktion verwendet.

Ab dem Fötalstadium MF15 (14,5-15 p.c.) wurde nur das Hirn präparativ entfernt und die RNA extrahiert. Weitere Stadien waren MF19 (19-20 p.c.), der Tag vor der Geburt und T1,

**Tabelle 3-2: Probenzahl pro Entwicklungsstadium**

Die Tabelle zeigt die Anzahl der Föten, die pro Entwicklungsstadium untersucht wurden.

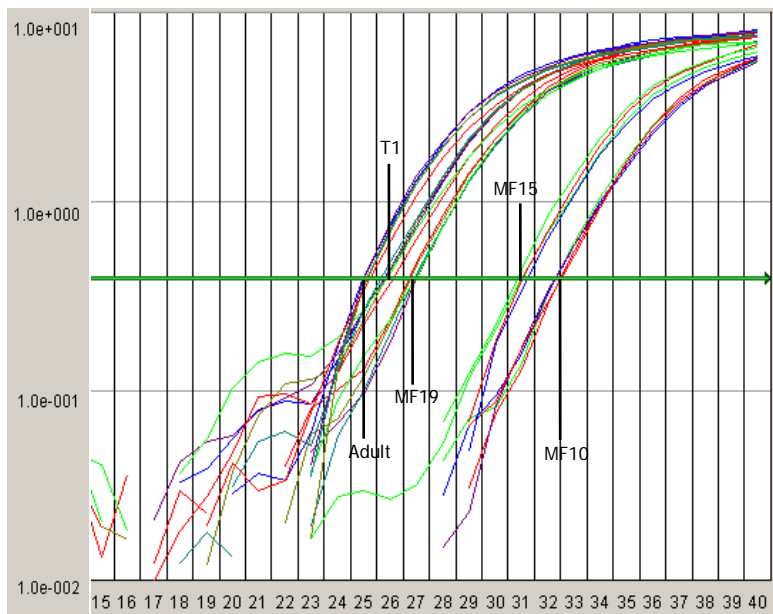
Stadium	Probenzahl
MF10	6
MF15	6
MF19	9
T1	8
Adult	3 (6 Hälften)

der Tag nach der Geburt. Zum Vergleich der Grundexpression wurden Hirne von drei adulten Tieren präpariert, die linke und rechte Hirnhälfte aber getrennt zur RNA-Extraktion verwendet. Für alle Stadien wurde von mindestens sechs Tieren die RNA einzeln mit dem RNeasy MiniPräp (Qiagen) präpariert. Die Qualität der gewonnenen RNA wurde auf einem Agarosegel getestet und anschließend je 1µg RNA zu cDNA revers transkribiert.

Die Normalisierung der Proben erfolgte durch Angleichen der RNA-Konzentration vor der reversen Transkription. Hierbei wird hauptsächlich die rRNA gemessen, die in den kommerziellen RNA-PräparationsKits 95% der Gesamt-RNA ausmacht (BUSTIN ET AL 2002).

Der erste Entnahmezeitpunkt der Föten lag im Entwicklungsstadium MF10. Die Probenzahl lag bei sechs. Die Probendubletts gruppierten für *Ngb* um die Zyklen 32/33.

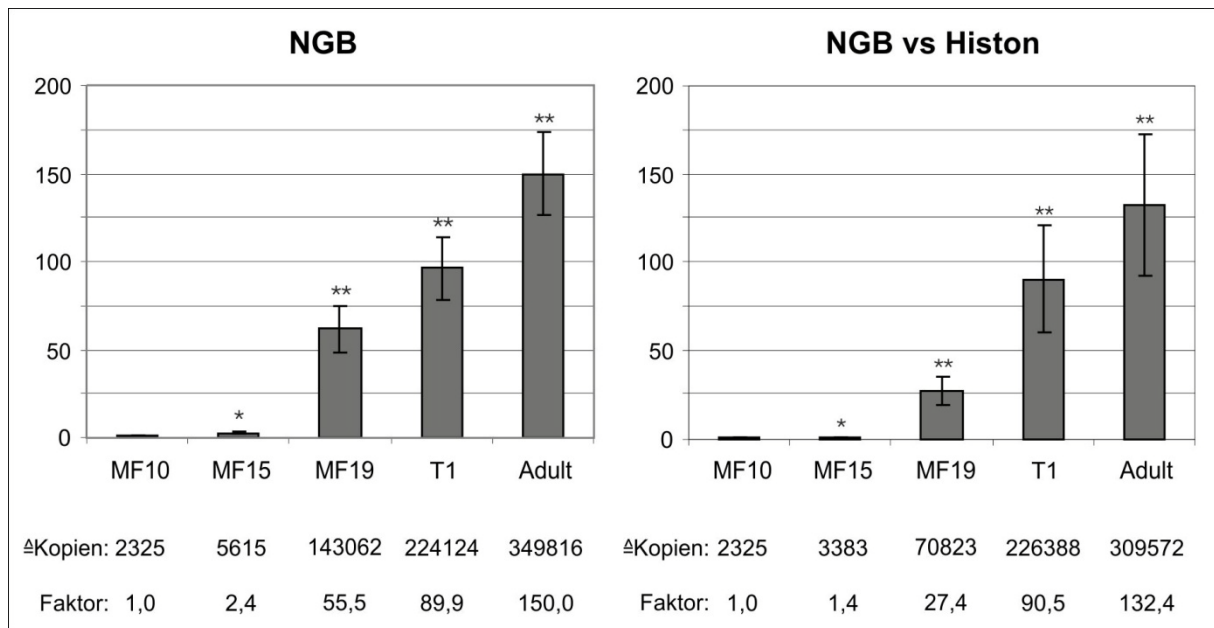
Die sechs Proben der Tiere des MF15 erreichten den Schwellenwert bei Zyklus 31. Im Stadium MF19 waren es neun Föten bei Zyklus 26/27. Die nächste Präparation erfolgte am Morgen nach der Geburt (T1). Der Wurf bestand aus acht Jungtieren und die *NGB*-Expression lag mit einem ct-Wert von 26 knapp über dem Wert der Föten des Stadiums MF19.



**Abbildung 3-1: NGB-Assay aller untersuchter Entwicklungsstadien.**

Die NGB-Expression liegt in Föten des Stadiums MF10 bei einem Ct-Wert von 32/33 und steigt bis zu den Adulttieren auf den Wert 25 an.  $N > 6$ ; \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$

Die RNA Extraktion der drei Adultthirne, bei der jede Hälfte einzeln präpariert worden war, wurde aufgrund von Problemen mit verstopfenden minipräp-Säulen und der RNA Qualität in einem größeren Volumen durchgeführt (RNeasy-midipräp, Qiagen). Alle Proben lagen darauf bei einem Ct-Wert von 25. Einen Vergleich aller Stadien zeigt Abbildung 3-1. Hierfür wurden zur besseren Übersicht nicht alle Proben in den *Amplification Plot* mit aufgenommen. Die NGB-Expression stieg in der Entwicklung stetig an. Im frühesten untersuchten Stadium MF10 lag *Ngb* bei 2325 gemessenen mRNA Kopien. Bis zum MF15-Wert stieg die Expression um den Faktor 2,4 auf 5615 Kopien an. Zum Entnahmepunkt MF19 folgte ein starker Anstieg der *Ngb*-mRNA auf 143.000 Kopien, was einer Steigerung um den Faktor 55 entspricht bzw. vom vorherigen Stadium MF15 um einen Faktor von 25,5. Bis zum Stadium T1 nach der Geburt nimmt die Kopienzahl auf 224.100 Kopien zu, was einem Anstieg um den Faktor 90 vom Fötalstadium MF10 gleichsteht bzw. um den Faktor 1,6 zum Stadium MF19. In den folgenden sieben Wochen der nun jungadulten Mäuse, stieg die Expression nochmals auf 349.800 mRNA-Kopien an. Im Vergleich zum Fötaltag 10 stellt dies ein Anstieg um den Faktor 150 dar, zum Tag1 nach der Geburt um den Faktor 1,6. Die Verrechnung mit dem ausgewählten Haushaltsgen Histon *H2a* führte zu einem ausgeglichenerem Anstieg der *Ngb*-Expression.

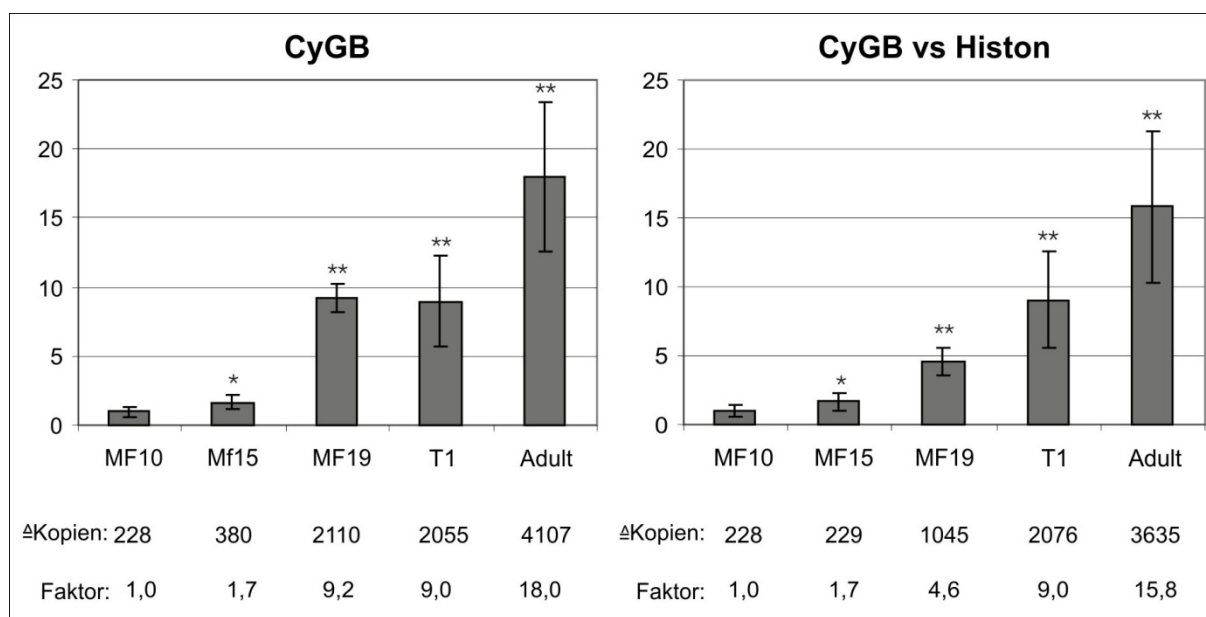


**Abbildung 3-2: *Ngb* Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus**

Expressionsstärke von *Ngb* relativ zum Entwicklungsstadium MF10. Darunter sind die absoluten Molekülmengen in 50ng revers transkribierter Gesamt-RNA und der Faktor der Regulation dargestellt. Im rechten Diagramm wurden die gemessenen Werte mit den Daten des nicht regulierten Gens Histon H2a verrechnet. Bei den Standardabweichungen des rechten Diagramms handelt es sich um SEM-Werte (*standard error of mean*), die nach dem qBASE *manual* ermittelt wurden. N>6; \*p<0,01; \*\*p<0,001

Vom Entnahmezeitpunkt MF15 zu MF19 steigt die Expression nun um den Faktor 19,6. Über den Zeitraum der Geburt erhöht sich die *Ngb* mRNA-Menge um den Faktor 3,2 und vom Tag der Geburt bis zum Adulttier nochmals um den Faktor 1,4. Verglichen zum Fötaltag 10 entspricht der Wert der Adulttiere einem Anstieg um den Faktor 132.

Bei Cytoglobin zeigte der *Amplification Plot* einen ähnlichen Verlauf mit einem steten Anstieg bis zum Adultstadium. Die relative Expressionsstärke zum Tag MF10 ist in Abbildung 3-3: dargestellt. *Cygb* ist auch schon ab dem Tag MF10 nachweisbar, doch nur in etwa 1/10 der Kopienzahl, die bei *Ngb* meßbar war. Der Anstieg während der Embryonalentwicklung verläuft nicht so steil wie bei *Ngb*, so dass zwischen dem Tag MF10 (228) und den gemessenen mRNA-Kopienzahlen in den Adulthirnen (4107) nur ein Zuwachs um den Faktor 18 vorliegt. Auch bei *Cygb* führt die Verrechnung der gemessenen Werte mit *H2a* zu einem gleichmäßigeren Verlauf des mRNA-Zuwachses. Deutlich wird dies vor allem bei dem Meßwert am Tag MF19. Dieser liegt vor der Verrechnung mit 2110 Kopien etwas über dem des Geburtstages T1 mit 2055 Kopien. Der Verlauf der *Cygb*-Expression nach Normalisierung mit *H2a* korreliert mit der Messung des *Cygb*-Proteins und spiegelt sich auch in der Literatur wider (MAMMEN ET AL 2006).



**Abbildung 3-3: *Cygb* Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus**

Expressionsstärke von *Cygb* relativ zum Entwicklungsstadium MF10. Darunter sind die absoluten Molekülmengen in 50ng revers transkribierter Gesamt-RNA und der Faktor der Regulation dargestellt. Im rechten Diagramm wurden die gemessenen Werte mit den Daten des nicht regulierten Gens Histon *H2a* verrechnet. Bei den Standardabweichungen des rechten Diagramms handelt es sich um SEM-Werte (*standard error of mean*), die nach dem qBASE *manual* ermittelt wurden.  $N > 6$ ; \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$

Geht man bei einer neuronalen Zelle von einem gesamt-RNA Gehalt von 15pg aus (vergl. LODISH ET AL., 2001), so läßt sich annähernd die mRNA Kopienzahl pro Zelle bestimmen. Diese Werte sind der Tabelle 3-3: Die mRNAs pro Zelle und die Faktoren der relativen Regulation der einzelnen Gene zu ihrem Grundwert im Stadium MF10. zu entnehmen. Da für das Gen *Cygb* bekannt ist, dass es nur in sehr distinkten Zellen im Säugerhirn exprimiert wird, müssen die Zahlen kritisch diskutiert werden (SCHMIDT ET AL., 2004).

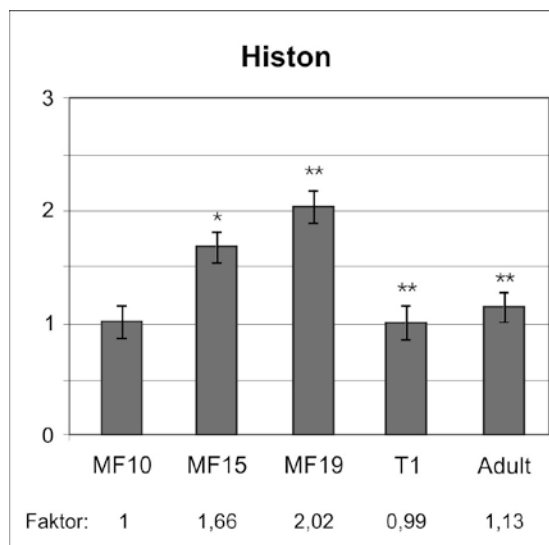
**Tabelle 3-3: Die mRNAs pro Zelle und die Faktoren der relativen Regulation der einzelnen Gene zu ihrem Grundwert im Stadium MF10.**

Der Berechnung der mRNA pro Zelle liegt die Annahme zugrunde, eine neuronale Zelle habe einen gesamt-RNA Gehalt von 15pg (vergl. LODISH ET AL., 2001).

Gen	<i>Ngb</i>		<i>Cygb</i>		<i>NSE</i>		<i>NF-L</i>	
	mRNA: Zelle	Faktor	mRNA: Zelle	Faktor	mRNA: Zelle	Faktor	mRNA: Zelle	Faktor
MF10	0,70	1	0,07	1	0,05	1	13,72	1
MF15	1,68	2,41	0,11	1,66	0,36	7,48	20,80	1,52
MF19	42,92	55,49	0,63	9,22	5,15	107,75	78,53	5,72
T1	67,24	89,76	0,62	8,98	4,92	102,82	41,05	2,99
Adult	104,96	150,44	1,23	17,95	27,91	583,78	69,12	5,04

Zusätzlich zu der Normalisierung der Proben auf die Gesamt-RNA/cDNA sollte für entsprechende Normalisierungsschritte ein nicht reguliertes sogenanntes Referenzgen (oder Haushaltsgen bzw. *housekeeping gene*) identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein Gen, das ungeachtet der physiologischen Umstände immer die gleiche Expressionsstärke zeigt. Dies stellt eine weitere Möglichkeit dar, gemessene Expressionsschwankungen der Zielgene zu verifizieren und sicherzustellen, dass es sich nicht um Artefakte handelt, die auf unterschiedliche RNA Qualitäten bzw. Mengen zurückzuführen sind. In der Literatur konnte kein Haushaltsgen ermittelt werden, das zur Untersuchung der mRNA-Expression während der Säugerhirn Entwicklung mit der Realtime q-PCR erfolgreich verwendet werden konnte.

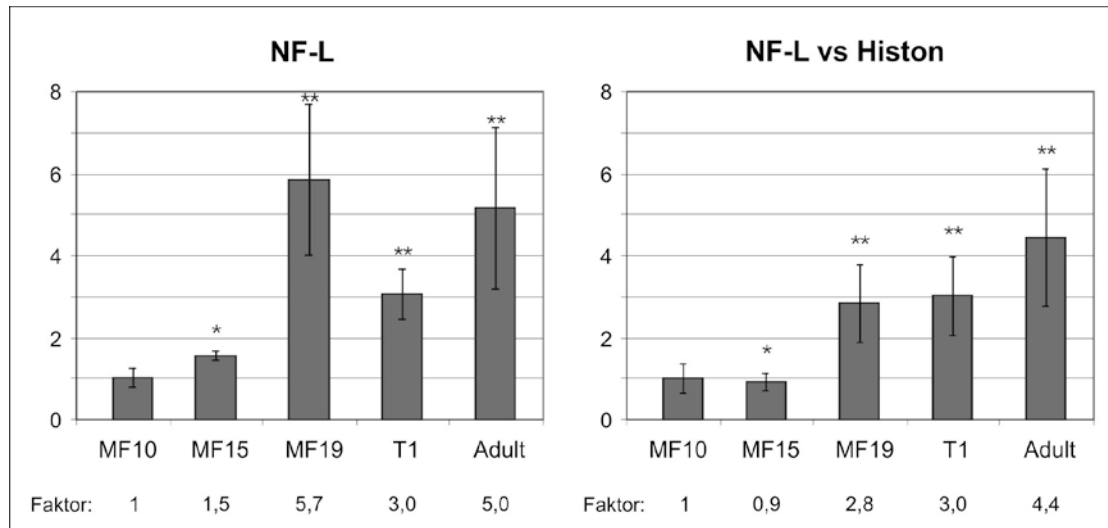
- Verrechnet wurden die Werte von *Ngb* und *Cygb* mit der ermittelten Expression von Histon *H2a*. Dieses Gen war von allen getesteten potentiellen Haushaltsgenen das stabilste. In der Publikation wurde dieses Gen bei der Entwicklung von präimplantierten Rinderembryonen untersucht (ROBERT 2002). Dort wurde Histon *H2a* als gleichmäßig exprimiertes Gen beschrieben.



**Abbildung 3-4: Histon *H2a*-Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus**  
 Expressionsstärke von *Cygb* relativ zum Entwicklungsstadium MF10. Darunter sind die Faktoren der Regulation dargestellt.

Da zum Zeitpunkt der RNA-Gewinnung und cDNA-Synthese noch kein geeignetes Haushaltsgen ermittelt war, wurde standardmäßig für die reverse Transkription ein Poly-T-Primer verwendet. Histon *H2a* zählt aber zu den Genen, deren mRNA kein Poly-A-Ende besitzt. PCR-Tests mit anschließender Sequenzierung der Amplifikate zeigten jedoch, dass bei der reversen Transkription mit Poly-T-Primern auch Histon-mRNA zu cDNA umgeschrieben wurde. Zudem konnte die in der Realtime qPCR

amplifizierte *H2a* Sequenz erfolgreich kloniert und sequenziert werden. Q-PCR-Tests belegten eine niedrige aber konstante Expression.

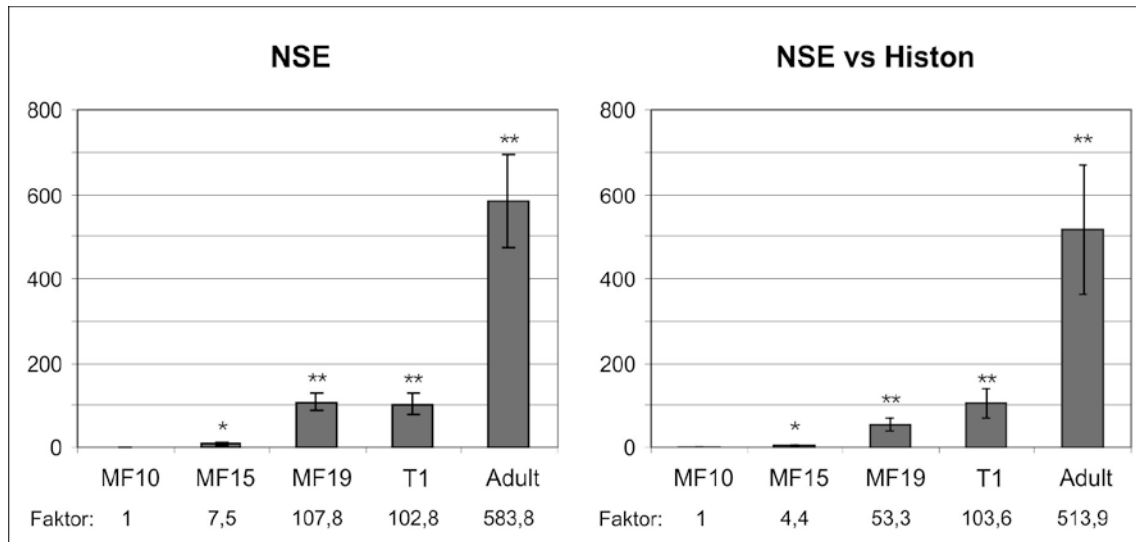


**Abbildung 3-5: *NF-L*-Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus**

Expressionsstärke von *NF-L* relativ zum Entwicklungsstadium MF10. Darunter sind die Faktoren der Regulation dargestellt. Im rechten Diagramm wurden die gemessenen Werte mit den Daten des nicht regulierten Gens Histon *H2a* verrechnet. Bei den Standardabweichungen des rechten Diagramms handelt es sich um SEM-Werte (*standard error of mean*), die nach dem qBASE *manual* ermittelt wurden.  $N > 6$ ; \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$

- WARRINGTON, beschreibt Neurofilament-L (*NF-L*) als eines von 47 Genen, das sowohl in fötalem wie auch adultem menschlichem Gewebe gleich stark exprimiert werde (WARRINGTON ET AL., 2000). *NF-L* ist eines von drei Stützproteinen der Nervenzellen. Das Gen gäbe durch seine Spezifität für Neuronen gleichzeitig einen Hinweis auf deren Stoffwechselaktivität bzw. Zuwachs während der Entwicklung des Nervensystems (CHARRON ET AL., 95). Die Untersuchung ergab jedoch über den Verlauf der Entwicklung einen schwachen Expressionsanstieg um den Faktor 5. Für eine Normalisierung der Proben als Haushaltsgen war *NF-L* nicht zu gebrauchen.
- Als weiteres potentielles Haushaltsgen wurde die Neuronenspezifische Eno<sup>l</sup>ase (*NSE*) getestet. Sie sollte als neuronenspezifisches Gen auch den Verlauf der Neuronenentwicklung widerspiegeln. Dieses Gen ist über den Verlauf der Säugerhirnentwicklung jedoch sehr stark reguliert und somit für eine Verrechnung ungeeignet. Zudem wurde sie mittlerweile auch in Fibroblasten nachgewiesen (SENSENBRENNER ET AL., 1997; DELOULME ET AL., 1996). *NSE* zeigte während der Entwicklung einen noch ausgeprägteren Zuwachs an Expressionsstärke als *Ngb* und *Cygb*. Zu berücksichtigen ist bei diesem Anstieg die zusätzliche mengenmäßige

Verschiebung der Neurone zu den sich ab Tag 15/16 ausbildenden Gliazellen. Diese verfügen über kein *NSE*, bilden aber im ausgewachsenen Tier einen Anteil von 50-80% am Gesamtvolumen des Gehirns (MAGISTRETTI ET AL., 1999)



#### Abbildung 3-6 *NSE*-Expression im Hirn während der Entwicklung der Maus

Expressionsstärke von *NSE* relativ zum Entwicklungsstadium MF10. Darunter sind die Faktoren der Regulation dargestellt. Im rechten Diagramm wurden die gemessenen Werte mit den Daten des nicht regulierten Gens Histon *H2a* verrechnet. Bei den Standardabweichungen des rechten Diagramms handelt es sich um SEM-Werte (*standard error of mean*), die nach dem qBASE *manual* ermittelt wurden. N>6; \*p<0,01; \*\*p<0,001

### 3.1.3 Quantifizierung der Protein-Expression von Cygb während der Entwicklung des Säugergehirns

Für die Bestimmung der Proteinexpression im Verlaufe der Entwicklung des Säugergehirns wurden die Hirne von Föten der Entwicklungsstadien MF15 und MF19, Neugeborenen (T1) und Adulttieren entnommen. Der Gesamtproteinextrakt wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf einen Western-Blot transferiert und im Anschluß mit einem polyklonalen Anti-Cygb Antiserum detektiert (anti-Cygb-1N, polyklonal Hsa-Peptid 2-16, Eurogentec, Belgien). Zur Kontrolle gleichmäßiger Beladung der Spuren wurde beta-Actin nachgewiesen.

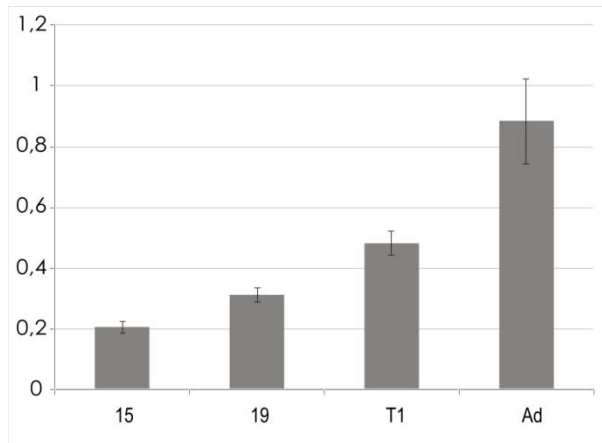


**Abbildung 3-7: Cytoglobin und β-Actinexpression in den Maus-Entwicklungsstadien MF15, MF19, T1 und Adult.**

Aufgetragen wurden 150µg Gesamtprotein aus Kompletthirnen. Deutlich ist eine Zunahme der Intensität der Banden im Verlauf der Entwicklung zu erkennen. Das rekombinante (rek) Cygb-Protein entspricht 100ng. Die Bande bei 24 kDa entspricht der zu erwartenden Größe für Cygb. Rekombinantes Aktin-Protein wurde nicht aufgetragen. Die erwartete Lauffront liegt bei 42 kDa.

Deutlich kann man bei den aufgetragenen Proben einen Anstieg der Proteinexpression im Vergleich der Stadien gegeneinander erkennen. Zwischen den Individuen eines Stadiums ist die nachgewiesene Proteinmenge gleich. Klar setzen sich alle drei Adultproben in der Expressionsstärke ab.

Die Quantitative Auswertung der Western Blot-Signale ist in Abbildung 3-8 dargestellt. Der Anstieg bezogen auf den geringsten Wert (MF15) beträgt zu MF19 1,5-fach, zum Tag nach der Geburt (T1) 2,4-fach und zum Adulttier 4,3-fach. Der große Zuwachs vom T1 zum Adulttier beträgt 1,8-fach. Die Messwerte verdeutlichen den optischen Eindruck der starken Zunahme an CyGB im Verlauf der Entwicklung des Säugergehirns bis zum Adulttier.



#### **Abbildung 3-8: Quantifizierung der CyGB Expression**

Mit dem Programm „KODAK 1D Imaging software“, V3.6.5 wurden die Banden der Westernblots quantifiziert und die Globinexpression auf die Expression des  $\beta$ -Actins normalisiert.

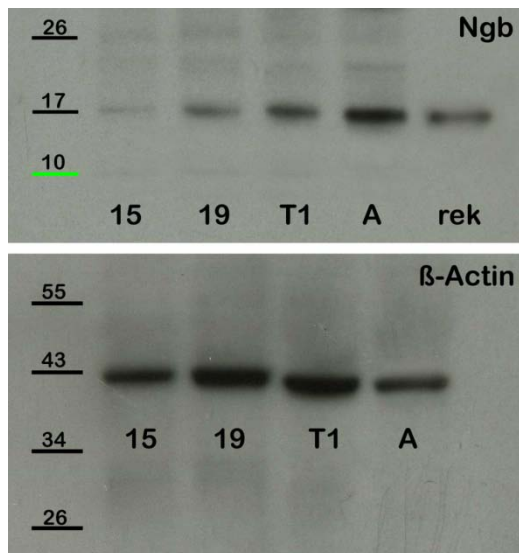
Cytoglobin zeigt einen konstanten Anstieg der Expression im Verlauf der Embryonalentwicklung über den Tag der Geburt bis zum Adulttier.

Beta-Actin sollte in allen Proben in gleicher Stärke vorhanden sein. Schwankungen innerhalb einer Gruppe bzw. zwischen Entwicklungsstadien weisen auf Pipettierfehler oder Ungenauigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung durch Bradford hin und können mit Cygb verrechnet werden.

Der Westernblots wurde mit dem Programm „KODAK 1D Imaging software“, V3.6.5 quantifiziert und die Globinexpression auf die Expression des  $\beta$ -Actins normalisiert.

#### **3.1.4 Quantifizierung der Protein-Expression von Ngb während der Entwicklung des Säugergehirns**

Die Untersuchung der Ngb-Expression stellte auf Grund des Fehlens eines im Western Blot konstant funktionierenden anti-Ngb-Antiserums ein großes Problem dar. In unzähligen Untersuchungen konnte ein durchaus klar definiertes Expressionsmuster erarbeitet werden; ein Blot mit jeweils drei Proben pro Stadium konnte dennoch nicht generiert werden. Auch bei Ngb wurde in Übereinstimmung mit den Daten der qPCR der Anstieg der Proteinexpression eindeutig nachgewiesen.

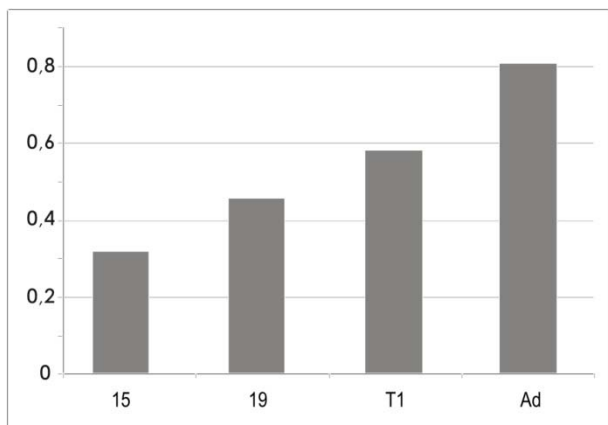


**Abbildung 3-9: Neuroglobin und  $\beta$ -Actinexpression in den Maus-Entwicklungsstadien MF15, MF19, T1 und Adult.**

Aufgetragen wurden 100 $\mu$ g Gesamtprotein aus Kompletthirnen. Wie bei Cygb nimmt die Menge an gemessenem Protein von MF15 bis hin zum Adulttier kontinuierlich zu. Das rekombinante Ngb-Protein entspricht 100ng. Die erwartete Bande für Ngb liegt bei 17 kDa. Rekombinantes Aktin-Protein wurde nicht aufgetragen. Die erwartete Lauffront liegt bei 42 kDa.

Auch für den Ngb-Nachweis wurde anschließend eine Vergleichsfärbung mit anti-beta-Actin durchgeführt. Die leichten Schwankungen, vor allem die etwas schwächere Ausprägung der Adulten beta-Actin-Bande muß in die Auswertung für Ngb mit einbezogen werden, verstärkt aber nur den klaren Nachweis einer erhöhten Ngb-Expression im Hirn adulter Mäuse im Vergleich zu Neugeborenen bzw. Föten.

Der Anstieg bezogen auf den geringsten Wert (MF15) beträgt zu MF19 1,4-fach, zum Tag nach der Geburt (T1) 1,8-fach und zum Adulttier 2,5-fach. Der Zuwachs von T1 zum Adulttier beträgt 1,3-fach. Die Messwerte verdeutlichen den optischen Eindruck der konstanten Zunahme an NGB im Verlauf der Entwicklung des Säugerhirns bis zum Adulttier. Im Vergleich zu CyGB verläuft der Anstieg bei NGB flacher.



**Abbildung 3-10 Quantifizierung der NGB Expression**

Mit dem Programm „KODAK 1D Imaging software“, V3.6.5 wurden die Banden der Westernblots quantifiziert und die Globinexpression gegen die konstante Expression des  $\beta$ -Actins verrechnet.

### 3.2 Immunhistologische Detektion der *Ngb*/*Cygb* Expression in Neuronen

Untersuchungen der mRNA-Expression von *Ngb* an adulten Maus-Gehirnschnitten mit der Methode der mRNA-*in situ*-Hybridisierung hatten den Hippocampus als eine Region identifiziert, die im Vergleich zum umliegenden Gewebe ein erhöhtes Maß an *Ngb* aufwies (BURMESTER ET AL., 2000). In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die beiden Globine neuronenspezifisch exprimiert werden oder auch in den umgebenden Gliazellen vorhanden sind, um über eine zellspezifische Expression Rückschlüsse auf ihre Funktion ziehen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu dem Versuchstier Ratte gewechselt und dessen hippocampale Region kultiviert, um eine größere Zahl Neurone pro Präparation zu erhalten. Es wurden pränatale Ratten (Ratte Fötal 17/18) präpariert, da Neurone in diesem Stadium der Entwicklung noch nicht den Großteil ihrer Neuriten ausgebildet haben. Dies führt dazu, dass sie nach dem Herauslösen aus dem Zellverband umgehend neue Fortsätze bilden, um sich mit den umliegenden Zellen neu zu verbinden (ALKONDON ET AL., 1994). Postnatal verlieren Neurone diese regenerative Fähigkeit mit zunehmendem Alter.

Ein weiterer Vorteil des Entnahmezeitpunktes stellt die zahlenmäßige Verteilung von Neuronen und Gliazellen dar. Obwohl die Gliogenese fast zeitgleich mit der Neurogenese beginnt, sind anfangs nur Radialgliazellen vorhanden, an deren Ausläufern entlang die entstehenden Neurone und Gliazellen aus der Subventrikularzone wandern. Während die Haupt-Mitosephase der Neuronen, die sich durch einen exponentiellen Zuwachs in der Subventrikularzone auszeichnet, am PC17 schon vorbei ist, steht diese für die Astroglia noch am Anfang. Ab PC16 läßt sich auch erstmals das *Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP) nachweisen. GFAP ist ein Astroglia spezifisches Protein aus dem die Intermediärfilamente gebildet werden. Diese verleihen den Astroglia eine gewisse strukturelle Festigkeit, so dass sie Nervenzellen mechanisch unterstützen können. Durch den immunhistochemischen Nachweis von GFAP können Astrogliazellen eindeutig identifiziert werden (BIGNAMI UND DAHL, 1974; LEVITT UND RAKIC, 1980).

Da die Neurone zum Zeitpunkt RF17/18 schon postmitotisch waren, nahm Ihre Zahl nicht mehr zu, während die mitpräparierten Gliazellen auch in Kultur teilungsfähig blieben. Nach 13 Tagen war die Generierung der Neurite weitgehend abgeschlossen. Ein weiterer Verbleib in Kultur hätte nur eine Vermehrung der Gliazellen und ein Überwuchern der Neuronen zur Folge gehabt. Zu diesem Zeitpunkt lag in der Zellkultur etwa eine Verteilung von 80% Neuronen zu 20% Gliazellen vor, wobei an den Rändern der Deckgläschen noch weitgehend gliafreie Bereiche vorhanden waren. Dies war auch lichtmikroskopisch sichtbar. Die Neurone

hatten sich dabei eher zu Clustern zusammengelagert und waren durch ihr bipolares Erscheinungsbild klar von den fibrillären Gliazellen, die im Verlauf der Kultivierung darüber eine zweite flache Zellschicht gebildet hatten, zu unterscheiden.

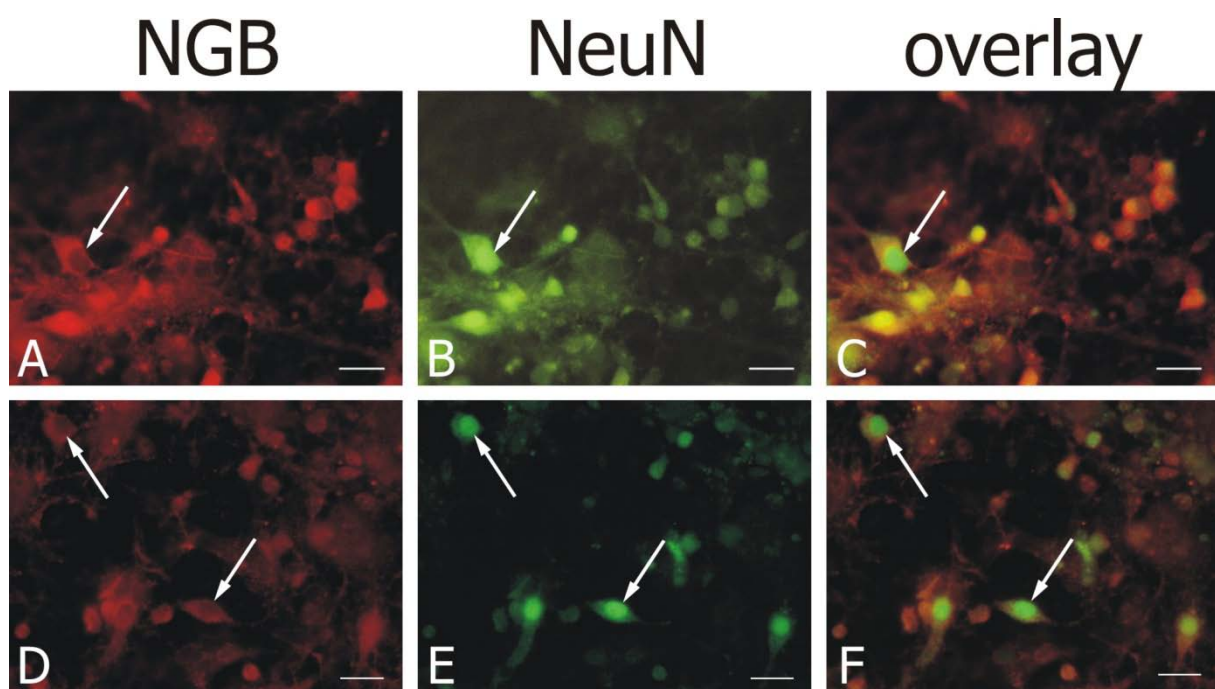
In den fixierten Primärkulturen wurde immunhistologisch die Expression von Ngb mit einem polyklonalen anti-Ngb-Antiserum aus Kaninchen nachgewiesen, der gegen ein synthetisches Maus Ngb-Peptid gerichtet war (WYSTUB ET AL., 2003; Mmu Peptid 55-70). Für die Detektion von Cygb wurden zwei polyklonale Cygb-Antiseren verwendet, die gegen die rekombinanten Bereiche Hsa Peptid 66-80 und Hsa Peptid 92-106 gerichtet erzeugt wurden (SCHMIDT ET AL., 2003). Als Sekundärantikörper wurde stets Cy3-markierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet. Indirekte Doppelfärbungen mit einem monoklonalen anti-Neurofilament (NeuN) Antikörper aus der Maus oder einem monoklonalen anti-*Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP)-Antikörper aus der Maus ermöglichten die Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen der Kultur. Diese monoklonalen Antikörper wurden mit einem FITC-markierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper aus dem Schaf nachgewiesen. Parallel zu jeder Antikörperfärbung wurden Negativkontrollen ohne den Primärantikörper durchgeführt. Eine Auswertung der Versuche fand nur statt, wenn sowohl die Negativkontrollen mit Cy3-markiertem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper als auch die Kontrollen mit FITC-markiertem anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper kein Signal zeigten. In der FITC-Kontrolle konnte oft ein leichter Hintergrund detektiert werden, da der FITC-markierte anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper extrazelluläre Strukturen unspezifisch erkennt. Diese Hintergrundfärbung ließ sich jedoch klar von einem positiven Signal unterscheiden. Kreuzreaktionen der beiden Sekundärantikörper konnten in Vorbereitung auf die immunhistologischen Doppelfärbungen durch Vorversuche ausgeschlossen werden. Die Spezifität der Globinseren wurde in Competitionstests, bei denen durch Zugabe des rekombinanten Proteins zum Antiserum das Signal auf den Proben komplett geblockt wird, im Rahmen der Publikationen SCHMIDT ET AL., 2003, WYSTUB ET AL., 2003 und SCHMIDT ET AL., 2004 erfolgreich nachgewiesen.

### 3.2.1 Detektion der Ngb-Expression

Da das Gehirn eine zelluläre Heterogenität aufweist, die sich hauptsächlich aus Neuronen, Astrozyten (Astroglia), Oligodendrozyten (Oligodendroglia), Mikroglia und Fibroblasten, Kapillaren und Endothel zusammensetzt, war eine Typisierung der Ngb-positiven Zellen notwendig. Hierfür wurden immunhistologische Doppelfärbungen durchgeführt, bei der zelltypspezifische Epitope mit monoklonalen Antikörpern markiert wurden.

Die Verwendung eines anti-NeuN-Antikörpers sollte Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den Ngb-positiven Zellen um Neurone handelt. Anti-NeuN (*Neuronal Nuclei*) ist gegen ein 160 kDa großes neuronenspezifisches, DNA-bindendes Protein gerichtet. Dieses wird im Nucleus exprimiert, wodurch der Antikörper eine kernlokalisierte Detektion zeigt. Es ist in allen neuronalen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems vorhanden, soweit die Zellen postmitotisch sind. Eine Ausnahme bilden Purkinje-, Photorezeptor- und Mitralzellen, in denen das Protein nicht nachgewiesen werden konnte (SARNAT ET AL, 1998).

Die anti Ngb/anti NeuN-Doppelfärbung der Primärkultur zeigte ein eindeutiges Verteilungsmuster. Anti-Ngb färbte in den positiven Zellen das Cytoplasma perinukleär an (Abbildung 3-11 A, D), während anti-NeuN in den gleichen Zellen den Kern markierte (Abbildung 3-11 B, E). Gut wurde diese klar abgegrenzte Färbung der beiden Antikörper in einer Bildüberlagerung sichtbar (Abb 3-1 C, F). Es wurde damit auf Proteinebene bestätigt, dass Neurone der Gehirnregion des Hippocampus Ngb exprimieren. Um zu klären, ob nur Neurone detektiert wurden oder auch andere Zelltypen Ngb positiv sind, wurde ein anti-GFAP Antikörper verwendet. Dieser monoklonale Antikörper ist gegen das 50 kDa große Protein der Intermediärfilamente gerichtet, welches ausschließlich in Astrogliazellen

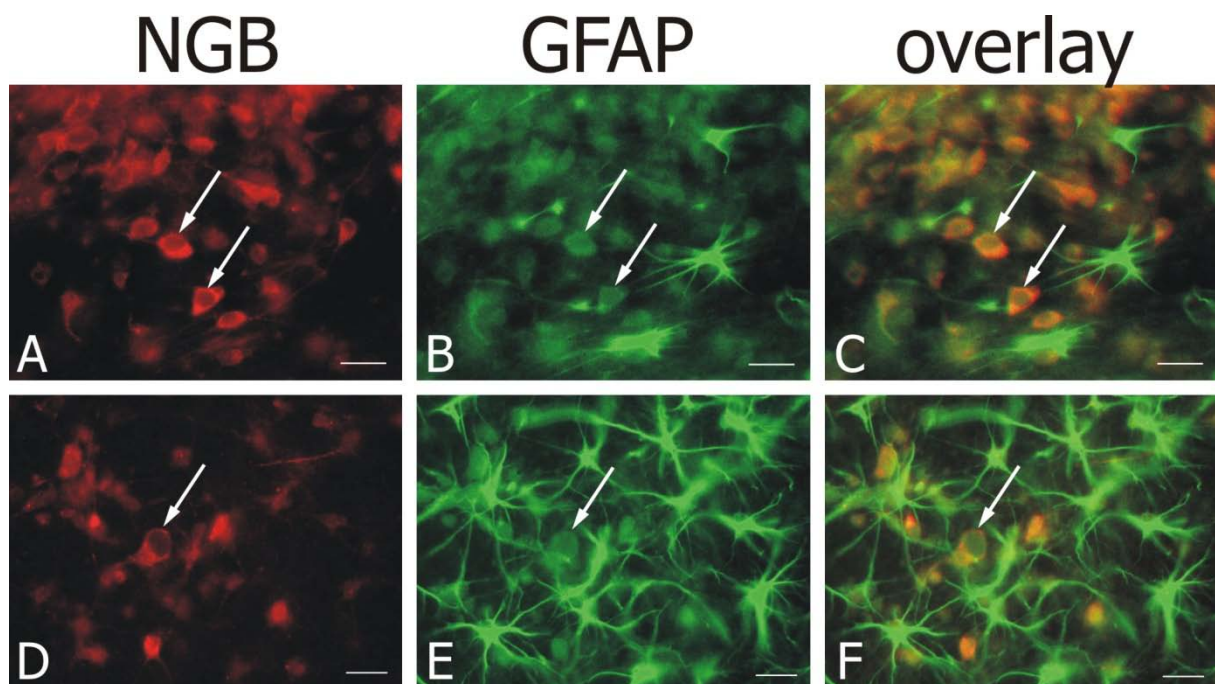


**Abbildung 3-11: Doppelfärbung mit anti-Ngb und anti-NeuN**

Doppelfärbung einer hippocampalen Primärkultur mit anti-Ngb-Antikörper (A, D) zeigt eine Anfärbung des Cytoplasmas. Der Kern ist ungefärbt. Der neuronenspezifische anti-NeuN-Antikörper färbt die gleichen Zellen wie anti-Ngb, markiert hierbei aber den Kern der Zelle (B, E). Noch deutlicher wird die Anfärbung der Neurone in der Überlagerung sichtbar (C, F). Barr 50  $\mu$ m

exprimiert wird. In der Entwicklung ist dieses Protein in Astrozyten ab dem Fötaltag 16/17 nachweisbar. Da zum Zeitpunkt der Präparation die Astrogenese bereits begonnen hatte, konnten weitgehend alle Gliazellen der vorliegenden primären Zellkultur nachgewiesen werden. Die Bildung der Oligodendrozyten in der SVZ setzt erst ab der Geburt ein und ist der Astrogenese zahlenmäßig weit unterlegen, weshalb auf einen gesonderten Nachweis mit Oligodendrozyten-Markern wie PDGF-R, NG2 oder MBP<sup>2</sup> verzichtet wurde (HARDY UND REYNOLDS, 1991; LEVISON ET AL., 1993; MILLER, 1996).

Die anti-Ngb/anti-GFAP-Doppelfärbung zeigte eine klare Unterscheidung der beiden markierten Zellgruppen. Sowohl morphologisch, als auch anhand unterschiedlicher Zellschichten der Kultur konnten die Neurone von den Gliazellen unterschieden werden. Die Neurone wurden vom anti-Ngb-Antikörper in der typischen zytoplasmatischen Weise markiert, während die Gliazellen klar Ngb negativ waren. Diese wurden mit ihren fibrillären

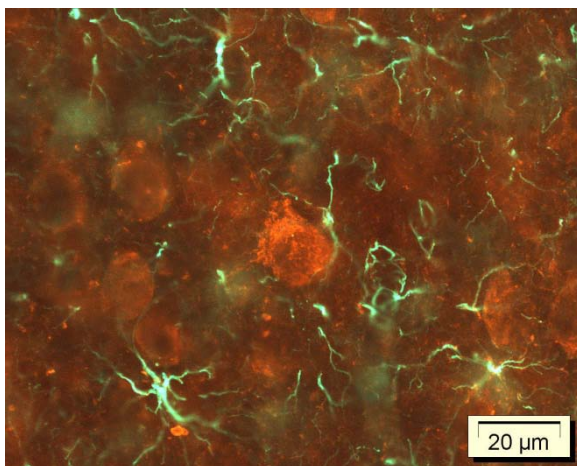


**Abbildung 3-12: Doppelfärbung mit anti-Ngb und anti-GFAP.**

Die Färbung einer hippocampalen Primärkultur mit anti-Ngb (A, D) zeigte eine perinukleäre Markierung. Die Verwendung eines anti-GFAP Antikörpers detektierte die mitpräparierten Gliazellen der Kultur (B, E). Diese unterschieden sich klar von den Ngb-positiven Zellen (Pfeile). In der Überlagerung wurde noch einmal deutlich, dass die Ngb-positiven Neurone in einer unteren Zellschicht, die GFAP-positiven Astrozyten in einer darüber liegenden Schicht wuchsen (C, F). Barr 20  $\mu\text{m}$ .

<sup>2</sup> PDGF-R: platelet-derived growth factor receptor; NG2: chondroitin sulfate proteoglycan, ein Typ I Membranprotein für frühen Nachweis; Myelin-Basisches Protein (MBP) für ausdifferenzierte Oligodendroglia im Adulthirn.

Ausläufern mit anti-GFAP komplett angefärbt (Abbildung 3-12 B, E). Auf den FITC-markierten Bildern und auf den beiden Überlagerungen (Abbildung 3-12 C, F) ist gut zu sehen, dass die Gliazellen eine Zellschicht über der unteren Zellschicht der Neuronen gebildet haben. Abbildung 3-12 B zeigt eine Region, in der fast ausschließlich Neuronen vorhanden sind, während Abbildung 3-12 E auf dem selben Kulturgläschen einen Bereich zeigt, in dem die Astroglia die am Glas festsitzenden Neuronen in einer darüberliegenden Zellschicht überwachsen. Schwach ist die Struktur der unmarkierten Neurone unter den Gliazellen in Abbildung 3-12 B und E zu erkennen (Pfeile), die sich jedoch klar von den GFAP positiven Gliazellen unterscheiden lassen und lediglich auf eine Hintergrundfärbung des FITC-Antikörpers beruhen. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch eine Untersuchung an einem Schnittpräparat eines zuvor perfundierten Mausehirns. Durchgeführt wurde die Präparation und anschließende Färbung von Prof. Stefan Reuss, Universitätsmedizin, Mainz. Der Ausschnitt zeigt eine Region aus dem Hippocampus (Abbildung 3-13). Der anti-Ngb-Antikörper wurde mit Cy3 markiert (rot). Die Neuronen sind Ngb-positiv, das Signal ist rein cytoplasmatisch. Die Gliazellen sind auch hier mit anti-GFAP markiert, der Sekundärantikörper FITC erscheint auf diesem Bild fast weiß. Die Gliazellen sind, wie auch in der Primärkultur (Abbildung 3-12), Ngb negativ.



**Abbildung 3-13: Doppelfärbung auf histologischem Schnitt**

Immunhistologischer Schnitt durch den Hippocampus einer adulten Maus. Das Tier wurde zuvor perfundiert. Der anti-Ngb Antikörper markiert nur die Neuronen. Der Kern ist frei, das Signal ist perinukleär und rein zytoplasmatisch. Die Gliazellen sind Ngb-negativ. Mit anti-GFAP Antikörper und dem Sekundärantikörper FITC erscheinen sie weiß. (Foto: Prof. S. Reuss, Universitätsmedizin, Mainz)

### 3.2.2 Detektion der Cygb-Expression

Um zu untersuchen, ob in den hippocampalen Primärkulturen auch Cytoglobin exprimiert wird, wurde eine Doppelfärbung mit einem anti-Cygb-Antiserum und dem monoklonalen anti-GFAP-Antikörper durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein stark vom Ngb abweichendes Verteilungsmuster. Bei den angefärbten Zellen handelt es sich um die gleiche Primärkultur, die auch zum Nachweis der Ngb-Expression verwendet wurde.

Auf der Abbildung 3-14 A bis C ist eine Region gezeigt, die fast ausschließlich Gliazellen beinhaltet. Die Anfärbung mit dem anti-Cygb Antiserum (Abbildung 3-14 A) zeigt eine Anfärbung der Kerne, wie auch eine leichte Färbung in den Ausläufern der Zellen. Die Verwendung des anti-GFAP Antikörpers in Abbildung 3-14 B zeigt, dass es sich bei den angefärbten Zellen hauptsächlich um Gliazellen handelt. Hierbei sind sowohl protoplasmatische Astrozyten (Pfeil) als auch fibrilläre Astrozyten (Faserglia) zu sehen (Bildmitte rechts). Die zentrale Region in den Zellen ist ausgespart, da GFAP nicht im Kern exprimiert wird. In der Überlagerung beider Abbildungen (Abbildung 3-14 C) wird dies noch einmal verdeutlicht. Die mit Pfeil markierte Zelle ist in den Abbildungen D bis F noch einmal vergrößert dargestellt. Hier fällt auf, dass ein zweiter Kern vorhanden ist. Es konnte anhand der anti-Cygb-Färbung nicht geklärt werden, ob es sich um zwei Gliazellen handelt oder um ein darunter liegendes Neuron. Auch die anti-GFAP-Färbung in Abbildung 3-14 E zeigt lediglich, dass nur der rechte Kern die typische Aussparung aufweist, wie sie die Gliazellen in Abbildung 3-14 B zeigten. Abbildung 3-14 C macht deutlich, dass der mit Pfeil markierte Kern unterhalb der Zelle liegt.

Die Abbildung 3-14 G bis L zeigen Regionen, die eine hohe Dichte an Neuronen aufweisen. Dies lässt sich mangels anti-Neu-N-Färbung nur anhand der Morphologie im Vergleich zu den anti-NeuN-Anfärbungen der Abbildung 3-11 belegen. Wie bei den Nachweisen auf Ngb, clustern hier die Neurone zu einem Zellklumpen. In Abbildung 3-14 G liegen viele Kerne dicht zusammen, angefärbt durch das anti-Cygb-Antiserum. Ein Schleier aus Cytoplasma-Anfärbungen verwischt das Bild des Zellhaufens. Mit dem anti-GFAP-Antikörper werden vereinzelt liegende Gliazellen angefärbt, die eine Zellschicht über den Neuronen gebildet haben (Abbildung 3-14 H). Die beiden mit Pfeilen markierten Zellkerne (Abbildung 3-14 G-I) liegen in der unteren Zellschicht, die, wie schon bei den Doppelfärbungen mit Ngb, aus Neuronen besteht (Abbildung 3-12) und sich unterhalb der Gliazellschicht befindet.



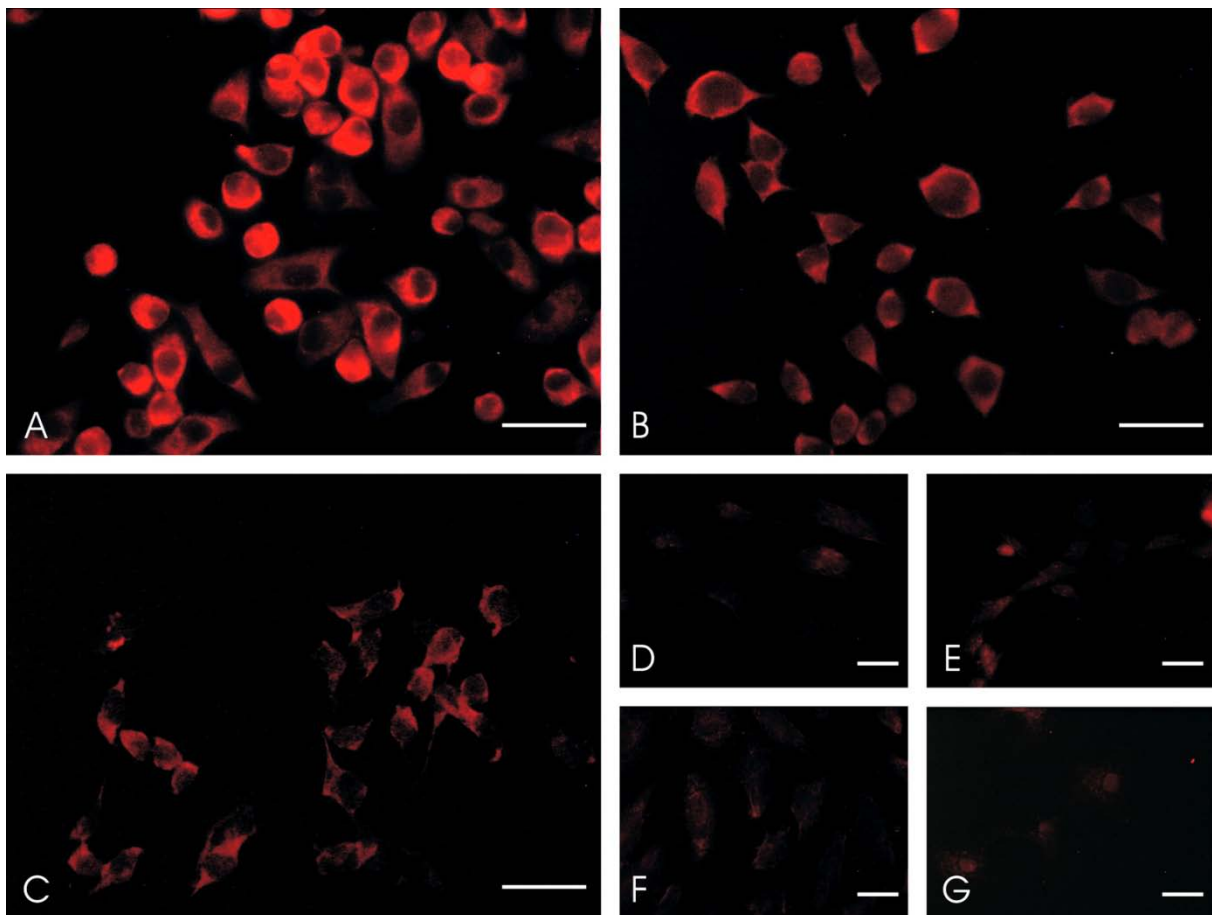
Das anti-Cygb-Antiserum markiert hauptsächlich die Kerne der Neurone, zeigt aber auch eine leichte Anfärbung ihrer Zellausläufer und des Cytoplasmas (Abbildung 3-14 J). Die Anfärbung des anti-GFAP-Antikörpers verdeutlicht, dass die Gliazellen in einer Schicht über den Neuronen wachsen (Abbildung 3-14 K).

Die Untersuchung weist Cytoglobin in der primären hippocampalen Zellkultur in Neuronen nach, wobei auch der Kern angefärbt ist. In Regionen mit Neuronen und Gliazellen ist eine eindeutige Zuweisung, wessen Kerne Cygb-positiv sind, nicht möglich. Die Gliazellkerne scheinen auch Cygb-positiv.

### 3.3 Nachweis von NGB in immortalisierten Zellkulturlinien

Um das Ergebnis der Untersuchungen an primären Hippocampalzellen zu erweitern, wurde die Expression von NGB in immortalisierten Zelllinien untersucht. Hierbei wurden Zelllinien verwendet, die aus Tumorgewebe neuronalen Ursprungs bzw. aus entarteten Gliazellen entstanden sind.

Die Proteinexpression wurde in den aus Neuroblastomen erzeugten Zellen der Linien Neuro-2a (N2a; ACC 148), und SH-SY5Y (ACC 209), sowie an der aus einer Nebenniere abgeleiteten Zelllinie PC-12 (ACC 159) durchgeführt. Auch wenn die Zelllinie PC-12 aus dem Phäochromozytom-Gewebe der Nebennierenrinde entnommen wurde, zeigt sie eine Differenzierung nach der Gabe von NGF (*nerve growth factor*). Die morphologische



**Abbildung 3-15 NGB-Immunfluoreszenz auf immortalisierten Zellkulturlinien**

N2a (A), PC-12 (B) und SH-SY5Y (C) zeigen die für Ngb typische perinukleäre Färbung des Cytoplasmas. Die Zelllinien GAMG (D), DK-MG (E), HeLa (F) und Vero (G) sind ungefärbt und zeigen nur ein leichtes unspezifisches Muster, das negativ zu werten ist. Barr 20µm.

Veränderung führt zur Ausbildung von Ausläufern, Neuriten vergleichbar. In der Untersuchung zeigten die beiden Neuroblastomzelllinien N2a und SH-SY5Y sowie die

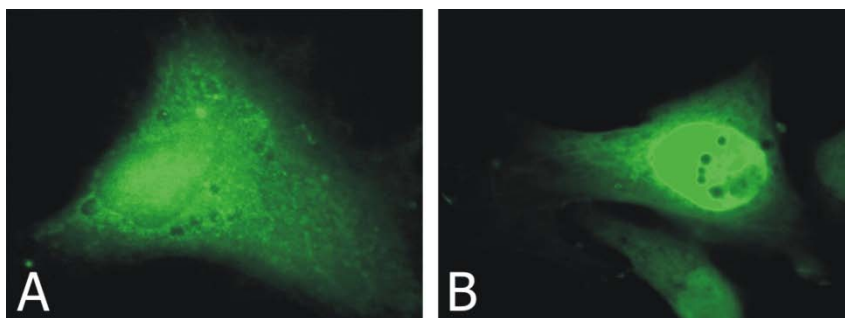
Phäochromozytom-Linie PC-12 eine typische perinukleäre Anfärbung mit freiem Zellkern. Die vier weiteren getesteten Zelllinien stammen von Glioblastomen (GAMG, ACC 242; DK-MG, ACC 277), einem Cervixkarzinom (HeLa, ACC 57) und einer Affeniere (Vero, ACC 33) ab und wiesen nur ein unspezifisches, diffuses Färbemuster auf, das als negativ gewertet wurde.

Die Untersuchungen an den Zelllinien bestätigten die Ergebnisse an der hippocampalen Primärkultur. NGB wird auch in Zelllinien neuronalen Ursprungs exprimiert. Zelllinien mit der Herkunft aus Glioblastomen exprimieren kein NGB.

### 3.4 Intrazelluläre Lokalisierung von NGB und CyGB mittels GFP-Fusionskonstrukten

Für das Verständnis der Funktion der Globine ist entscheidend, sich einen Einblick in die zelluläre und intrazelluläre Lokalisation der Proteine zu verschaffen, da diese mit der Funktion korreliert. Um die beiden Globine intrazellulär lokalisieren zu können, wurden die jeweiligen cDNAs in einem Plasmid N-terminal, bzw. C-terminal des Gens für ein grün fluoreszierendes Protein ligiert (*Green Fluorescent Protein / GFP*; CHALFIE ET AL., 1994). Dieses Gen stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und ist mit einem Grünfilter am Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Das Fusionsprotein soll innerhalb der Zelle durch seine grüne Fluoreszenz die Lokalisation von NGB bzw. CyGB anzeigen.

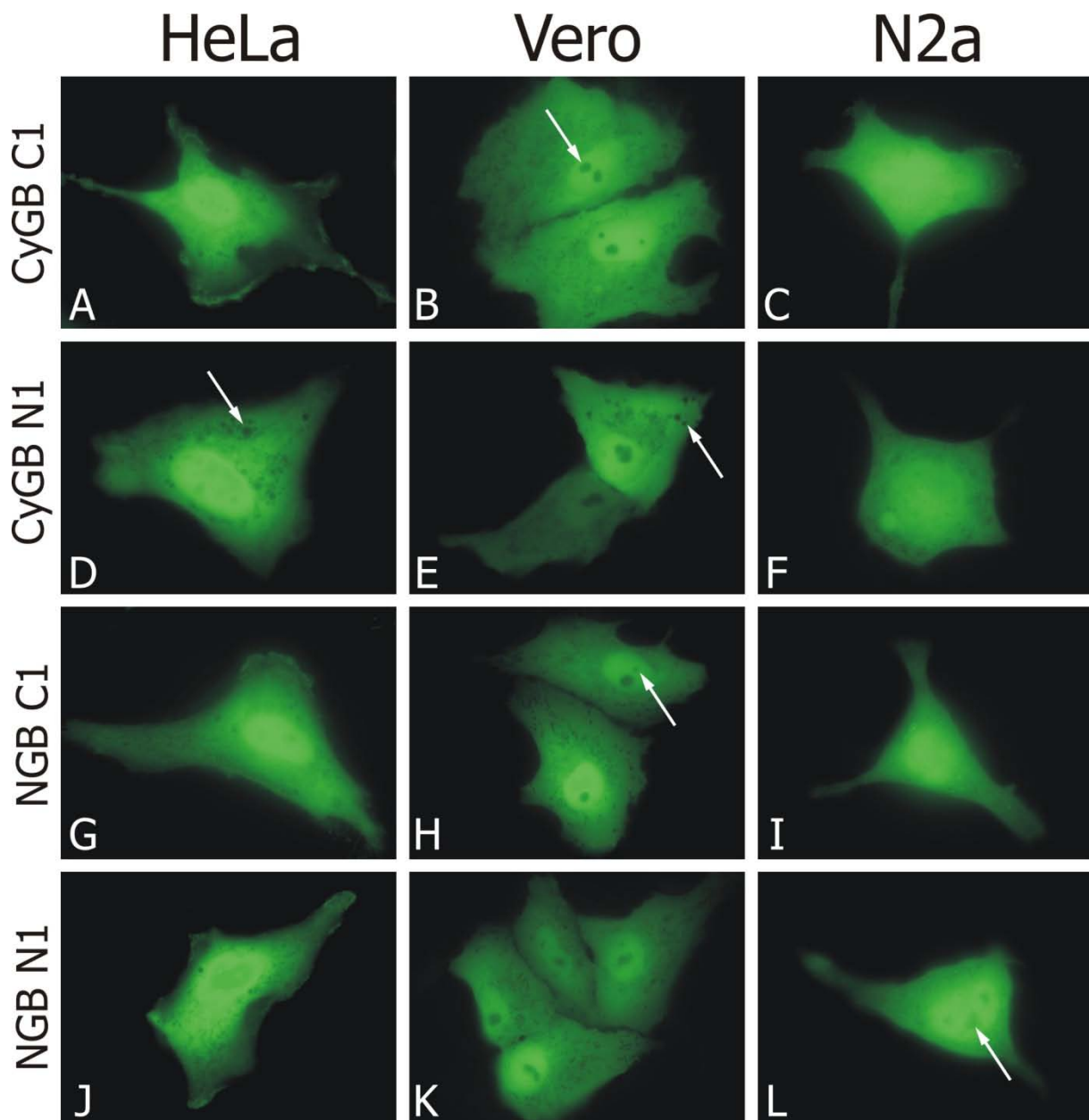
Die pEGFP+Globin-Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde ein leerer pEGFP-Vektor verwendet (Abbildung 3-16). Ohne einen Globin-Fusionsteil war GFP im Cytoplasma und Kern sichtbar.



**Abbildung 3-16: Testtransfektion mit leerem pEGFP-Vektor**

Das Protein kann auf Grund seiner geringen Größe von 27 kDa frei in den Kern diffundieren und war sowohl im Cytoplasma als auch im Kern nachzuweisen. Die Transfektion wurde an HeLa-Zellen vorgenommen.

Als Zelllinien wurden HeLa, Vero und N2a verwendet. HeLa (ACC 57) aus dem Zervixtumor der 1949 verstorbenen Henriette Lachs und die aus Affeniere stammende Linie Vero (ACC 33) galten als unkompliziert und leicht zu transfizieren. Neuro2a (N2a, ACC 148), entstammt dem Neuroblastom einer Maus und sollte vor allem über die Lokalisation des NGBs neue Erkenntnisse liefern. Mit einer Transfektionsrate von etwa 5-10% waren die Transfektionen allesamt erfolgreich, doch ließ sich bei keiner Zelllinie bzw. Fusionskonstrukt eine eindeutige Lokalisation feststellen. Abbildung 3-17 zeigt je ein Beispiel für pEGFP-Konstrukt (Reihe) und Zelllinie (Spalte). Bei allen Linien erschienen die GFP-CyGB-transfizierten Zellen in einem diffusen Signal. In den Zellen der Linien HeLa und Vero konnte man Organellen, eventuell



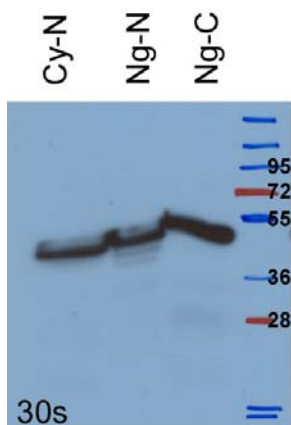
**Abbildung 3-17: Transfektion dreier Zelllinien mit pEGFP-Vektor und einkloniertem Globin.**

Als Zelllinien wurden HeLa (humanes Cervixcarzinom), Vero (Affenierte) und N2a (Neuroblastom Maus) verwendet. Transfiziert wurden je Vektor mit C-terminal zum EGFP liegendem Globin (Reihe eins und drei) und mit N-terminal kloniertem Globin (Reihe zwei und vier). Die Abb. A bis F zeigen Zellen, die mit pEGFP-CyGB transfiziert wurden. Die Zellen zeigen im Zytoplasma ein diffuses Signal des GFP-Proteins. Einige Organellen sind signalfrei (Pfeil in D). Der Kern überstrahlt das Zytoplasma. Vor allem in der Zelllinie Vero erschienen im Kern eine bis mehrere freie Regionen, vermutlich Nucleoli (Pfeil in B und E). In den N2a-Zellen zeichnete sich der Kern aufgrund der kugeligern Morphologie der Zellen nicht so deutlich ab. Die mit GFP-NGB transfizierten Zellen (G bis L) waren in ihrer Erscheinung nicht von den GFP-CyGB-tragenden Zellen (A bis F) zu unterscheiden. Auch in den N2a-Zellen waren trotz runderer Erscheinung die Nucleoli zu erkennen (Pfeil in L).

Vakuolen, erkennen, die frei von GFP waren (Pfeil in Abbildung 3-17 D und E). Der Kern zeigte ein stärkeres Signal als das Cytoplasma. Vor allem in den Vero-Zellen erschienen im

Nukleus eine bzw. mehrere Regionen, vermutlich Nucleoli, die kein Signal aufwiesen (Pfeil in Abbildung 3-17 B und H). Die mit GFP-Ngb transfizierten Zellen zeigten ein zu den GFP-CyGB-tragenden Zellen identisches Muster (Abbildung 3-17 G-L). Unterschiede der Signalverteilung waren lediglich morphologischer Art, nicht aber zwischen den beiden überexprimierten Globinen. So veränderten die transfizierten N2a-Zellen ihr adhärentes flaches Erscheinungsbild und wurden etwas kugelig. Dadurch trat der Kern nicht so deutlich in Erscheinung wie in den Zelllinien HeLa und Vero (Abbildung 3-17 C, F, I, L). Die Nucleoli waren aber auch hier als dunklere Flecken zu erkennen (Pfeil in Abbildung 3-17 L). Die intrazelluläre Lokalisation innerhalb von Mitochondrien, anderen Zellorganellen und an Membranen konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Dies passt zur bislang in Schnitten diverser Gewebe beobachteten cytoplasmatischen Lokalisation von Ngb. Im Falle von Cygb konnte keine reine Kernlokalisation beobachtet werden.

In dem verwendeten pEGFP-N1-Vektor der Firma Clontech liegt N-terminal des GFPs ein Startcodon. Dies würde eine alleinige Expression des GFP ermöglichen und könnte eine Erklärung für das unspezifische grüne Signal darstellen.



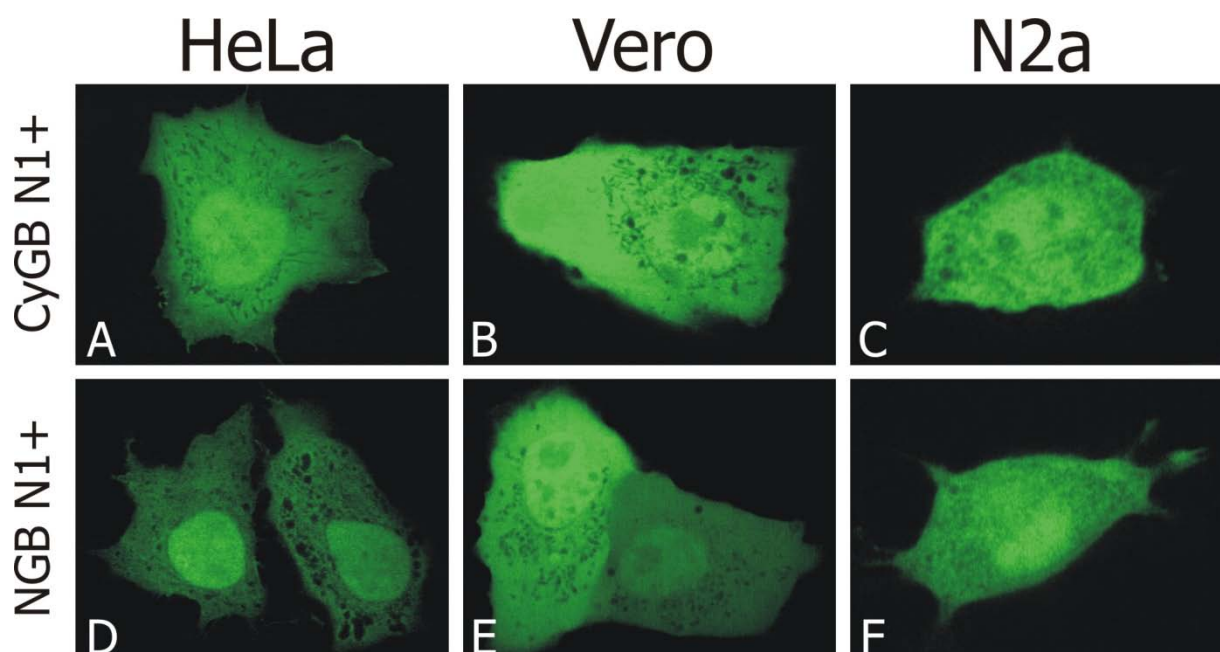
**Abbildung 3-18 Westernblot anti-GFP Nachweis**

Aufgetragen wurden Lysate von transfizierten HeLa Zellen. Transfiziert wurden Cygb mit GFP, Ngb mit GFP und ein Plasmid, in dem das GFP vor dem NGB einkloniert ist. In allen drei Fällen ist nur eine Bande entstanden. Dies zeigt, dass GFP nicht ohne das jeweilige Globin in der Zelle exprimiert vorliegt. In diesem Fall wäre eine Bande bei 27 kDa entstanden.

Zur Kontrolle und Absicherung der Ergebnisse wurde eine weitere Transfektion an HeLa-Zellen vorgenommen, um diese auf einem Westernblot zu testen. Eine Antikörperfärbung mit einem anti-GFP-Antikörper sollte Aufschluß darüber geben, ob Globin-GFP-Fusionsprotein exprimiert wurde oder GFP zusätzlich allein in den Zellen vorliegt. Transfiziert wurden Plasmide, in denen das CyGB N-terminal also vor dem GFP positioniert ist, ebenso NGB N-terminal vom GFP und ein Plasmid, in dem das GFP vor dem NGB einkloniert ist. Der Blot zeigt in allen drei Transfektionen nur eine Bande. Diese liegt in Höhe der erwarteten 44 kDa bzw. 48 kDa. Es ist keine Bande auf Höhe der GFP-Größe von 27 kDa zu erkennen. Die

unspezifisch wirkende grüne Fluoreszenz ist somit nicht auf einzelnes GFP zurückzuführen. Die Zellen exprimieren in allen Fällen das Fusionsprotein.

Einschränkend zur Aussagekraft des Experiments muss gesagt werden, dass das EGFP einen störenden Einfluss auf die korrekte Faltung und somit die Funktionalität der Globine haben könnte. Das EGFP ist mit 27 kDa etwa ein Drittel größer als die relativ kleinen Proteine NGB mit 17 kDa und CyGB mit 20,9 kDa (BURMESTER ET AL., 2000, 2002). Um den Abstand der beiden in den Fusionskonstrukten kombinierten Proteine zueinander zu vergrößern, wurde ein *Spacer*, bestehend aus 18 zusätzlichen Basenpaaren, zwischen die beiden Gene kloniert (DAHME ET AL., 2001). Das Ergebnis der durchgeführten Transfektion ist in Abbildung 3-19 zu



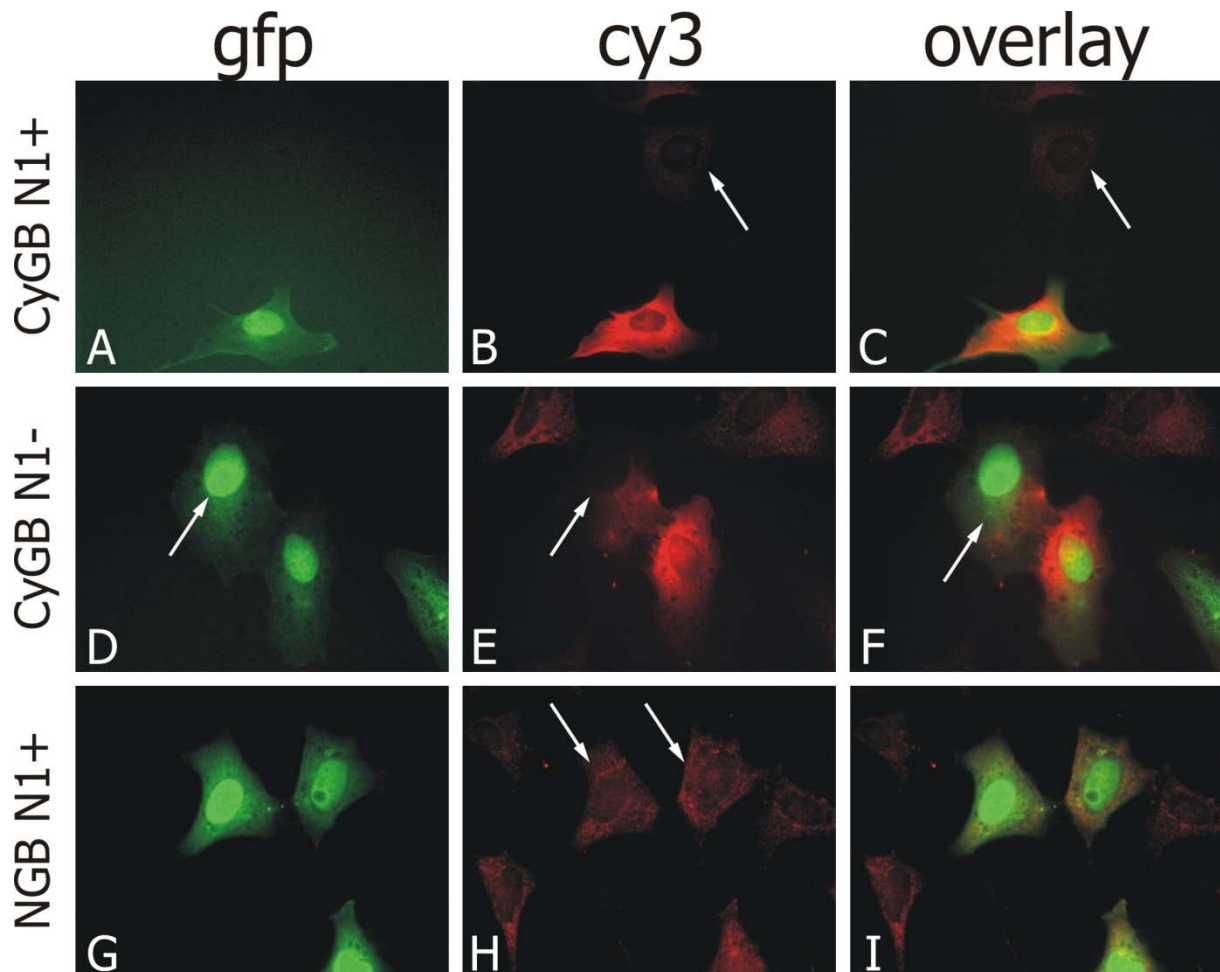
**Abbildung 3-19: Transfektion dreier Zelllinien mit pEGFP-Vektor, *Spacer* und Globin.**

Gezeigt sind nur die N-terminalen Konstrukte. Der eingefügte *Spacer* hat zu keiner Veränderung der GFP-Verteilung innerhalb der Zelle geführt (vgl. Abbildung 3-17).

sehen. Das Erscheinungsbild der transfizierten Zellen glich denen des vorherigen Experiments (Abbildung 3-17). Die Fluoreszenz war im Kern stark vorhanden, einzelne Nucleoli waren sichtbar und, die restliche Zelle zeigte ein diffuses Signal mit deutlich dunkler erscheinenden Vakuolen und anderen Organellen. Die eingefügten sechs Aminosäuren hatten zu keiner veränderten Lokalisation der Proteine geführt.

In immunhistologischen Tests mit anti-NGB-Antikörpern konnte in HeLa und Vero kein NGB nachgewiesen werden, während sich in N2a ein cytoplasmatisches Signal darstellte (Abbildung 3-15; LAUFS ET AL., 2004). Der Anti-CyGB-Antikörper zeigte in allen drei Zelllinien ein rein cytoplasmatisches Signal (eigenes Labor, unveröffentlichte Daten). Um die

Kernlokalisation der Fusionsproteine mit den Aussagen der Immunhistologie gegeneinander zu prüfen, wurde mit HeLa-Zellen eine Transfektion mit anschließender Antikörperfärbung durchgeführt. Zum Einsatz kamen sowohl die Konstrukte ohne (-) als auch die mit *Spacer* (+). Zum Globinnachweis wurden die polyklonalen Antikörper anti-Ngb-TB5b (WYSTUB ET AL., 2003) und anti-Cygb-2M (SCHMIDT ET AL, 2004) verwendet.



**Abbildung 3-20: Transfektion von HeLa-Zellen mit pEGFP-Vektor und Globin mit (+) und ohne (-) *Spacer*.**

Die GFP-Färbung zeigte mit allen Konstrukten (NGB-N1 nicht gezeigt) das vorher beschriebene Muster. Der anti-CyGB-Antikörper zeigte deutlich die Überexpression des CyGBs in GFP-CyGB+ *Spacer* transfizierten Zellen (B), die untransfizierten Zellen konnten im Vergleich nur ein sehr schwaches Signal erzeugen (Pfeil in B). Die Verwendung des anti-CyGB-Antikörpers konnte nachweisen, dass die Lokalisation des GFP nicht mit der des CyGBs übereinstimmte. Das GFP-Signal erscheint in der transfizierten Zelle vor allem im Kern, während CyGB rein cytoplasmatisch nachgewiesen wurde (A-C). HeLa-Zellen mit dem Konstrukt ohne *Spacer* (CyGB-N1) konnten nicht alle Cygb überexprimieren. Die Detektion der GFP-Expression war identisch, während nicht alle Zellen fähig waren, CyGB zu überexprimieren (Pfeil in E). Sie zeigten ein ähnlich schwaches Signal wie untransfizierte Zellen (oberer Bildrand in E). Das GFP im Zytoplasma überstrahlte in diesen Zellen noch die Fluoreszenz des CyGBs (Pfeil in F). Die GFP-NGB Konstrukte zeigten für GFP das beschriebene Muster. Mit dem anti-NGB-Antikörper konnte weder in den transfizierten (Pfeil in H) noch in den untransfizierten Zellen NGB nachgewiesen werden. Nur eine starke Überbelichtung ermöglichte, dass die Zellen in Bild H sichtbar wurden.

Das Ergebnis der Transfektion entsprach der unspezifischen Kern- und Zytoplasmaanfärbung der vorangegangenen Untersuchungen (Abbildung 3-17 und Abbildung 3-19). Gezeigt wird daher nur eine repräsentative Auswahl. Die Abbildung 3-20 A zeigt eine transfizierte HeLa-Zelle mit GFP-CyGB-Konstrukt inklusive *Spacer*, Abbildung 3-20 D zwei Zellen ohne *Spacer*. In Abbildung 3-20 G sind drei Zellen mit GFP-NGB-Konstrukt mit *Spacer* dargestellt. Die zweite Spalte zeigt das Ergebnis der Antikörperfärbung. In Abbildung 3-20 B ließ sich die transfizierte deutlich von der untransfizierten Zelle (Pfeil) unterscheiden. Das Protein lag auch in der CyGB-überexprimierenden Zelle rein cytoplasmatisch vor. Die untransfizierte Zelle (Pfeil) erschien wegen der starken Fluoreszenz der transfizierten Zelle nur sehr schwach positiv. Deutlich war zu erkennen, dass die Verteilung des GFP nicht mit der des CyGBs korrelierte. In der Überlagerung beider Bilder fluoreszierte der Kern grün, die perinukleäre Region rot (Abbildung 3-20 C). Die anti-CyGB-Antikörperfärbung der transfizierten Zellen, die in ihrem Konstrukt keinen *Spacer* enthielten, zeigten eine weitere Besonderheit: Nicht alle Zellen, die erfolgreich transfiziert waren, überexprimierten CyGB. In Abbildung 3-20 D sind zwei GFP-positive Zellen gezeigt. In der anti-CyGB-Färbung schien nur die eine Zelle CyGB zu überexprimieren. Die andere war nicht als transfizierte Zelle zu erkennen (Pfeil in Abbildung 3-20 D und E) und zeigt ein ähnlich schwaches Signal wie die untransfizierten Zellen am oberen Bildrand.

Die Transfektion mit den GFP-NGB-Konstrukten zeigte für GFP wieder das in Abbildung 3-17 und Abbildung 3-19 beschriebene Verteilungsmuster (Abbildung 3-20 G). Der anti-NGB-Antikörper konnte weder in den transfizierten (Pfeile in Abbildung 3-20 H), noch in den untransfizierten Zellen ein positives Signal erzeugen. HeLa-Zellen sind NGB-negativ (LAUFS ET AL. 2004). Um die Zellen dennoch für das Foto sichtbar zu machen, wurde die Belichtung so erhöht, dass das unspezifische Hintergrundrauschen des Zweitantikörpers Cy3 sichtbar wurde. Die Belichtungszeit der Abbildung 3-20 B und Abbildung 3-20 E hätte in diesem Fall ein rein schwarzes Bild erzeugt.

### 3.5 Veränderung der Globinexpression unter dem Einfluss von oxidativem Stress.

Die Globine *Ngb* und *Cygb* besitzen auf Grund ihres Hämzentrums die Fähigkeit, Sauerstoff und andere gasförmige Liganden zu binden. Dies kann einer Zelle in verschiedenen physiologischen Zuständen dienen. Eine denkbare Aufgabe wäre die Detoxifizierung von ROS (*reactive oxygen species*). Um zu untersuchen, ob sich der Gehalt von *Ngb* oder *Cygb* unter oxidativem Stress verändert, wurden Primärkulturen vom Kortex der Ratte und vom Cerebellum der Maus mit Paraquat behandelt und per qRT-PCR die Genexpression quantifiziert. Die RNAs wurden dem Institut freundlicherweise von Frau Dr. Gabriele Schmuck vom Pharma Research Center der Bayer AG zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3-4: Neurone aus dem Kortex, Ratte**

Liste aller zur Verfügung gestellten Proben. **x** markiert die zur Quantifizierung verwendeten Proben.

	1000µM	500µM	250µM	100µM	50µM	10µM	V0
0 min	o	o	o	o	o	o	x
15 min	o	o	o	o	o	o	
30 min	x	o	x	o	x	o	
45 min	o	o	o	o	o	o	
60 min	x	o	x	o	x	o	
90 min	o	o	o	o	o	o	
6 h	x	o	o	o	o	o	

**Tabelle 3-5: Neurone aus dem Cerebellum, Maus**

Liste aller zur Verfügung gestellten Proben. **x** markiert die zur Quantifizierung verwendeten Proben..

	1000µM	500µM	250µM	100µM	50µM	10µM	V0
0 min	o	o	o	o	o	o	x
15 min	o	o	o	o	o	o	
30 min	x	o	x	o	x	o	
45 min	x	o	o	o	o	o	
60 min	x	x	x	o	x	o	
90 min	x	o	o	o	o	o	
2 h	x	x	o	o	o	o	
3 h	x	o	x	o	x	o	
4 h	x	x	o	o	o	o	
5 h	x	o	o	o	o	o	
6 h	x	x	o	o	o	o	

Zur Normalisierung sollten die erhaltenen Daten wieder mit einem *Housekeeping* Gen verrechnet werden. Bei den mit Paraquat behandelten Primärkulturen wurde das oft als unreguliertes Haushaltsgen beschriebene „Ribosomal 18s“ verwendet (CONEJO UND GARCIA, 2001; BAR ET AL., 2003). Alle Proben, sowohl des Kortex wie auch des Cerebellums, schnitten

den Schwellenwert im selben Ct (Abbildung 3-21). *18s* ist für eine Normalisierung der Proben ein geeignetes Haushaltsgen.

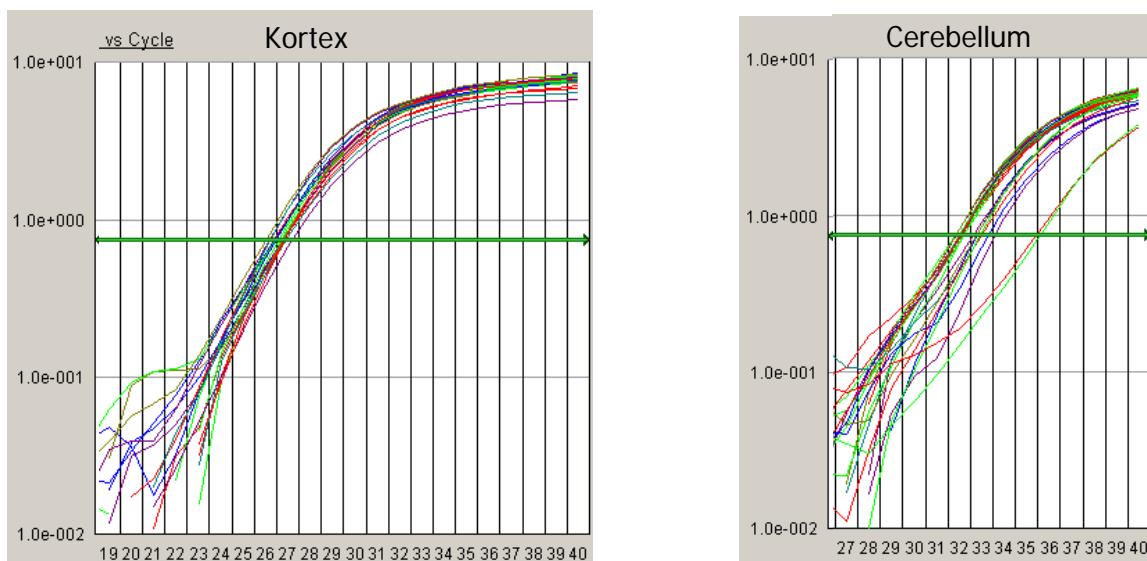


**Abbildung 3-21: Quantitative Bestimmung der *18s*-mRNA in allen Paraquatproben.**

Sowohl die Proben des Cerebellums wie auch die des Kortex gruppierten im Ct 16 und bestätigten *18s* als geeignetes *Housekeeping* Gen.

### 3.5.1 Quantifizierung der *Ngb* m-RNA nach Behandlung mit verschiedenen Paraquatkonzentrationen.

Die qRT-PCR zeigte, dass die *Ngb*-mRNA im Kortex keiner Regulation unterlag. Alle zehn Proben, die zwischen 30 Minuten und einer bzw. 6 Stunden mit jeweils 50µM, 250µM oder 1000µM Paraquat behandelt worden waren, lagen auf dem gleichen Ct-Wert von 26/27 wie auch die Kontrolle, die keiner Paraquatbehandlung unterzogen worden war (Abbildung: 3-22).



**Abbildung: 3-22: Quantitative Bestimmung der *Ngb*-mRNA im Kortex und Cerebellum.**

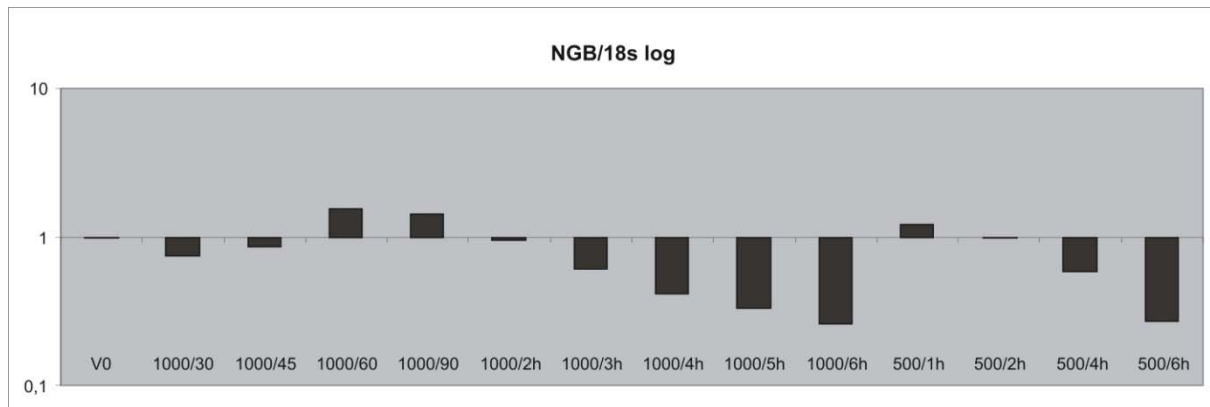
Alle getesteten Proben des Kortex gruppierten um dem Ct 26/27. Die Konzentrationen erstreckten sich von 50µM, 250µM bis 1000µM Paraquat. Die Einwirkdauer lag zwischen 30 Minuten, einer Stunde und 6 Stunden. Die Kontrolle lag im Bereich der behandelten Proben.

Die Kontrolle und die niedrig dosierten Proben des Cerebellums gruppierten bei einem Ct-Wert von 32. Nach 30min/1000µM sank die Konzentration um einen Ct, während die 3h/1000µM-Probe 1 ½ und die 6h/1000µM-Probe 3 ½ Cts später den Schwellenwert erreichte.

Im Probenpool aus dem Cerebellum waren im Gegensatz zum Kortex mehr RNAs vorhanden, die länger als 1 ½ Stunden mit Paraquat behandelt worden waren. Die Kontrolle und alle Proben niedriger Dosierung gruppierten bei einem Ct von 32 und schienen keinerlei Regulation zu zeigen. Erst bei einer Konzentration von 1000µM Paraquat und 3 Stunden Einwirkzeit wurde die *Ngb*-mRNA-Menge geringer (Abbildung: 3-22). Die 3h/1000µM-Probe schnitt den Schwellenwert 1 ½ Cts nach der Kontrolle und die 6h/1000µM-Probe erst 3 ½ Cts später bei Ct 35/36.

Die ersten Läufe der qRT-PCR zeigten, dass sich die mRNA-Menge von *Ngb* nur nach intensiver Paraquatbehandlung mit hoher Konzentration und langer Einwirkzeit im Cerebellum verringerte. In Form eines Balkendiagramms ist der relativ zur Kontrolle

gemessene Rückgang an *Ngb*-mRNA in Abbildung: 3-23 dargestellt. Die ersten zehn Proben sind alle mit 1000 $\mu$ M Paraquat behandelt worden, wobei die Dauer der Einwirkzeit nach rechts ansteigt. Die mit 500 $\mu$ M Paraquat behandelten Proben wurden an der rechten Seite gruppiert. Nach einer halben Stunde nahm die *Ngb*-mRNA zunächst ab, um wieder leicht anzusteigen und bei einer Stunde den höchsten Wert mit Faktor 1,55 zu erreichen, der leicht über dem Ausgangswert der Leerkontrolle lag. Bei längerem Versuchsverlauf nahm die

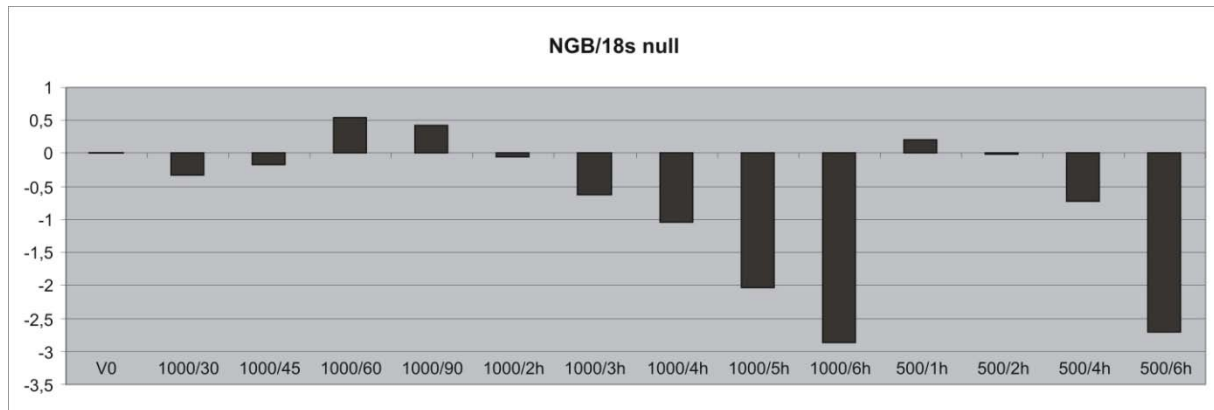


**Abbildung: 3-23: *Ngb*-mRNA nach Behandlung mit Paraquat, Cerebellum**

Primärkulturen aus dem Cerebellum von Mäusen, nach der Behandlung mit Paraquat. Das Diagramm zeigt den Verlauf der Zu- und Abnahme an *Ngb*-mRNA nach der Behandlung mit 1000 $\mu$ M bzw. 500 $\mu$ M Paraquat über einen Zeitraum von einer halben bis zu sechs Stunden. Nach einer anfänglichen Abnahme stieg die mRNA-Menge leicht über den Ausgangswert der Leerkontrolle V0, um bei längerem Verlauf um das Dreifache reduziert zu werden. Die schwächer konzentrierten Proben rechts zeigten das gleiche Verhalten in etwas abgeschwächter Form. Verrechnet wurden die gemessenen Werte mit dem *Housekeeping* Gen Ribosomal *18s*.

mRNA-Konzentration kontinuierlich ab, erreichte nach etwa zwei Stunden den Ausgangswert und fiel in den folgenden vier Stunden um Faktor drei. Die Proben mit 500 $\mu$ M Paraquat zeigten einen ähnlichen, etwas abgeschwächten Verlauf. Eine hohe Dosis Paraquat wirkte sich auf die *Ngb* mRNA-Expression negativ aus, je länger die Behandlung andauerte. Die Tabelle der gemessenen Werte ist im Anhang zu finden.

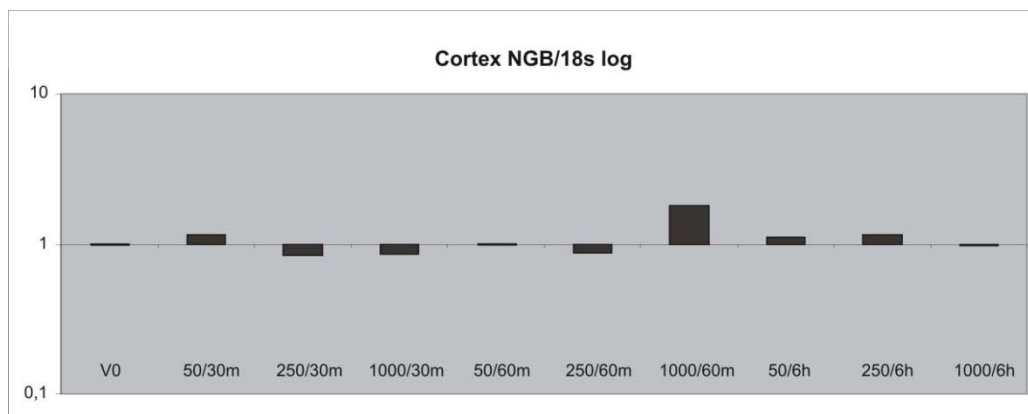
Noch deutlicher zeigt eine veränderte relative Darstellung die Abnahme der mRNA-Konzentration. Hierbei wurde der Ausgangswert gleich Null gesetzt. Von den Werten größer Eins wurde Eins subtrahiert, von den Werten kleiner Eins das Reziprok verwendet und mit minus Eins multipliziert. Die erhaltenen Werte sind nicht mehr mathematisch korrekt, doch erzeugen die positiven Schwankungen einen gleich starken Ausschlag wie die negativen, da sich deren Bereich nicht mehr nur von Eins bis Null erstreckt, sondern ausgehend von Null den gleichen Ausschlag in den negativen Bereich der rationalen Zahlen ermöglicht (Abbildung: 3-24).



**Abbildung: 3-24: Veränderte Darstellung der *Ngb*-mRNA Konzentration**

Nach der Behandlung der Primären Zellkultur aus dem Cerebellum mit Paraquatbehandlung. Die Gleichsetzung des Ausgangswertes V0 mit Null ermöglicht eine Darstellung, bei der auch die ermittelten Werte zwischen 1 und 0 einer rationalen negativen Zahl zugeordnet werden können und somit einen optisch vergleichbaren Negativbalken erzeugen. Hierfür wurden die Werte über 1 mit 1 subtrahiert und von Werten kleiner 1 das Reziprok verwendet und mit minus 1 multipliziert. Verrechnet wurden die gemessenen Werte mit dem *Housekeeping* Gen Ribosomal *18s*.

Zum Vergleich sind in Abbildung: 3-25 die Expressionsdaten der Kortexprouben aus fötalen Ratten dargestellt. Auch hier führte eine Paraquatdosis von 1000 $\mu$ M nach einer Stunde zu einer leicht erhöhten *Ngb*-mRNA-Expression, doch blieb die starke Konzentrationsabnahme wie bei den Proben aus dem Cerebellum aus. Die *Ngb*-mRNA-Expression wurde im Kortex von Paraquat auch nach einer Versuchsdauer von sechs Stunden nicht beeinflusst.



**Abbildung: 3-25: *Ngb*-mRNA nach Behandlung mit Paraquat, Kortex**

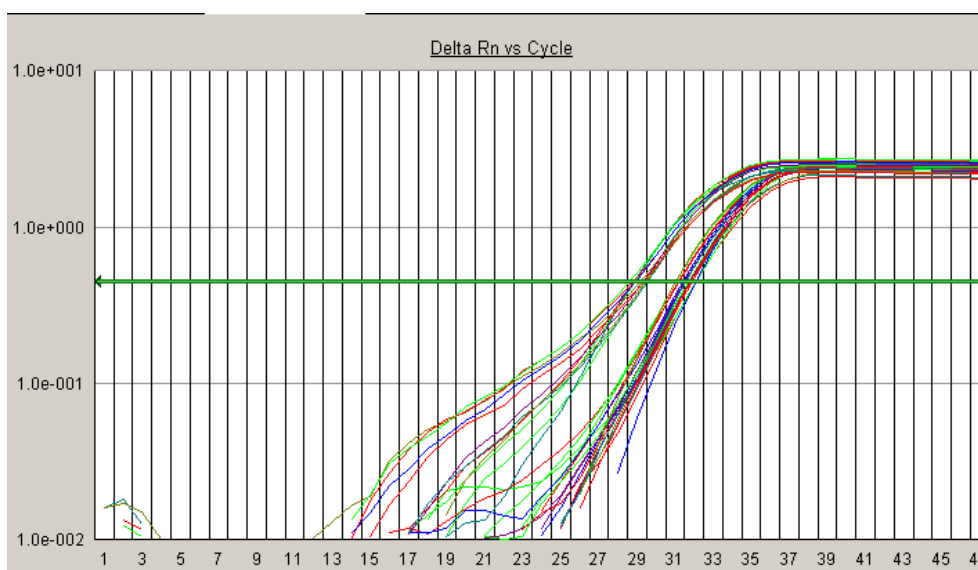
Primärkulturen aus dem Kortex von Ratten nach der Behandlung mit Paraquat.

Die gemessenen Schwankungen liegen nicht im statistisch relevanten Bereich. Auffällig ist, dass auch eine Versuchsdauer von sechs Stunden bei einer Gabe von 1000 $\mu$ M Paraquat zu keiner Veränderung der *Ngb*-mRNA Expression führte. Verrechnet wurden die gemessenen Werte mit dem *Housekeeping* Gen Ribosomal *18s*.

### 3.5.2 Quantifizierung der *Cygb*-mRNA nach Behandlung mit verschiedenen Paraquatkonzentrationen.

Die gleiche Untersuchung wurde für *Cygb* durchgeführt, wobei keine Zu- oder Abnahme der mRNA-Konzentration festgestellt werden konnte.

Eine Behandlung der Zellen mit Paraquat und der daraus entstehende oxidative Stress scheint keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *Cygb* zu haben (Abbildung: 3-26). Es zeigte sich, dass *Cygb* im Vergleich zu *Ngb* stärker im Cerebellum transkribiert wird, wohingegen die mRNA von *Ngb* stärker im Kortex nachgewiesen werden konnte (Abbildung: 3-22).



**Abbildung: 3-26: Quantitative Bestimmung der *Cygb*-mRNA im Cerebellum und Kortex.**

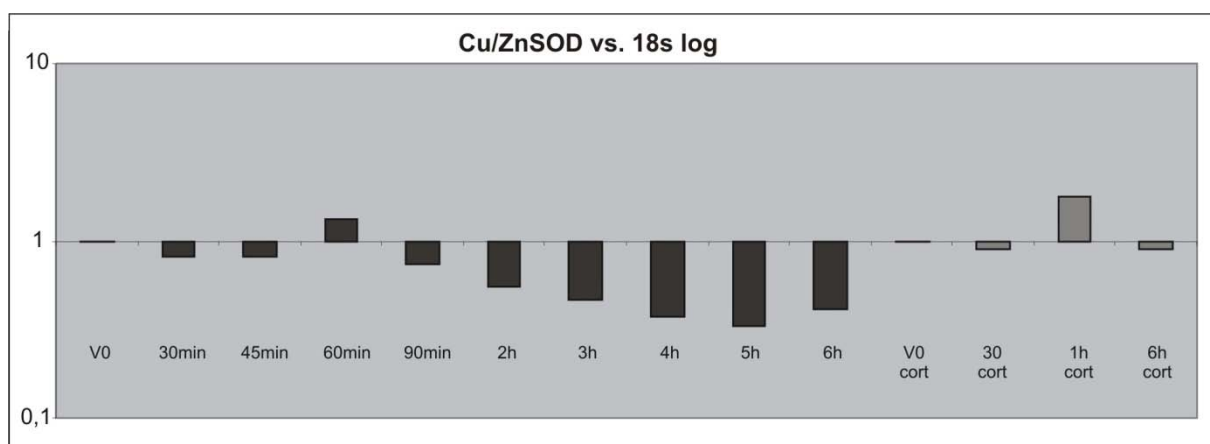
Die Paraquatkonzentrationen und die Einwirkdauer hatten keinen Einfluss auf die *Cygb*-mRNA. Alle Proben des Cerebellums gruppieren bei Ct 30, während die Proben aus dem Kortex den Schwellenwert bei einem Ct von 31/32 erreichen.

### 3.5.3 Quantifizierung der mRNA Expression von Antioxidanz-Enzymen in neuronalen Primärkulturen nach einer Behandlung mit verschiedenen Paraquatkonzentrationen.

*Ngb* und *Cygb* könnten auf Grund ihrer Fähigkeit, Sauerstoff zu binden eine detoxifizierende Wirkung besitzen, wie sie von anderen Enzymen bekannt ist. Zwei Antioxidanz-Enzyme sind die Cu/Zn Superoxid Dismutase (SOD) und die Glutathion Peroxidase (GPx). Diese Enzyme verzeichnen einen Anstieg an Aktivität bei verstärktem ROS-Vorkommen, und transgene Mäuse, die das jeweilige Gen überexprimieren, zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Gabe von Paraquat mit weniger neurodegenerativen Symptomen überstehen als nicht transgene Versuchstiere (KHAN ET AL., 03; THIRUCHELVAM ET AL., 05). Da sich die Daten in der Literatur nur auf Proteinebene und deren Aktivität beziehen, sollte getestet werden, ob sich die beiden Gene bei auftretendem oxidativem Stress durch Paraquat ähnlich in ihrer mRNA-Expression verhalten würden wie zuvor *Ngb*.

Beschränkt wurde die Testreihe auf die Proben, die mit 1000 $\mu$ M Paraquat behandelt worden waren, da nur diese bei den vorangegangenen *Ngb*-Tests eine signifikante Veränderung der Expression gezeigt hatten (Abbildung: 3-22). Hinzugefügt wurden auch die drei hoch dosierten Proben aus dem Kortex der Ratte (Abbildung: 3-27 und Abbildung: 3-28).

Die *Cu/Zn SOD* zeigte einen ähnlichen Verlauf in den Proben des Cerebellums wie *Ngb* (Abbildung: 3-27). Die Konzentration an *Cu/Zn SOD*-mRNA nahm zunächst leicht ab, um nach einer Stunde einen im Vergleich zu *V0* erhöhten Wert um Faktor 1,3 zu erreichen.

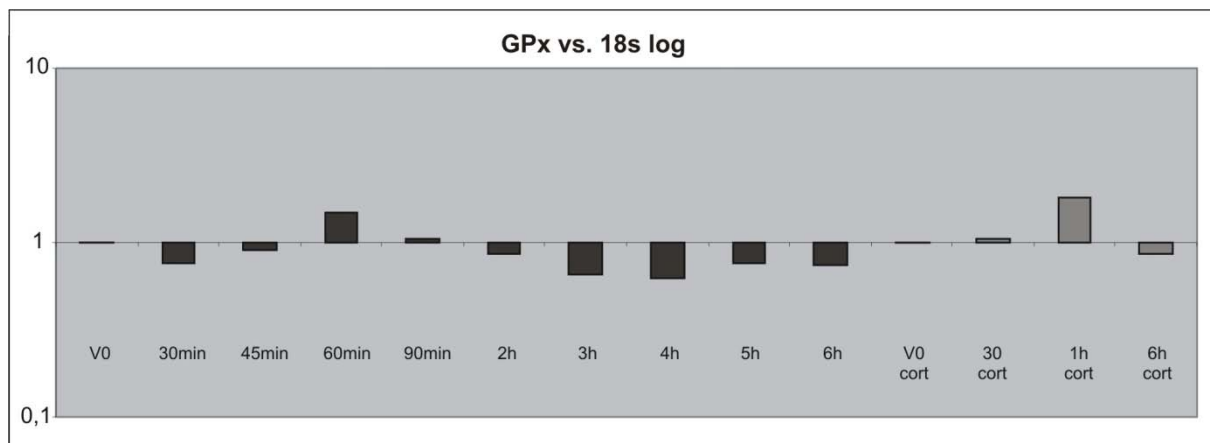


**Abbildung: 3-27: Quantifizierung der *Cu/Zn SOD* mRNA nach Behandlung mit Paraquat.**

Das Diagramm zeigt den Verlauf der Zu- und Abnahme an *Cu/Zn SOD*-mRNA im Cerebellum nach der Behandlung mit 1000 $\mu$ M Paraquat über einen Zeitraum von einer halben bis zu sechs Stunden. Nach einer anfänglichen Abnahme stieg die mRNA-Menge leicht über den Ausgangswert der Leerkontrolle *V0*, um bei längerem Verlauf um das Dreifache reduziert zu werden. Die Proben aus dem Kortex der Ratte, rechts, zeigten keine ausgeprägte Regulation. Die erhöhte mRNA-Expression nach einer Stunde war sowohl im Cerebellum als auch in den Untersuchungen von *Ngb* beobachtet worden. Verrechnet wurden die gemessenen Werte mit dem *Housekeeping* Gen Ribosomal *18s*.

Nach andauernder Paraquatbehandlung nahm die *Cu/Zn SOD*-mRNA kontinuierlich bis auf Faktor 3 unter *V0* ab. Die Proben aus dem Kortex der Ratte zeigten wieder keine signifikante Veränderung, wobei auch wieder die leichte Konzentrationserhöhung bei dem Einstundenwert vorhanden war.

Die Proben zeigten bei der Untersuchung auf die *GPx*-mRNA-Konzentration wieder einen Verlauf, der dem des *Ngb* ähnelte, jedoch war die Ausprägung noch schwächer als bei der *Cu/Zn SOD* (Abbildung: 3-28). Die Expression der *GPx*-mRNA zeigte nach einer halben Stunde auch eine leichte Abnahme, der nach einer Stunde der höchste gemessene Wert folgte. Dieser lag aber nur bei einem Faktor von 1,5. Die folgende Abnahme fiel auch gedämpfter aus und erreichte den niedrigsten Wert mit einem Faktor von nur 2 unter dem Ausgangswert von *V0* schon nach vier Stunden. Eine weitere Behandlung der Zellen mit Paraquat führte zu keiner weiteren Abnahme an *GPx*-mRNA, sondern die Konzentration stieg wieder leicht an. Die Proben aus dem Kortex der Ratte zeigten auch den bei den anderen Messungen festgestellten Anstieg nach einer Stunde, doch wurden auch nach sechs Stunden Behandlung mit Paraquat keine signifikant negativen Werte erreicht.



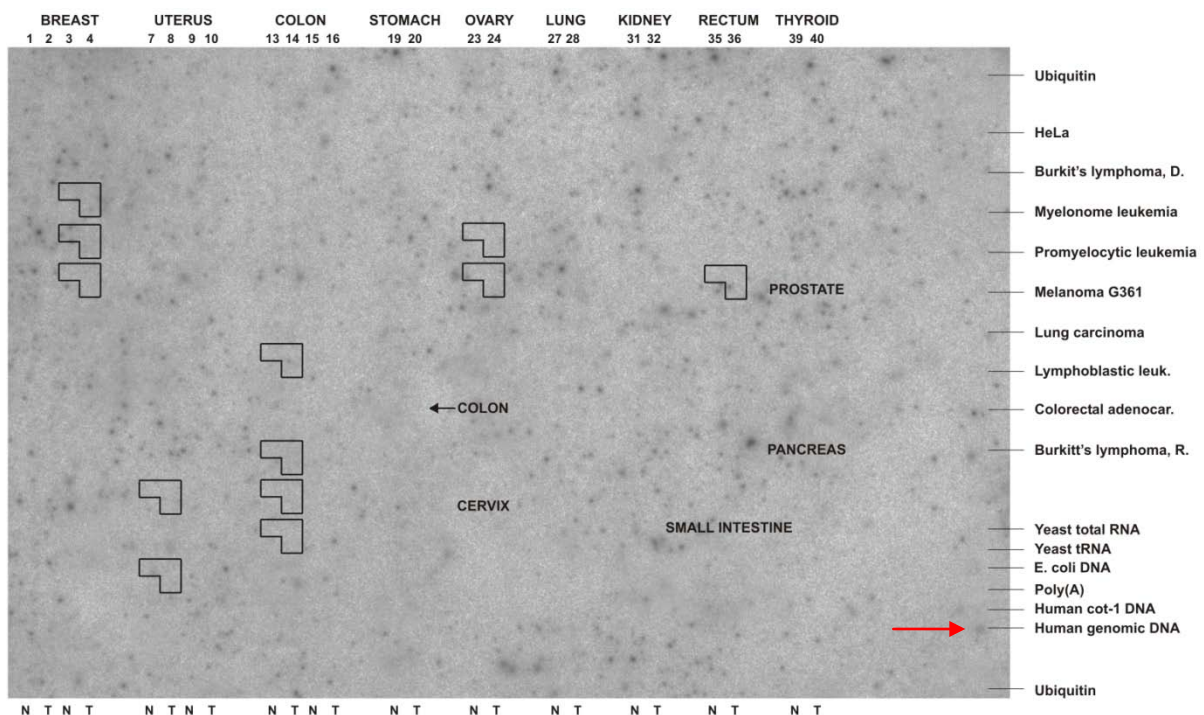
**Abbildung: 3-28: Quantifizierung der *GPx* mRNA nach Behandlung mit Paraquat.**

Das Diagramm zeigt den Verlauf der Zu- und Abnahme an *GPx*-mRNA im Cerebellum nach der Behandlung mit 1000 $\mu$ M Paraquat über einen Zeitraum von einer halben bis zu sechs Stunden. Nach einer anfänglichen Abnahme stieg die mRNA-Menge leicht über den Ausgangswert der Leerkontrolle *V0*, um bei längerem Verlauf unter den Ausgangswert von *V0* zu sinken. Der Verlauf ähnelt dem der *Cu/Zn SOD*, ist aber nicht so ausgeprägt. Nach 4 Stunden erreichte die *GPx* mRNA Konzentration ihren niedrigsten Wert, der aber nur um Faktor 2 reduziert war. Danach fielen die Messwerte nicht weiter ab, sondern näherten sich wieder dem Ausgangswert von *V0*. Die Proben aus dem Kortex der Ratte, rechts, zeigten keine ausgeprägte Regulation. Die erhöhte mRNA-Expression nach einer Stunde war sowohl im Cerebellum als auch in den Untersuchungen von *Ngb* beobachtet worden. Verrechnet wurden die gemessenen Werte mit dem *Housekeeping* Gen Ribosomal *18s*.

### 3.6 Expression von *NGB* und *CyGB* in Krebsgewebe

Um zu untersuchen, ob die Expression von *NGB* oder *CyGB* während der Tumorgenese einer Regulation unterliegt, wurde ein Cancer Profiling Array<sup>TM</sup> (Clontech) verwendet. Auf diesem Blot sind cDNAs von 241 Krebspatienten gespottet. Er ermöglicht es, die Anwesenheit bzw. die unterschiedliche Menge von Gentranskripten in einem breiten Spektrum von Krebsgeweben zu prüfen, wobei jedoch keine neuronalen Gewebe vertreten sind. Die cDNAs des Blotfilters wurden aus Gesamt-RNA von normalem, malignem und in einigen Fällen metastasierendem Gewebe eines Patienten synthetisiert. Zusätzlich verfügt der Cancer Array über eine Reihe Positiv- und Negativkontrollen und eine Anzahl cDNAs von Krebszelllinien. Als radioaktiv markierte Sonde wurde in beiden Versuchen die komplette CDS der Gene verwendet. Die Detektion erfolgte nicht über einen Röntgenfilm, sondern mit Hilfe eines Phosphoimagers (FujiFilm, Düsseldorf).

#### 3.6.1 Hybridisierung des Human Cancer Profiling Arrays mit einer *NGB*-Sonde



**Abbildung 3-29: *NGB*-Nachweis auf Cancer Profiling Array (Clontech)**

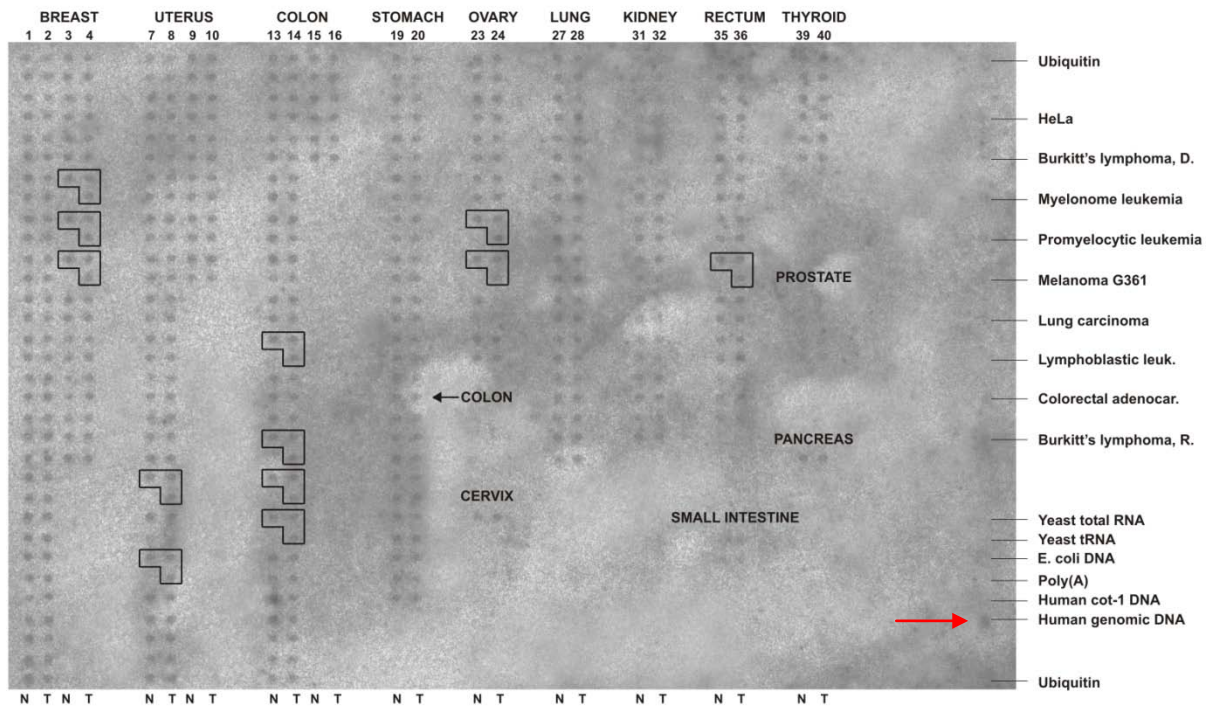
Darstellung des mit einer *NGB*-spezifischen Sonde hybridisierten Cancer Profiling Arrays. Der Blot verfügt über 241 Paare normalisierter cDNA von Tumoren (T) und dem dazugehörigen Normalgewebe (N) einzelner Patienten. Umrandete Boxen beinhalten neben dem Normal- und Tumorgewebe noch eine Metastasenprobe des Patienten. Rechts sind Negativ- und Positivkontrollen aufgetragen, die neben einigen Krebszelllinien noch Hefe, *E.coli* und menschliche genomische DNA aufweisen.

Bei der Hybridisierung mit der *NGB*-spezifischen Sonde konnte kein Nachweis auf *NGB*-Transkripte erbracht werden. Auch nach langer Expositionszeit (5 Tage) war kein spezifisches Signal detektierbar. Bei den in Abbildung 3-29 sichtbaren Signalen handelt es sich lediglich um unspezifischen Bindungen, die durch die lange Exposition auf der Phosphoimagerplatte in den Vordergrund traten. Einzig bei der *Human genomic DNA*-Kontrolle war ein leichtes Signal sichtbar (roter Pfeil). Dieses Signal tritt in starkem Maße nur auf, wenn es sich bei dem untersuchten Gen um ein *highly abundant gene* oder um ein Mitglied einer Multigenfamilie handelt. Da die Globine eine Multigenfamilie bilden, scheint hier die Sonde auch andere Globingene markiert zu haben. Die cDNA aller Zelllinien, die am rechten Rand aufgetragen waren, zeigten kein Hybridisierungssignal. Da es sich bei diesen Zelllinien um keine neuronalen Gewebe handelt, passt dies zum *NGB*-Expressionsmuster. *NGB* konnte erwartungsgemäß auf diesem Blot in keinem Normalgewebe nachgewiesen werden und unterlag auch in Tumorgewebe keiner starken Induktion oder Hochregulierung.

### 3.6.2 Hybridisierung des Human Cancer Profiling Arrays mit einer *CyGB*-Sonde

Ein anderes Ergebnis erbrachte die Hybridisierung des Cancer Profiling Arrays mit einer *CyGB*-spezifischen Sonde. Im Gegensatz zum vorherigen Test waren fast alle Gewebeproben positiv, wenn auch von keiner sehr starken Hybridisierung geprägt. Die Aufteilung der Proben lässt sich nun gut erkennen.

Brust, Uterus, Darm, Lunge und Magen zeigten ein einheitlich positives Signal. Ovar, Niere, Mastdarm und Schilddrüse waren nicht gleichmäßig detektiert, wobei sich die Schwankungen nicht innerhalb eines Paares zeigten. Prostata und Dünndarm erschienen sowohl für die Normal- als auch für die Tumorproben negativ. Von Cervix und Bauchspeicheldrüse war nur ein Probenpaar vorhanden, die beide eine Hybridisierung aufwiesen. Die Kontrollen erschienen wie bei der *NGB*-Sonde alle negativ bis auf die genomische, menschliche DNA (roter Pfeil), was wie bei *NGB* auf die Zugehörigkeit zur Genfamilie der Globine zurückzuführen ist. Auch bei diesem Test waren für die Anwendung des Phosphoimagers mit mehreren Tagen sehr lange Expositionszeiten nötig, um ein Signal zu erzeugen. *CyGB* schien in den Geweben nur in geringem Maße vorhanden zu sein. Im Zusammenhang mit einer Tumorbildung oder Metastasierung war keine erhöhte bzw. erniedrigte Expression zu erkennen.



### Abbildung 3-30: *CyGB*-Nachweis auf Cancer Profiling Array (Clontech)

Darstellung des mit einer *CyGB*-spezifischen Sonde hybridisierten Cancer Profiling Arrays. Einheitliche Markierung bei Brust, Uterus, Darm, Magen und Lunge. Ovar, Niere, Mastdarm und Schilddrüse zeigte in einigen Probenpaaren kein Signal. In der rechten Kontrollreihe war kein Signal detektierbar bis auf die leichte Hybridisierung der menschlichen genomischen DNA (roter Pfeil).

### 3.7 Herstellung von monoklonalen anti-NGB Antikörpern aus der Maus.

Um über einen spezifischen Antikörper zu verfügen, der in größeren Mengen zur Verfügung steht, sollte in Kooperation mit Prof. Dr. Sigrid Saaler-Reinhardt, Institut für Genetik, Univ. Mainz und Marc Schmidt, Institut für Zoologie, Univ. Mainz, ein monoklonaler Antikörper gegen Neuroglobin hergestellt und charakterisiert werden.

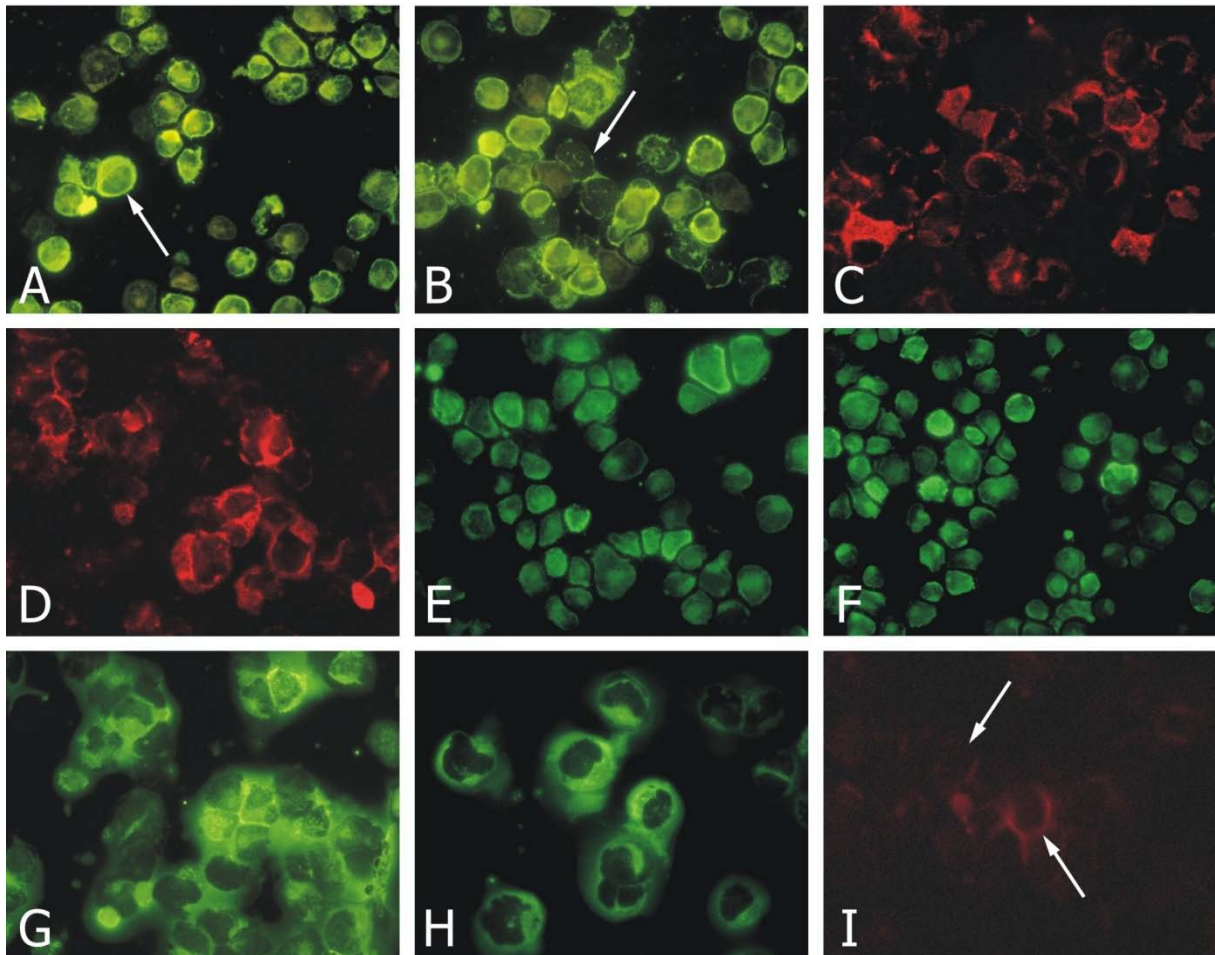
Nach der Fusion der B-Lymphozyten immunisierter Mäuse mit den Myelomzellen konnten auf zwanzig *96er-wells* 205 Klone gezählt werden. Von allen Klonen wurden die Überstände in einem ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) auf rekombinantem Ngb getestet. Acht Klone erreichten hierbei einen positiven Wert über eins in Relation zu einer mitgeführten Kontrolle. Desweiteren wurden die Überstände auf pränatalen Hirnschnittpräparaten getestet, wobei drei Klone hierbei gute Ergebnisse zeigten, ohne eine starke Reaktion im ELISA. Tabelle 3-6 führt alle positiv getesteten Klone auf, wobei die Klone im ELISA einen Wert über 1 erreichen sollten. Auf einem Western-Blot, auf dem Gesamtproteinextrakt aus dem Hirn einer Maus transferiert wurde, zeigte unter den getesteten Bedingungen kein Klon eine Detektion. Auf einem Dot-Blot zeigten alle Klone ein positives Ergebnis, soweit es getestet wurde. Die indirekten Immunfärbungen pränataler Hirnschnitte des Stadiums MF16-18 und adulter Hirnschnitte wurden als positiv vermerkt, sofern eine deutliche perinukleäre

#### Tabelle 3-6: Charakterisierte monoklonale HsaNGB-Primärantikörper.

Aufgelistet sind alle Klone, die bei einer Methode durch eine positive Reaktion auffielen. += gutes Resultat; (+)= bedingt anwendbar; —= nicht verwendbar; n.d., nicht durchgeführt; IIF, indirekte Immunfärbung; NE, Neuroepithel. Fett markiert sind positive Klone. 1) durchgeführt von M.Schmidt, AG Burmester, 2) durchgeführt von S.Reuss.

Klonname	ELISA <sup>1</sup>		Western-Blot <sup>1</sup>	Dot-Blot <sup>1</sup>	IIF Pränataler Hirnschnitt	IIF Adulter Hirnschnitt <sup>2</sup>
6E1	0,35	—	n.d.	n.d.	NE (+)	(+)
<b>9D11</b>	<b>1,0</b>	<b>(+)</b>	—	<b>(+)</b>	NE —	+
<b>9G3</b>	<b>3,6</b>	<b>+</b>	—	<b>+</b>	<b>NE (+)</b>	—
9G10	3,1	+	—	+	Blutgefäße +, NE (+)	—
10A8	1,6	(+)	—	n.d.	Zellkern	Zellkern
<b>11B12</b>	<b>1,9</b>	<b>+</b>	—	n.d.	<b>NE +</b>	<b>+</b>
<b>13F7</b>	<b>3,0</b>	<b>+</b>	—	<b>(+)</b>	<b>NE +</b>	<b>++</b>
17B12	3,3	+	—	+	Zellkern	Gefäße
18E10	3,4	+	—	+	NE ++	Gefäße
<b>18G2</b>	<b>n.d.</b>	—	n.d.	<b>+</b>	<b>NE +</b>	<b>++</b>
19F12	0,24	—	n.d.	—	—	(+)

Färbung der Neuro-Epithelzellen detektiert werden konnte, also das Färbemuster dem vorher produzierter polyklonaler anti-NGB-Antiseren entsprach (WYSTUB ET AL., 2003). Drei Klone hatten hohe ELISA-Werte, doch in der Immunfärbung markierten die Antikörper lediglich Blutgefäße und Zellkerne.



**Abbildung 3-31: Cytopspinpräparate Immunglobulin produzierender Hybridomzellen.**

Gezeigt sind die fünf Klone, die in Tabelle 3-6 fett dargestellt sind. A/B 9G3; C/D 11B12; E/F 13F7; G/H 18G2; I 9D11. In Bild A ist eine Immunglobulin produzierende Hybridomzelle markiert, in B eine negative. Der Klon 13F7 (E/F) zeigte vor der Reklonierung die größte Homogenität. Klon 9D11 (I) hatte nach dem Auftauen seine Fähigkeit, IgG zu produzieren, weitestgehend verloren. Die unterschiedliche Färbung entstand durch die Nutzung zweier verschiedener Sekundärantikörper (grün: FITC; rot: Cy3)

Als vielversprechend wurden die Klone 9D11, 9G3, 11B12, 13F7 und 18G2 eingestuft und für die Reklonierung verwendet (in Tabelle 3-6 fett dargestellt). In vier Durchläufen wurden alle fünf Klone ein- oder mehrmals rekloniert und insgesamt 2400 Subklone ausgesäht, von denen 120 im ELISA getestet und ihre Homogenität auf einem Cytozentrifugenpräparat überprüft wurden. Stark positive Klone wurden wieder auf perfundierten Adulthirnschnitten und Kryofötalschnitten auf ihre Immunreaktivität untersucht. Abbildung 3-31 zeigt die Zellen 3-4

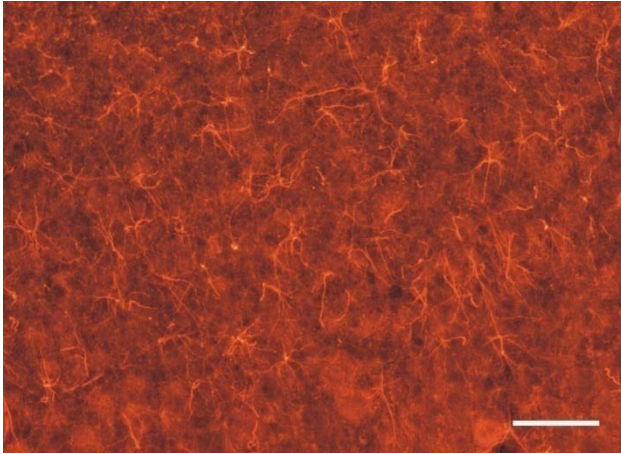
Tage nach dem Auftauen vor der Reklonierung auf einem Cytospinpräparat. In Bild A ist eine IgG-produzierende und in B eine negative Hybridomzelle markiert. Bis auf den Klon 13F7 (Abbildung 3-31 E/F) waren die Zellen nicht sehr homogen. Der Klon 9D11 hatte seine Fähigkeit, Immunglobulin zu produzieren, nach dem Auftauen fast vollständig verloren (Abbildung 3-31 I). Die Subklone wurden auf Grund des ELISA-Wertes vorsortiert und anschließend per Cytospin und Gewebeschnitten aus dem Mausehirn immunhistochemisch getestet. Einige Klone lagen auch nach einer zweiten Reklonierung nicht homogen vor. Obwohl die Subklone aus einer einzigen Zelle stammten, produzierten nur vereinzelte IgG. Die Überstände vieler Klone zeigten trotz ELISA-Werten von über 1,5 kaum noch Färbungen auf Gewebeschnitten, oder sie veränderten ihr Färbemuster. Die fünf Klone mit den besten Ergebnissen über die verschiedenen Messmethoden verteilt, sind in Tabelle 3-7 aufgeführt. Die drei fett markierten Klone wurden zur Expansion der Kultur und späteren Antikörperherstellung ausgewählt.

**Tabelle 3-7: Reklonierte Subklone und ihre Charakterisierung.**

Fett dargestellte Klone wurden nach dem Reklonieren weiter kultiviert und in größeres Volumen überführt. Der Cytospinwert bezieht sich auf die Homogenität und die Intensität der Immunglobulin-Produktion. (\* = ½ +; (+)=nicht konstant positiv)

Klonname	ELISA <sup>1</sup>	Cytospin	Fötal Hirn 13/14	Fötal Hirn quer 14/15	Adult Hirn perf. <sup>2</sup>
<b>9G3/3B9</b>	2,51	+++	+ <sup>+</sup>	(+)	?(+)
13F7/3E4	1,88	+	++	+	-/+
<b>13F7/2A2</b>	1,93	+ <sup>+</sup>	+++ <sup>+</sup>	+	(+)
13F7/3B3	1,47	++	+++ <sup>-</sup>	+ <sup>+</sup>	(+)
<b>13F7/3C7</b>	1,19	++	+++ <sup>+</sup>	++	+

Leider konnte bis heute kein Klon gefunden werden, der auch nach einer Vergrößerung des Kulturvolumens seine Homogenität und sein spezifisches Färbemuster beibehalten hätte. So detektierte der Überstand des Klones 9G3/3B9, der immer die höchsten ELISA-Werte aufwies und auch im Cytospin sehr homogen erschien, nach der schrittweisen Expandierung des Volumens auf schließlich 1000ml am Ende nur noch Gefäße im Neuroepithel. Weitere Versuche wurden eingestellt.



**Abbildung 3-32: Färbemuster des Klons 9G3/3B9 nach der Vergrößerung des Volumens auf 1000ml.**

Trotz eines hohen ELISA-Wertes und sehr guter Homogenität veränderte sich das Färbemuster des Klons und markierte im Neuroepithel der adulten Maus hauptsächlich Gefäße. Foto: S.Reuss; Barr 50µm

## 4 Diskussion

Allen Globinen ist eine prosthetische Gruppe, der Eisenprotoporphyrin-IX Komplex gemein, der ihnen die reversible Bindung gasförmiger Liganden wie O<sub>2</sub>, CO und \*NO ermöglicht. Hiermit tragen sie zur adäquaten Versorgung des Organismus mit Sauerstoff und damit zur aeroben Energieversorgung bei (WEBER ET AL., 2004; WITTENBERG UND WITTENBERG, 2003; MERX ET AL., 2001). Doch werden weitere Funktionen von Globinen übernommen. Als Beispiel seien hier die Flavohämoglobine, die \*NO abbauen und so detoxifizierend wirken oder die Protoglobine in Archaeobakterien, die bei der O<sub>2</sub>-Detoxifikation und dem Elektronentransport involviert sind, genannt (GARDNER ET AL., 1998; FREITAS ET AL., 2004). Um die bislang ungeklärten Funktionen von Ngb und Cygb gezielter diskutieren zu können, muss geklärt werden, in welchen Zelltypen diese Globine gebildet werden, wo sie intrazellulär lokalisiert sind und wie ihre Gene während der Entwicklung von Säugetieren und nach Stressexposition in Zellkulturen reguliert werden.

### 4.1 Zelluläre und Intrazelluläre Lokalisation von Neuroglobin

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Ngb in einer primären hippocampalen Zellkultur embryonaler Rattenhirne immunhistologisch in Neuronen nachgewiesen werden. Das Färbemuster war rein zytoplasmatisch und perinukleär. Die Doppelfärbung mit dem Neuronenmarker NeuN und dem Gliamarker GFAP zeigte eine ausschließliche Expression in Neuronen und nicht in Gliazellen. Ngb-Nachweise in immortalen Zelllinien zeigten zudem, dass Linien neuronalen Ursprungs, wie Neuroblastome (N2a, SH-SY5Y), Ngb exprimieren, während Linien nicht-neuronalen Ursprungs, wie Niere und Cervixkarzinom (Vero, HeLa) und Glioblastomlinien (GAMG, DK-MG), klar negativ sind. Die Neuronenspezifität der Expression steht in Übereinstimmung aber auch in scheinbarem Gegensatz zu Arbeiten anderer Autoren. OSTOJIC untersuchte in der Mausretina die Expression von Ngb in Neuronen, Astrozyten und Gliazellen (OSTOJIC ET AL., 2006). Die Ngb-Expression beschränkte sich auch hier auf die Neurone. CHEN hingegen publizierte erstmals Daten, wonach *Ngb*-mRNA auch in Astrozytenkulturen aus neugeborenen Maushirnen und das Ngb-Protein kolokalisiert mit GFAP in kultivierten Astrocyten nachgewiesen werden konnte (CHEN ET AL., 2005). Die quantitativen PCR-Daten dieser Arbeit zeigen jedoch Spuren einer Amplifikation von *Ngb* erst

im 38. von 40 Zyklen, kurz vor der *no-template-control*. Das Färbemuster der immunhistochemischen Nachweise entspricht mit der Anfärbung sowohl des Zytoplasmas als auch des Astrocytenkerns keiner bisherigen Publikation über Ngb. Dies könnte auch einen Artefakt darstellen, bei dem die chemische Fixierung des Gewebes die Veränderung des Epitops verursacht und so zu einer Kreuzreaktion der Antikörper führen kann. Die Ergebnisse der Veröffentlichung von CHEN ET AL. sollten daher mit Vorsicht bewertet werden. EMARA untersuchte Glioblastomzelllinien (GBM, *glioblastoma multiforme*) und konnte einerseits dort *Ngb*-mRNA und Protein nachweisen, andererseits auch eine durch Hypoxie induzierbare Expressionssteigerung *in vivo* wie *in vitro* erzielen (EMARA ET AL., 2009). Der Nachweis von erhöhten Ngb-Mengen in hypoxischen und nekrotischen Tumorregionen in *Xenografts* wird von EMARA als Argument für einen sauerstoffabhängigen Regulationsmechanismus gewertet als Teil der Abwehrstrategie der GBM-Zellen, um dem hypoxischen Umfeld zu widerstehen. Zum Nachweis von Ngb in Glioblastomen merken die Autoren selbst kritisch an, dass der Ursprung der GBM-Zelllinien nicht eindeutig geklärt ist, und obwohl sie als astrozytäre Tumorlinien klassifiziert sind, exprimieren sie neuronale wie auch Gliamarker (REBETZ ET AL., 2008).

Einen von meinen Untersuchungen abweichenden Befund zur Ngb-Lokalisation im Gehirn lieferte auch die Untersuchung der Hirne tieftauchender Säugetiere. Die Klappmützenrobbe wies eine starke Ngb-Expression in den Astrogliazellen, kaum jedoch in den Neuronen auf (MITZ ET AL., 2009). Die Gesamtmenge an Ngb im Hirn war mit der terrestrisch lebender Säuger vergleichbar (MITZ ET AL., 2009). Ngb ist wie auch das mitochondriale Enzym Cytochrom-c-Oxidase ein Marker für oxidativen Metabolismus, und beide Proteine werden in Neuronen landlebender Nager gemeinsam exprimiert (SCHMIDT ET AL 2003; HANKELN ET AL., 2005). Die Expression von Ngb und Cyt c ist dabei auf die Neurone beschränkt, wohingegen die Astrogliazellen keine Expression aufweisen. Im Hirn der Klappmütze ist jedoch auch die Expression von Cyt c in die Astrogliazellen verschoben, was für eine veränderte Lokalisation des gesamten aeroben Stoffwechsels von den Neuronen hin zu den Astrogliazellen spricht. Die gemeinsame Verlagerung der Expression beider Proteine bei tieftauchenden Säugetieren deutet darauf hin, dass die Astroglia hier den Hauptteil des verfügbaren Sauerstoffs verbraucht. Ngb könnte hierbei den oxidativen Metabolismus unterstützen (MITZ ET AL., 2009; HANKELN ET AL., 2005; BURMESTER UND HANKELN 2009). Hierauf weisen auch Untersuchungen an der Retina, dem Organ mit der höchsten Ngb-Expression, hin. Die Ngb-Lokalisation korreliert mit der Verteilung der Cyt-c-Oxidase und den Mitochondrien in den Segmenten mit der höchsten Sauerstoffumsatzrate (Ganglienzellen, innere und äußere plexiforme Schicht, Innensegmente der Photorezeptorzellen). Neuroglobin könnte an der

*facilitated oxygen diffusion* von der Zellmembran zu den Mitochondrien hin beteiligt sein (BENTMANN ET AL., 2005). Subzellulär ist die Verteilung stark an Kapillaren gebunden. Hier könnte Ngb mit seiner höheren O<sub>2</sub>-Affinität als Hb in den Kapillaren aber einer niedrigeren Affinität als die Cytochrom-c-Oxidase der Atmungskette in den Mitochondrien eine Sauerstoff Transportfunktion übernehmen (SCHMIDT ET AL., 2003; SCHMIDT ET AL., 2004). Untersuchungen an der avaskulären Retina des Meerschweinchens bestärken diese These. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass Mitochondrien lediglich in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen vorhanden sind, dem Bereich, der für 90% des O<sub>2</sub>-Konsums verantwortlich ist (CRINGLE ET AL., 2002). Auch Ngb ist hier auf dieses Segment, also die stoffwechselaktive Region, beschränkt (BENTMANN ET AL., 2005). Aus den eigenen Resultaten sowie auf Basis der Aussagen oben angeführter Publikationen liegt eine Sauerstoffversorgungsfunktion von Ngb nahe.

#### **4.2 Zelluläre und Intrazelluläre Lokalisation von Cygb**

Für Cytoglobin zeigte die primäre hippocampale Zellkultur unter anderem einen Nachweis in den Neuronen des Hippocampus. Die Anfärbungen wiesen jedoch neben der zytoplasmatischen Färbung auch ein Cygb-Signal im Kern auf. In Fibroblasten und ontogenetisch verwandten Zelltypen, wie Osteoblasten, Chondroblasten und Sternzellen, wird Cygb bisher als rein zytoplasmatisch beschrieben (NAKATANI ET AL., 2004; SCHMIDT ET AL., 2004). Die Kernlokalisierung von Cygb ist parallel zu meiner Arbeit für neuronale Zellen auch in Gehirnschnitten und der neuronalen Retina beschrieben worden (SCHMIDT ET AL., 2004; SCHMIDT ET AL., 2005). Die funktionelle Bedeutung der Kernlokalisation von Cygb im Nervensystem ist hingegen noch nicht geklärt.

Die Färbung der hippocampalen Primärkultur mit Cygb-Antiserum in der vorliegenden Arbeit wies auch auf eine Cygb-Lokalisation in Gliazellen hin (Abbildung 3-14). Allerdings ist die Färbung aufgrund der unterschiedlichen Ebenen von Neuronen und Gliazellen schwer zu bewerten und sollte, um ein klareres Ergebnis zu erzielen, mit einer gleichzeitigen Kernfärbung bzw. einem Neuronenmarker wiederholt werden. MAMMEN postuliert, dass Gliazellen über kein Cygb verfügen (MAMMEN ET AL., 2006). Auf perfundierten Schnittpräparaten von Maushirnen ist Cygb in nur wenigen distinkten Zellpopulationen nachgewiesen worden, die weniger als 10% der Neurone ausmachten. Eine Gliafärbung ist

hierbei nicht beobachtet worden (REUSS ET AL., IN VORBEREITUNG). GEUENS beschrieb eine ubiquitäre Verteilung des Cygb-Proteins in den Zellkernen der meisten Neurone, nicht aber im Zytoplasma, wobei hier als bisher einzige Publikation eine Kernlokalisierung von Cygb auch in Hepatozyten der Leber, Glomerulizellen der Niere und in Zellen des Pankreas postuliert wurde (GUENS ET AL., 2003). WYSTUB (2007) konnte anhand von Tests verschiedener Antikörper, bei denen auch der Antikörper aus der Publikation von GUENS ET AL., 2003 Verwendung fand, zeigte, dass unter hiesigen Laborbedingungen zeigten alle Cygb-Antiseren auf neuronalem Gewebe ein Signal distinkter Neuronen im Zytoplasma wie auch im Zellkern, während der Nukleus ungefärbt blieb. Auch die Anfärbungen der Kerne in nichtneuronalem Gewebe waren nicht nachvollziehbar und entsprachen nicht den zytoplasmatischen Nachweisen anderer Publikationen (NAKATANI ET AL., 2004; SCHMIDT ET AL., 2004; TATEAKI ET AL., 2004). Sie lassen sich am ehesten auf methodisch bedingte Artefakte zurückführen. Prinzipiell wurde eine Kernlokalisierung von Globinen jedoch auch schon im Pfeiffrosch (*Odontophrynus americanus*) und der Riesenkröte (*Bufo ictericus*) gezeigt (CIANCIARULLO ET AL., 1999). Bei diesen Amphibien besitzen die Erythrocyten einen Zellkern. In den euchromatischen Regionen des Nukleus konnte durch Immunfluoreszenz Hämoglobin nachgewiesen werden. Aufgrund des hohen Molekulargewichtes ist eine Diffusion durch die Kernmembran unwahrscheinlich, so dass die Autoren einen Einschluss des Proteins während zahlreicher mitotischer Zellteilungen postulierten (CIANCIARULLO ET AL., 1999). Durch den Nachweis, dass Cytoglobin nur in distinkten Zellpopulationen im Säugerhirn vorkommt, scheidet eine Funktion als genereller Sauerstoffspeicher bzw. -versorger aus. Naheliegender wäre eine Funktion als O<sub>2</sub>-Lieferant für spezifische, enzymatische, sauerstoffkonsumierende Funktionen, wie im Falle der NO-Synthase (GOTTI ET AL, 2005; WYSTUB 2007).

### 4.3 Intrazelluläre Lokalisation von Ngb und Cygb als GFP-Fusionsprotein

Die Kenntnis der intrazellulären Lokalisation eines Proteins ist von großer Bedeutung, um über die Korrelation von Expressionsort und eventuellem Zielkompartiment in der Zelle Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen zu können. Die intrazelluläre Lokalisation von Ngb und Cygb wurde auch mittels GFP-Fusionsexpression analysiert. Die grüne Fluoreszenz des GFP war für beide Fusionsproteine sowohl im Zytoplasma als auch im Kern der Zellen

sichtbar. Dies spricht für eine freie Diffusion zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern. Ein gezielter Transport des Fusionsproteins in den Kern oder in Organellen bzw. Membranen scheint daher nicht vorzuliegen. Dies entspricht auch bioinformatischen Vorhersagen. Eine *in silico*-Bestimmung der Lokalisation mit dem Programm PSORTII (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) ergab für Cygb eine Wahrscheinlichkeit von 94% und für Ngb von 89%, dass sich diese Proteine im Zytoplasma befinden. Es wurden von dem Programm auch keine Kernimportsignale ermittelt. Eine Vorhersage für die Aminosäuresequenz inklusive des GFP-Anteils veränderte das Ergebnis nicht.

Um auszuschließen, dass die korrekte Lokalisation der Globine von dem GFP-Anteil behindert wird, wurden sowohl N- wie auch C-terminale Fusionskonstrukte kloniert. Dies resultiert bei manchen Proteinen in unterschiedlichen Expressionsmustern, da das GFP die Proteinfaltung behindern und so die Wirkung von Signalpeptiden hemmen kann (SIMPSON ET AL., 2000). Im Fall von Ngb und Cygb ergaben beide Varianten keinen Unterschied. Auch das Einfügen eines *spacers* von sechs Aminosäuren zwischen den beiden Proteinen, der eine Behinderung der Proteinfaltung vermeiden sollte (DAHM ET AL., 2001; PLANCON ET AL., 2001), führte zum gleichen Expressionsmuster.

Die Größe der Fusionsproteine liegt mit 44 kDa für Ngb-GFP und 48 kDa für Cygb-GFP noch im Größenbereich der Proteine (60 kDa), die ohne Signalpeptid durch die Kernporen diffundieren können (RABUT ET AL., 2004; WEIS, 2003). Ein Nachweis per Westernblotanalyse konnte sicherstellen, dass die Zellen das jeweilige Fusionsprotein in der erwarteten Größe exprimieren. Die nachgewiesene GFP-Kernfärbung könnte nämlich auch durch eine proteolytische Spaltung des Fusionsproteins in der Zelle entstehen, nach der das GFP alleine in den Kern diffundieren könnte. Eine solche Proteolyse wäre jedoch als zusätzliche Bande auf dem Westernblot sichtbar gewesen. Der Grund für die Tatsache, dass Cygb per Ak-Färbung nur im Zytoplasma, als Fusionsprotein hingegen auch im Kern, nachweisbar war, könnte auf eine veränderte Faltung im Kern zurückgeführt werden. Die Veränderung der Tertiärstruktur könnte das Epitop für den Ak verändern und somit die Bindungsstelle zerstören (Abbildung 3-20).

Vielleicht könnte die Kopplung der Globine mit nur wenigen AS langen, über Antikörper nachweisbaren *Tags*, eine abschließende Klärung der Lokalisation erbringen. HA oder Myc sind Beispiele für solche *Tags*, die auf Grund ihrer geringen Größe keinen Einfluss auf die Proteinfaltung haben. Falls kein negativer Einfluss auf die Faltung vorliegt, könnte man das Globin-GFP-Fusionsprotein noch durch ein weiteres Protein, wie z.B. der GST (Glutathion-S-Transferase), vergrößern und somit die passive Diffusion bei der Untersuchung der

Lokalisation ausschließen, um gezielt aktiven Transport in den Zellkern oder andere Organellen zu untersuchen.

Bei Pflanzen ist ein Fall publiziert, bei dem ein Globin prädominant im Kern nachgewiesen wurde. In Alfalfa-Zellen konnte das Hämoglobin (Mhb1) vor allem im Kern, zum Teil aber auch im Zytoplasma, nachgewiesen werden (SEREGELYES ET AL., 2000). Auch dieses Globin weist kein nukleäres Transportsignal auf, und eine Diffusion durch die Kernmembran ist aufgrund seiner geringen Größe von 18kDA denkbar (QUADRINI AND BIEKER, 2002). Mhb1 zeigt eine Kolokalisation mit NO-Synthase, die wiederum das Häm als O<sub>2</sub>-Donor benötigt (RIBEIRO ET AL., 1999; HAUSLADEN AND STAMLER, 1998). Dies spricht für eine Funktion des kernlokalisierten Hämoglobins in der NO-Signaltransduktionskaskade. Zudem ist das Alfalfa-Hämoglobin in der Lage, unter NADPH-Verbrauch schädliche Mengen NO abzubauen (SEREGELYES ET AL., 2004).

Die Ergebnisse dieses Versuchs könnten einen Hinweis darauf geben, dass Cytoglobin in der NO-Signaltransduktionskaskade die Funktion eines O<sub>2</sub>-Donors übernehmen.

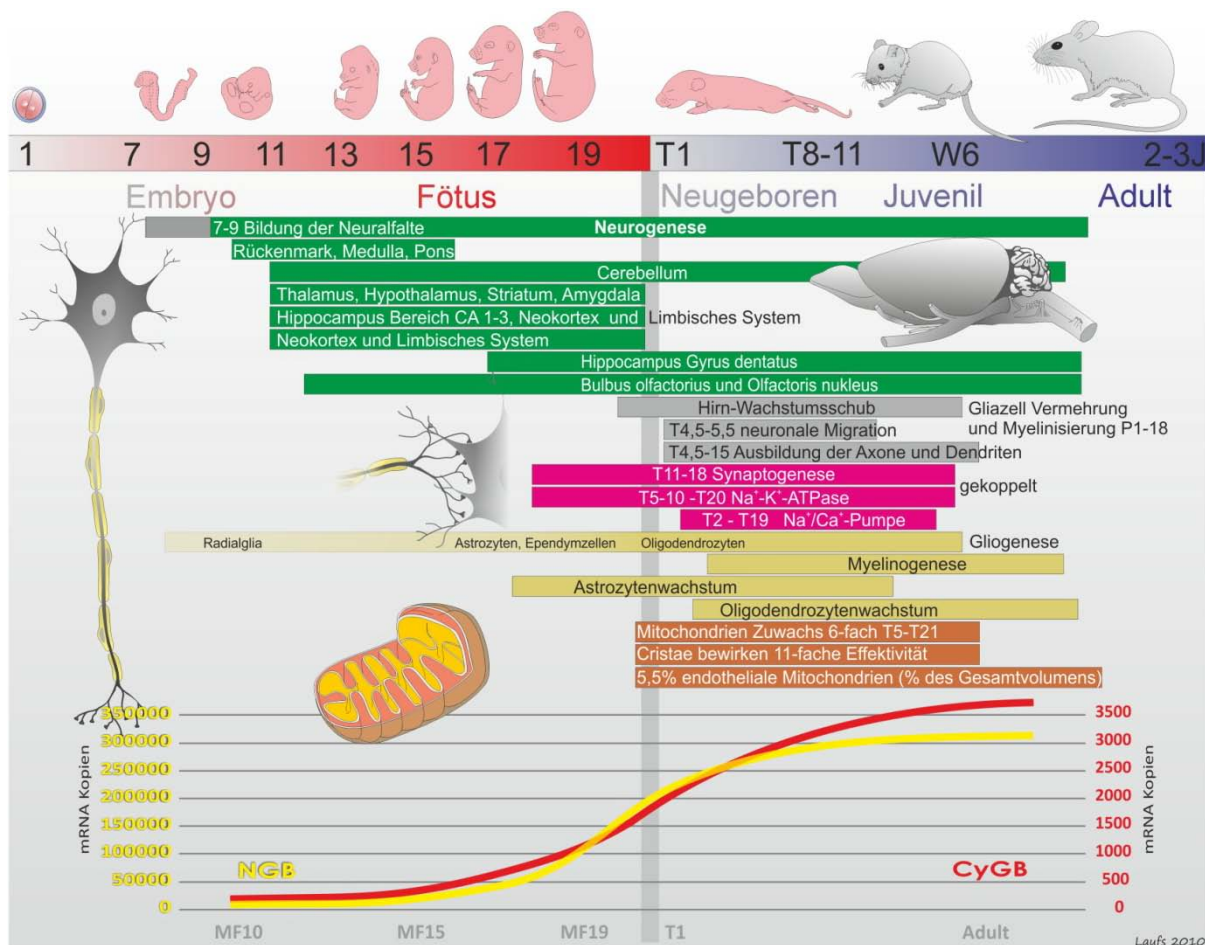
#### 4.4 Ngb während der Entwicklung des Säugerhirns

Neuroglobin zählt zu den am höchsten konservierten Proteinen innerhalb der Säugetiere. Dies legt eine essentielle Funktion im Organismus nahe. Von entscheidender Bedeutung für die Klärung der Funktion des Proteins kann das Wissen über den Zeitpunkt geben, wann das Globin erstmals in der Entwicklung eines Embryos nachweisbar ist und wie die Expression im Verlauf der Embryogenese und der Geburt verläuft. Für die Untersuchung von Neuroglobin während der Hirnentwicklung bei Säugetieren wurden von getimten Maus-Embryonen und -Föten das Hirn präpariert und sowohl die mRNA als auch der Gesamtproteinextrakt präpariert. Es konnte ein Assay für den quantitativen Realtime-PCR-Nachweis etabliert werden und ein in der Entwicklung nicht reguliertes Gen, welches als Referenz herangezogen werden sollte, gefunden werden (Histon, H2a).

Neuroglobin konnte auf Ebene der mRNA vom ersten Entnahmezeitpunkt an nachgewiesen werden (MF10). Das Gen zeigte einen kontinuierlichen Anstieg während der Entwicklung bis hin zum Adultstadium. Die absolute mRNA-Kopienzahl, bereinigt durch die Verrechnung mit dem unregulierten Gen Histon-2a, liegt am MF10 bei 2300 Kopien. Bis MF19 steigt die mRNA-Menge um den Faktor 27 (70.000 Kopien) und in den nächsten zwei Tagen (T1), im

Vergleich zur Expression am MF10, um Faktor 90 an (220.000 Kopien). Bis zum Adultstadium liegt der Anstieg für Ngb bei Faktor 130.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse mit ihrem kontinuierlichen Zuwachs an Globin laufen parallel zur Entwicklung des Säugerhirns (Abbildung 4-1). Schon vor dem ersten Entnahmezeitpunkt (MF10) um den Tag 7 nach der Befruchtung beginnt die Neurogenese. Bis zum Tag 15 (MF15) sind mit der Ausnahme z. B. des Hippocampus weitgehend alle Hirnbereiche in Anlagen vorhanden. Im Zeitraum vom Tag 17 setzt die Synaptogenese ein, die für die Verschaltung der Neuronen und deren Aktivität Voraussetzung ist.



**Abbildung 4-1: Die Expression der Ngb- und Cygb-mRNA im zeitlichen Verlauf der Entwicklung des Säugerhirns**

Gezeigt sind die Entwicklungsstadien der Maus, kombiniert mit den Geschehnissen der Neurogenese, des Hirnwachstums, dem Beginn der Synaptogenese, der Gliogenese und der Mitochondrienentwicklung im Säugerhirn. Zum Vergleich ist die Expressionsstärke der beiden Globine zum jeweiligen Zeitpunkt aufgetragen. Beide Graphen haben unterschiedliche Ordinaten und sind nur in der Tendenz miteinander zu vergleichen. Die mRNA-Kopienzahl von Ngb ist schon bei der ersten Probenentnahmen (MF10) 10-mal so hoch wie die von Cygb und steigt um das 17-fache bis zu MF19, auf das 90-fache bis zum Tag eins nach der Geburt und ist im Adulthirn 130-mal so stark exprimiert wie am MF10. Cygb-mRNA ist von Beginn an nur schwach exprimiert und steigt bis zum MF19 auf das vierfache und bis zum T1 auf das neunfache an. Im Adulthirn ist im Vergleich zum MF10 die 15-fache Cygb-mRNA Menge enthalten. Dies entspricht in etwa der Ngb-mRNA-Expression am MF15.

Der größte Anteil der Synapsen wird erst nach der Geburt ausgebildet (LAUDER ET AL., 1975; SUTOR ET AL., 1995; SWANN ET AL., 1990) Die Gliogenese beginnt zeitgleich zur Neurogenese, doch sind zu Beginn lediglich Radialgliazellen vorhanden. Sie bilden Ausläufer von der Subventrikularzone bis zur Pia mater, die bei der embryonalen Wanderung der neu gebildeten Neurone und Gliazellen von großer Bedeutung sind. Der exponentielle Zuwachs von Astrozyten, Ependymzellen und Oligodendrozyten findet hauptsächlich zwischen PC17 und PB7 statt. Die Myelinogenese startet erst nach der Geburt und dauert wie die Synaptogenese und Gliogenese bis weit in das Jungadult-Stadium hinein (BAYER ET AL., 1993). Bei der Abbildung ist zu beachten, dass Neuroglobin und Cytoglobin mit unterschiedlichen Ordinaten aufgetragen wurde. Die Einheit der Neuroglobin-Ordinate liegt 100-fach über der von Cytoglobin. Die Darstellung soll lediglich den Verlauf des Zuwachses vergleichbar machen. Der stärkste Anstieg an Ngb ist vom Tag 19 bis kurz nach der Geburt zu verzeichnen, ein Zeitraum, in dem der Fötus starken Veränderungen ausgesetzt ist. Zum einen ist die Geburt ein Vorgang, der meist mit einer Sauerstoffunterversorgung einhergeht. Zum anderen ist der Organismus des Neugeborenen vom Zeitpunkt der Geburt an 10x höheren Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Der einsetzende Stoffwechsel nach dem Durchtrennen der Nabelschnur produziert von nun an die Zellen belastende reaktive Sauerstoff-Spezies.

Um eine physiologische Funktion zu übernehmen, muss Ngb in einer ausreichenden Menge vorhanden sein. Ngb ist sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervengewebe nachgewiesen, doch die Konzentration im Hirn ist mit ~0,01% des Gesamtproteinanteils bzw. 1µM sehr gering, wobei jedoch 80% der Hirnmasse auf Gliazellen beruhen (BURMESTER ET AL., 2000; REUSS ET AL., 2002; MAGISTRETTI ET AL., 1999). Deutlich wird dies durch einen Vergleich mit der Konzentration von Myoglobin im Muskel, die bei 100-400µM liegt (WITTENBERG UND WITTENBERG, 1989). Allerdings beschränkt sich die Expression von Neuroglobin im Hirn landlebender Säuger auf die Population der Neurone (LAUFS ET AL. 2004). Eine vergleichbar hohe Konzentration wie Mb weist Ngb nur in der Retina auf. Hier liegt die Konzentration etwa 100-fach höher, was dafür sprechen könnte, dass Ngb hier eine O<sub>2</sub>-versorgende Funktion ähnlich der des Myoglobins übernimmt (SCHMIDT ET AL., 2003; HUNDAHL ET AL, 2006; WITTENBERG UND WITTENBERG 1989). Dafür spricht auch, dass ein Fehlen von Nervenglobinen bei Invertebraten unter Hypoxie zu einer reduzierten Überlebensfähigkeit von Neuronen führt (WITTENBERG, 1992; BURMESTER UND HANKELN, 2008).

Man geht davon aus, dass Ngb ubiquitär in allen Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert wird, doch gibt es starke regionale Unterschiede. Die stärkste Expression zeigen die Neurone des Hippocampus, des Cerebralen Kortex, Thalamus und Hypothalamus und des

Cerebellums (BURMESTER ET AL., 2000; WYSTUB ET AL., 2003). Selbst in diesen stark Ngb-exprimierenden Bereichen bilden Gliazellen einen großen Anteil, der sich zum Beispiel im menschlichen Gesamthirn auf mehr als die Hälfte des Hirnvolumens beläuft (KIMELBERG AND NORENBURG, 1989; O'KUSKY AND COLONNIER, 1982). Da für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit das Gesamthirn verwendet wurde, kann nicht auf die Expression in einzelnen Zellen geschlossen werden.

Ein Grund für den Anstieg der Expression könnte der Geburtsvorgang selbst sein, der meist mit einer O<sub>2</sub>-Unterversorgung einhergeht, wobei sich die Föten durch extreme Hypoxieresistenz auszeichnen (siehe Einleitung). Ngb könnte durch seine hohe Expression Sauerstoff im Gewebe speichern und den Versorgungsmangel kompensieren. Das komplett ausgebildete Säugerhirn benötigt in etwa 20% des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs und reagiert sehr empfindlich auf O<sub>2</sub>-Mangel. Die Ngb-Expression wurde je nach Publikation unter O<sub>2</sub>-Mangel *in vitro* wie auch *in vivo* sowohl reguliert als auch als unverändert beschrieben. Die Tabelle 4-1 fasst die bisher publizierten Ergebnisse zur Regulation von Neuroglobin unter Hypoxie zusammen.

Gegen die Möglichkeit, Ngb könne dem Hirn als Sauerstoffspeicher dienen, spricht die von DEWILDE *in vitro* beobachtete hohe Autooxidationsrate von Fe<sup>2+</sup>-Ngb (*Ferro*) zu oxigeniertem Fe<sup>3+</sup>-Ngb (*Ferr*) (DEWILDE ET AL., 2001). Entkräftet würden die Bedenken nur durch die Entdeckung einer Fe<sup>3+</sup>-Ngb-Reduktase, die vor einer affinen O<sub>2</sub>-Bindung zunächst das oxigenierte Fe<sup>3+</sup>-Ngb zu Fe<sup>2+</sup>-Ngb reduzieren könnte (FAGO ET AL., 2004; HANKELN ET AL., 2005). Untersuchungen der Sauerstoffbindungseigenschaften unter physiologischen Bedingungen (37°C, ~pH 7) führten zu einem vergleichbaren Resultat. Um O<sub>2</sub> an ein Gewebe abgeben zu können, sollte ein Hämprotein eine niedrigere O<sub>2</sub>-Affinität als der Sauerstoffkonsument aufweisen. In den Tests verringerte sich der P<sub>50</sub>-Wert von Ngb jedoch auf 7,5 Torr. Dies würde bedeuten, dass in einer Zelle lediglich 10% des vorhandenen Ngbs in oxigenierter Form vorläge (FAGO ET AL., 2004 A; FAGO ET AL., 2004 B).

#### **Tabelle 4-1: Regulation von Ngb in der Literatur**

Die Tabelle zeigt bisherige Publikationen zur Regulation von Ngb unter Hypoxie und Ischämie bzw. Reperfusion. In Zellkultur wird Ngb unter Hypoxie heraufreguliert, während *in vivo* die Ergebnisse gegen eine Regulation von Neuroglobin unter Hypoxie sprechen (O: Karotidenokklusion, ODN: Oligo-Desoxynukleotid).

Publikation	<i>in vivo/in vitro</i>	Ischämie/Reperfusion(I/R) Hypoxie/Dauer (H/D)	Methode	Ngb-Regulation
SUN ET AL., 2001	Maus Gehirn	90 min/ 4, 8, 16, 24 Std. (I/R)	Fokale Ischämie / Immuno	Protein: Heraufregulation nach 24 Std.
	HN33	0% O <sub>2</sub> / 24 Std.	Western Blot	Protein: Heraufregulation um Faktor 2,3 nach 8 Std.,danach Abfall
	kortikale embryonale Maus Neurone		Ngb-Antisense-ODN-Inkubation, Bestimmung der Lebendzellzahl (MTT 20 bzw. TBE 21 )	Überlebensrate signifikant erniedrigt
MAMMEN ET AL., 2002	Maus Gehirn	10% O <sub>2</sub> / 14 Tage (H/D)	ISH, qPCR	mRNA: keine Regulation
SUN ET AL., 2003	Ratte Gehirn	ODN: 1µl/h für 72h dann 90 O/24 Std. R	Fokale Ischämie/ Ngb-Antisense-ODN-Gabe	Infarkt volumen um 55-60% erhöht
FORDEL ET AL., 2004	Maus Gehirn	7 bzw. 12% O <sub>2</sub> / 48 Std. (H/D)	Hypoxie/ Immuno	mRNA: keine Regulation
	HN33	1% O <sub>2</sub> / 4 bis 54 Std. (I/R)	Hypoxie/qPCR	mRNA: keine signifikante Heraufregulation max. um Faktor 4,1
HUNDAHL ET AL., 2005	Maus Gehirn und Retina	7,6% O <sub>2</sub> / ½ bzw. 2 Std. (H/D)	Hypoxie/ Immuno und qPCR	mRNA und Protein: keine Regulation
HUNDAHL ET AL., 2006	Ratte Gehirn	90 min/ 24 Std. bzw. 1 Woche (I/R)	Globale Ischämie/qPCR/Immuno	mRNA: Runterregulation um 40% / Immunfärbung: weniger Ngb-positive Neurone im Striatum
SCHMIDT-KASTNER ET AL., 2006	Ratte Gehirn	12,5 min/ ½ bis 72 Std. (I/R)	Globale Ischämie/ ISH	mRNA: keine Regulation
	HN33, PC12	0-1% O <sub>2</sub> / 24 Std. (H/D)	Hypoxie/qPCR	mRNA: Heraufregulation max. um Faktor 2,3
LI ET AL., 2006	Ratte Gehirn	10% O <sub>2</sub> / 1, 3, 7 und 14 Tage (H/D)	Hypoxie/qPCR	mRNA und Protein: Heraufregulation um Faktor 1,8 bzw. 1,7 nach 1 Tag
		10 und 21% O <sub>2</sub> alternierend/ 1, 3, 7 und 14 Tage (H/D)	Hypoxie/qPCR	mRNA und Protein: Heraufregulation um Faktor 2,5 bzw. 1,9 nach 3 Tagen
SHANG ET AL., 2006	Maus Gehirn (Gerbil)	20 min/ 2, 8, 16, 24, 48 und 72 Std. (I/R)	Globale Ischämie/ Immuno, ELISA	Cortex: Heraufregulation nach 16-24 Std. um 46-70%
				Hippocampus: Herunterregulation nach 24 Std. um 35-79%
RAYNER ET AL., 2006	ND15 (Neuroblastoma)	1,2%/1 Std. /R für 2, 5, 24 Std.	Hypoxie/qPCR	mRNA: Heraufregulation bis 4-fach danach wieder Abfall
BURMESTER ET AL., 2007	Ratte Gehirn	6% O <sub>2</sub> / 5 Std. (H/D)	Hypoxie/qPCR	mRNA: keine Heraufregulation (evtl. Faktor 2 runter)
		10% O <sub>2</sub> / 22 und 40 Std. (H/D)	Hypoxie/qPCR	mRNA: keine Heraufregulation
EMARA ET AL., 2009	Glioblastoma multiforme	0,6% O <sub>2</sub> / 0 bis 48 Std.	Hypoxie/qPCR	mRNA: Heraufregulation bis 9-fach
		0,6% O <sub>2</sub> / 0 bis 48 Std.	Hypoxie/Western Blot	Protein: Heraufregulation

Bei dem von STUDER publizierten Sauerstoffpartialdruck von 8-40 Torr, der im Säugerhirn vorherrscht, und der Annahme, zur Aufrechterhaltung des O<sub>2</sub>-Partialdrucks innerhalb der Neurone sollte der Wert etwa 10 Torr betragen, scheint Ngb für diese Aufgaben ungeeignet zu sein (STUDER ET AL., 2000; HOFFMAN ET AL., 1999). Andere Arbeitsgruppen hingegen haben im Hirn große Schwankungen der Sauerstoffpartialdrücke detektiert, die je nach Gehirnregion zwischen 1-3 Torr aber auch lokal Werte um 10-20 Torr erreichen (ERECINSKA UND SILVER, 2001; FAGO ET AL., 2004). Unter diesen Bedingungen läge ein Großteil des Ngbs in O<sub>2</sub>-gesättigter Form vor und stünde durchaus dem O<sub>2</sub>-Metabolismus des Hirns zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit, wie Ngb die Überlebensrate von Zellen unter Hypoxie steigern könnte, liegt in der Eigenschaft, eine Disulfidbrücke zwischen den AS Cys46 und Cys55 der Helices CD7 und D5 auszubilden und dadurch eine hohe O<sub>2</sub>-Affinität von 1 Torr zu erreichen (HAMDANE ET AL., 2003). Diese neigt aber unter reduzierenden Bedingungen dazu aufzubrechen, wenn sich z. B. unter akuter Hypoxie NADH<sup>+</sup> Reduktionsäquivalente anreichern. Der Verlust der Disulfidbrücke wiederum senkt die O<sub>2</sub>-Affinität von Ngb um das 10-fache. Der nun verfügbare Sauerstoff könnte den Hypoxiestress der Nervenzelle vermindern. Dieser Mechanismus konnte bisher aber nur *in vitro* nachgewiesen werden (HAMDANE ET AL., 2003; HANKELN ET AL., 2005). Hierzu passt auch die Beobachtung, dass Hypoxie in Neuronen zu einem pH-Wert Abfall führt, was auch mit einer Verminderung von Bindungen exogener Liganden einhergeht (LIPTON, 1999). FAGO hat diese Eigenschaften des humanen Neuroglobins noch genauer untersucht und *in vitro* über Temperatur und pH-Wert physiologische Bedingungen nachempfunden, die in der Zelle auch einen reduzierenden Charakter aufweisen. Hierbei lag die O<sub>2</sub>-Affinität des Ngbs mit 7,5 Torr weit niedriger (FAGO ET AL., 2004). Verantwortlich hierfür ist die schon von HAMDANE beschriebene Disulfidbrücke, die sich unter diesen Bedingungen nicht ausbilden kann und zu einer Verringerung der Sauerstoffaffinität um den Faktor 7-8 führt. Auch in diesem Beispiel führten die geringen Sauerstoffpartialdrücke im Gehirn dazu, dass nur ein kleiner Anteil des Ngbs in oxygenierter Form vorläge.

Während Ngb also in metabolisch aktiven Geweben zwar durchaus eine O<sub>2</sub>-versorgende Funktion übernehmen könnte, ist dies für die Neuronen des Säugerhirns gesamt betrachtet eher unwahrscheinlich. Die durchschnittliche Konzentration von ~1µM erscheint zu niedrig, um einen ausreichenden Transport zu den Mitochondrien zu gewährleisten.

#### 4.5 Cygb während der Entwicklung des Säugerhirns

Die embryonalen mRNAs und Gesamtproteinextrakte wurden auch auf die Expression von Cytoglobin untersucht. Wie bei Neuroglobin war ein Nachweis vom ersten Entnahmepunkt an möglich, doch liegt die mRNA-Menge während der Entwicklung weit unter der von *Ngb*. Die absolute Kopienzahl lag nach der Normalisierung mit dem unregulierten Gen Histon-2a bei 220 mRNA-Kopien. Im weiteren Verlauf stieg die *Cygb* Expression um den Faktor 4,5 (1.000 Kopien), bzw. um den Faktor 9 am T1 nach der Geburt an (2000 Kopien). Bis zum Adultstadium lag der Anstieg für *Cygb* bei Faktor 16 (3600 Kopien). Den extremen Unterschied zur Expression von *Ngb* während der Entwicklung verdeutlicht Abbildung 4-1. Hierbei ist zu beachten, dass die Graphen einen ähnlichen Verlauf zeigen, jedoch unterschiedliche Ordinaten besitzen (*Cygb* rot, rechts; *Ngb* gelb, links). Anfangs liegt die Menge an *Cygb* noch etwa bei 1/10 der *Ngb*-mRNA-Menge. Bis zum Adultstadium wächst dieser Unterschied auf mehr als das 100-fache an. Der Proteinnachweis zeigte wie die mRNA einen kontinuierlichen Anstieg der Expression im Verlaufe der Hirnentwicklung. Diese geringe Menge ist auch dem Umstand zuzuschreiben, dass *Cygb* nur in distinkten Zellpopulationen des Kortex, des Striatums und der Pyramidenzellen des Hippocampus in hoher Intensität nachgewiesen werden konnte, wobei hierbei nie mehr als 10% der vorhandenen Neurone diese intensive Färbung zeigten (SCHMIDT ET AL., 2004). MAMMEN untersuchte den Zuwachs an *Cygb*-mRNA anhand einer semiquantitativen PCR zwischen MF17,5 und dem Adultstadium und postulierte einen 10-fachen Zuwachs (MAMMEN ET AL., 2006). Dies entspricht in etwa den Werten der vorliegenden Arbeit, die zwischen dem früheren Zeitpunkt MF15 und dem Adultstadium einen 15-fachen Anstieg und zwischen dem MF19 und dem Adultstadium einen knapp 4-fachen Anstieg ermittelt hat. MAMMEN hat *Cygb* während der Entwicklung und unter Hypoxie untersucht und schlägt aufgrund seiner selektiven Expression im Hirn und seiner ermittelten Hochregulation unter Hypoxie eine Funktion als stressinduziertes Gen im Bereich des Metabolismus und der kardiovaskulären Homöostase vor (MAMMEN ET AL., 2006).

#### 4.6 Ngb- und Cygb-Expression nach Paraquat-induziertem oxidativem Stress

Um die Auswirkung von Sauerstoffradikalen auf die Ngb-Expression zu bestimmen, wurde die mRNA von Primärkulturen vom Kortex der Ratte und vom Cerebellum der Maus quantifiziert, die zuvor mit Paraquat behandelt worden waren. Dies führte zu einer vermehrten Bildung von Hydroperoxid (siehe hierzu Abbildung 1-8). Verglichen wurde hierbei die Expression der beiden Globine mit den bekannten Antioxidanz-Enzymen Cu/Zn-Superoxid Dismutase (SOD) und der Glutathion-Peroxidase (GPx). Ein leichter Anstieg der mRNA-Expression konnte bei Ngb nur in der höchsten Paraquat-Konzentration ermittelt werden (1000µM), wobei das Cerebellum starke Schwankungen aufwies, während der Kortex keine Regulation zeigte. Da auch bei diesem Versuch keine einzelnen Zellpopulationen untersucht werden konnten, können Expressionsunterschiede in distinkten, stark exprimierenden Zellen im Kortex nicht ausgeschlossen werden. Im Cerebellum fiel die mRNA-Konzentration anfangs ab (30min), um wieder leicht anzusteigen und bei einer Stunde den höchsten Wert mit Faktor 1,55 zu erreichen, der leicht über dem Ausgangswert der Leerkontrolle lag. Bei längerem Versuchsverlauf nahm die mRNA-Konzentration wieder kontinuierlich ab, erreichte nach etwa zwei Stunden den Ausgangswert und fiel in den folgenden vier Stunden um den Faktor drei. Je länger die Dauer und je höher die Konzentration des Paraquats, desto negativer sind also die Auswirkungen auf die Ngb-mRNA-Expression. Gegen die Möglichkeit, dass die Zellen sich mit längerer Einwirkzeit dem Zelltod näherten, spricht die Tatsache, dass der Verlauf des Referenzgens, Ribosomal-18s, keine Veränderung zeigte.

Die im Folgenden untersuchten Antioxidanz-Enzyme zeigten einen Verlauf, der sich mit dem Expressionsmuster von Ngb deckte, wobei beide eine schwächere Ausprägung zeigten. Hier muss aber auch berücksichtigt werden, dass die Anzahl an Ngb-mRNA-*templates* im Cerebellum 700-fach niedriger als die der SOD ist und 200-fach niedriger als Gpx.

In der Literatur ist für SOD und Gpx auf Proteinebene ein Anstieg an Aktivität bei verstärktem ROS-Vorkommen nachgewiesen. Transgene Mäuse, die das jeweilige Gen überexprimieren, zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Gabe von Paraquat mit weniger neurodegenerativen Symptomen überstehen als nicht transgene Versuchstiere (KHAN ET AL.,03; THIRUCHELVAM ET AL.,05).

Dieser Versuch zeigt, dass die Ngb-Expression zumindest geringfügig von Sauerstoffradikalen beeinflusst werden kann. Folgende Funktionen von Ngb wären dadurch zu diskutieren:

Globine können ROS und RNS unschädlich machen und dadurch in Zellen neuroprotektive Wirkungen entfalten (FLÖGEL ET AL., 2004). Ein solcher Effekt ist auch für Ngb von einigen Arbeitsgruppen publiziert worden und wird durch Vergleiche mit den *Scavenger-*

Eigenschaften von Myoglobin begründet (SUN ET AL., 2001; WEBER ET AL. 2004; MILTON ET AL., 2006; WANG ET AL., 2008). Wie Hämoglobin und Myoglobin vermag Ngb  $\cdot\text{NO}$  zu binden. *In vitro* wird bei einem Überschuss von  $\cdot\text{NO}$  über die reduktive Nitrosilierung des Häms eine Ngb-Fe<sup>2+</sup>-NO-Spezies gebildet. Diese reagiert mit dem unter Hypoxie vermehrt auftretenden starken Zellgift Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), wobei  $\cdot\text{NO}$  mit dem O<sub>2</sub><sup>-</sup> reagiert und Ngb-Fe<sup>3+</sup> und  $\cdot\text{NO}$  entstehen. Die Verbindungsrate von NgbNO und ONOO<sup>-</sup> ist dabei um zwei Größenordnungen höher als die von HbNO, was die Wahrscheinlichkeit für eine Funktion als Radikalfänger *in vivo* stark erhöht (HEROLD ET AL, 2004; HEROLD ET AL, 2005). Dagegen könnte lediglich die für *in vivo*-Verhältnisse niedrige Thermolyserate des Ngb-Fe<sup>2+</sup>-NO-Komplexes von  $t_{1/2} \geq 10$  Minuten sprechen (VAN DOORSLAER ET AL., 2003).

Infolge cerebraler Ischemie weisen Neurone einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck und eine Erhöhung der  $\cdot\text{NO}$ -Werte auf. In diesem Fall schlagen BURMESTER UND HANKELN für Ngb eine NO-Dioxygenasefunktion vor. Unter normoxischen Bedingungen könnte Ngb den  $\cdot\text{NO}$ -Überschuss zu Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) abbauen oder aber unter Hypoxie als deoxygeniertes Ngb aus NO<sub>2</sub><sup>-</sup> NO bilden und so die Kontraktion bzw. Relaxion der Blutgefäße direkt und hierdurch die O<sub>2</sub>-Versorgung der Mitochondrien indirekt beeinflussen. (BURMESTER UND HANKELN, 2009; JIN ET AL., 2008; PETERSEN ET AL., 2008).

In oxygenierter Form reagiert Ngb (Ngb-Fe<sup>2+</sup>) *in vitro* mit NO sehr schnell zu Ngb-Fe<sup>3+</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Eine weitere Reaktion des *Ferri*-Ngbs mit dem stark oxidierenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer *Ferryl*-Form (Fe<sup>4+</sup>) bleibt aus (BRUNORI ET AL., 2005; HEROLD ET AL., 2004). Diese Eigenschaft erweist sich unter oxidativem Stress als sinnvoll. Doch sollte Ngb unter länger anhaltender Hypoxie die Zellen vor entstehenden ROS und NOS bewahren, so wäre eine ständige Reduzierung der *Ferri*-Form zur *Ferro*-Form erforderlich, um erneut NO binden zu können. Hiergegen spricht die Tatsache, dass dazu eine Ngb-Reduktase vonnöten wäre, die bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

Obwohl BURMESTER UND HANKELN darauf hinweisen, dass *in vitro* bisher keine direkte Korrelation zwischen dem Aussetzen neuronaler Zellkulturen mit ROS oder RNS und einer Hochregulation von Ngb gezeigt werden konnte, führt eine Überexpression des Proteins zu erhöhter Toleranz der Zellen gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NO-induziertem Stress (BURMESTER UND HANKELN, 2009; FORDEL ET AL., 2006; LI ET AL., 2008; JIN ET AL., 2008). DUONG ET AL. führten für diese Beobachtung gleich mehrere Begründungen an: Die Aufrechterhaltung des ATP-Gleichgewichts, Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Zustroms, Regulation der Eisen-, Kupfer- und Zinkaufnahmen und eine Hemmung der Apoptose der Zelle (DUONG ET AL., 2009). Eine Begründung, wieso Zellen nicht von sich aus mit einer Ngb-Hochregulation reagieren und ob diese Schutzmechanismen *in vivo* von Bedeutung sind, bleiben die Autoren schuldig.

In den von mir untersuchten Proben konnten für die Expression von Cytoglobin keine Unterschiede festgestellt werden. Es konnte eine beständige, niedrige mRNA-Menge in allen Proben detektiert werden, die keinerlei Veränderung durch die Paraquat-Stimulation zeigten. Anhand dieser Ergebnisse kann man für Cytoglobin keine Funktion als ROS-induziertes Stressprotein annehmen.

#### 4.7 Expression von NGB in Tumorgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *cDNA-Human-Cancer-Profilling-Array* mit einer *NGB*-Sonde hybridisiert. Ziel war es nachzuweisen, ob Gewebe mit einer kanzerogenen Entartung mit einer Initiation der *NGB*-Expression reagiert. Auf dem Array waren keine neuronalen Gewebe vertreten. Auch nach einer langen Expositionszeit konnte in keiner der von 241 unterschiedlichen Patienten stammenden cDNAs ein Hybridisierungssignal nachgewiesen werden.

In mRNA-Proben humaner Nierentumore konnte weder in gesundem Nierengewebe noch im Tumorgewebe *NGB* nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mit den Zelllinien GAMG und DK-MG auch von Glioblastomen abstammende Zelllinien auf Neuroglobin mittels Immunfluoreszenz untersucht, doch war keine der Zelllinien *Ngb*-positiv (Abbildung 3-15).

In jüngst veröffentlichten Daten, bei denen Biopsien von Glioblastomen und Astrozytomen mittels quantitativer PCR untersucht wurden, konnte in fünf von sieben Glioblastomen und einem von zwei Astrozytomen Neuroglobin nachgewiesen werden. Die Menge ist aber so gering, dass bei einer angenommenen mRNA-Menge von 15pg pro Zelle lediglich 0,01 *NGB*-mRNA-Moleküle vorhanden sind (GORR ET AL., 2011). Wie schon unter 4.1 beschrieben, publizierte CHEN erstmals Daten, wonach *Ngb*-mRNA auch in Astrozyten nachgewiesen werden konnte (CHEN ET AL., 2005). Doch sowohl die quantitativen PCR-Daten als auch das Färbemuster des Immunfluoreszenz-Nachweises sollten mit Vorsicht betrachtet werden.

EMARA wies in Glioblastomzelllinien (GBM, *glioblastoma multiforme*) *NGB*-mRNA und das Protein nach (EMARA ET AL., 2009). Allerdings ist der Nachweis des astrozytären Ursprungs nicht eindeutig geklärt, da die verwendeten GBM neuronale wie auch Gliamarker exprimieren (REBETZ ET AL., 2008). Ein Vergleich all dieser Daten mit der Auswertung einer Suche in der SAGE-Datenbank (*serial analysis of gene expression*; VELCULESCU ET AL., 1995;

<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) des *Cancer Genome Anatomy Projects* (CGAP; LAL ET AL., 1999; SIU ET AL., 2001) führte zu ähnlichen Ergebnissen. In den Daten von Glioblastoma und Astrozytoma weisen nur 1-2 *Tags* von 200.000 auf *NGB* hin. Medullablastomen verzeichnen mit 5-6 *Tags* von 200.000 eine etwas höhere Anzahl. Dies passt wiederum zu den *NGB*-Nachweisen von EMARA, da Medullablastome ihren Ursprung in unreifen neuronalen Vorläuferzellen haben (HUSE UND HOLLAND, 2010). Doch auch für gesundes Hirngewebe werden nicht mehr als 5-6 *Tags* von 200.000 angegeben. Dies ist wohl mit der vorwiegend auf Neurone beschränkten Expression zu begründen, wenn man sich das Verhältnis von Gliazellen und Neuronen (10:1) im menschlichen Hirn vor Augen hält (HANKELN ET AL. 2004; REUSS ET AL. 2002; WYSTUB ET AL. 2004; SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2001).

Die sehr geringe in Tumoren nachgewiesene Menge an *NGB* macht eine Aufgabe als Sauerstoffversorger oder eine Beteiligung an der Beseitigung von *Reactive Oxygen Spezies* unwahrscheinlich. Eine mögliche Funktion könnte die auch bei der Entwicklung diskutierte Reaktion und Reduzierung von Cytochrom-c darstellen (FAGO ET AL., 2006; FAGO ET AL., 2008). Während einer Sauerstoffunterversorgung wird von den Mitochondrien *Ferri*-Cytochrom-c in das Zytoplasma abgegeben. Dies ist ein wichtiger Bestandteil der Caspase-Kaskade, die zur Apoptose führt. *Ferro*-*NGB* könnte über die Reduktion von *Ferri*-Cytochrom-c die Einleitung dieser Kaskade verhindern und so die Zelle vor der Apoptose bewahren (FAGO ET AL., 2006). Die Unterbindung der Apoptose durch *NGB*-Expression könnte von Tumorzellen zum eigenen Überleben genutzt werden (RAYCHAUDHURI ET AL., 2010).

Eine weitere Verbindung von *Ngb* mit dem Schutz vor dem programmierten Zelltod könnte über eine Bindung mit den Proteinen Rac1 und RhoA bestehen, die wie die Pak1-Kinase während auftretender Hypoxie eine Schlüsselrolle im Aufbau von Aktin und der Aktivität des RhoGDI-GTPase<sup>3</sup>-Signal-Komplexes einnehmen (KHAN ET AL., 2008). Über die Hemmung der Pak1-Kinaseaktivität und Abspaltung der GTPase Rac1 vom endogenen GDI würden wiederum der Aktinaufbau gehemmt, das Apoptosesignal gespalten und *Ngb* eine neuroprotektive Bedeutung zukommen. Dies konnte auch in Versuchen mit Neuronen aus *Ngb*-überexprimierenden Mäusen gezeigt werden. Neurone dieser Tiere reagierten auf Hypoxie nicht mit Polarisierung der lipiden Mikrodomänen in der Membran oder mitochondrialer Aggregation (KHAN ET AL., 2007; KHAN ET AL., 2008).

---

<sup>3</sup> guanine-nucleotide dissociation inhibitor, GDI

#### 4.8 Cytoglobin: ein mögliches Tumorsuppressorgen?

Publikationen zu funktionellen Untersuchungen von Cytoglobin häufen sich im Vergleich zu Neuroglobin erst in den letzten Jahren. Eine Korrelation der Cygb-Expression mit metabolisch besonders aktiven Bereichen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Bei dem oben erörterten Beispiel der Retina, in der Ngb in den Schichten mit dem höchsten Sauerstoffkonsum im Bereich der Mitochondrien exprimiert wird, ist Cygb auch in Koexpression mit Ngb in allen Schichten außer der Photorezeptorschicht und den inneren Plexiformen vorhanden (SCHMIDT ET AL., 2004; OSTOJIC ET AL., 2006). Um als O<sub>2</sub>-Speicher und Transporter zu fungieren, liegt die Expression von Cytoglobin jedoch zu niedrig. Hier wäre eine Funktion als O<sub>2</sub>-Lieferant für spezifische enzymatische, sauerstoffkonsumierende Funktionen, wie im Falle der NO-Synthase (nNOS), denkbar. (GOTTI ET AL., 2005). Eine Veränderung der Cygb-Expression unter oxidativem Stress, wie unter 4.6 für Ngb beschrieben, konnte für Cygb nicht nachgewiesen werden.

Mit dem *Cancer Profiling Array* der Firma *Clontech*, bei dem 241 Paare normalisierter cDNAs von Tumoren und dem dazugehörigen Normalgewebe einzelner Patienten verglichen werden, konnten für *CyGB* keine Unterschiede in der Expression ermittelt werden. Bei den Kontrollen, die aus Krebszelllinien, HeLa, Hefe, *E. coli* und humaner genomischer DNA bestanden, zeigte lediglich die genomische DNA ein schwaches Signal, was auf die Zugehörigkeit von *CyGB* zur Genfamilie der Globine zurückzuführen ist. Die epitheliale HeLa-cDNA zeigte kein Signal. In der Literatur ist diese Zelllinie als *CyGB*-positiv beschrieben, doch sind Epithelzellen im Gewebe als *CyGB*-negativ publiziert (SHAW ET AL., 2009; SCHMIDT ET AL., 2004).

Im Zusammenhang mit einer Tumorbildung oder Metastasierung war keine erhöhte bzw. erniedrigte Expression zu erkennen. Dagegen konnte Dr. Koslowski aus der AG Türeci an den Uni-Kliniken Mainz mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR in Lungentumorgeweben eine signifikante Herunterregulation von *CyGB*-mRNA im Vergleich zu gesundem Gewebe nachweisen. Für Tumorgewebe aus Ovar, Darm und Brust war keine veränderte Regulation nachweisbar (GORR ET AL., 2011, ABB.7.1.1; ANHANG). In aktuellen Publikationen hingegen wurde eine Regulation von *CyGB* auf mRNA-Ebene postuliert.

*CyGB* liegt in der chromosomalen Region 17q25, der oft eine Rolle bei der Entstehung bösartiger Tumore zugeschrieben wird (PRESNEAU ET AL., 2005). Der Locus für die erblich bedingte Erkrankung *Tylosis palmaris* (Hornschwielen), die häufig mit gleichzeitig bestehendem Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus einhergeht (TOC, *Tylosis with Oesophageal Cancer*), wurde auf einen 42,5-kb umfassenden Bereich eingegrenzt, in dem nur *Cygb* als komplettes Gen vorhanden ist. Eine Mutation des Gens konnte in *Tylosis*

Patienten jedoch nicht nachgewiesen werden (RISK ET AL., 2002; LANGAN ET AL., 2004; SHAHABI ET AL., 2004). Erst die Untersuchung auf Methylierungen im Promotorbereich zeigte, dass diese bei *Cygb* in Lungen- und Ösophagustumorgewebe signifikant erhöht sind (XINARIANOS ET AL., 2006). Dagegen konnte McRONALD lediglich eine niedrige *Cygb*-Expression bei TOC nachweisen, fand aber keine signifikant erhöhte Methylierung im Promotorbereich und versuchte die Untersuchungsergebnisse mit Trans-Allelischer-Repression zu begründen (McRONALD ET AL., 2006). Beim Vergleich von Tumorgewebe mit gesundem Vergleichsgewebe und primären Zelllinien aus Kopf-Halstumoren schließt SHAW, dass die Menge an Methylierungen im Bereich des Promotors entscheidend ist, wobei abgekapselte Tumore ab einer Größe von ca. 20mm wiederum einer *Cygb*-Regulation, ausgelöst durch mangelnde Sauerstoffversorgung, unterliegen, die später erörtert wird (SHAW ET AL., 2006; SHAW ET AL., 2009). Eine Analyse des Methylierungsstatus und der Expression von *Cygb* in 16 Zelllinien, von denen 14 lungen- und bronchialkarzinogenen Ursprungs waren, zeigte eine Methylierung aller 24 CG-Dinukleotide in acht von zehn Lungenkrebszellen und allen vier Bronchialkarzinom Zelllinien in einem 110 bp großen Bereich der Promotorregion, der als entscheidend für ein *Genesilencing* ermittelt wurde. Die Zelllinien mit methyliertem Promotorbereich zeichneten sich durch reduzierte bzw. fehlende *Cygb* Expression aus. Die verbleibenden Krebszelllinien und nichtmalignen Epithellinien waren unmethyliert und *Cygb* positiv. Eine Behandlung der methylierten Zellen mit 5-Aza-2-Deoxycytidin zur Aufhebung der Methylierung induzierte eine *Cygb*-Expression. Dies zeigt die Bedeutung der CG-Dinukleotide in dieser Region für die Expression von *Cygb* und die Korrelation zwischen *Cygb* und einer Tumorentstehung (SHIVARPURKAR ET AL., 2008). Quantitative methylierungsspezifische PCR auf verschiedenen Tumorgeweben zeigten vor allem in Lungentumoren eine hohe Spezifität für *Cygb*-Methylierung im Vergleich zu gesundem Gewebe. Die Tatsache, dass keine Beziehung zwischen Methylierung und Malignität hergestellt werden konnte, deutet laut SHIVARPURKAR auf den frühen Zeitpunkt der Methylierung in der Tumorentstehung hin (SHIVARPURKAR ET AL., 2008).

Das veränderte Wachstumsverhalten der Zellen, wobei sie nach einem RNAi vermittelten *Cygb-knock-down* dazu neigten, übereinander zu wachsen, gleicht Zellen nach einem *knock-down* des Tumor Suppressor-Gens p53 (SATO ET AL., 2006).

Transfiziert man Tumorzellen, die aufgrund der Methylierung des Promotorbereiches kein *Cygb* exprimieren, transient mit einem Expressionskonstrukt, welches für die cDNA von *Cygb* kodiert, so führt die *Cygb*-Expression zu einer signifikanten Herunterregulation mehrerer Gene, die allesamt eine erhöhte Expression in Tumorgeweben gemein haben. *COL1A1* kodiert für das fibrilläre Kollagen 1, welches hauptsächlich das Bindegewebe bildet. Unter

Hypoxie und in fortgeschrittenen Stadien verschiedener Tumorarten (Ovar-, Cervix-, Prostata-, Magen-, Lungenkarzinom) ist für *COL1A1* eine erhöhte Expression beschrieben worden (FALANGA ET AL., 2002; YASUI ET AL., 2005; CREIGHTON ET AL., 2005; DE CECCO ET AL., 2004; CHEN ET AL., 2003; VILLAR ET AL., 2007).

*UCP2 (uncoupling protein-2)* ist ein Anionen-Transporter der inneren Mitochondrienmembran und dient dort vermutlich als Sensor für oxidativen Stress, induziert durch Hyperoxid bzw. die bei der Lipidoxidation entstehenden freien Radikale (ARSENIJEVIC ET AL., 2000; ECHTAY ET AL., 2003). In Darmzellkarzinomen konnte beobachtet werden, wie Zellen mit einer erhöhten *UCP2*-Expression die Anreicherung von ROS und die Einleitung der Apoptose, vermittelt durch ein Chemotherapeutikum, verhindern konnten (DERDAK ET AL., 2008). Ein weiteres Gen ist das *PRPF40 (precursor mRNA-processing factor)*, ein RNA-Binde- und pre-mRNA-Prozessier-Faktor, dessen erhöhte Expression während der Entwicklung fortgeschrittener Tumore beschrieben wurde (SLUIMER ET AL., 2007; THAKUR ET AL., 2008).

Die Expression der drei Gene war in allen untersuchten Lungen- und Brustkrebszelllinien durch die induzierte *Cygb*-Expression unterdrückt, was sie zu Zielkandidaten für *Cygb* als Suppressor-Gen macht (SHIVARPURKAR ET AL., 2008).

Eine Hochregulation von *DNMT1* (DNA-Methyltransferase) wird in vielen Tumoren beobachtet und geht einher mit der Methylierung der Promotorregion von Tumorsuppressor-Genen. Seine Expression konnte durch die Transfektion von *Cygb* ebenso gehemmt werden, wie dies durch die Expression des bekannten Tumorsuppressor-Gens *APC (Adenomatous polyposis coli)* gezeigt wurde (SUZUKI ET AL., 2004; CAMPBELL ET AL., 2003; SHIVARPURKAR ET AL., 2008).

All diese Versuche legen nahe, dass *Cygb* eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor-Gen spielen könnte. In Bezug auf die Hemmung des *UCP2*-Gens, das direkt mit der Wirkung von Chemotherapeutika in Verbindung steht, ließe sich gar ein Ansatz für neue Krebstherapien untersuchen.

Eine weitere Funktion des Globins wird in aggressiven Tumoren einer bestimmten Größe angenommen. Durch unkontrolliertes Wachstum leiden die inneren Regionen unter Hypoxie. Die Expression von *Cygb* ist durch Hypoxie induzierbar (MAMMEN ET AL., 2006). Invasive, eingekapselte Tumore mit einer Größe über 20mm zeigen eine signifikant erhöhte *Cygb*-Expression. Dass es sich bei Tumoren um sehr heterogene Gewebe handelt, zeigt das Beispiel eines Tumors (>20mm) mit reduzierter *Cygb*-Expression bei unmethyliertem Promotor. Als Begründung bleibt den Autoren nur die Vermutung eines allelischen Ungleichgewichts (SHAW ET AL., 2009) Da *Cygb* über *hypoxic reactive elements (HRE)* verfügt, wurde parallel die Expression des hypoxieinduzierten Faktors 1a (HIF1a) untersucht, von dem ein regulativer Einfluss auf *Cygb* vermutet wird (SHAW ET AL., 2009, FORDEL ET AL.,

2004). Auch die Expression von HIF1a war erhöht, doch eine direkte Korrelation konnte nicht nachgewiesen werden. Vergleichende Untersuchungen von sechs Zelllinien mit Kopf-Hals-tumor-Ursprungs, zeigten einen klaren Anstieg der HIF1a-Expression nach sechs bzw. 24 Stunden unter Hypoxie, wohingegen die *Cygb*-Expression weder kontinuierlich anstieg, noch in allen Linien signifikant gewesen ist. Hier war die Expression stark vom Methylierungsgrad des Promotors abhängig. Wurde die Methylierung entfernt, kam es unter Hypoxie zu Steigerungen bis zu 350-fach. Den stärksten Anstieg verzeichnete die als Kontrolle mitgeführte Zelllinie HeLa (SHAW ET AL., 2009)!

Eine weitere Funktion als NO-Dioxygenase in Fibroblasten wird von HALLIGAN postuliert. Sie wiesen *Cygb* in der äußeren Fibroblastenschicht von Blutgefäßen, der Adventitia nach. In der Fibroblasten-Zelllinie NIH3 wurde eine direkte Korrelation zwischen der Menge an *Cygb* und der intrazellulären Nitratproduktion nachgewiesen. Hierbei hemmt *Cygb* den zytostatischen Effekt von NO: Durch einen *Cygb knock down* konnte eine NO induzierte Inhibition der Zellproliferation um bis zu 70% erreicht werden (HALLIGAN ET AL., 2009). Dies steht in direktem Widerspruch zu den zuvor erörterten Untersuchungen in Tumorgeweben. Im Tumor wird für *Cygb* eine Suppressor-Wirkung angenommen, die Tumorgene reguliert. Fehlt *Cygb*, führt dies zu ungehemmter Proliferation. In Fibroblasten dioxygeniert *Cygb* Stickoxid (NO) zu Nitrat und ermöglicht so eine ungehemmte Proliferation der Zelle.

Es verwundert, dass bei der Vielzahl an Publikationen, die sich mit der Expression von *Cygb* in Tumorgeweben befassen bisher weder mit mRNA-*in situ*-Hybridisierungen noch mit immunhistochemischen Nachweisen eine Regulation nachgewiesen wurde. SHAW begründet seinen „beinahe signifikanten“ Vergleich eines HIFA1-*Immunostainings* mit quantitativer Realtime-PCR mit der fehlenden Verfügbarkeit eines anti-*Cygb*-Antikörpers (SHAW ET AL., 2009). Vielleicht scheuen die Arbeitsgruppen auch den bei kommerziell erworbenen Ak fehlenden Nachweis der Spezifität. Für die Durchführung eines Kompetitionstestes muss zusätzlich das rekombinante Protein erworben werden, diese Validierung des Ak sollte auch auf einem Western-Blot vorhanden sein.

#### 4.9 Interpretation der Ergebnisse bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Ngb

Im Rahmen dieser Arbeit konnten über 200 Klone nach der Fusion der B-Lymphozyten immunisierter Mäuse mit den Myelomzellen gezählt werden, wovon acht aufgrund ihres hohen ELISA-Wertes weiter kultiviert wurden. Zeigten die Überstände dieser Klone im kleinen Volumen noch Ngb-typische Färbemuster, so verloren die Zellen ihre Fähigkeit der IgG-Produktion mit zunehmender Volumenexpansion bzw. wiesen eine veränderte Spezifität auf. Der Klon 9G3/3B9 zum Beispiel markierte im Anschluss Gefäße, während neuronale Strukturen nicht mehr zu erkennen waren. In späteren, in dieser Arbeit nicht mehr aufgeführten Versuchen, wurden mit der *Gene-Gun*-Methode sowohl Mäuse als auch Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) immunisiert. Hierbei wurde den Tieren humanes Ngb und Cygb gekoppelt an Goldpartikeln unter die Haut geschossen. Im Anschluß an die Immunisierung wurden die Milzzellen mit Myelomzellen zu Hybridomzellen fusioniert. Nur zwei Hamster zeigten eine geringe Reaktion des Immunsystems auf Neuroglobin, wobei auch hier der Titer nach der dritten Immunisierung noch so gering war, dass die Kultivierung der fusionierten Zellen eingestellt wurde.

Wie sich schon bei der Herstellung polyklonaler Antikörper gezeigt hat, sind die beiden Globine Ngb und Cygb nicht sehr immunogen. Die erzeugte Immunantwort war stets sehr gering, und die produzierten Antikörper zeigten eine große Streuung an Färbemustern.

Vielleicht könnte die Nutzung der Aptamertechnik eine für alle Anwendungen funktionierende Alternative darstellen (ELLINGTON AND SZOSTAK ET AL., 1990; CARLSON, 2007). Da die Selektion der spezifischen Sequenzen aus  $10^{15}$  *Random*-Oligonukleotiden schon unter den Bedingungen der zukünftigen Anwendung stattfinden kann, sollte das Ziel ein Aptamer sein, das zum Nachweis sowohl in der Immunfluoreszenz als auch unter den stringenten Bedingungen des Western-Blots einsetzbar ist: Inwieweit unter diesen Umständen auch eine Verwendung zwischen verschiedenen Spezies möglich ist, muss experimentell geklärt werden. Eine Hürde dürfte dabei noch der hohe Preis sein, der deutlich über dem einer *customized* Bestellung eines monoklonalen Antikörpers liegt (PERS. GESPRÄCH CLAUDIA DAHMEN, *APTARES*, LUCKENWALDE).

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beinhaltet Untersuchungen zur Expression und Funktion der respiratorischen Proteine Neuroglobin (Ngb) und Cytoglobin (Cygb) in Vertebraten.

Um die Expression der Globine während der Entwicklung des Säugerhirns zu untersuchen, wurden die Hirne von Maus-Embryonen ab dem Fötalstadium MF10 bis zum Tag eins nach der Geburt (T1) mit Adulttieren verglichen. Gemessen wurde sowohl die mRNA-Expression als auch die Protein-Expression. Beide Globine waren vom ersten Entnahmezeitpunkt an nachweisbar und zeigten im Verlauf der Entwicklung einen stetigen Anstieg der Expression, wobei die mRNA von Ngb von Beginn an in einer zehnfach höheren Konzentration vorlag und im zeitlichen Verlauf einen 130-fachen Anstieg zeigte. Den stärksten Anstieg bei Ngb verzeichnete das Zeitfenster zwischen dem MF15 und dem T1, die Zeit der Neurogenese und des einsetzenden Stoffwechsels. Cygb zeigte ebenfalls einen stetigen Anstieg vom ersten Entnahmezeitpunkt bis zum Adulttier, doch lag die *Cygb*-mRNA-Menge im Vergleich zu *Ngb* am MF10 bei 1/10 und später bei 1/100 der *Ngb*-mRNA. Es zeigte sich lediglich ein 16-facher Anstieg bis zum Adultstadium. Auf Proteinebene konnte die zunehmende Expression beider Globine im Verlauf der Entwicklung gleichermaßen gezeigt werden. Die Tatsache, dass beide Globine schon sehr früh in der Säuger-Hirnentwicklung nachweisbar sind, spricht für eine essentielle Funktion. Es zeigte sich weder ein *Peak* in den hypoxieresistenten Frühembryonalstadien noch während der Geburt, wenn vor allem ROS-Stress entsteht. Dies spricht für keine Funktion in der Oxidanz-Abwehr. Eher könnte Ngb mit der Reifung der Neurone und dem gesteigerten Stoffwechsel assoziiert sein.

Des Weiteren sollte die zelluläre und intrazelluläre Lokalisation beider Globine anhand von Gewebe-Primärkulturen und immortalen Zelllinien untersucht werden. Neuroglobin wurde hierbei nur in Neuronen nachgewiesen. Gliazellen waren Neuroglobin-negativ, was an einer primären Zellkultur aus dem Hippocampus pränataler Ratten gezeigt werden konnte. Dies deckte sich mit Untersuchungen immortaler Zelllinien neuronalen Ursprungs, die ein positives NGB-Signal aufwiesen. Im Gegensatz dazu waren Zelllinien aus Glioblastomen NGB-negativ. Das Färbemuster war in allen Ngb-exprimierenden Zellen zytoplasmatisch.

Cytoglobin wurde in der Primärkultur in den Neuronen nachgewiesen, zeigte jedoch ebenso ein Signal in den mit anti-GFAP markierten Gliazellen. In beiden Zellpopulationen war auch der Kern durch das anti-CyGB-Antiserum markiert, was eine Kernlokalisierung des Globins nahelegt.

Eine genauere Untersuchung der intrazellulären Lokalisation sollte durch die Transfektion von Globin-pEGFP-Fusionsproteinen erfolgen. Beide Globine wurden als Genkonstrukt N- bzw. C-terminal mit GFP fusioniert. Des Weiteren wurde ein sechs Aminosäuren langer Spacer einkloniert, um die Distanz zwischen GFP und Globin zu vergrößern und somit negative Einflüsse auf die Faltung zu verhindern. Nach Transfektion der Fusionskonstrukte wurde die GFP-Färbung bei beiden Globinen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern beobachtet. Durch eine Western-Blot-Analyse konnte abgesichert werden, dass die zelluläre GFP-Färbung auf ein vollständig translatiertes Fusionsprotein zurückzuführen war. Eine rein nukleäre Lokalisation, die insbesondere für Cygb von anderen Autoren postuliert wurde, konnte somit ausgeschlossen werden.

In primären Zellkulturen aus dem Cerebellum und des Kortex, die mit Hilfe von Paraquat oxidativem Stress ausgesetzt wurden, wurde der Verlauf der Globin-Expression mit dem unreguliertem Gen der 18s rRNA und mit den Antioxidanz-Enzymen Cu-Zn-SOD und Gpx verglichen. Neuroglobin zeigte als Reaktion auf den oxidativen Stress im Cerebellum einen Expressionsverlauf ähnlich dem der beiden Antioxidanz-Enzyme, jedoch liegt es im Hirngewebe in hundertfach niedrigerer Konzentration als Cu-Zn-SOD und Gpx vor. Cytoglobin zeigte keine Veränderung der Expression. Eine Funktion der Globine im Sinne einer ROS-Abwehr kann aus den Befunden nicht abgeleitet werden.

Untersuchungen von Tumor und Normalgewebe mittels eines cDNA-Cancer-Arrays zeigten, dass Ngb in Tumoren verschiedenen Ursprungs nicht exprimiert wird, Cygb dagegen keine Änderung seiner Expression in Tumor versus Normalgewebe erfährt. Eine Induktion der beiden Globine z.B. durch Hypoxie in solchen Tumoren kann daher ausgeschlossen werden.

Beide Globine sind auf Sequenzebene stark konserviert und zeichnen sich bei einer Immunisierung durch eine sehr geringe Immunogenität aus. Viele der polyklonalen anti-NGB- bzw. anti-CyGB-Antisera, die in der Arbeitsgruppe aufgereinigt wurden, zeigten sehr schwache bzw. abweichende Färbemuster. Im Verlauf dieser Arbeit wurde daher versucht monoklonale Antikörper zu etablieren. Zunächst wurden Makrophagen von zuvor mit menschlichem NGB immunisierten Mäusen mit Myelomzellen zu Hybridomzellen fusioniert und IgG-produzierende Klone rekloniert. Obwohl die Überstände einiger Klone gute Markierungsmuster zeigten, musste die Antikörperherstellung wegen Verlusts der Spezifität bei der Produktion in größerem Volumen eingestellt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

ADACHI, H., STRAUSS, W., OCHI, H., WAGNER, H.N. JR.

**The effect of hypoxia on the regional distribution of cardiac output in the dog**

*Circ Res.* 1976 Sep;39(3):314-9

ADOLPH, E.F.

**Regulations during survival without oxygen in infant mammals**

*Respir Physiol.* 1969;7(3):356-68

ALKONDON, M.; REINHARDT, S.; LOBRON, C.; HERMSEN, B.; MAELICKE, A.; ALBUQUERQUE, E.X.

**Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. II. The rundown and inward rectification of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by in situ hybridization**

*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 (1994) 494–506.

ALVAREZ-BUYLLA, A., GARCIA-VERDUGO, J. M. AND TRAMONTIN, A. D.

**A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells**

*Nat. Rev. Neurosci.* 2001,2,287-293.

ANTON, B., VITETTA, L., CORTIZO, F. AND SALI, A.

**Can we delay aging? The biology and science of aging**

*Ann N Y Acad Sci* (2005) 1057, 525-35.

ARREDONDO-PETER, R., HARGROVE, M.S., MORAN, J.F., SARATH, G., KLUCAS, R.V.

**Plant hemoglobins**

*Plant Physiol.* 1998;118(4):1121-5

ARSENIJEVIC D, ONUMA H, PECQUEUR C, ET AL.

**Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production** *Nat Genet* 2000, 26:435–9.

AZAROV, I., HUANG, K. T., BASU, S., GLADWIN, M. T., HOGG, N. AND KIM-SHAPIRO, D. B.

**Nitric oxide scavenging by red blood cells as a function of hematocrit and oxygenation**

*J Biol Chem* 2005; 280, 39024-32

BABIOR, B.M.

**Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes**

*New Engl. J. Med.* (1978) 298, 659-668.

BARBER SC, MEAD RJ, SHAW PJ.

**Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target**

*Biochim Biophys Acta* 2006, 1762:1051-1067.

BARCROFT, J.

**Researches in prenatal life**

*Oxford: Blackwell.* 1946

BARONDEAU DP, KASSMANN CJ, BRUNS CK, TAINER JA, GETZOFF ED

**Nickel superoxide dismutase structure and mechanism**

*Biochemistry* (2004). (25): 8038–47

BASU S, GRUBINA R, HUANG J, ET AL

**Catalytic generation of N2O3 by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin** *Nat Chem Biol.* 2007;3:785-794

BAYER SA, ALTMAN J, RUSSO RJ, ZHANG X.

**Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat** *Neurotoxicology* 14(1):83–144 (1993).

BEALL, C.M., BRITTENHAM, G.M., STROHL, K.P., BLANGERO, J., WILLIAMS-BLANGERO, S., GOLDSTEIN, M.C., DECKER, M.J., VARGAS, E., VILLENA, M., SORIA, R., ALARCON, A.M., GONZALES, C.

**Hemoglobin concentration of high-altitude Tibetans and Bolivian Aymara**  
*Am J Phys Anthropol.* 1998;106(3):385-400

BECKMAN JS, KOPPENOL WH

**Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly**  
*Am J Physiol* (1996) 271:C1424–C1437

BECKMAN RA, LOEB LA.

**Negative clonal selection in tumor evolution**  
*Genetics.* 2005 Dec;171(4):2123-31. Epub 2005 Sep 2.

BENTMANN, A.; SCHMIDT, M.; REUSS, S.; WOLFRUM, U.; HANKELN, T.; BURMESTER, T.

**Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration** *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 20660-20665.

BICHET, S., WENGER, R.H., CAMENISCH, G., ROLFS, A., EHLEBEN, W., PORWOL, T., ACKER, H., FANDREY, J., BAUER, C., GASSMANN, M.

**Oxygen tension modulates beta-globin switching in embryoid bodies**  
*FASEB J.* 1999;13(2):285-95

BICKLER, P. AND BUCK, L.T.

**Adaptation of vertebrate neurons to hypoxia and anoxia: maintaining critical Ca<sup>2+</sup> concentrations** *J. Exp. Biol.* 1998; 201, 1141–1152.

BICKLER, P.E., DONOHOE, P.H.

**Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia**  
*J Exp Biol.* 2002;205(Pt 23):3579-86

BIGNAMI A AND DAHL D

**Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat**  
*Nature* 1974, 252:55-56

BOON EM, DOWNS A, MARCEY D.

**"Catalase: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidoreductase"**  
*Catalase Structural Tutorial Text.* Retrieved 2007-02-11

BORGSTAHL GE, PARGE HE, HICKEY MJ, BEYER WF JR, HALLEWELL RA, TAINER JA.

**The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles** *Cell* (1992) 71 (1): 107–18

BOUTILIER, R.G.

**Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia**  
*The Journal of Experimental Biology* 2001, 204, 3171–3181

BOVERIS A, CHANCE B.

**The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen** *Biochem J* 1973, 134:707-716.

BOVERIS, A., CADENAS, E. AND STOPPANI, A. O.

**Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide**

*Biochem J* 156, 435-44 (1976).

BOYLE, P. & FERLAY, J.

**Mortality and survival in breast and colorectal cancer**

*Nature clinical practice* 2005, 2, 424-5. ()

BRAND K.

**Aerobic glycolysis by proliferating cells: Protection against oxidative stress at the expense of energy yield.** *Journal of BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES* 1997, 29:355–364.

BRIGELIUS-FLOHE R.

**Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases**

*Free Radic Biol Med* 1999, 27:951-965.

BRITTAİN, T., SKOMMER, J., RAYCHAUDHURI, S. & BIRCH, N.

**An antiapoptotic neuroprotective role for neuroglobin**

*INT J MOL Sci* 2010, 11, 2306-2321

BRITTON, S.W., KLINE, R.F.

**Age, sex, carbohydrate, adrenal cortex and other factors in anoxia**

*Am J Physiol.* 1945/46, 145:190-202

BRUNORI, M.; GIUFFRE, A.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U.; SCANDURRA, F. M.; VALLONE, B.

**Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes**

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 8483-8488.

BUCK, L. T. AND HOCHACHKA, P. W. ()

**Anoxic suppression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and constant membrane potential in hepatocytes: support for channel arrest** *Am. J. PHYSIOL.* 1993; 265, R1020–R1025

BUCK, L. T., LAND, S. C. AND HOCHACHKA, P. W.

**Anoxia-tolerant hepatocytes: model system for study of reversible metabolic suppression**

*Am. J. Physiol.* 1993M 265, R49–R56

BURMESTER, T.

**Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily**

*Mol Biol Evol* 2001,18, 184-95.

BURMESTER, T., EBNER, B., WEICH, B. AND HANKELN, T.

**Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues**

*Mol Biol Evol* 2002,19, 416-21

BURMESTER, T.; HANKELN, T.

**Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system**

*News Physiol. Sci* 2004, 19, 110-113.

BURMESTER, T.; HANKELN, T.

**Neuroglobin and other nerve globins**

In *Protein Reviews: Dioxygen binding and sensing proteins*,

BOLOGNESI, M.; DI PRISCO, G.; VERDE, C. Eds. Springer: Milan, 2008; Vol. 9, pp 211-22.

BURMESTER, T.; WEICH, B.; REINHARDT, S.; HANKELN, T.

**A vertebrate globin expressed in the brain**

*Nature* 2000, 407, 520-523.

BUSE, E., DE GROOT, H.

**Generation of developmental patterns in the neuroepithelium of the developing**

**mammalian eye: the pigment epithelium of the eye** *Neurosci Lett.* 1991;126(1):63-6

CADENAS, E.

**Mitochondrial free radical production and cell signaling**

*Mol Aspects Med* 2004, 25, 17-26.

CALABRESE EJ, CANADA AT.

**Catalase: its role in xenobiotic detoxification**

*Pharmacol Ther* 1989, 44:297-307.

CAMPBELL PM, SZYF M.

**Human DNA methyltransferase gene DNMT1 is regulated by the APC pathway**

*Carcinogenesis* 2003;24:17-24.

CARLSON B.

**Aptamers: The New Frontier in Drug Development?**

*Biotechnology Healthcare* April 2007 S.31

CHAN PH..

**Role of oxidants in ischemic brain damage**

*Stroke* 1996, 27:1124-1129.

CHELIKANI P, FITA I, LOEWEN PC

**Diversity of structures and properties among catalases**

*Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2): 192-208 (January 2004).

CHEN Y, MILLER C, MOSHER R, ET AL.

**Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays**

*Cancer Res* 2003;63:1927-35.

CHEN, X.Q., QIN, L.Y., ZHANG, C.G., YANG, L.T., GAO, Z., LIU, S., FUNG, Y.W., GREENBERG, D.A., YU, A.C.

**Presence of neuroglobin in cultured astrocytes**

*Glia* 2005, 50, 182-186.

CHURCH DF, PRYOR WA.

**Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications**

*Environ Health Perspect* 1985, 64:111-126.

CLAIBORNE A, YEH J, MALLETT T, LUBA J, CRANE E, CHARRIER V, PARSONAGE D.

**Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation** *Biochemistry* 1999, 38 (47): 15407-16

CLEETER MW, COOPER JM, DARLEY-USMAR VM, MONCADA S, SCHAPIRA AH

**Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases**

*FEBS Lett* 1994; 345:50-54

COUTURE, M., BURMESTER, T., HANKELN, T., ROUSSEAU, D.L.

**The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket** *J Biol Chem.* 2001;276(39):36377-82

COUTURE, M., DAS, T.K., LEE, H.C., PEISACH, J., WITTENBERG, B.A., WITTENBERG, J.B., GUERTIN, M.

**Chlamydomonas chloroplast ferrous hemoglobin. Heme pocket structure and reactions with ligands** *J Biol Chem.* 1999;274(11):6898-910

COUTURE, M., DAS, T.K., SAVARD, P.Y., WITTENBERG, J.B., WITTENBERG, B.A., ROUSSEAU, D.L., GUERTIN, M.

**Structural investigations of the hemoglobin of the cyanobacterium Synechocystis**

**PCC6803 reveal a unique distal heme pocket** *Eur J Biochem.* 2000, 267(15):4770-80

COZZI A, CORSI B, LEVI S, SANTAMBROGIO P, ALBERTINI A, AROSIO P.

**Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity** *J Biol Chem* 2000, 275:25122-25129.

CREIGHTON CJ, BROMBERG-WHITE JL, MISEK DE, ET AL.

**Analysis of tumor-host interactions by gene expression profiling of lung adenocarcinoma xenografts identifies genes involved in tumor formation** *Mol Cancer Res* 2005;3:119–29

DAHM T, WHITE J, GRILL S, FÜLLEKRUG J, STELZER EH.

**Quantitative ER <-> Golgi transport kinetics and protein separation upon Golgi exit revealed by vesicular integral membrane protein 36 dynamics in live cells**  
*Mol Biol Cell.* 2001 May;12(5):1481-98.

DANG CV.

**The interplay between MYC and HIF in the Warburg effect**

IN: KROEMER G, MUMBERG D, KEUN H, RIEFKE B, STEGER-HARTMANN T, PETERSEN, K, EDITORS.

**Oncogenes meet metabolism**, 1st edn, Berlin, Heidelberg: Springer. 2007 pp. 35–53.

DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV, MURAD F

**Novel effects of nitric oxide**

*Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:203-236

DAVIS R.W., KANATOUS S.B.

**Convective oxygen transport and tissue oxygen consumption in Weddell seals during aerobic dives** *J. Exp. Biol.* 1999, 202, 1091-1113

DE CECCO L, MARCHIONNI L, GARIBOLDI M, ET AL.

**Gene expression profiling of advanced ovarian cancer: characterization of a molecular signature involving fibroblast growth factor 2** *Oncogene* 2004;23:8171–83.

DE WEVER, O. & MAREEL, M.

**Role of tissue stroma in cancer cell invasion**

*The Journal of pathology*, 2003, 200, 429-47

DERDAK Z, MARK NM, BELDI G, ROBSON SC, WANDS JR, BAFFY G.

**The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells**

*Cancer Res* 2008;68:2813–9

DEWILDE, S., KIGER, L., BURMESTER, T., HANKELN, T., BAUDIN-CREUZA, V., AERTS, T., MARDEN, M.C., CAUBERGS, R., MOENS, L.

**Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family** *J Biol Chem.* 2001, 276(42):38949-55

DEWILDE, S.; KIGER, L.; BURMESTER, T.; HANKELN, T.; BAUDIN-CREUZA, V.; AERTS, T.; MARDEN, M. C.; CAUBERGS, R.; MOENS, L.

**Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family** *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 38949-38955.

DICKERSON RE, GREIS I

**Hemoglobin: Structure, function, evolution and pathology**

*California: Benjamin/Cummings* 1983

DIKSHIT, R. P., DIKSHIT, K. L., LIU, Y. X. AND WEBSTER, D. A.

**The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases** *Arch Biochem Biophys* 1992, 293, 241-5

DOETSCH F

**The glial identity of neural stem cells**

*Nat Neurosci* 2003, 6:1127–1134.

DOETSCH F, CAILLE I, LIM DA, GARCIA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLA A

**Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain**

*Cell* 1999, 97: 703–716.

DONOHUE, P. H., WEST, T. G. AND BOUTILIER, R. G.

**Factors affecting membrane permeability and ionic homeostasis in the cold-submerged frog** *J. Exp. Biol.* 2000; 203, 405–414

DRÖGE WULF

**Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function**

*Physiol Rev* 82: 47–95, 2002; 10.1152/physrev.00018.2001.

DU, W., SYVITSKI, R., DEWILDE, S., MOENS, L. AND LA MAR, G. N.

**Solution 1h NMR characterization of equilibrium heme orientational disorder with functional consequences in mouse neuroglobin** *J Am Chem Soc* 2003, 125, 8080-1.

DUONG, T. T.; ANTAO, S.; ELLIS, N. A.; MYERS, S. J.; WITTING, P. K.

**Supplementation with a synthetic polyphenol limits oxidative stress and enhances neuronal cell viability in response to hypoxia-re-oxygenation injury**

*Brain Res.* 2008, 1219, 8-18

ECHTAY KS, ESTEVES TC, PAKAY JL, ET AL.

**A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling**

*EMBO J* 2003; 22: 4103–10.

ELIASSON, M. J.; HUANG, Z.; FERRANTE, R. J.; SASAMATA, M.; MOLLINER, M. E.; SNYDER, S. H.; MOSKOWITZ, M.

**Neuronal nitric oxide synthetase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neuronal damage** *J. Neurosci.* 1999, 19, 5910-5918.

ELLINGTON D. AND SZOSTAK W.J.

**In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands**

*Nature* Band 346, 1990, S. 818–822

EMARA M, SALLOUM N, ALLALUNIS-TURNER J.

**Expression and hypoxic up-regulation of neuroglobin in human glioblastoma cells**

*Mol Oncol* 2009 Feb;3(1):45-53. Epub 2008 Dec 12.

ERECINSKA, M. AND SILVER, I. A.

**Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia**

*Respir Physiol* 2001, 128, 263-76.

ERMLER, U., SIDDIQUI, R. A., CRAMM, R. AND FRIEDRICH, B.

**Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution**

*Embo J* 1995, 14, 6067-77

ESPEY MG, MIRANDA KM, THOMAS DD, WINK DA

**Distinction between nitrosating mechanisms within human cells and aqueous solution**

*J Biol Chem.* 2001;276:30085-30091

FAGO, A.; HUNDAHL, C.; DEWILDE, S.; GILANY, K.; MOENS, L.; WEBER, R. E.

**Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance**

*J. Biol. Chem.* 2004, 279, 44417-44426

FAGO, A.; HUNDAHL, C.; MALTE, H.; WEBER, R. E.

**Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins** *IUBMB life* 2004, 56, 689-696

FAGO, A.; MATHEWS, A. J.; BRITTAİN, T.

**A role for neuroglobin: resetting the trigger level for apoptosis in neuronal and retinal cells** *IUBMB life* 2008, 60, 398-401

FAGO, A.; MATHEWS, A. J.; MOENS, L.; DEWILDE, S.; BRITTAİN, T.

**The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c** *FEBS Lett.* 2006, 580, 4884-4888.

FALANGA V, ZHOU L, YUFIT T.

**Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-h1** *J Cell Physiol* 2002;191:42–50.

FAZEKAS, J.F., ALEXANDER, F.A.D., HIMWICH, H.E.

**Tolerance of the newborn to anoxia**

*Am J Physiol.* 1941;134:281-7

FISCH L. (1970)

**The selective and differential vulnerability of the auditory system**

*GEW Wolstenholm and J Knight, Sensorineural Hearing Loss:A Ciba Foundation Symposium* 101-116

FISCHER K, HOFFMANN P, VOELKL S, MEIDENBAUER N, ... ANDRESEN R, KRAUSE SW, KREUTZ M.

**Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells**

*Blood* 2007, 109:3812–3819

FISHER DA, DUSSAULT JH, SACK J, CHOPRA IJ.

**Ontogenesis of hypothalamic-pituitary-thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat** *Recent Prog Horm Res* 33:59–116 (1976).

FLÖGEL, U.; GODECKE, A.; KLOTZ, L. O.; SCHRADER, J.

**Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart**

*FASEB* 2004, 18, 1156-1158.

FLÖGEL, U.; MERX, M. W.; GODECKE, A.; DECKING, U. K.; SCHRADER, J.

**Myoglobin: A scavenger of bioactive NO**

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 735-740. Erratum in: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4276

FOLKMAN J.

**Tumor angiogenesis: therapeutic implications**

*New Engl. J. Med.* 1971, 285, 1182 ± 1186.

FOLKMAN J.

**Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease**

*Nat. Med.* 1995, 1, 27 ± 31 A

FOLKMAN J.

**Clinical Applications of Research on Angiogenesis**

*New Engl. J. Med.* 1995, 333, 1757 ± 1763. B

FORDEL E, GEUENS E, DEWILDE S, ROTTIERS P, CARMELIET P, GROOTEN J, MOENS L.

**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* 2004, 319:342-348.

- FORDEL E, THIJS L, MARTINET W, SCHRIJVERS D, MOENS L, DEWILDE S..  
**Anoxia or oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells: a step closer to the unraveling of neuroglobin and cytoglobin functions** *Gene* 2007, 398:114-122. A
- FORDEL E, THIJS L, MOENS L, DEWILDE S..  
**Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging** *Febs J* 2007, 274:1312-1317. B
- FORDEL, E.; THIJS, L.; MARTINET, W.; LENJOU, M.; LAUFS, T.; VAN BOCKSTAELE, D.; MOENS, L.; DEWILDE, S.  
**Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death** *Neurosci. Lett.* 2006, 410, 146-151.
- FREITAS, I., GRIFFINI, P., BERTONE, V., BERTONE, R., FENOGLIO, C., MILLIERY, R. AND VAIRETTI, M.  
**In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast**  
*Exp Gerontol* 2002, 37, 591-602.
- FREITAS, T. A., HOU, S., DIOUM, E. M., SAITO, J. A., GONZALEZ, G., GILLES-GONZALEZ, M. A. AND ALAM, M.  
**Ancestral hemoglobins in Archaea**  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101, 6675-80
- FUCHS C, LUCKHARDT A, GERLACH F, BURMESTER T, HANKELN T.  
**Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes**  
*Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Nov 11;337(1):216-23.
- FUCHS, C., BURMESTER, T. AND HANKELN, T.  
**The amphibian globin gene repertoire as revealed by the Xenopus genome**  
*Cytogenet. Genome Res.* 2006, 112, 296-306.
- GARDNER, P. R.; GARDNER, A. M.; MARTIN, L. A.; SALZMAN, A. L.  
**Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin**  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 10378-10383.
- GARRY D.J., ORDWAY G.A., LORENZ J.N., RADFORD N.B., GRANGE R.W., BASSEL-DUBY R., WILLIAMS R.S.  
**Mice without myoglobin**  
*Nature* 1998, 395, 905-908
- GASSMANN, M., FANDREY, J., BICHET, S., WARTENBERG, M., MARTI, H.H., BAUER, C., WENGER, R.H., ACKER, H.  
**Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93(7):2867-72
- GENOVA, M. L., PICH, M. M., BERNACCHIA, A., BIANCHI, C., BIONDI, A., BOVINA, C., FALASCA, A. I., FORMIGGINI, G., CASTELLI, G. P. AND LENA Z, G.  
**The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology** *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1011, 86-100.
- GERLACH, F., AVIVI, A., BURMESTER, T., NEVO, E., HANKELN, T.  
**Molecular characterization and expression analysis of the neuroglobin gene of the subterranean blind mole rat, Spalax ehrenbergi** *Abstract, iO2-BiP 13th International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins.* 2003; P44:115
- GEUENS E, BROUNS I, FLAMEZ D, DEWILDE S, TIMMERMANS JP, MOENS L..  
**A Globin in the nucleus!**  
*J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):30417-20. Epub 2003 Jun 9.
- GIANNIS, A.; RÜBSAM, F.

*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, 109, 606 ± 609

GIANNIS, A.; RÜBSAM, F.

*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, 36, 588 ± 590

GLADWIN MT, SCHECHTER AN, KIM-SHAPIRO DB, ET AL.

**The emerging biology of the nitrite anion**

*NAT CHEM BIOL* 2005;1:308-314

GLASS, H.G., SNYDER, F.F., WEBSTER, E.

**The rate of decline in resistance to anoxia of rabbits, dogs and guinea pigs from the onset of viability to adult life** *Am J Physiol.* 1944;140:609-15

GÖDECKE A., FLÖGEL U., ZANGER K., DING Z., HIRCHENHAIN J., DECKING U.K., SCHRADER J.

**Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms**

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999,96, 10495-10500

GÖDECKE, A.; MOLOJAVYI, A.; HEGER, J.; FLÖGEL, U.; DING, Z.; JACOBY, C.; SCHRADER, J.

**Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress** *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 21761-21766.

GORR AT, WICHMANN D, PILARSKY C, THEURILLAT JP, FABRIZIUS A, LAUFS T, BAUER T, KOSLOWSKI M, HORN S, BURMESTER T, HANKELN T, KRISTIANSEN G

**Old proteins – new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells**

*Acta Physiologica*, Accepted Articles, Accepted manuscript online: 19 OCT 2010

GOTTFRIED E, KUNZ-SCHUGHART LA, EBNER S, MUELLER-KLIESER W,... MACKENSEN A, KREUTZ M.

**Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression**

*Blood* 2006, 107:2013–2021.

GÖTZ, M. AND HUTTNER, W. B.

**The cell biology of neurogenesis**

*Nat. Rev.Mol. Cell Biol.* 2005,6, 777-788.

GOULD E, TANAPAT P, HASTINGS NB, SHORS TJ.

**Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning**

*Trends Cogn Sci* 3(5):186–192 (1999).

GOW AJ, STAMLER JS.

**Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions**

*Nature* 1998;391:169-173

GRESSENS P, RICHELME C, KADHIM HJ, GADISSEUZ JF, EVRARD P

**The germinative zone produces the most cortical astrocytes after neuronal migration in the developing mammalian brain** *Biol Neonate* 1992, 61:4-24

GROSSARD C, MOREL I, CHEVANNE M, MONNIER M, CILLARD J, DELAMARCHE A.

**Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study**

*Journal of Applied Physiology* 2000, 89:169–175

GUYTON G.P., STANEK K.S., SCHNEIDER R.C., HOCHACHKA P.W., ZAPOL D.G., LIGGINS G.C., ZAPOL W.M.

**Myoglobin saturation in free-diving Weddell seals**

*J.Appl. Physiol.* 1995, 79, 1148-1155

GUYTON, A.C., HALL, J.E.

**Textbook of medical physiology**

*Philadelphia: Saunders.* 1996

HALLIWELL B.

**Reactive oxygen species and the central nervous system**

*J Neurochem* 1992, 59:1609-1623.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.

**The antioxidants of human extracellular fluids**

*Arch Biochem Biophys* 1990, 280:1-8

HAMDANE, D.; KIGER, L.; DEWILDE, S.; GREEN, B. N.; PESCE, A.; UZAN, J.; BURMESTER, T.; HANKELN, T.; BOLOGNESI, M.; MOENS, L.; MARDEN, M. C.

**The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin** *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 51713-51721

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A.

**The hallmarks of cancer**

*Cell*, 2000, 100, 57-70

HANKELN, T.; EBNER, B.; FUCHS, C.; GERLACH, F.; HABERKAMP, M.; LAUFS, T. L.; ROESNER, A.; SCHMIDT, M.; WEICH, B.; WYSTUB, S.; SAALER-REINHARDT, S.; REUSS, S.; BOLOGNESI, M.; DE SANCTIS, D.; MARDEN, M. C.; KIGER, L.; MOENS, L.; DEWILDE, S.; NEVO, E.; AVIVI, A.; WEBER, R. E.; FAGO, A.; BURMESTER, T.

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

*J. Inorg. Biochem.* 2005, 99, 110-119

HARDISON R.C.

**Globin genes on the move**

*Journal of Biology* 2008, 7:35

HARDISON, R.C.

**A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria**

*Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(12):5675-9

HARDY R UND REYNOLDS R

**Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo** *Development* 1991, 111:1061-1080

HARMAN D.

**Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry**

*J Gerontol* 1956, 11:298-300.

HASTY, P., RIVERA-PEREZ, J. AND BRADLEY, A.

**The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells**

*Mol Cell Biol* 1991, 11, 5586-91

HERMANN L.

**Ueber die Wirkungen des Stickoxydylgases auf das Blut**

*Arch Anat Physiol Lpz* 1865;469-481

HEROLD, S.; FAGO, A.

**Reactions of peroxynitrite with globin proteins and their possible physiological role**

*Compar. Biochem. Physiol. (Part A)* 2005, 142, 124-129

HEROLD, S.; FAGO, A.; WEBER, R. E.; DEWILDE, S.; MOENS, L.

**Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress** *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 22841-7228

HILLE R, NISHINO T.

**Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase**  
*Faseb J* 1995, 9:995-1003

HOCHACHKA, P.W.

**Defence strategies against hypoxia and hypothermia**  
*Science* 1986; 231, 234-241

HOCHACHKA, P.W., RUPERT, J.L.

**Fine tuning the HIF-1 'global' O<sub>2</sub> sensor for hypobaric hypoxia in Andean high-altitude natives** *Bioessays*. 2003;25(5):515-9

HOFFMAN, W. E.; CHARBEL, F. T.; GONZALEZ-PORTILLO, G.; AUSMAN, J.

**Measurement of ischemia by changes in tissue oxygen, carbon dioxide, and pH**  
*Surg. Neurol.* 1999, 51, 654-658

HOLM L, SANDER C.

**Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A**  
*FEBS Lett* 1993, 315:301-306

HOLSCHER C

**Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity**  
*Trends Neurosci* 1997, 20:298 -303

HOU, S., FREITAS, T., LARSEN, R. W., PIATIBRATOV, M., SIVOZHELEZOV, V., YAMAMOTO, A., MELESHKEVITCH, E. A., ZIMMER, M., ORDAL, G. W. AND ALAM, M.

**Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria**  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98, 9353-8

HUA S, ANTAO ST, CORBETT A, WITTING PK

**The Significance of Neuroglobin in the Brain**  
*Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17, 160-172

HUANG X, MOIR RD, TANZI RE, BUSH AI, ROGERS JT.

**Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology**  
*Ann N Y Acad Sci* 2004, 1012:153-163

HUNDAHL, C. A.; KELSEN, J.; DEWILDE, S.; HAY-SCHMIDT, A.

**Neuroglobin in the rat brain (II): co-localisation with neurotransmitters**  
*Neuroendocrin.* 2008, 88, 183-198

HUNDAHL, C.; KELSEN, J.; KJAER, K.; RONN, L. C.; WEBER, R. E.; HAY-SCHMIDT, A.; NYENGAARD, J.R.

**Does neuroglobin protect neurons from ischemic insult? A quantitative investigation of neuroglobin expression following transient MCAo in spontaneously hypertensive rats**  
*Brain Res.* 2006, 1085, 19-27

HUNDAHL, C.; STOLTENBERG, M.; FAGO, A.; WEBER, R. E.; DEWILDE, S.; FORDEL, E.; DANSCHER, G.

**Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues** *Neuropath. App. Neurobiol.* 2005, 31, 610-617

HUNT, P.W., WATTS, R.A., TREVASKIS, B., LLEWELYN, D.J., BURNELL, J., DENNIS, E.S., PEACOCK, W.J.

**Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants**  
*Plant Mol Biol.* 2001;47(5):677-92

HUSE, J. T. & HOLLAND, E. C.

**Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and**

**medulloblastoma** *Nat Rev Cancer* 2010, 10, 319-331

HVITVED, A.N., TRENT, J.T. 3RD, PREMER, S.A., HARGROVE, M.S.

**Ligand binding and hexacoordination in synechocystis hemoglobin**

*J Biol Chem.* 2001;276(37):34714-21

ISELL TS, SUN C-W, WU L-C, ET AL

**SNO-hemoglobin not essential for red blood cell dependent hypoxic vasodilatation**

*Nat Med* 2008;14:773-777

ITOH, Y.; ESAKI, T.; SHIMOJI, K.; COOK, M.; LAW, M. J.; KAUFMAN, E.; SOKOLOFF, L.

**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. USA* 2003, 100, 4879-4884

JAIN R. K., SCHLENGER K, HÖCKEL M., YUAN F.

**Quantitative angiogenesis assays: progress and problems**

*Nat. Med.* 1997, 3, 1203 ± 1208

JEFFERS A, XU XL, HUANG KT, ET AL.

**Hemoglobin mediated nitrite activation of soluble guanylyl cyclase**

*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;142:130-135

JELKMANN, W.

**Erythropoietin: structure, control of production, and function**

*Physiol Rev.* 1992;72(2):449-89

JIN, K., MAO, X. O., XIE, L., KHAN, A. A. AND GREENBERG, D. A.

**Neuroglobin protects against nitric oxide toxicity**

*Neurosci Lett.* 2008, 430, 135-137

JÜRGENS, K.D., PAPADOPOULOS, S., PETERS, T., GROS, G.

**Myoglobin: Just an Oxygen Store or Also an Oxygen Transporter?**

*News Physiol Sci.* 2000 Oct;15:269-274

KANATOUS S.B., DAVIS R.W., WATSON R., POLASEK L., WILLIAMS T.M., MATHIEU-COSTELLO O.

**Aerobic capacities in the skeletal muscles of Weddell seals: key to longer dive durations?**

*J. Exp. Biol.* 2002, 205, 3601-3608

KANATOUS, S.B., DIMICHELE, L.V., COWAN, D.F., DAVIS, R.W.

**High aerobic capacities in the skeletal muscles of pinnipeds: adaptations to diving hypoxia** *J Appl Physiol.* 1999;86(4):1247-56

KAUFMAN MH, BARD JBL.

**Index 5.2: Table of mouse and rat development. In: The Anatomical Basis of Mouse Development** (KAUFMAN MH, BARD JBL, EDS). *San Diego, CA:Academic Press*, 1999;220-223

KAUFMANN, M.H.

**The Atlas of Mouse Development**

*Academic Press, London.* 1992 149

KAWADA, N., KRISTENSEN, D.B., ASAHINA, K., NAKATANI, K., MINAMIYAMA, Y., SEKI, S., YOSHIZATO, K.

**Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells** *J Biol Chem.* 2001;276(27):25318-23

KHAN, A.A.; OU MAO, X.; BANWAIT, S.; DERMARDIROSSIAN, C.M.; BOKOCH, G.M.; JIN, K.; GREENBERG, D.A.

**Regulation of hypoxic neuronal death signaling by neuroglobin**

*FASEB* 2008, 22, 1737-1747

KHAN, A.A.; WANG, Y.; SUN, Y.; MAO, X.; XIE, L.; MILES, E.; CHEN, S.; ELLERBY, L.; JIN, K.; GREENBERG, D.A.  
**Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 17944-19948

KIMELBERG, H.K. AND NOREMBERG, M.D.

**Astrocytes**

*Sci Am* 1989, 260, 66-72, 74, 76.

KLIPPENSTEIN G. L.

**Structural Aspects of Hemerythrin and Myohemerythrin**

*Amer. Zool.* 1980, 20, 20 - 39

KOORYMAN, G.L., PONGANIS, P.J.

**The physiological basis of diving to depth: birds and mammals**

*Annu Rev Physiol.* 1998;60:19-32

KORNACK DR, RAKIC P.

**The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain** *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (8):4752–4757 (2001)

KOWALTOWSKI, A. J. AND VERCESI, A. E.

**Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress**

*Free Radic Biol Med* 1999, 26, 463-71

KRIEGL, J. M., BHATTACHARYYA, A. J., NIENHAUS, K., DENG, P., MINKOW, O. AND NIENHAUS, G. U.

**Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin**

*Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99, 7992-7

KUGELSTADT D, HABERKAMP M, HANKELN T, BURMESTER T

**Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken**

*Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Dec 17;325(3):719-25

KUNDU, S., TRENT, J.T., 3RD AND HARGROVE, M.S.

**Plants, humans and hemoglobins**

*Trends Plant Sci* 2003, 8, 387-93

KURTZ, D.M. JR.

**Oxygen-carrying proteins: three solutions to a common problem**

*Essays Biochem.* 1999;34:85-100

KUWAHIRA, I., GONZALEZ, N.C., HEISLER, N., PIIPER, J.

**Changes in regional blood flow distribution and oxygen supply during hypoxia in conscious rats** *J Appl Physiol.* 1993 Jan;74(1):211-4

KUWAHIRA, I., KAMIYA, U., IWAMOTO, T., MOUE, Y., URANO, T., OHTA, Y., GONZALEZ, N.C.

**Splenic contraction-induced reversible increase in hemoglobin concentration in intermittent hypoxia** *J Appl Physiol.* 1999;86(1):181-7

LANGAN JE, COLE CG, HUCKLE EJ, ET AL.

**Novel microsatellite markers and single nucleotide polymorphisms refine the tylosis with oesophageal cancer (TOC) minimal region on 17q25 to 42.5 kb: sequencing does not identify the causative gene** *Hum Genet* 2004; 114:534–40

LAUDER JM, BLOOM FE.

**Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. II: Synaptogenesis** *J Comp Neurol* 163(3):251–264 (1975)

LAUFS TL, WYSTUB S, REUSS S, BURMESTER T, SAALER-REINHARDT S, HANKELN T.

**Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals.**

*Neurosci Lett.* 2004 May 20;362(2):83-6

LEI B, ADACHI N, ARAI T.

**The effect of hypothermia on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during ischemia and reperfusion: a microdialysis study in the gerbil hippocampus** *Neurosci Lett* 1997, 222:91-94

LEONE, A. M., PALMER, R. M., KNOWLES, R. G., FRANCIS, P. L., ASHTON, D. S. AND MONCADA, S.

**Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline** *J Biol Chem* 1991, 266, 23790-5

LEVINE SM AND GOLDMAN JE

**Spatial and temporal patterns of oligodendrocyte differentiation in rat cerebrum and cerebellum** *J Comp Neurol* 1988, 277(3):441-455

LEVISON SW AND GOLDMAN JE

**Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain** *Neuron* 1993, 10:201-212

LEVISON SW, CHUANG C, ABRAMSON BJ, GOLDMAN JE

**The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated** *Development* 1993, 119:611-622

LEVITT P AND RAKIC P

**Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain** *J Comp Neurol* 1980, 193:815-840

LEWIN B.

**Genes VII**

*Oxford Univ. Press* 2000

LI, R. C.; POURANFAR, F.; LEE, S. K.; MORRIS, M. W.; WANG, Y.; GOZAL, D.

**Neuroglobin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury**

*Neurobiol. Aging* 2008, 29, 1815-1822

LI, R.C.; LEE, S K.; POURANFAR, F.; BRITTIAN, K.R.; CLAIR, H.B.; ROW, B.W.; WANG, Y.; GOZAL, D.

**Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain**

*Brain Res.* 2006, 1096, 173-179

LIN X, ZHANG F, BRADBURY CM, KAUSHAL A, LI L, SPITZ DR, AFT RL, GIUS D.

**2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via dis-ruptions in thiol metabolism** *Cancer Research* 2003 63:3413-3417

LINZEN, B., SOETER, N.M., RIGGS, A.F., SCHNEIDER, H.J., SCHARTAU, W., MOORE, M.D., YOKOTA, E., BEHRENS, P.Q., NAKASHIMA, H., TAKAGI, T.

**The structure of arthropod hemocyanins** *Science.* 1985;229(4713):519-24

LIPTON, P.

**Ischemic cell death in brain neurons**

*Physiol. Rev.* 1999, 79, 1431-1568

LOEW O

**A New Enzyme of General Occurrence in Organisms**

*Science (journal)* May 1900, 11 (279): 701-702

LU H, FORBES RA, VERMA A.

**Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis** *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277:23111–23115

LUTZ, P. L. AND NILSSON, G. E.

**Contrasting strategies for anoxic brain survival – glycolysis up or down**

*J. Exp. Biol.* 1997; 200, 411–419

MACMICKING J, XIE QW, NATHAN C

**Nitric oxide and macrophage function**

*Annu Rev Immunol* 1997, 15:323–350

MADAN, A., VARMA, S., COHEN, H.J.

**Developmental stage-specific expression of the alpha and beta subunits of the HIF-1 protein in the mouse and human fetus** *Mol Genet Metab.* 2002;75(3):244–9

MAGISTRETTI, P. J.

**Brain Energy Metabolism**

*Academic Press.* (1999)

MAMMEN PP, SHELTON JM, YE Q, KANATOUS SB, MCGRATH AJ, RICHARDSON JA, GARRY DJ.

**Cytoglobin is a stress-responsive hemoprotein expressed in the developing and adult brain** *J Histochem Cytochem* 2006, 54:1349-1361

MAMMEN, PP.; SHELTON, JM.; GOETSCH, SC.; WILLIAMS, SC.; RICHARDSON, JA.; GARRY, MG.; GARRY, DJ

**Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain** *J. Histochem. Cytochem.* 2002, 50, 1591-1598

MANGUM, C. P.

**Physiological function of hemerythrin**

*Adv. Comp. Environ. Physiol.* 1992, 13, 173-192

MARLETTA MA

**Nitric oxide synthase structure and mechanism**

*J Biol Chem* 1993; 268:12231-12234

MARTINDALE JL, HOLBROOK NJ

**Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival**

*J Cell Physiol.* 2002 Jul;192(1):1-15

MASAKI H, ATSUMI T, SAKURAI H.

**Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 206:474-479

MCCORD JM, FRIDOVICH I

**"Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988)"**

*Free Radic. Biol. Med.* 1988, 5 (5-6): 363–9

MCRONALD FE, LILOGLOU T, XINARIANOS G, HILL L, ROWBOTTOM L, ELLIS A, SHAW JM, FIELD JK, RISK JM

**Down-regulation of the cytoglobin gene, located on 17q25, in tylosis with oesophageal cancer (TOC): evidence for trans-allele repression.** *Hum Mol Genet* 2006, 15: 1271–1277

MERX, M. W.; FLÖGEL, U.; STUMPE, T.; GÖDECKE, A.; DECKING, U. K.; SCHRADER, J.

**Myoglobin facilitates oxygen diffusion**

*FASEB* 2001, 15, 1077-1079

MILLER RH

**Oligodendrocyte origins**

*Trend Neurosci* 1996, 19:92-96

MILLIKAN, G.A.

**Experiments on muscle haemoglobin in vivo; the instantaneous measurement of muscle metabolism.** *Proc R So. Lond Ser B.* 1937;123:218-241

MILLS, GC

**"Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown"** *J. Biol. Chem.* Nov. 1957, 229 (1): 189-97

MILTON, S. L.; NAYAK, G.; LUTZ, P. L.; PRENTICE, H. M.

**Gene transcription of neuroglobin is upregulated by hypoxia and anoxia in the brain of the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*** *J. Biomed. Sci* 2006, 13, 509-514

MISSON JP, EDWARDS MA, YAMAMOTO M, CAVINESS VS

**Mitotic cycling of radial glia cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study** *Brain Res* 1988, 466(2):183-190

MITZ SA, REUSS S, FOLKOW LP, BLIX AS, RAMIREZ JM, HANKELN T, BURMESTER T.

**When the brain goes diving: glial oxidative metabolism may confer hypoxia tolerance to the seal brain** *Neuroscience.* 2009 Oct 6;163(2):552-60. Epub 2009 Jul 2.

MONCADA S

**Nitric oxide**

*J Hypertens Suppl* 1994, 12:S35-S39

MONOD J, WYMAN J, CHANGEUX J-P.

**On the nature of allosteric transitions: a plausible model**

*J Mol Biol* 1965;12:88-112

MULLER FL, LUSTGARTEN MS, JANG Y, RICHARDSON A, VAN REMMEN H

**"Trends in oxidative aging theories"**

*Free Radic. Biol. Med.* August 2007, 43 (4): 477-503

NIEDOWICZ DM, DALEKE DL.

**The role of oxidative stress in diabetic complications**

*Cell Biochem Biophys* 2005, 43:289-330

NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U.

**Searching for neuroglobin's role in the brain**

*IUBMB life* 2007, 59, 490-497

O'KUSKY, J. AND COLONNIER, M.

**A laminar analysis of the number of neurons, glia, and synapses in the adult cortex (area 17) of adult macaque monkeys** *J Comp Neurol* 1982, 210, 278-90

ORINO K, WATANABE K.

**Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin**

*Vet J.* 2007

OSTOJIC J, SAKAGUCHI DS, DE LATHOUDER Y, HARGROVE MS, TRENT III JT, KWON YH, KARDON RH, KUEHN MH, BETTS DM, GROZDANIC S

**Neuroglobin and cytoglobin: oxygen-binding proteins in retinal neurons**

*Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, 47: 1016-1023

PAN Z, VOEHRINGER DW, MEYN RE.

**Analysis of redox regulation of cytochrome c induced apoptosis in a cell-free system**

Cell Death Differ 1999, 6:683-688

PARADIS V., DARGERER D., BONVOUST F., VIDAUD M., SEGARINI P., BEDOSSA P.

**Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells**

*Lab. Invest.* 2002, 82, 767-774

PARER, J.T.

**Fetal uteroplacental circulation and respiratory gas exchange**

*New York: Williams and Wilkins.* 1993;19-28

PATEL VS, COOPER SJB, DEAKIN JE, FULTON B, GRAVES T, WARREN WC, WILSON RK, GRAVES JAM

**Platypus globin genes and flanking loci suggest a new insertional model for beta-globin evolution in birds and mammals** *BMC Biol* 2008 , 6:34

PESCE, A.; DEWILDE, S.; NARDINI, M.; MOENS, L.; ASCENZI, P.; HANKELN, T.; BURMESTER, T.; BOLOGNESI, M.

**Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity**

*Structure* 2003, 11, 1087-1095

PETERSEN, M. G., DEWILDE, S. AND FAGO, A.

**Reactions of ferrous neuroglobin and cytoglobin with nitrite under anaerobic conditions**

*J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1777-1782

PIHLAJANIEMI, T., MYLLYLÄ, R. AND KIVIRIKKO, K. I.

**Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis**

*J Hepatol* 1991, 13 Suppl 3, S2-7

PLANCON, S.; MOREL-KOPP, M-C.; SCHAFFNER-RECKINGER, E.; CHEN, P.; KIEFFER, N.

**Green fluorescent protein (GFP) tagged to the cytoplasmic tail of  $\alpha 1 \text{Ib}$  or  $\beta 3$  allows the expression of a fully functional integrin  $\alpha 1 \text{Ib} \beta 3$ : Effect of  $\beta 3 \text{GFP}$  on  $\alpha 1 \text{Ib} \beta 3$  ligand binding**

*Biochem. J.* (2001) 357, 529±536

PLATE, K.H., BREIER, G., RISAU, W.

**Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis**

*Brain Pathol.* 1994 Jul;4(3):207-18

PODKOLODNAYA, O.A., STEPANENKO, I.L., ANANKO, E.A., VOROBIEV, D.G.

**Representation of information on erythroid gene expression regulation in the GeneExpress system** *Proceedings of the Second International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. ICG, Novosibirsk, Russia.* 2000:7-11, 1, 34-36

PRESNEAU N, DEWAR K, FORGETTA V, PROVENCHER D, MES-MASSON AM, TONIN PN.

**Loss of heterozygosity and transcriptome analyses of a 1.2 Mb candidate ovarian cancer tumor suppressor locus region at 17q25.1-q25.2** *Mol Carcinog* 2005;43:141-54

PUGH C. W. UND RATCLIFFE P. J. (2003A)

**Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system**

*NAT MED.* 2003A, 9, 677-84

PURVES, D., AUGUSTINE, G. J., FITZPATRICK, D., KATZ, L. C., LA MANTIA, A.-S., MCNAMARA, J. O., EDS.

**Neuroscience**

*Sinauer Associates* (Sunderland, MA). 1997

QIU Y, SUTTON L, RIGGS AF

**Identification of myoglobin in human smooth muscle**

*Biol. Chem.* 1998, 273, 23426-23432

QUENNET V, YAROMINA A, ZIPS D, ROSNER A, WALENTA S, BAUMANN M, MUELLER-KLIESER W.

**Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human**

**squamous cell carcinomas in nude mice** *Radiotherapy and Oncology* 2006, 81:130–135

RABUT G, DOYE V, ELLENBERG J.

**Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells**  
*Nat Cell Biol* 2004; 6:1114–1121

RAKIC P

**Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex**  
*J Comp Neurol* 1972, 145:61-84

RAN Q, LIANG H, IKENO Y (2007).

**"Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis"** *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62 (9): 932–42

RAYNER, B. S.; DUONG, T. T.; MYERS, S. J.; WITTING, P. K.

**Protective effect of a synthetic anti-oxidant on neuronal cell apoptosis resulting from experimental hypoxia re-oxygenation injury** *J. Neurochem.* 2006, 97, 211-221

REBETZ J., TIAN D., PERSSON A., WIDEGREN B., SALFORD L., ENGLUND E., GISSELSSON D.; FAN, X.

**Glial progenitor-like phenotype in low-grade glioma and enhanced CD133-expression and neuronal lineage differentiation potential in high-grade glioma** *PLoS One* 2008 3, e1936

REBETZ, J., TIAN, D., PERSSON, A., WIDEGREN, B., SALFORD, L.G., ENGLUND, E., GISSELSSON, D., FAN, X.

**Glial progenitor-like phenotype in low-grade glioma and enhanced CD133-expression and neuronal lineage differentiation potential in high-grade glioma**  
*PLoS ONE* 2008, 3 e1936

REUSS S, SAALER-REINHARDT S, WEICH B, WYSTUB S, REUSS MH, BURMESTER T, HANKELN T.

**Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues**  
*Neuroscience* 2002, 115:645-656

RHEE S, CHAE H, KIM K

**Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling** *Free Radic Biol Med* 2005, 38 (12): 1543–52

RICE D, BARONE S.

**Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models** *Environ Health Perspect* 108 (suppl 3):511–533 (2000)

RILEY PA.

**Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation**  
*Int J Radiat Biol* 1994, 65:27-33

RISK JM, EVANS KE, JONES J, ET AL.

**Characterization of a 500 kb region on 17q25 and the exclusion of candidate genes as the familial Tylosis Oesophageal Cancer (TOC) locus** *Oncogene* 2002;21:6395–402

RODKEY F.L.

**Mechanism for conversion of oxyhe-moglobin to methemoglobin by nitrite**  
*Clin Chem.* 1976;22:1986-1990

ROESNER A, FUCHS C, HANKELN T, BURMESTER T

**A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals** *Mol Biol Evol.* 2005 Jan;22(1):12-20. Epub 2004 Sep 8.

ROSLIN M, HENRIKSSON R, BERGSTROM P, UNGERSTEDT U, BERGENHEIM AT.

**Baseline levels of glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma**

**assessed by stereotactic microdialysis** *Journal of Neuro-Oncology* 2003 61:151–160

SALAHUDEEN AK, CLARK EC, NATH KA.

**Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo** *The Journal of Clinical Investigation* 1991, 88:1886–1893

SARDESAI VM.

**Role of antioxidants in health maintenance**

*Nutr Clin Pract* 1995, 10:19-25

SATO M, VAUGHAN MB, GIRARD L, ET AL.

**Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells** *Cancer Res* 2006;66:2116–28

SATTLER UGA, MEYER SS, QUENNET V, HOERNER C, ... ZIPS D, WALENTA S, BAUMANN M, MUELLER-KLIESER W.

**Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation**

*Radiotherapy and Oncology* 2010, 94(1):102-9

SAWAI, H.; KAWADA, N.; YOSHIZATO, K.; NAKAJIMA, H.; AONO, S.; SHIRO, Y.

**Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans** *Biochemistry* 42 (2003) 5133–5142

SCHLEGEL, H.G.

**Allgemeine Mikrobiologie,**

*Georg Thieme Verlag. 7. Auflage* 1992

SCHMIDT, M.; GIESSL, A.; LAUFS, T.; HANKELN, T.; WOLFRUM, U.; BURMESTER, T.

**How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina** *J.Biol. Chem.* 2003, 278, 1932-1935

SCHMIDT-KASTNER, R.; HABERKAMP, M.; SCHMITZ, C.; HANKELN, T.; BURMESTER, T.

**Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture** *Brain Res.* 2006, 1103, 173-180

SCHWARTZ G.F., SCHWARTLING R., RABINDRANAUTH P. AND FINKEL G.C.

**Clinical Applications of Serum and Tissue Markers in Malignant Disease: Breast Cancer as the Paradigm**

*CLIN.CHEM.*39/11(B),2404-2412 (1993)

SCHWINDINGER, W. F.; ROBISHAW, J. D.

**Heterotrimeric G-protein beta-gamma-dimers in growth and differentiation**

*Oncogene* 2001, 20, 1653-1660

SCOTT, N.L., FALZONE, C.J., VULETICH, D.A., ZHAO, J., BRYANT, D.A., LECOMTE, J.T.

**Truncated hemoglobin from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002: evidence for hexacoordination and covalent adduct formation in the ferric recombinant protein**

*Biochemistry.* 2002;41(22):6902-10

SEN, C.K. AND PACKER, L.

**Antioxidant and redox regulation of gene transcription**

*FASEB J* 10: 709–720, 1996

SERI B, GARCIA-VERDUGO JM, COLLADO-MORENTE L, McEWEN BS, ALVAREZ-BUYLLA A

**Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus**

*J Comp Neurol* 2004, 478: 359–378.

SERI B, GARCIA-VERDUGO JM, McEWEN BS, ALVAREZ-BUYLLA A

**Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus**

*J Neurosci* 2001, 21:7153–7160.

SHAHABI M, NOORI DALOII MR, LANGAN JE, ROWBOTTOM L, JAHANZAD E, KHOSHBIN E, TAGHIKHANI M, FIELD JK, RISK JM

**An investigation of the tylosis with oesophageal cancer (TOC) locus in Iranian patients with oesophageal squamous cell carcinoma** *INT J ONCOL* 2004, 25: 389–395

SHANG, A.; ZHOU, D.; WANG, L.; GAO, Y.; FAN, M.; WANG, X.; ZHOU, R.; ZHANG, C.

**Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults** *Brain Res.* 2006, 1078, 219-226

SHAW RJ, LILOGLOU T, ROGERS SN, BROWN JS, VAUGHAN ED, LOWE D, FIELD JK, RISK JM

**Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing** *Br J Cancer* 2006, 94: 561 –568

SHAW RJ, OMAR MM, ROKADIYA S, KOGERA FA, LOWE D, HALL GL, WOOLGAR JA, HOMER J, LILOGLOU T, FIELD JK, RISK JM.

**Cytoglobin is upregulated by tumour hypoxia and silenced by promoter hypermethylation in head and neck cancer** *Br J Cancer* 2009 JUL 7; 101(1):139-44

SHEN H.M., SHI C.Y., SHEN Y., ONG C.N.

**Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1** *Free Radic Biol Med* 1996, 21:139-146

SILBERNAGL, S. & DESPOPOULOS, A.

**Taschenatlas der Physiologie**

*Thieme* [u.a.] Stuttgart 2001

SILVER, I., ERECINSKA, M.

**Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells**

*Adv Exp Med Biol.* 1998;454:7-16

SIMPSON JC, NEUBRAND VE, WIEMANN S, PEPPERKOK R.

**Illuminating the human genome**

*Histochem Cell Biol.* 2001 Jan;115(1):23-9. Review

SIMS, N.R.; ANDERSON, M.F.

**Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke**

*Neurochem. Int.* 2002, 40, 511-526

SIMS, N.R.; MUYDERMAN, H.

**Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke**

*Biochim. Biophys. Acta* 2009

SINGER, D.

**Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach**

*Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1999;123(3):221-34

SINGER, D.

**Phylogenie des Stoffwechsels der Säugetiere**

*Anästhesiol Intensivmed Scherzther* 2002; 37: 441-460

SKOFF RP

**Gliogenesis in rat optic nerve: astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes** *Dev Biol* 1990, 139:149-168

SLUIMER JC, KISTERS N, CLEUTJENS KB, ET AL.

**Dead or alive: gene expression profiles of advanced atherosclerotic plaques from autopsy and surgery** *Physiol Genomics* 2007;30:335–41

SONVEAUX P, VEGRAN F, SCHROEDER T, WERGIN MC, VERRAX J, RABBANI ZN, DE SAEDELEER CJ, KENNEDY KM, DIEPART C, JORDAN BF, KELLEY MJ, GALLET B, WAHL ML, FERON O, DEWHIRST MW.

**Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice** *The Journal of Clinical Investigation* 2008 118:3930–3942

SOWA, A.W.; DUFF, S.M.; GUY, P.A.; HILL, R.D.

**Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 10317-10321

STAMLER JS, JIA L, EU JP, ET AL.

**Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient** *Science* 1997;276:2034-2037

STRYER L., BERG JM, TYMOCZKO JL

**Biochemie**

*Spektrum Akademischer Verlag*, 2003, Heidelberg, Berlin, Oxford

STUDER, L.; CSETE, M.; LEE, S. H.; KABBANI, N.; WALIKONIS, J.; WOLD, B.; MCKAY, R.

**Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen** *J. Neurosci.* 2000, 20, 7377-7383

SUN, Y.; JIN, K.; MAO, X. O.; ZHU, Y.; GREENBERG, D. A.

**Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxicischemic injury** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 15306-15311

SUN, Y.; JIN, K.; PEEL, A.; MAO, X.O.; XIE, L.; GREENBERG, D.A.

**Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 3497-3500

SUTOR B., LUHMANN H.J.

**Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex** *Perspect Dev Neurobiol* 2(43):409–419 (1995)

SUZUKI M, SUNAGA N, SHAMES DS, TOYOOKA S, GAZDAR AF, MINNA JD.

**RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells** *Cancer Res* 2004;64:3137–43

SUZUKI Y.J. AND FORD G.D.

**Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle** *J Mol Cell Cardiol* 31: 345–353, 1999

SWANN J.W., SMITH K.L., BRADY R.J.

**Neural networks and synaptic transmission in immature hippocampus** *Adv Exp Med Biol* 268:161–171 (1990)

SWANN JW, SMITH KL, BRADY RJ

**Neural networks and synaptic transmission in immature hippocampus** *Adv Exp Med Biol* 268:161–171 (1990)

TABATABAEI P, BERGSTROM P, HENRIKSSON R, BERGENHEIM AT.

**Glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma tumours during**

**radiotherapy** *Journal of Neuro-Oncology* 2008 90:35–39

TAINER JA, GETZOFF ED, RICHARDSON JS, RICHARDSON DC

**"Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase"**

*Nature* 1983 (5940): 284–7

THAKUR A, BOLLIG A, WU J, LIAO DJ.

**Gene expression profiles in primary pancreatic tumors and metastatic lesions of Ela-c-myc transgenic mice** *Mol Cancer* 2008;7:11

TRENT, J.T. 3<sup>RD</sup>, HARGROVE, M.S.

**A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin**

*J Biol Chem.* 2002;277(22):19538-45

UNO, T., RYU, D., TSUTSUMI, H., TOMISUGI, Y., ISHIKAWA, Y., WILKINSON, A.J., SATO, H. AND HAYASHI, T.  
**Residues in the distal heme pocket of neuroglobin. Implications for the multiple ligand binding steps** *J Biol Chem* 2004, 279, 5886-93

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J.

**Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**

*Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. Epub 2006 Aug 4.

VALLONE, B.; NIENHAUS, K.; BRUNORI, M.; NIENHAUS, G. U.

**The structure of murine neuroglobin: Novel pathways for ligand migration and binding**

*Proteins* 2004, 56, 85-92

VALLONE, B.; NIENHAUS, K.; MATTHES, A.; BRUNORI, M.; NIENHAUS, G.U.

**The structure of carbonmonoxy neuroglobin reveals a heme sliding mechanism for control of ligand affinity** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 17351-17356

VAN DOORSLAER, S.; DEWILDE, S.; KIGER, L.; NISTOR, S. V.; GOOVAERTS, E.; MARDEN, M. C.; MOENS, L.

**Nitric oxide binding properties of neuroglobin. A characterization by EPR and flash photolysis** *J.Biol. Chem.* 2003, 278, 4919-4925

VAN HOLDE K.E., MILLER K.I.

**Haemocyanins**

*Q. Rev. Biophys.* 1982, 15, 1 – 129

VAUGHN, M. W., HUANG, K. T., KUO, L. AND LIAO, J. C.

**Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption**

*J Biol Chem* 2000; 275, 2342-8

VILLAR J, ARENAS MI, MACCARTHY, CM, BLANQUEZ MJ, TIRADO OM, NOTARIO V.

**PCPH/ENTPD5 expression enhances the invasiveness of human prostate cancer cells by a protein kinase C y-dependent mechanism** *Cancer Res* 2007;67:10859–68

VINOGRADOV, S.N.

**The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocruorins and chlorocruorins)** *Comp Biochem Physiol B.* 1985;82(1):1-15

VOGT, M., PUNTSCHART, A., GEISER, J., ZULEGER, C., BILLETER, R. AND HOPPELER, H.

**Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions** *J Appl Physiol* 2001; 91, 173-82

WAKASUGI, K. AND MORISHIMA, I.

**Preparation and characterization of a chimeric zebrafish-human neuroglobin engineered**

**by module substitution** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 330, 591-597

WAKASUGI, K.; NAKANO, T.; KITATSUJI, C.; MORISHIMA, I.

**Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 318, 453-460. A

WAKASUGI, K.; NAKANO, T.; MORISHIMA, I.

**Association of human neuroglobin with cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor**  
*Biochemistry* 2004, 43, 5119-5125. B

WAKASUGI, K.; NAKANO, T.; MORISHIMA, I.

**Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor** *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 36505-36512. A

WAKASUGI, K.; NAKANO, T.; MORISHIMA, I.

**Identification of residues in human neuroglobin crucial for guanine nucleotide dissociation inhibitor activity** *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 36505-36512. B

WALENTA S, MUELLER-KLIESER WF.

**Lactate: Mirror and motor of tumor malignancy**  
*Seminars in Radiation Oncology* 2004 14:267-274

WANG X.; LIU J.; ZH, H.; TEJIMA E.; TSUJI K.; MURATA Y.; ATOCHIN D.N.; HUANG P.L.; ZHANG C.; LO E.H.

**Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia** *Stroke* 2008, 39, 1869-1874

WANG, H. Y.; WANG, J.; LI, Q.

**Expression of neuroglobin in serum of premature neonates and its significance**  
*Chinese J. Ped.* 2008, 46, 716-717

WARBURG O, POESENER K, NEGELEIN E.

**Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle**  
*Biochemische Zeitschrift* 1924 152:309-344

WATANABE, S.; WAKASUGI, K.

**Neuroprotective function of human neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 369, 695-700

WEBER, R. E.; FAGO, A.

**Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins.** *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2004, 144, 141-159

WEHNER, R., GEHRING, W.

**Zoologie**  
*Georg Thieme Verlag.* 23. Auflage 1995

WEINBERG, R.A.

**How cancer arises**  
*Scientific American,* 1996, 275, 62-70

WEIS K.

**Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle**  
*Cell* 2003;112:441-451

WERNERT N., STANJEK A., KIRIAKIDIS S., HÜGEL A., JHA HC., MAZITSCHKE R. AND GIANNIS A.

**Inhibition of Angiogenesis in vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides-D-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin**

*Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, No. 21

WEST, T.G. AND BOUTILIER, R.G.

**Metabolic suppression in anoxic frog muscle.**

*J. Comp. Physiol. B* 1998; 168, 273–280

WIRSTAM M., LIPPARD S.J., FRIESNER R.A.

**Reversible dioxygen binding to hemerythrin**

*J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3980-3987

WITTENBERG B.A., WITTENBERG J.B.

**Myoglobin-mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes**

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 7503-7507

WITTENBERG J.B.

**Formation of the porphyrin ring**

*Nature.* 1959;184:876-8

WITTENBERG J.B.

**Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle**

*Physiol. Rev.* 1970, 50, 559-636

WITTENBERG J.B., WITTENBERG B.A.

**Myoglobin function reassessed.**

*J. Exp. Biol.* 2003, 206, 2011-2020

WITTENBERG, B.A.; WITTENBERG, J.B.

**Transport of oxygen in muscle.**

*Annu. Rev. Physiol.* 1989, 51, 857-878

WITTENBERG, J. B.

**Functions of cytoplasmic hemoglobins and myohemerythrin**

*Adv. Comp. Environ. Physiol.* 1992, 13, 60-85

WYSTUB S

**Expressions- und Funktionsanalysen von Neuroglobin und Cytoglobin**

*Dissertation* 2007

WYSTUB S, LAUFS T, SCHMIDT M, BURMESTER T, MAAS U, SAALER-REINHARDT S, HANKELN T, REUSS S.

**Localization of neuroglobin protein in the mouse brain**

*Neurosci Lett* 2003, 346:114-116

XINARIANOS G, McRONALD FE, RISK JM, ET AL.

**Frequent genetic and epigenetic abnormalities contribute to the deregulation of cytoglobin in non-small cell lung cancer** *Hum Mol Genet* 2006; 15:2038–44

XU, W. L.; WANG, C. L.; LIAO, Z. Y.; ZHANG, Y. L.; YU, L. H.; MENG, F. W.; WANG, X. X.; MENG, F. W.; YIN, Z. Y.; QIAN, L. J.; ZHANG, C. G.

**Identification of interaction and interaction domains between neuroglobin and Na(+), K(+)-ATPase beta2 subunit** *Acta Biochim. Biophys. Sinica* 2003, 35, 823-828

YASUI W, OUE N, AUNG PP, MATSUMURA S, SHUTOH M, NAKAYAMA H.

**Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review**

*Gastric Cancer* 2005, 8:86–94.

ZERLIN M, LEVISON WL, GOLDMAN JE

**Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of**

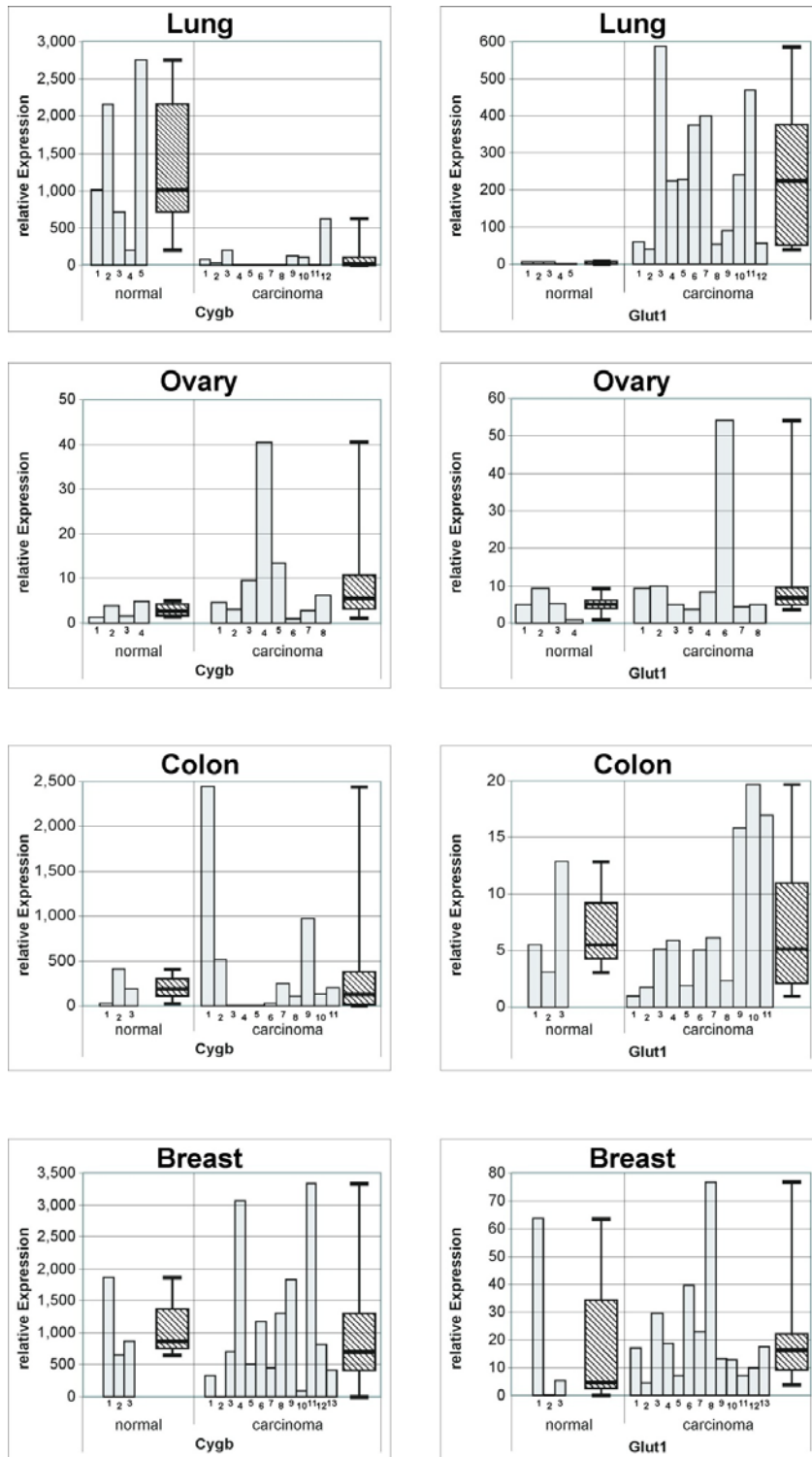
**subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain** *J Neurosci* 1995, 15(11):7238-7249

ZHANG J, PERRY G, SMITH MA, ROBERTSON D, OLSON SJ, GRAHAM DG, MONTINE TJ.

**Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons** *Am J Pathol* 1999, 154:1423-1429.

## 7 Anhang

### 7.1.1 qPCR auf Tumorgewebe, Koslowski



---

## **Versicherung**

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

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit verwendet habe. Weiterhin bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit, oder Teile davon, nicht als Arbeit in einer anderen Fakultät oder für eine andere Prüfung eingereicht habe.

Mainz, den 28. November 2010

---

Tilmann Laufs