

Untersuchungen zur Globinexpression in Karpfenfischen

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anja Rösner
geb. am 31.01.1978 in Frankfurt am Main

Mainz, 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2007

Glücklicher Weise sind Haemoglobin und Chlorophyll
Körper von hohem physiologischem Interesse -

und es giebt deren noch mehr; für welche die Bestimmung
der Verbreitung bei verschiedenen Thieren,
die unter verschiedenen Bedingungen leben,
ein wenn auch vielleicht kleiner Beitrag zur
Lösung des grossen Problem es ist.

E. Ray Lankester (1871)

Veröffentlichungen

Originalveröffentlichungen

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

Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., **Roesner, A.**, Schmidt, M., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., and Hankeln, T. (2004) Neuroglobin and cytoglobin: Genes, proteins and evolution. *IUBMB Life* **56**, 671-679

Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2005) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: Evidence for two distinct globin families in animals. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 12-20

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

Roesner, A., Hankeln, T., and Burmester, T. (2006) Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* **209**, 2129-2137

Tagungsabstracts

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

Haberkamp, M., Fuchs, C., Schmidt, M., Heib, V., Mitz, S., **Roesner, A.**, Hankeln, T., and Burmester, T. (2003) *Danio* neuroglobin: Differences and conservation of mammalian and fish neuroglobins. *3rd Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network 'Molecular and Cellular Neurobiology', Mainz*

Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) A neuroglobin-like gene from lower vertebrates expressed in non-neuronal tissues. *97. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock*. Abstract map, p. 36

Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: Evidence for two distinct globin families in animals. *Proteins in Adaptation and Evolution (International Symposium on Animal Physiology Physiology)*, Greifswald. Abstract map, p. 35

Roesner, A., Fago, A., Hankeln, T., Weber, R.E., and Burmester, T. (2005) Characterization of globin X, a novel member of the vertebrate globin family, 98. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Bayreuth*. Abstract map, p. 34

Burmester, T., **Roesner, A.**, and Hankeln, T. (2006) Hypoxia induces a complex response of respiratory proteins in zebrafish. *Keystone Symposium: Hypoxia and Development, Physiology and Disease, Breckenridge, USA*. Abstract map # 123

Roesner, A., Hankeln, T., and Burmester, T. (2006) Hypoxia induces a complex response of respiratory proteins in zebrafish. *First International Congress of Respiratory Biology, Bonn/Bad Honnef*, Abstract map p. 97

Roesner, A., Hankeln, T., and Burmester, T. (2006) Oxygen-dependent changes of globin expression in zebrafish. *XIVth International Conference on Dioxygen Binding and Sensing Proteins, Naples, Italy*. Abstract map, p. 58

Roesner, A., Hankeln, T., and Burmester, T. (2006) Oxygen-dependent changes of globin expression in zebrafish. 99. *Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Münster*. Abstract map, p. 18

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
1	Sauerstoff in aquatischen Lebensräumen.....	1
2	Hypoxieanpassungen der Fische	2
2.1	Verhaltensanpassungen.....	2
2.2	Anatomische Anpassungen.....	3
2.3	Physiologische Anpassungen.....	4
3	Karpfenfische.....	6
3.1	Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)	6
3.2	Goldfisch (<i>Carassius auratus</i>).....	7
4	Respiratorische Proteine.....	8
5	Globine	9
5.1	Myoglobin	10
5.2	Hämoglobin.....	11
5.3	Neuroglobin	12
5.4	Cytoglobin.....	16
5.5	Evolution der Globine	19
6	Zielsetzung.....	20
B	MATERIAL UND METHODEN	21
1	Tiere	21
1.1	<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	21
1.2	<i>Carassius auratus</i> (Goldfisch)	21
1.3	<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Grüner Kugelfisch).....	22
1.4	Systematik der Fische	23
2	Chemikalien und Geräte	24
3	Hypoxieexperimente	25
4	Mikrobiologische Methoden.....	27
4.1	Bakterienstämme.....	27
4.2	Nährmedien und Agarplatten.....	27

4.3	Flüssigkulturen.....	28
4.4	Expressionskulturen	28
4.5	Glycerinkulturen.....	28
5	Allgemeine molekularbiologische Methoden	29
5.1	Präparation von RNA.....	29
5.1.1	RNA-Präparation mit der GITC-Methode	29
5.1.2	RNA-Präparation mit dem "RNeasy-Kit" (Qiagen, Hilden)	30
5.2	Präparation von genomischer DNA.....	30
5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
5.4	PCR-Techniken	31
5.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
5.4.2	RT-PCR	31
5.5	Gelelektrophorese	32
5.5.1	DNA-Gelelektrophorese	32
5.5.2	RNA-Gelelektrophorese	32
5.6	DNA-Isolierung aus Agarosegelen und PCR-Produktreinigung.....	33
5.7	Klonierungsmethoden.....	33
5.7.1	Klonierung von PCR-Fragmenten	33
5.7.2	Klonierung in pET-3a und pET-15b.....	34
5.8	Transformation kompetenter Bakterien	35
5.9	Präparation von Plasmid-DNA.....	35
5.10	Überprüfung des Klonierungserfolgs.....	36
5.10.1	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	36
5.10.2	PCR mit Vektorprimern.....	36
5.11	Oligonukleotidprimer.....	37
5.12	DNA-Sequenzierung.....	37
5.13	Auswertung der Sequenzen	37
5.13.1	Verwendete Datenbanken und Computerprogramme.....	37
5.13.2	Alignment und Sequenzanalyse	38
5.13.3	Phylogenie und statistische Auswertung	38
6	Quantitative real-time PCR	39
6.1	cDNA-Synthese	39
6.2	Entwerfen der qRT-PCR Primer	39
6.3	Durchführung der qRT-PCR.....	40
6.4	Auswertung der quantitativen real-time PCR	40

7	Proteinbiochemische Methoden	43
7.1	Isolierung von Proteinen aus Gewebeproben	43
7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
7.2.1	Extinktionsmessung	43
7.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	43
7.3	Aufnahme eines Absorptionsspektrums	44
7.4	Entsalzen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	44
7.5	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	44
7.5.1	Gelherstellung	45
7.5.2	Proteindenaturierung	45
7.5.3	Elektrophorese	46
7.5.4	Coomassie-Färbung	46
7.6	Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)	46
7.6.1	Elektrotransfer	46
7.6.2	Färbung der Proteine mit PonceauS	47
7.6.3	Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern	47
7.7	Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern	48
7.7.1	Immunisierung	48
7.7.2	Affinitätsreinigung	48
7.8	Rekombinante Expression in Bakterien	48
7.8.1	Bakterielles Expressionssystem	48
7.8.2	Bakterielle Expression	49
7.8.3	Aufbrechen der Bakterienzellen	50
7.8.4	Verdau von Nukleinsäuren	50
7.8.5	Reinigung der rekombinanten Proteine ohne His-Tag	51
7.8.5.1	Ammoniumsulfatpräzipitation	51
7.8.5.2	Anionenaustauschchromatographie	51
7.8.5.3	Gelfiltrationschromatographie	52
7.8.6	Reinigung von rekombinanten Proteinen mit His-Tag	52
C	ERGEBNISSE	53
1	Identifikation von neuartigen Fischglobinen	53
1.1	Globin X	53
1.1.1	Molekulare Charakterisierung von Globin X	53
1.1.1.1	Genomische Sequenz für Globin X des <i>Tetraodon nigroviridis</i>	53
1.1.1.2	Kodierende Sequenz für Globin X	54
1.1.1.3	Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse	56

1.1.1.4	Expression von Globin X-mRNA	59
1.1.2	Proteinbiochemische Charakterisierung von Globin X	61
1.1.2.1	Rekombinante Expression von Globin X des Zebra ä rblings	61
1.1.2.2	Absorptionsspektrum von rekombinantem Globin X Δ NC des Zebra ä rblings	63
1.1.2.3	Sauerstoffaffinität und Hill-Koeffizient von Globin X Δ NC	63
1.1.2.4	Expression von Globin X-Protein in unterschiedlichen Geweben	64
1.2	Myoglobine der Karpfenfische	65
1.2.1	Molekulare Charakterisierung von Myoglobin 2 des Goldfisches	65
1.2.2	Phylogenie der Fisch-Myoglobine	67
1.2.3	Expression von Myoglobin	69
1.2.3.1	Rekombinante Expression von Myoglobin des Zebra ä rblings	69
1.2.3.2	Expression von Myoglobin in Geweben des Goldfisches	70
2	Sauerstoffabhängige Globinexpression in Karpfenfischen.....	72
2.1	Hypoxieexperimente	72
2.1.1	Hypoxieexperimente mit Zebra ä rblingen	72
2.1.2	Hypoxieexperimente mit Goldfischen	73
2.2	Verhalten der Fische während der Hypoxieexperimente	73
2.3	Vorbereitung der quantitativen real-time PCR-Experimente	74
2.4	Normalisierung der quantitativen real-time PCR-Daten	74
2.5	Hypoxieinduzierte Veränderung der Globinexpression in Zebra ä rblingen	75
2.5.1	Expression von Globin-mRNA	75
2.5.2	Expression von Neuroglobin-mRNA in Hirn und Auge des Zebra ä rblings	77
2.5.3	Quantitative Western Blot-Analyse	78
2.6	Hypoxieinduzierte Veränderung der Globinexpression im Goldfisch	81
2.6.1	Expression von Globin-mRNA	81
2.6.2	Expression von Neuroglobin und Myoglobin auf Proteinebene	84
3	Vergleichende Untersuchung zur konstitutiven Globinexpression in Zebraärbling und Goldfisch	86
3.1	Konstitutive Neuroglobin mRNA-Expression	87
3.2	Konstitutive Neuroglobin-Proteinexpression	88
3.3	Konstitutive Myoglobin-Proteinexpression	90
D	DISKUSSION.....	92
1	Identifikation und Charakterisierung neuartiger Globine in Fischen.....	92
1.1	Globin X: Ein fünfter Globintyp der Wirbeltiere!	92
1.1.1	Ubiquitäre Expression von Globin X	92

1.1.2	Charakterisierung der Protein- und Genomstruktur von Globin X.....	93
1.1.3	Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von Globin X.....	94
1.1.4	Möglicher Verlust von Globin X in der Evolution der Amniota.....	96
1.1.5	Mögliche Hinweise für eine Intronverschiebung in Globinen	96
1.1.6	Zwei Globinfamilien im Tierreich?	98
1.2	Zwei Myoglobine der Karpfenfische	100
1.2.1	Molekulare und biochemische Charakterisierung der Myoglobine.....	100
1.2.2	Phylogenie der Myoglobine	101
2	Sauerstoffabhängige Globinexpression in Karpfenfischen.....	104
2.1	Verhaltensänderungen unter Sauerstoffmangel.....	104
2.2	Rolle der respiratorischen Proteine in der Hypoxieantwort.....	105
2.3	Zebrabärblinge bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen	106
2.3.1	Reduzierte Expression von Hämoglobin unter Hypoxie.....	107
2.3.2	Hypoxie induziert die Myoglobin-Expression.....	108
2.3.3	Gewebespezifische Neuroglobin-Regulation unter Sauerstoffmangel.....	109
2.3.4	Regulation von Cytoglobin und Globin X.....	110
2.4	Goldfische unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen	111
2.5	Konstitutive Neuroglobin-Expression im Zebrabärbling und im Goldfisch	113
3	Neuroglobin und seine Bedeutung für die Hypoxietoleranz.....	114
E	ZUSAMMENFASSUNG.....	119
F	LITERATURVERZEICHNIS.....	120
G	ANHANG	130
1	Abkürzungsverzeichnis	130
2	Abkürzungscodes der Aminosäuren.....	131
3	Genetischer Standardcode.....	132
4	Verwendete Primer	132
4.1	PCR und RT-PCR.....	132
4.1.1	Globin X.....	132
4.1.2	Myoglobin	133
4.1.3	Andere	133
4.2	Quantitative real-time PCR.....	133

4.2.1	Zebrabärbling <i>Danio rerio</i>	133
4.2.2	Goldfisch <i>Carassius auratus</i>	134
4.3	Sequenzierprimer	134
5	Untersuchte Gene bei der quantitativen real-time PCR	135
6	Alignments	135
6.1	Globalalignments	135
6.1.1	Hämoglobin α	135
6.1.2	Hämoglobin β	136
6.1.3	Myoglobin	136
6.1.4	Cytoglobin	137
6.1.5	Neuroglobin	137
6.1.6	Globin X	138
6.1.7	Genomische Globin X-Sequenz des Kugelfisches <i>T. nigroviridis</i>	138
6.1.8	Stammbaum der Globine im Tierreich.....	142
6.1.9	Stammbaum der Fisch-Myoglobine.....	146
6.2	Alignments der Kontroll- und Referenzgene	147
6.2.1	β -Actin	147
6.2.2	Acidic ribosomal protein (ARP).....	147
6.2.3	Cyclophilin (CP).....	148
6.2.4	Lactatdehydrogenase A (LDH-A)	148
6.2.5	Phosphoglyceratkinase 1 (PGK-1)	149
6.2.6	Superoxiddismutase 1 (SOD-1).....	149
7	Abkürzungen und deutsche Namen der Tiere.....	150
7.1	Stammbaum der Globine im Tierreich.....	150
7.2	Stammbaum der Fisch-Myoglobine.....	151
8	Zugangsnummern der Sequenzen	153
8.1	Stammbaum der Globine im Tierreich.....	153
8.2	Stammbaum der Fisch-Myoglobine.....	154
9	Vektoren	155
9.1	Vektorkarte des pCR [®] 4-TOPO [®] -Vektors	155
9.2	Vektorkarte des pGEM [®] -T Easy-Vektors.....	155
9.3	Vektorkarte des pET-3a-Vektors	156
9.4	Vektorkarte des pET-15b-Vektors	157
H	PUBLIKATIONEN.....	158

A Einleitung

1 Sauerstoff in aquatischen Lebensräumen

Mit Beginn der Akkumulation von molekularem Sauerstoff (O_2) in der Atmosphäre vor mehr als zwei Milliarden Jahren konnten die bis dahin anaerob lebenden Organismen komplexe aerobe Stoffwechselwege erschließen, die ihnen eine effizientere Energieausbeute ermöglichten (Berg et al., 2003; Raymond & Segre, 2006). Der durch die Photosynthese der Pflanzen und Cyanobakterien gebildete Sauerstoff sammelte sich zunehmend in der Atmosphäre an und erreichte vor 300 Millionen Jahren eine maximale Konzentration von 35% (Berner, 1999). Im Laufe der folgenden 100-150 Millionen Jahre nahm der Sauerstoffgehalt auf lediglich 10% ab (Berner, 1999) und liegt seit 10 Millionen Jahren bei konstant 21% (Falkowski et al., 2005). "Niedere" Wirbeltiere (Fische, Amphibien und Reptilien) waren somit im Laufe ihrer Evolution großen Variationen in der Konzentration des Sauerstoffgehalts der Atmosphäre und dementsprechend einem starken Selektionsdruck für Hypoxietoleranz ausgesetzt (Huey & Ward, 2005). Daher haben diese Tiere verschiedene Anpassungen entwickelt, um mit vorübergehenden Schwankungen des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs zurechtzukommen (Bickler & Buck, 2007).

Aquatische Lebensräume weisen zudem einen deutlich niedrigeren Sauerstoffgehalt auf als terrestrische Habitate, da sich unter optimalen Bedingungen lediglich 1/30 des in der Luft enthaltenen Sauerstoffs im Wasser löst (Atkins & de Paula, 2006). Die Aufnahme des Sauerstoffs aus dem Wasser ist ferner durch die langsamere Diffusion in flüssigem Medium im Vergleich zur Luft deutlich erschwert (1. Ficksches Diffusionsgesetz; Fick, 1855; Stokes-Einstein-Gleichung; Einstein, 1905). Die Löslichkeit von Sauerstoff ist abhängig von Temperatur und Salzgehalt des Wassers. Eine hohe Sauerstoffkonzentration findet man in kalten, salzhaltigen Gewässern, während mit zunehmender Temperatur und bei geringem Salzgehalt des Wassers die Löslichkeit von Sauerstoff abnimmt. Besonders deutlich wird dies zum Beispiel bei stehenden Gewässern, die durch Sonneneinstrahlung stark erwärmt werden, wodurch ihr Sauerstoffgehalt so stark abnimmt, dass die darin lebenden Organismen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind. Während bei 10°C in Süßwasser bis zu 10,92 mg O_2 pro Liter gelöst sind, kann der Sauerstoffgehalt im Extremfall bei Erwärmung auf 30°C auf 7,53 mg O_2 pro Liter Wasser abnehmen (Henrysches Gesetz, Atkins & de Paula, 2006). Der maximale Sauerstoffgehalt wird jedoch nur sehr selten, zum Beispiel in gut belüfteten Gewässern, erreicht. Auch kommt es durch Photorespiration der Wasserpflanzen zu Schwankungen im Sauerstoffgehalt des Wassers. Im Winter können geschlossene Eis- und Schneedecken die Diffusion von Luft in das Wasser verhindern. Der

aerobe Abbau von organischem Material durch Bakterien verringert den Sauerstoffgehalt in stehenden Gewässern deutlich. In Trockenzeiten entstehen bei flachen Gewässern isolierte kleine Wasserbereiche, die neben der Erwärmung auch durch mangelnde Ventilation des Wassers und geringe pflanzliche Photosyntheseleistung von Sauerstoffmangel bedroht sind. Auch die Gezeiten stellen für Meeresbewohner von Küstenregionen und Riffen ein großes Risiko dar, da während der Ebbe Priele entstehen können, die von der bewegten Wasserfläche abgeschnitten sind. In solchen flachen, stehenden Gewässern steigt die Temperatur durch Sonneneinstrahlung wesentlich stärker an als im freien Meer, zudem wird der Sauerstoffgehalt des Wassers durch die Atmung von Korallen und anderen Meeresbewohnern weiter reduziert.

2 Hypoxieanpassungen der Fische

Aufgrund der Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration des Wassers haben Fische neben Veränderungen ihres Verhaltens verschiedene anatomische, physiologische und biochemische Anpassungen entwickelt, die ihnen helfen, unter Hypoxie zu überleben (Nikinmaa, 2002; Nilsson & Renshaw, 2004; Cossins & Crawford, 2005; Nikinmaa & Rees, 2005; Bickler & Buck, 2007). Unter den ca. 20.000 Fisch-Spezies gibt es große Unterschiede in der Hypoxietoleranz. Fische der Familien der Lachse (Salmonidae) und der Makrelen und Thunfische (Scombridae), die zu den schnellen und ausdauernden Schwimmern zählen, sind sehr stark abhängig von einem aeroben Stoffwechsel und reagieren sensibel auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Bushnell et al., 1990; Gamperl et al., 2001). Zu der Gruppe der hypoxietoleranten Fische zählen zum Beispiel Karpfenfische und Aale (Gesser, 1977; Bailey et al., 1999; Nilsson & Renshaw, 2004).

2.1 Verhaltensanpassungen

Viele Fische reagieren bereits auf kurzzeitige Hypoxie mit abnehmender Aktivität (van den Thillart et al., 1976; Kramer & Mehegan, 1981; Dalla Via et al., 1994). Zudem wurde unter Sauerstoffmangel eine Zunahme der Atemfrequenz beobachtet (Jensen et al., 1993; Nilsson & Renshaw, 2004; van der Meer et al., 2005). Einige Fische reagieren auf hypoxische Bedingungen mit Oberflächenatmung (Kramer, 1983; Affonso & Rantin, 2005; Tobler et al., 2006). Sie nutzen dabei die höhere Sauerstoffkonzentration in dem Bereich des Gewässers aus, der direkt mit der Luft in Kontakt steht (Kramer & Mehegan, 1981). Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt bei Fischen, die nicht dauerhaft mit Sauerstoffmangel konfrontiert sind. Bei Spezies, die sich hauptsächlich am schlammigen, sauerstoffarmen Grund von Gewässern aufhalten, wurde bei Hypoxie keine Oberflächenatmung beobachtet; trotzdem überlebten diese Tiere unter Sauerstoffmangel aufgrund anderer Anpassungen (Kramer,

1983). Fische aus stark sauerstoffhaltigen Gewässern (zum Beispiel Flüssen mit starker Strömung) zeigten bei Sauerstoffmangel keine Veränderung der Atmung. Der Lebensraum dieser Spezies ist selten bis nie von Hypoxie bedroht, so dass diese Tiere offenbar keine besonderen Anpassung an Sauerstoffmangel entwickelt haben (Kramer, 1983).

2.2 Anatomische Anpassungen

Anhand der Größe der respiratorischen Oberfläche verschiedener Fisch-Spezies können Rückschlüsse auf den jeweiligen Sauerstoffbedarf und damit auch auf die Hypoxietoleranz getroffen werden. Thunfische haben als ausdauernde Schwimmer auch bei langsamer Fortbewegung einen hohen Sauerstoffbedarf (Bushnell & Brill, 1992). Durch eine große Kiemenoberfläche gelingt es ihnen, eine bessere O₂-Aufnahme zu erzielen. So besitzt der zu den Makrelen und Thunfischen (Scombridae) zählende Echte Bonito (*Katsuwonus pelamis*) im Vergleich mit einer gleich großen Regenbogenforelle eine 10-fach größere Kiemenoberfläche (Hughes, 1984 a, b). Im Allgemeinen ist die respiratorische Oberfläche in Thunfischen 5- bis 10-mal größer als bei anderen aktiven Teleostiern (Hughes, 1984 a, b). Allerdings muss durch die große, mit dem umgebenden Wasser in Kontakt stehende, respiratorische Oberfläche sehr viel Energie zur Osmoregulation aufgewendet werden (Bushnell & Brill, 1992).

Um die geringen Konzentrationen des Sauerstoffs im Wasser effektiver nutzen zu können, vergrößern manche Fische bei einem mehrere Tage andauerndem Sauerstoffmangel die Oberfläche ihrer Kiemen (Chapman et al., 2000; Saroglia et al., 2002; Sollid et al., 2003; 2005; van der Meer et al., 2005). Unter Normoxie besitzen die Kiemen der Karausche keine hervorstehenden Lamellen (Sollid et al., 2003). Bereits nach einem Tag Hypoxie konnte aufgrund der Reduktion der zwischen den Lamellen liegenden Zellmasse eine deutliche Zunahme der Kiemenoberfläche beobachtet werden. In den Kiemen des Zebraäbrblings kommt es bei Sauerstoffmangel durch eine Steigerung der Zellzahl bei gleichzeitiger Reduktion der Zellgröße der Epithelzellen der sekundären Lamelle zu einer zerklüfteteren Kiemenoberfläche (van der Meer et al., 2005).

2.3 Physiologische Anpassungen

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass ein Schlüssel zum Überleben längerer hypoxischer Perioden ein Zusammenspiel aus gleichzeitiger Abnahme der Stoffwechselrate und einer Verringerung des Energiebedarfs ist (Hochachka, 1986 b; Bickler & Buck, 2007). Eine Reduktion oder die Einstellung vieler bioenergetischer Prozesse ist die Folge. Unter Sauerstoffmangel hat der Organismus lediglich zwei Möglichkeiten, die Energieversorgung mit ATP aufrecht zu erhalten: die anaeroben Stoffwechselwege der Energieproduktion zu verstärken oder den Energiebedarf zu reduzieren (Hochachka, 1986 a, b). Der Wechsel von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel ermöglicht auch bei Hypoxie die Bildung von Energieäquivalenten, jedoch ist diese Möglichkeit zumeist lediglich zur kurzzeitigen Überbrückung von Sauerstoffmangel geeignet, da durch Anaerobiose toxische Stoffwechselendprodukte gebildet werden. Bei Wirbeltieren, die längere Zeit unter geringen Sauerstoffkonzentrationen überleben müssen, ist eine Verringerung des ATP-Bedarfs unablässig. In Extremfällen kann es dabei sogar zu einem Stillstand des Metabolismus kommen (Hochachka, 1986 b). Ein anaerober Stoffwechsel verursacht im Normalfall durch die Anreicherung von Lactat eine toxische Ansäuerung des Gewebes. Anoxietolerante Karpfenfische wie die Karausche und der Goldfisch verhindern diese Acidose durch eine modifizierte Glykolyse (Shoubridge & Hochachka, 1980; 1981; van den Thillart et al., 1982; Holopainen et al., 1986; Lutz et al., 2003). Bei einigen Fisch-Spezies konnte gezeigt werden, dass größere Individuen eine stärkere Hypoxietoleranz besitzen als kleinere Fische (Almeida-Val et al., 2000; Foss et al., 2002), was vermutlich auf einen geringeren massespezifischen Stoffwechsel zurückzuführen ist (Almeida-Val et al., 2000). Ebenso erleichtern größere Glykogenreserven in größeren Fischen (Sloman et al., 2006) die Energieproduktion durch anaerobe Stoffwechselwege. Besonders deutlich wird dies bei den Karpfenfischen, die im Verhältnis zur Körpergröße die größten Glykogenreserven aller bisher untersuchten Fische aufweisen (Nilsson & Renshaw, 2004). Die Karausche ist das am besten erforschte hypoxietolerante Wirbeltier und kann monatelang unter hypoxischen Bedingungen bei geringer Temperatur und einige Tage unter Anoxie bei Raumtemperatur überleben (Nilsson & Renshaw, 2004).

Seit einigen Jahren werden die Kenntnisse der phänotypischen und verhaltensbasierten Anpassungen an Sauerstoffmangel zunehmend durch molekulare Analysen ergänzt. Hypoxie bewirkt zahlreiche Veränderungen der Genexpression in Fischen (Gracey et al., 2001; Ton et al., 2003; Nikinmaa & Rees, 2005; van der Meer et al., 2005), die helfen, Sauerstoff zu sparen, und somit dem Fisch eine bessere Überlebenschance bei geringen Sauerstoffkonzentrationen ermöglichen. Unter Sauerstoffmangel kommt es aufgrund der Aktivierung anaerober Stoffwechselwege zu einer verstärkten Expression von Genen, die an

der anaeroben Energiegewinnung beteiligt sind (Gracey et al., 2001; Ton et al., 2003; van der Meer et al., 2005). In verschiedenen Microarray-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei *Gillichthys mirabilis* ebenso wie bei adulten und embryonalen Zebrafischen die mRNA von Enzymen der Glykolyse unter Hypoxie vermehrt gebildet wird (Gracey et al., 2001; Ton et al., 2003; van der Meer et al., 2005). Ebenso war auf molekularer Ebene eine Hochregulation der Gluconeogenese-Enzyme zu beobachten (Gracey et al., 2001). Hierdurch lässt sich auch unter Sauerstoffmangel, der häufig mit Nahrungsmangel assoziiert ist, der zur Versorgung des Gehirns zwingend erforderliche Blut-Glucose-Wert aufrechterhalten. Des Weiteren erfolgt bei Sauerstoffmangel eine reduzierte Genexpression von Enzymen, die für die sauerstoffabhängige Energieproduktion (Citratzyklus, mitochondriale Atmungskette) benötigt werden (Ton et al., 2003; van der Meer et al., 2005).

Neben der Regulation der energieliefernden Prozesse konnte eine Abnahme der Genexpression von Enzymen energieverbrauchender Schritte beobachtet werden. Die Proteinbiosynthese benötigt 20-30% des aerob produzierten ATPs (Bickler & Buck, 2007). Aus diesem Grund ist die Proteinsynthese einer der Prozesse, der in hypoxischen oder anoxischen Geweben sehr früh eingestellt wird (Hochachka et al., 1996). Diese Regulation tritt allerdings nur in hypoxietoleranten Spezies wie dem Goldfisch auf, während es bei hypoxieintoleranten Spezies bei Sauerstoffmangel häufig zu einer Hochregulation der Proteinsynthese kommt. Ionenpumpen wie die Na^+/K^+ -ATPase verbrauchen bis zu 30% der ATP-Produktion zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials (Bickler & Buck, 2007). Die Plasmamembran von anoxietoleranten Organismen besitzt im Vergleich zu Säugetieren eine bis zu 5-fach geringere Permeabilität für Na^+ - und K^+ -Ionen (Hochachka, 1986 a, b; Else & Hulbert, 1987), die unter Sauerstoffmangel weiter abnimmt (Buck & Hochachka, 1993). Eine Reduktion des ATP-Verbrauchs durch Verschluss der Ionenkanäle ist eine weitere Anpassung an Sauerstoffmangel (Hochachka, 1986 a). In Zebrafischen konnte tatsächlich neben der Abnahme der Proteinbiosynthese auch eine Verringerung der Genexpression von ATPasen beobachtet werden (Ton et al., 2003).

3 Karpfenfische

3.1 Zebrabärbling (*Danio rerio*)

Der Zebrabärbling *Danio rerio* ist aufgrund seiner kurzen Generationszeit, der leichten Haltung und Zucht sowie der durchsichtigen Embryonen ein Modellorganismus der Molekular- und Entwicklungsbiologie (Haffter & Nüsslein-Volhard, 1996; Dooley & Zon, 2000; Wixon, 2000; Briggs, 2002). Zebrabärblinge besiedeln sowohl schnell und langsam fließende Gewässer als auch stehende Wasserbereiche (Talwar & Jhingran, 1991). Da ihr warmer tropischer Lebensraum (zum Beispiel in Indien, Bangladesch, Pakistan und Nepal) natürlichen Schwankungen des Sauerstoffgehalts unterworfen sein kann, haben Zebrabärblinge die Fähigkeit entwickelt, sowohl als adultes Tier (Rees et al., 2001; van der Meer et al., 2005) als auch während der Embryonalentwicklung (Padilla & Roth, 2001; Pelster, 2002; Ton et al., 2003) hypoxische Phasen zu überleben. Die Larven von Fischen sind häufig niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt, da sie hypoxische Zonen nicht meiden können. Bei Sauerstoffmangel kommt es beim Zebrabärbling zu einer verlangsamten oder im Extremfall sogar eingestellten Entwicklung (Padilla & Roth, 2001; Pelster, 2002; Ton et al., 2003). Des Weiteren zeigt der Zebrabärbling diverse molekulare und biochemische Anpassungen an Hypoxie, wie sie auch bei anderen Fischen beschrieben wurden (siehe 2). So wurde gezeigt, dass die Aktivität des Fisches bei Sauerstoffmangel stark abnimmt (Rees et al., 2001), ebenso konnte eine vergrößerte Kiemenoberfläche und eine verstärkte Ventilation beobachtet werden (van der Meer et al., 2005). Zudem kommt es zu einer gesteigerten Expression von Genen des anaeroben Metabolismus und teilweise zu einer Verringerung der Proteinsynthese (Rees et al., 2001, Bosworth et al., 2005; van der Meer et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine Adaptation an niedrige, nicht letale Sauerstoffkonzentrationen ($pO_2 = 15$ Torr; Normoxie $pO_2 \sim 140$ Torr) die Überlebensrate adulter Zebrabärblinge bei starker Hypoxie ($pO_2 = 8$ Torr) deutlich erhöht (Rees et al., 2001). Die Steigerung war bei männlichen Tieren wesentlich stärker ausgeprägt als bei weiblichen. Scheinbar sind männliche Tiere leichter dazu in der Lage, ihre Stoffwechselrate zu reduzieren, als es weiblichen Tieren aufgrund des hohen Energiebedarfs des Ovariengewebes möglich ist. Diese Vermutung wird gestützt von Untersuchungen, die gezeigt haben, dass ein lang andauernder Sauerstoffmangel während der Entwicklung von Zebrabärblingen ein verstärktes Auftreten von männlichen Individuen bewirkt (Shang et al., 2006). Während in den ersten Tagen die Gonaden Ovarien ähneln, kommt es innerhalb des ersten Monats zur Ausbildung des Geschlechts. Enzyme, die für die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen benötigt werden, sind in hypoxischen Embryonen in wesentlich geringeren Konzentrationen vorhanden, so dass es zu relativ höheren Testosteronwerten

und damit mehr männlichen Tieren kommt. Eine größere männliche Population (75% statt 60%) bedeutet einen geringeren Fortpflanzungserfolg, somit hat Sauerstoffmangel im Gewässer einen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der Fischpopulation.

3.2 Goldfisch (*Carassius auratus*)

Während der Zebraabürbling erst seit einigen Jahren als Modellorganismus zur Untersuchung der Hypoxietoleranz dient, ist die Fähigkeit von Spezies der Gattung *Carassius*, lange Zeit in Gewässern mit niedrigem Sauerstoffgehalt zu überleben, schon lange bekannt (Blazka, 1958; van den Thillart et al., 1976; van den Thillart, 1977; Walker & Johansen, 1977; Holopainen et al., 1986; van Waarde et al., 1990). Der Goldfisch *C. auratus* ist eine Zuchtform der Karausche *Carassius carassius*, die bevorzugt in stehenden Gewässern von Europa bis Nordasien beheimatet ist. Der Lebensraum von *C. carassius* ist besonders im Winter von geringen Sauerstoffkonzentrationen geprägt, wenn eine Eis- und Schneedecke die Diffusion von Luft in das Wasser verhindert. Beide *Carassius*-Spezies sind aus diesem Grund in der Lage, unter anoxischen Bedingungen zu überleben. Bei einer Temperatur von 20°C kann der Goldfisch für 16 Stunden anoxische Bedingungen überstehen (van den Thillart, 1977), bei niedrigeren Temperaturen von 5°C verlängert sich die Zeitspanne sowohl beim Goldfisch als auch bei der Wildform, der Karausche, auf mehrere Wochen oder Monate (Walker & Johansen, 1977; van den Thillart et al., 1983; Holopainen et al., 1986, Smith et al., 1996). Eine hohe Effizienz der Sauerstoffaufnahme durch die Kiemen bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, eine Verringerung des Energiebedarfs bei Sauerstoffmangel sowie ein modifizierter anaerober Stoffwechsel mit den Endprodukten Ethanol, Kohlendioxid und Ammoniak ermöglichen dem Goldfisch eine gute Anpassung an Sauerstoffmangel (van den Thillart & Kesbeke, 1978; Shoubridge & Hochachka, 1980; van Waarde, 1983; 1988; van Waversfeld et al., 1989 a, b). Im Ruhezustand wird bei einer zehnstündigen Anoxie bei 20°C lediglich ein Drittel des Energiebedarfs durch Glykolyse, Hydrolyse von ATP und Kreatinphosphat, sowie durch das Aufbrauchen von vorhandenen Sauerstoffreserven gedeckt (van den Thillart et al., 1976). Ein Großteil der benötigten Energie wird durch die anaerobe Umsetzung von Glykogen und Proteinen und der weiteren Umsetzung der entstandenen Stoffwechselprodukte zu Ethanol und Kohlendioxid geliefert (van den Thillart et al., 1982; van Waarde et al., 1982), allerdings beginnt dieser Prozess erst nach ungefähr vier Stunden Sauerstoffmangel. Vor Beginn der Ethanolproduktion kommt es zur Ansammlung von Lactat (van den Thillart et al., 1976) und Alanin (van Waarde et al., 1982), deren Konzentrationen jeweils ein konstantes Niveau erreichen, bevor der energieaufwändige ethanolproduzierende Stoffwechselweg aktiviert wird (van den Thillart et al., 1976; van Waarde et al., 1982, Holopainen et al., 1986). Karpflinge wie der Goldfisch und die Karausche sind die einzigen Wirbeltiere, die unter Sauerstoffmangel eine modifizierte Glykolyse mit dem Endprodukt Ethanol anstelle von Lactat betreiben (Shoubridge &

Hochachka, 1980; van Waarde et al., 1991). Sie verhindern hierdurch eine durch die Ansammlung von anaerob gebildetem Lactat auftretende toxische Acidose (van Waarde et al., 1990). Während andere Vertebraten wie die Schildkröten der Gattungen *Trachemys* und *Chrysemys* bei Sauerstoffmangel in einen komatösen Zustand verfallen (Lutz & Nilsson, 1997), gelingt es der Karausche, einen konstanten ATP-Spiegel aufrecht zu erhalten, der ihr erlaubt, auch bei starkem Sauerstoffmangel aktiv zu bleiben (Nilsson et al., 1993; Nilsson, 2001). Ein erhöhter cerebraler Blutfluss erleichtert hierbei die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen (Nilsson, 2001; Nilsson & Renshaw, 2004). Die Deaktivierung der Sehkraft bei Sauerstoffmangel (Nilsson & Renshaw, 2004) ist eine weitere Anpassung, die hilft, Energie zu sparen, da die Retina des Wirbeltierauges eines der stoffwechselaktivsten Gewebe ist (Anderson, 1968). Zudem konnte unter Hypoxie bei der Karausche eine deutliche Zunahme der Kiemenoberfläche nachgewiesen werden, wodurch eine verbesserte Sauerstoffaufnahme erzielt wird (Sollid et al., 2003, 2005).

4 Respiratorische Proteine

Die verschiedenen Tiergruppen haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um die Sauerstoffversorgung ihrer Zellen zu gewährleisten. An den respiratorischen Epithelien erfolgt die Aufnahme des Sauerstoffs durch Diffusion. Dies jedoch ist ein langsamer Vorgang, der nur zur Versorgung derjenigen Zellen geeignet ist, die im direkten Kontakt mit dem respiratorischen Organ stehen. Größere Tiere benötigen ein Kreislaufsystem, um alle Zellen des Organismus effektiv mit Sauerstoff zu versorgen. Zirkulierende Körperflüssigkeiten fungieren dabei unter anderem als Transportmedium für Sauerstoff. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in Flüssigkeiten beträgt der Anteil des physikalisch gelösten Sauerstoffs im Blut lediglich 0,3 Volumenprozent (Vol%) (Schmidt & Thews, 1997). Durch die Bindung an respiratorische Proteine kann die Sauerstoffkonzentration im Blut auf bis zu 20 Vol% erhöht werden (Schmidt & Thews, 1997).

Im Laufe der Evolution entwickelten sich drei Gruppen von respiratorischen Proteinen, die mit Hilfe von Metallionen Sauerstoff reversibel binden: Globine, Hämerythrine und Hämocyanine. Während in den Hämerythrinen (Fe^{2+}) und den Hämocyaninen (Cu^+) das Metallion direkt an die Proteinkette gebunden wird (Garbett et al., 1971; van Holde & Miller, 1995), besitzen die Globine eine prosthetische Gruppe, das Häm (Abb. A 1 A), in dem das Fe^{2+} -Ion koordinativ in einem Porphyrinring gebunden ist (Perutz, 1979). Globine sind im Tierreich weit verbreitet und können sowohl intrazellulär in Blutzellen (zum Beispiel bei Vertebraten) als auch extrazellulär (zum Beispiel das Chlorocruorin der Anneliden) vorliegen (Hardison, 1996; Weber & Vinogradov, 2001). Hämerythrine sind bei einigen marinen Anneliden und verschiedenen kleinen Tierstämmen zu finden (Klippenstein, 1980). Die

Hämocyanine der Arthropoden und Mollusken unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich und kommen als große extrazelluläre Aggregate vor (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 1995).

5 Globine

Globine sind die im Organismenreich am weitesten verbreiteten respiratorischen Proteine; sie kommen nicht nur bei Tieren, sondern auch bei Archaeobakterien, Eubakterien, Protisten, Pilzen und Pflanzen vor, und erreichen eine enorme Vielfalt bezüglich ihrer Struktur und ihrer Funktionalität (Hardison, 1996; Weber & Vinogradov, 2001; Freitas et al., 2004). Wahrscheinlich haben sich alle Globine aus einem Vorläuferprotein entwickelt, welches bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren vor 1,8 Milliarden Jahren vorhanden war (Hardison, 1996; Freitas et al., 2004).

Globine sind kleine, globuläre Proteine, die typischerweise aus 140-150 Aminosäuren aufgebaut sind. Die acht α -Helices (A-H) bilden eine drei-über-drei α -helikale Sandwichstruktur aus, die charakteristisch für Vertreter der Proteinsuperfamilie der Globine ist (Kendrew, 1963; Perutz, 1979; Bolognesi et al., 1997; Abb. A 1 B). Die prosthetische Gruppe der Globine, das Häm, wird durch verschiedene Aminosäurereste der Peptidkette in einer hydrophoben Tasche des Proteins fixiert. Diese Aminosäuren sind bei fast allen untersuchten Globinen identisch und haben einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur und die Funktionalität des Proteins. Das proximale Histidin F8 (achte Aminosäure der F-Helix) bindet an die fünfte Koordinationsstelle des Eisenions im Häm (Abb. A 1 B). Die Aminosäuren Histidin E7, Phenylalanin CD1 und Leucin F4 stabilisieren das Häm in der Proteinkette und beeinflussen somit das sauerstoffbindende Zentrum. Globine können neben Sauerstoff auch andere gasförmige Liganden (CO, NO) reversibel binden. Während die Globine für ihre Fähigkeit bekannt sind, Sauerstoff zu transportieren und zu speichern (Dickerson & Geis, 1983; Wittenberg & Wittenberg, 2003) und so den oxidativen Stoffwechsel der Zellen aufrechterhalten, wurden in den letzten Jahren auch andere Funktionen der Globine entdeckt (Gardner et al., 1998; Sowa et al., 1998; Minning et al., 1999; Flögel et al., 2001).

Die Globine der Invertebraten zeichnen sich durch eine große strukturelle Diversität aus. Neben intrazellulären und extrazellulären monomeren Globinen gibt es intrazelluläre multi- und polymere Globine, "Multi-Subunit"-Hämoglobine, die aus mehreren Globinuntereinheiten zusammengesetzt sind, und so genannte "Multi-Domänen"-Globine, die aus mehreren dieser Globinketten bestehen (Vinogradov et al., 1970; Weber & Vinogradov, 2001). Die Familie der Vertebratenglobine besteht aus mindestens vier Mitgliedern. Schon lange bekannt und demzufolge gut untersucht sind das Hämoglobin in Blutzellen und das Myoglobin in

Muskelzellen. Vor einiger Zeit konnten zwei weitere Vertreter der Vertebratenglobine identifiziert werden: Neuroglobin, welches hauptsächlich in neuronalem Gewebe lokalisiert ist (Burmester et al., 2000) und Cytoglobin, welches in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird (Burmester et al., 2002). Alle vier Globine unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Struktur, ihres Vorkommens und ihrer biophysikalischen Eigenschaften. Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit den Globinen der Wirbeltiere.

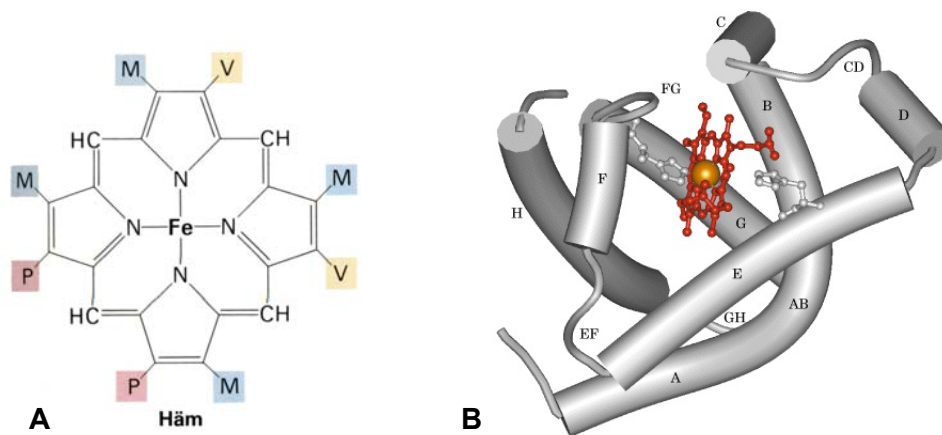


Abb. A 1: Struktur von Myoglobin und seiner prosthetischen Gruppe

A: Struktur der prosthetischen Hämgruppe der Globine. Das Häm besteht aus einem Protoporphyrinring mit einem zentralen Eisen(II)ion. M = Methyl-, P = Propyl-, V = Vinylrest (nach Stryer, 1997). B: Räumliche Struktur von Myoglobin. Die acht α -helikalen Bereiche sind mit A-H gekennzeichnet. Deutlich zu erkennen ist die Ausbildung der globintypischen Sandwichstruktur der Helices AEF und BGH. Die rot eingezeichnete Hämgruppe wird durch das proximale Histidin fixiert (http://www.cm.utexas.edu/academic/courses/Spring2002/CH339K/Robertus/overheads-1/ch7_myoglobin.jpg).

5.1 Myoglobin

Myoglobin ist das erste Globin, dessen dreidimensionale Struktur durch Röntgenkristallographie aufgeklärt wurde (Kendrew, 1963). Humanes Myoglobin besteht aus 153 Aminosäuren, die ein monomeres Protein mit einer molekularen Masse von ca. 17 kDa bilden. Die acht α -Helices A bis H formen dabei die globintypische α -helikale Sandwichstruktur. Das Innere des Moleküls wird hauptsächlich von unpolaren Aminosäureresten gebildet, lediglich das Histidin F8 fixiert die Hämgruppe direkt in der hydrophoben Tasche des Proteins. Myoglobin ist hauptsächlich im Skelett- und im Herzmuskel zu finden und dient dort als temporärer Sauerstoffspeicher, der die Sauerstoffversorgung der Mitochondrien aufrecht erhält (Wittenberg, 1992; Wittenberg & Wittenberg, 2003). Zudem erleichtert es die intrazelluläre Diffusion des Sauerstoffs (Wittenberg & Wittenberg, 2003). Des Weiteren kann Myoglobin durch die Bindung oder Freisetzung von Sauerstoff schwankende Sauerstoffkonzentrationen im Muskelgewebe ausgleichen (Ordway & Garry, 2004). Zudem wurde eine Beteiligung von Myoglobin an der

Detoxifikation von NO beschrieben, indem es als NO-Dioxygenase fungiert und NO zu Nitrat oxidiert (Flögel et al., 2001; Wittenberg & Wittenberg, 2003). Die Sauerstoffaffinität des Myoglobins ist mit einem Halbsättigungsgrad von $P_{50} = 1$ Torr deutlich höher als die des Hämoglobins und erleichtert so die Aufnahme von Sauerstoff aus dem Blut. Eine hohe Lactatkonzentration, wie sie unter anaeroben Bedingungen im Muskelgewebe vorliegt, verringert die Sauerstoffaffinität des Myoglobins und sorgt so für eine erleichterte Freisetzung des Sauerstoffs unter hypoxischen Bedingungen (Giardina et al., 1996).

5.2 Hämoglobin

Hämoglobin ist ein tetrameres Globin, das aus zwei α - und zwei β -Ketten aufgebaut ist, die jeweils aus 141 beziehungsweise 146 Aminosäuren bestehen. Das gesamte Hämoglobinmolekül hat somit eine molekulare Masse von ca. 64 kDa. Das Hämoglobin der Vertebraten ist in Erythrocyten lokalisiert und transportiert Sauerstoff von den respiratorischen Epithelien zu den inneren Organen (Dickerson & Geis, 1983). Hämoglobin konnte bisher nahezu in allen Wirbeltieren nachgewiesen werden, lediglich einige Arten der Eisfische besitzen kein Hämoglobin (Ruud, 1954; Sidell et al., 1997). Die Sauerstoffaffinität des nativen humanen Hämoglobins beträgt $P_{50} = 26$ Torr (McCarthy, 1943). Die im Vergleich zu Myoglobin deutlich geringere Sauerstoffaffinität des Hämoglobins kommt durch die Wechselwirkung mit 2,3-Bisphosphoglycerat (BPG) zustande. Bisphosphoglycerat bindet im Zentrum des Hämoglobintetramers und stabilisiert durch Quervernetzung der β -Untereinheiten die Quartärstruktur des deoxy-Hämoglobins (Berg et al., 2003). Hierdurch muss für die Bindung von Sauerstoff mehr Energie aufgewandt werden als bei Myoglobin. Hämoglobin und Myoglobin unterscheiden sich weiterhin durch den Verlauf ihrer Sauerstoffbindungskurven. Während der hyperbolische Verlauf bei Myoglobin zeigt, dass die Sauerstoffaffinität lediglich vom Sauerstoffpartialdruck im Gewebe abhängig ist, lässt sich aus dem sigmoidalen Verlauf der Sauerstoffbindungskurve bei Hämoglobin folgern, dass zusätzlich das Verhältnis von oxygenierten zu deoxygenierten Untereinheiten einen Einfluss auf die Bindung von Sauerstoff hat. Hämoglobin ist aufgrund seiner vier Untereinheiten ein allosterisches Protein. Die Bindung von einem Molekül Sauerstoff an eine Untereinheit erleichtert die Aufnahme weiterer Sauerstoffmoleküle durch die anderen Untereinheiten. Diese Kooperativität der Untereinheiten wird auch bei der Abgabe von Sauerstoff beobachtet. Die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins ist abhängig vom pH-Wert und von der CO_2 -Konzentration im Blut. In stoffwechselaktiven Geweben liegen eine hohe CO_2 -Konzentration sowie ein niedriger pH-Wert vor. Unter diesen Bedingungen sinkt die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins und eine Abgabe des gebundenen Sauerstoffs an das Gewebe wird erleichtert (Bohr-Effekt).

5.3 Neuroglobin

Neuroglobin konnte vor einigen Jahren als drittes Vertebratenglobin in cDNA-Sequenzen aus humanen und murinen Hirngewebe identifiziert werden (Burmester et al., 2000). Im Laufe der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass sein Vorkommen nicht auf Säugetiere beschränkt ist. Neuroglobin-mRNA konnte in allen Wirbeltierklassen (Säuger, Fische, Amphibien, Reptilien und Vögeln) nachgewiesen werden (Burmester et al., 2000; Awenius et al., 2001; Kugelstadt et al., 2004; Fuchs et al., 2006; Milton et al., 2006), so dass vermutet werden kann, dass Neuroglobin in allen Vertebraten vorhanden ist. Die Neuroglobine der Säugetiere bestehen aus 151-160 Aminosäuren und bilden die typische drei-über-drei α -helikale Sandwichstruktur mit acht α -Helices aus (Burmester et al., 2000; Awenius et al., 2001; Reuss et al., 2002). Auf Aminosäureebene beträgt die Identität mit Myoglobinen und Hämoglobinen lediglich 20-25% (Burmester et al., 2000).

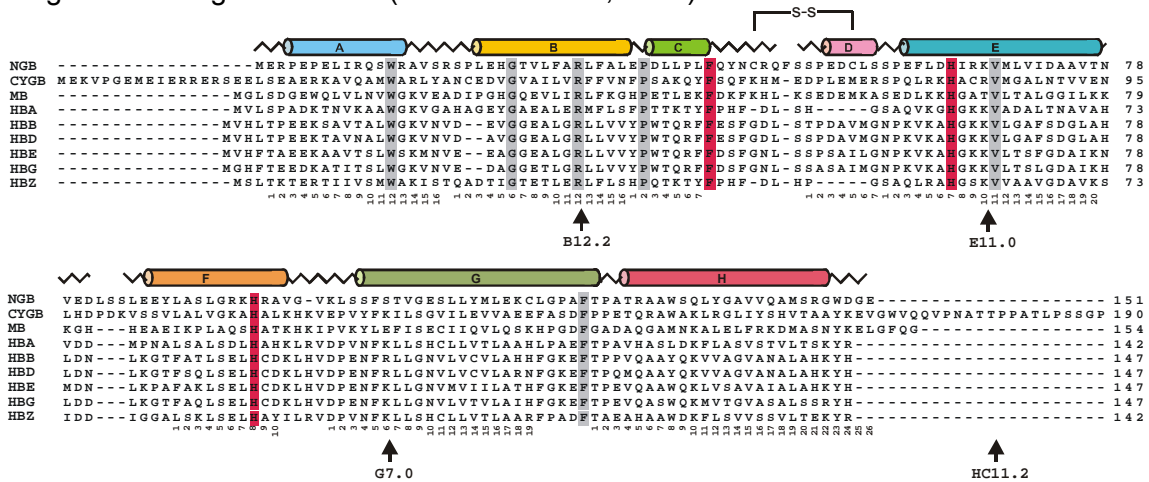


Abb. A 2: Aminosäurealignment von humanen Globinen

Dargestellt ist ein Vergleich der verschiedenen humanen Globinsequenzen. Ngb = Neuroglobin, Cygb = Cytoglobin, MB = Myoglobin, HBA, HBB, HBD, HBE, HBG, HBZ = Hämoglobin α , β , δ , ϵ , γ , ζ . Konservierte Aminosäuren sind grau, die Histidine E7 und F8 sowie das Phenylalanin CD1 rot eingefärbt. Die Intronpositionen sind durch Pfeile markiert. Die Sekundärstruktur von humanem Neuroglobin sowie die interne Disulfidbrücke sind angegeben (nach Burmester & Hankeln, 2004).

Während die meisten Globine der Vertebraten und Invertebraten zwei konservierte Introns an den Positionen B12.2 (zwischen der zweiten und dritten Base des 12. Codons der B-Helix) und G7.0 besitzen, weist das Gen der Neuroglobine ein zusätzliches Intron an Position E11.0 auf (Burmester et al., 2000, Awenius et al., 2001, Abb. A 2). Im Vergleich zu den Neuroglobinen der Säugetiere besitzen die Fisch-Neuroglobine noch ein zusätzliches Intron in der 5'-UTR (Awenius et al., 2001; Fuchs et al., 2004). Neuroglobin liegt in den meisten Spezies als "single-copy" Gen vor, lediglich in der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* konnten zwei für Neuroglobin kodierende Sequenzen identifiziert werden, die sich um 6 Aminosäuren unterscheiden (Rösner, 2003).

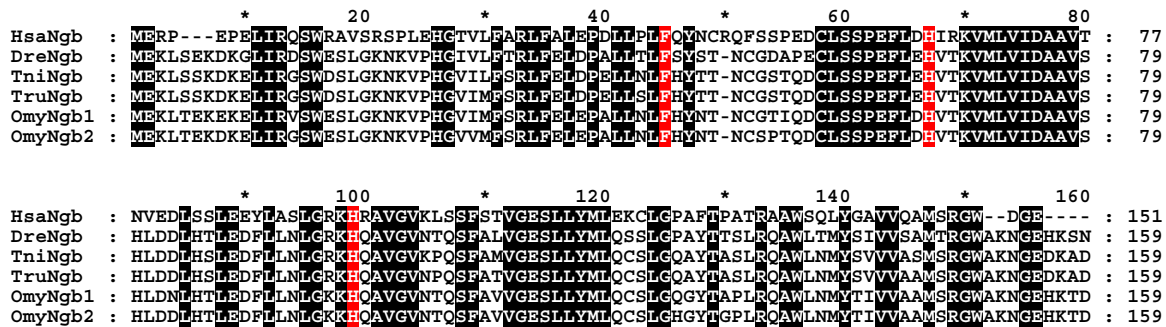


Abb. A 3: Aminosäurealignment der Neuroglobine

Vergleich der Neuroglobine (Ngb) verschiedener Fische mit humanem Neuroglobin. Konservierte Aminosäuren sind schwarz markiert, die zur Fixierung des Häms benötigten Aminosäuren sind rot unterlegt. Hsa = *Homo sapiens*, Dre = *Danio rerio*, Tni = *Tetraodon nigroviridis*, Fru = *Fugu rubripes*, Omy = *Oncorhynchus mykiss*.

Innerhalb der bekannten Neuroglobin-Sequenzen der verschiedenen Wirbeltierklassen sind 70 Aminosäuren hochkonserviert, dies entspricht bis zu 46% der Aminosäurepositionen. Zwischen humanem Neuroglobin und dem Neuroglobin der Fische beträgt die Identität auf Aminosäureebene bis zu 54%, während die bisher vollständig sequenzierten Fisch-Neuroglobine einen deutlich höheren Konservierungsgrad von über 80% besitzen (Abb. A 3). Die an der Häm- und Ligandbindung beteiligten Aminosäuren (proximales und distales Histidin F8 und E7, Phenylalanin B10, CD1 und G5, Tyrosin CD3, Valin E11, FG1 und FG3, Leucin F4) sind in allen Neuroglobin-Sequenzen unverändert zu finden (Pesce et al., 2003). Insertionen und Deletionen von Aminosäuren sind im Laufe der Neuroglobin-Evolution nur selten zu beobachten und beschränken sich hauptsächlich auf die N- und C-terminalen Bereiche sowie auf den flexiblen Bereich der C- und D-Helix (Burmester et al., 2004). Die Aminosäuresubstitutionsrate beträgt mit $0,4 \cdot 10^{-9}$ Substitutionen pro Position und Jahr lediglich ein Drittel der bei Hämoglobinen beobachteten Rate (Wystub et al., 2004; Roesner et al., 2005). Dies kommt hauptsächlich durch die Abnahme der nichtsynonymen Substitutionen während der Neuroglobin-Evolution zu Stande und ist ein Hinweis auf einen hohen negativen Selektionsdruck (Burmester et al., 2004). Innerhalb der Fisch-Neuroglobine beträgt die Substitutionsrate $0,9 \cdot 10^{-9}$ Aminosäuresubstitutionen pro Position und Jahr (Awenius et al., 2001; Fuchs et al., 2004).

Die hohe Übereinstimmung auf Aminosäureebene spiegelt sich auch in den nahezu identischen Bindungskinetiken der Neuroglobine von Mensch, Maus und Zebrafisch wider (Dewilde et al., 2001; Fuchs et al., 2004). Während in Hämoglobin und Myoglobin das zentrale Eisenion des Häms im deoxygenierten Zustand lediglich durch eine Bindung über das proximale Histidin F8 an die Proteinkette gebunden ist, fixiert im deoxy-Neuroglobin das distale Histidin E7 ebenfalls das Häm und bindet an die sechste Koordinationsstelle des Eisens (Burmester et al., 2000; Dewilde et al., 2001; Pesce et al., 2003). Eine

Hexakoordination des Eisens konnte bereits bei Globinen der Pflanzen, Bakterien und der Invertebraten gezeigt werden (Kundu et al., 2003), war allerdings vorher noch nicht bei Vertebraten beschrieben.

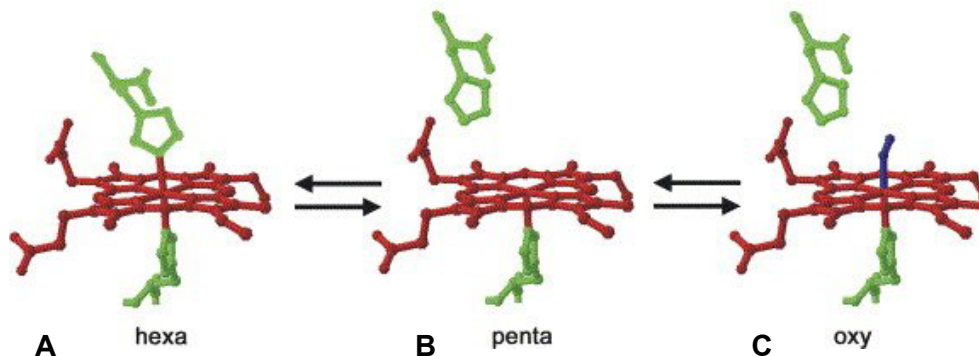


Abb. A 4: Koordination des Häms in penta- und hexakoordinierten Globinen

A: das von zwei Histidinen (oben His E7, unten His F8) fixierte hexakoordinierte Häm im deoxy-Neuroglobin und -Cytoglobin. B: pentakoordiniertes Häm im deoxygenierten Myoglobin. C: oxygeniertes Globin (nach Hankeln et al., 2005).

Aus der Hexakoordination im deoxy-Zustand resultiert für Neuroglobin eine komplexe biphasische Ligandenkinetik. Die Verdrängung des internen Liganden Histidin E7 stellt bei der Bindung von gasförmigen Liganden den limitierenden Faktor dar; nach diesem langsamen Schritt erfolgt die Bindung eines externen Liganden aufgrund der hohen Affinität des Eisenions schnell (Dewilde et al., 2001; Kundu et al., 2003; Pesce et al., 2005). Die Sauerstoffaffinität von Neuroglobin liegt im Bereich von $P_{50} = 1$ Torr (Burmester et al., 2000; Dewilde et al., 2001; Pesce et al., 2002; Fuchs et al., 2004) und ist damit vergleichbar mit der von Myoglobin.

Neuroglobin konnte auf mRNA- und Proteinebene im Cytoplasma von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems nachgewiesen werden (Burmester et al., 2000; Sun et al., 2001; Zhang et al., 2002; Reuss et al., 2002; Mammen et al., 2003; Geuens et al., 2003; Wystub et al., 2003; Fuchs et al., 2004; Laufs et al., 2004). Gewebe mit einem hohen Sauerstoffbedarf zeigen eine starke Expression von Neuroglobin (Burmester et al., 2000). Besonders deutlich wird dies im Hirn, welches zwar lediglich 2% der Masse des Körpers ausmacht, dafür jedoch 20% des eingeatmeten Sauerstoffs zur Energiegewinnung benötigt (Schmidt & Thews, 1997). Die Proteinkonzentration an Neuroglobin im gesamten Hirngewebe der Maus beträgt ca. $1 \mu\text{M}$. Weitere Neuroglobin-positive Signale konnten in endokrinen Geweben wie der Adenohypophyse, der Nebenniere, den Hoden und in den Langerhans'schen Zellen der Bauchspeicheldrüse detektiert werden (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002; Geuens et al., 2003). Diese Gewebe sind, ebenso wie Neuronen, sehr stoffwechselaktiv, ein Merkmal aller Neuroglobin exprimierenden Zellen. Ein Gewebe mit besonders hohem Sauerstoffbedarf ist die Retina (Netzhaut) des Wirbeltierauges (Anderson,

1968; Osborn et al., 2004). Aus diesem Grund ist nicht verwunderlich, dass die höchste Neuroglobin-Konzentration in der Retina der Maus beobachtet werden konnte (Schmidt et al., 2003). Die Neuroglobin-Konzentration beträgt hier ca. 100 μM , was vergleichbar ist mit der Konzentration von Myoglobin in einigen Skelettmuskelzellen. Subzelluläre Untersuchungen ergaben, dass die Lokalisation von Neuroglobin in der Retina von Wirbeltieren signifikant mit dem Auftreten von Mitochondrien korreliert ist (Bentmann et al., 2005). Im Zebrafisch *Danio rerio* ist Neuroglobin nicht nur im Hirngewebe und im Auge lokalisiert, sondern auch in den Chloridzellen der Kiemen, die während der Osmoregulation ebenfalls eine hohe Stoffwechselrate aufweisen (Fuchs et al., 2004).

Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Neuroglobin-Funktionen diskutiert (Burmester & Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005). Neuroglobin könnte ähnlich wie Myoglobin eine Funktion als Sauerstoffspeicher einnehmen, oder die Diffusion von Sauerstoff innerhalb der Zellen zu den Mitochondrien erleichtern (Wittenberg & Wittenberg, 2003; Abb. A 5 a). Ähnlich wie bei bakteriellen Globinen beobachtet, könnte Neuroglobin als Sauerstoffsensor dienen (Freitas et al., 2005; Abb. A 5 b). Eine Funktion als terminale Oxidase, die durch die Regeneration von NAD^+ die glykolytische ATP-Produktion unter Hypoxie gewährleistet, erscheint ebenso möglich (Abb. A 5 c). Dies konnte bereits bei Mäusen gezeigt werden (Sowa et al., 1998). Neuroglobin könnte des Weiteren an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS), die unter hypoxischen Bedingungen gebildet werden, beteiligt sein (Abb. A 5 d). Ebenso ist eine Funktion als Dioxygenase, die reaktive Stickstoffverbindungen (RNS) wie NO in unschädliches Nitrat umwandelt, vorstellbar (Abb. A 5 e), eine solche Funktion wurde bereits für Myoglobin im Herzmuskel beschrieben (Flögel et al., 2001). Ferner ist es denkbar, dass Neuroglobin andere cytoplasmatische Enzyme mit Sauerstoff versorgt, die diesen für verschiedene chemische Reaktionen benötigen (Abb. A 5 f). Die deutliche Korrelation zwischen der Neuroglobin-Expression und der Stoffwechselaktivität der Gewebe lässt eine sauerstoffspeichernde Funktion (Abb. A 5 a) am wahrscheinlichsten erscheinen (Burmester & Hankeln, 2004). Eine hohe Konzentration eines solchen Proteins erleichtert die Aufrechterhaltung eines aeroben Metabolismus in Zellen, die aufgrund einer hohen Stoffwechselrate einen gesteigerten Sauerstoffbedarf aufweisen.

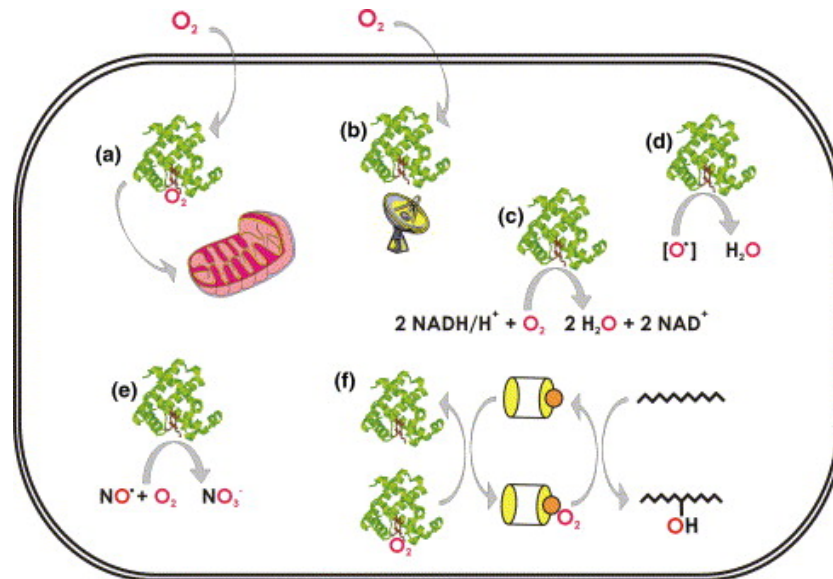


Abb. A 5: Mögliche Funktionen von Neuroglobin
(nach Hankeln et al., 2005).

Das Nervensystem von Wirbeltieren reagiert sehr empfindlich auf schwankende und niedrige Sauerstoffkonzentrationen, wie sie bei Schlaganfall oder cerebraler Ischämie auftreten. Durch die geringere Versorgung der Neuronen mit Sauerstoff kommt es unweigerlich zu einem Absterben von Zellen. Eine hohe Neuroglobin-Konzentration könnte die Schädigung neuronaler Gewebe bei Hypoxie verhindern oder verringern. Die in den letzten Jahren zahlreich durchgeführten Untersuchungen zur Veränderung der Neuroglobin-Expression unter Sauerstoffmangel bei Säugetieren kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während von einigen Arbeitsgruppen eine Zunahme der Neuroglobin mRNA-Expression nach Hypoxie im Hirn von Maus oder Ratte (Fordel et al., 2004; Hundahl et al., 2006 b; Li et al., 2006) beobachtet wurde, ergaben andere Untersuchungen keine Veränderung (Mammen et al., 2002) oder sogar eine Abnahme der Neuroglobin-Expression (Hankeln, persönliche Mitteilung).

5.4 Cytoglobin

Das vierte Mitglied der Vertebratenglobine wurde zeitgleich von drei verschiedenen Forschergruppen unabhängig voneinander identifiziert und benannt (Kawada et al., 2001; Burmester et al., 2002; Trent & Hargrove; 2002). Aufgrund der ubiquitären Expression des Proteins im Säugergewebe hat sich der Name Cytoglobin durchgesetzt (Burmester et al., 2002). Bisher sind Cytoglobin-Sequenzen nicht nur von Säugetieren, sondern auch vom Huhn und von einigen Fischen bekannt (Burmester et al., 2002; Kugelstadt et al., 2004; Fuchs et al., 2005). Cytoglobine sind mit 174 bis 190 Aminosäuren und einer berechneten

molekularen Masse von ungefähr 21 kDa aufgrund von N- und C-terminalen Verlängerungen deutlich größer als typische Vertreter der Globinfamilie (siehe Abb. A 2 und A 6). Die globintypischen Introns an den Positionen B12.2 und G7.0 sind in allen bekannten Cytoglobinen konserviert, zusätzlich besitzen die Säugetiere noch ein Intron an Position H11.2 (Burmester et al, 2002; 2004; siehe Abb. A 2). Die Verlängerungen resultieren aus einem zusätzlichen Exon am C-Terminus der Säugetier-Cytoglobine sowie vermutlich aus einer Verdopplung des 5'-kodierenden Bereichs am N-Terminus (Burmester et al., 2002). Den Cytoglobinen der Fische und des Huhns fehlt das zusätzliche Exon im 3'-Bereich, so dass sie etwas kürzer als die Cytoglobine der Säuger sind (Kugelstadt et al., 2004; Fuchs et al., 2005). Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass die Cytoglobine der Säugetiere mit einer geringen Aminosäuresubstitutionsrate von lediglich $0,3 \cdot 10^{-9}$ Aminosäuren pro Position und Jahr und einer Reduktion der nichtsynonymen Nukleotidaustausche noch stärker konserviert sind als die Neuroglobine (Burmester et al., 2002; Wystub et al., 2004). Die Evolutionsrate der Knochenfisch-Cytoglobine ist ungefähr doppelt so hoch wie die der Cytoglobine von Huhn und Säuger (de Sanctis et al., 2004; Kugelstadt et al., 2004; Fuchs et al., 2005). Im Vergleich zu anderen Globinen deutet sie aber dennoch auf eine konservative Evolution der Knochenfisch-Cytoglobine hin (Fuchs et al., 2005).

Während die Cytoglobine der Säugetiere und des Huhns als "single-copy" Gene vorliegen, besitzen die Knochenfische zwei paraloge Cytoglobin-Gene Cytoglobin 1 und Cytoglobin 2 (Fuchs et al., 2005). Ähnlich wie das orthologe Säuger-Cytoglobin werden beide Cytoglobine der Knochenfische in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wobei die Expression von Cytoglobin 2 in neuronalen Geweben 250-fach stärker ist als die von Cytoglobin 1, was eine mögliche Subfunktionalisierung der beiden Cytoglobine nach der Genduplikation vermuten lässt (Fuchs et al., 2005). Ein Vergleich der Genregion von humanem Cytoglobin auf Chromosom 17q25.3 mit den paralogenen Regionen der genomischen Sequenz des *T. nigroviridis* ergab, dass die beiden Kopien der Knochenfisch-Cytoglobine nicht aus einer einzelnen Genduplikation resultieren, sondern vielmehr das Resultat einer großflächigen genomischen Duplikation mit zahlreichen benachbarten Genen ist, die vermutlich vor 320-350 Millionen Jahren im Vorläufer der Strahlenflosser stattgefunden hat (Fuchs et al., 2005). Ein Vergleich der Fisch-Cytoglobine mit humanem Cytoglobin verdeutlicht die unterschiedliche Länge der verschiedenen Cytoglobine und zeigt, dass zwischen den verschiedenen Spezies zahlreiche Aminosäuren hochkonserviert sind (Abb. A 6).

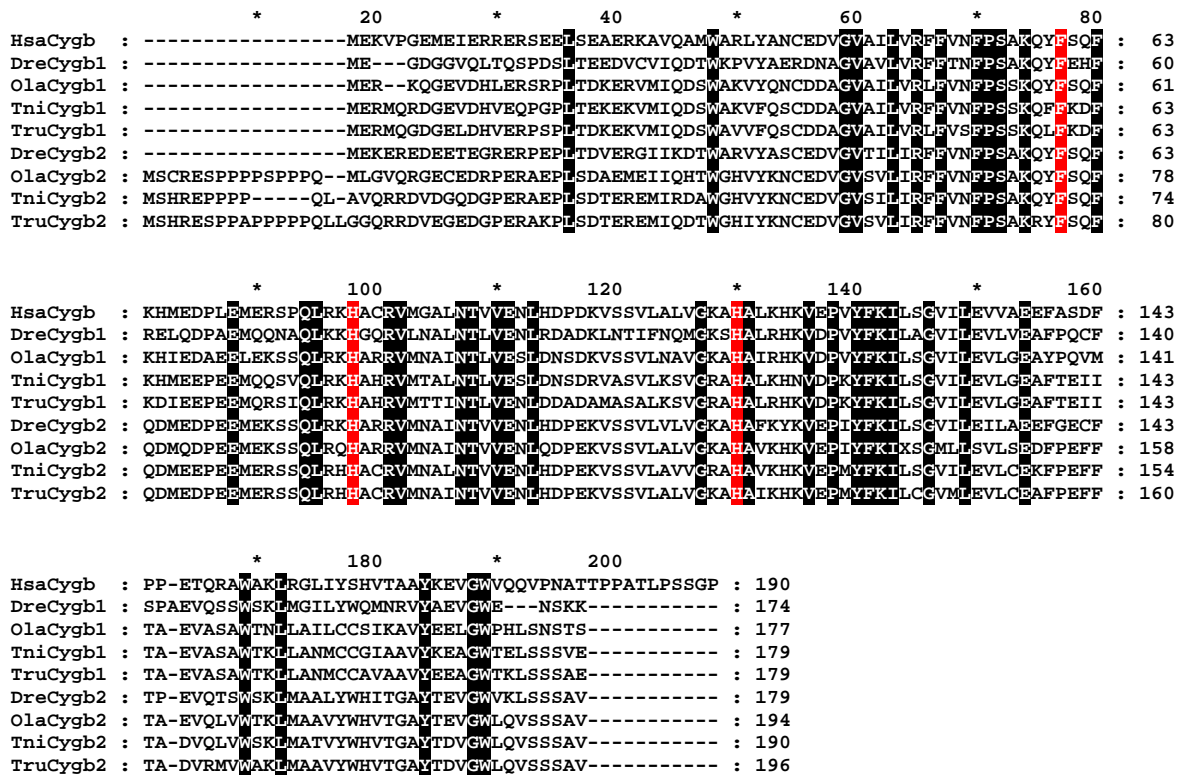


Abb. A 6: Aminosäurealignment der Cytoglobine

Vergleich der Cytoglobine (Cygb) verschiedener Fische mit humanem Cytoglobin. Konservierte Aminosäuren sind schwarz markiert, die zur Fixierung des Häms benötigten Aminosäuren sind rot unterlegt. Hsa = *Homo sapiens*, Dre = *Danio rerio*, Ola = *Oryzias latipes*, Tni = *Tetraodon nigroviridis*, Fru = *Fugu rubripes*.

Trotz der Verlängerungen im N- und C-terminalen Bereich bilden die Cytoglobine die globintypische Struktur mit acht α -Helices in einem drei-über-drei α -helikalem Sandwich aus (de Sanctis et al., 2004). Im Gegensatz zum monomeren Myoglobin und Neuroglobin liegt humanes Cytoglobin *in vitro* als stabiles Homodimer vor (Hamdane et al., 2003; de Sanctis et al., 2004). Cytoglobin ist wie Neuroglobin im deoxygenierten Zustand durch die Bindung des distalen Histidins E7 an die Hämgruppe hexakoordiniert (de Sanctis et al., 2004). Innerhalb der Cytoglobine sind neben dem proximalen Histidin F8 und dem distalen Histidin E7, die das Eisenion im Häm koordinieren, die zur Stabilisierung der Hämgruppe benötigten Aminosäuren Phenylalanin CD1 sowie Valin E11 und F4 hochkonserviert (Burmester et al., 2004). Die Bindungskinetiken von Cytoglobin werden geprägt von der langsamen Verdrängung des internen Histidin E7-Liganden, bevor ein externer gasförmiger Ligand an das Häm binden kann (Pesce et al., 2002; Kundu et al., 2003). Die Sauerstoffaffinität von Cytoglobin beträgt $P_{50} = 1$ Torr und ist damit vergleichbar mit der von Neuroglobin und Myoglobin (Trent & Hargrove, 2002; Hamdane et al., 2003).

Während zunächst von einer ubiquitären Expression von Cytoglobin ausgegangen wurde (Burmester et al., 2002), konnten in den letzten Jahren genauere Aussagen über die Lokalisation von Cytoglobin getroffen werden. Cytoglobin wird cytoplasmatisch in Fibroblasten und nah verwandten Zelltypen des Bindegewebes und in Eingeweideorganen exprimiert (Schmidt et al., 2004; Nakatani et al., 2004). Des Weiteren konnte Cytoglobin in Osteoblasten und Chondroblasten, nicht jedoch in ausgereiften Osteocyten und Chondrocyten detektiert werden (Schmidt et al., 2004). Cytoglobin ist damit häufig in Zellen lokalisiert, die an der Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix in Eingeweiden beteiligt sind. Außerdem konnte in einigen neuronalen Zellen des zentralen und des peripheren Nervensystems, inklusive der Retina, eine cytoplasmatische und nukleäre Expression von Cytoglobin nachgewiesen werden (Hankeln et al., 2004; Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004; 2005).

Cytoglobin könnte verschiedene gewebespezifische Funktionen einnehmen. Eine Beteiligung an der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen erscheint ebenso möglich wie das Bereitstellen von Sauerstoff für enzymatische Reaktionen (Hankeln et al., 2004). Eine Überexpression von Cytoglobin steigert die Kollagensynthese (Nakatani et al., 2004), möglicherweise stellt Cytoglobin hierbei der Prolylhydroxylase Sauerstoff zur Verfügung (Hankeln et al., 2005). Untersuchungen zur Veränderungen der Cytoglobin-Expression unter hypoxischen Bedingungen ergaben jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Während von Schmidt et al. (2004) und Fordel et al. (2007) eine deutliche Zunahme der Cytoglobin-mRNA in verschiedenen Geweben (Leber, Herz, Muskel und Auge) von Maus und Ratte nach Hypoxie beschrieben wurde, konnten Li et al. (2006) eine unveränderte Cytoglobin-Expression im Hirn von Ratten nach Sauerstoffmangel beobachten. Offensichtlich erfolgt die Regulation von Cytoglobin gewebespezifisch.

5.5 Evolution der Globine

Aufgrund der großen Anzahl an bekannten Globinsequenzen bietet sich diese Proteinfamilie zur Untersuchung der Evolution von Genen und Spezies gleichermaßen an (Graur & Li, 2000). Anhand von phylogenetischen Untersuchungen der vier bekannten Globine der Vertebraten konnte gezeigt werden, dass vor ungefähr einer Milliarde Jahren ein Vorläuferglobin existiert haben könnte, von dem sich alle heutigen Globine der vielzelligen Tiere (Metazoa) ableiten lassen (Burmester et al., 2002; Abb. A 7). Neuroglobin bildet zusammen mit den Nervenglobinen einiger Invertebraten im Stammbaum der Globine einen ursprünglichen Ast, der sich bereits vor der Trennung der Protostomia und Deuterostomia vor mehr als 600 Millionen Jahren von den anderen Globinen abgespalten hat (Burmester et al., 2000). Innerhalb des anderen Astes entstanden vor ca. 500 bis 600 Millionen Jahren zunächst das Hämoglobin sowie ein zelluläres Globin (Goodman et al., 1988), aus dem

durch Genduplikation vor ca. 450 Millionen Jahren, und somit bevor die Chondrichthyes (Knorpelfische) und die kiefertragenden Wirbeltiere (Gnathostomata) divergierten, die Myoglobine und Cytoglobine entstanden (Burmester et al., 2002).

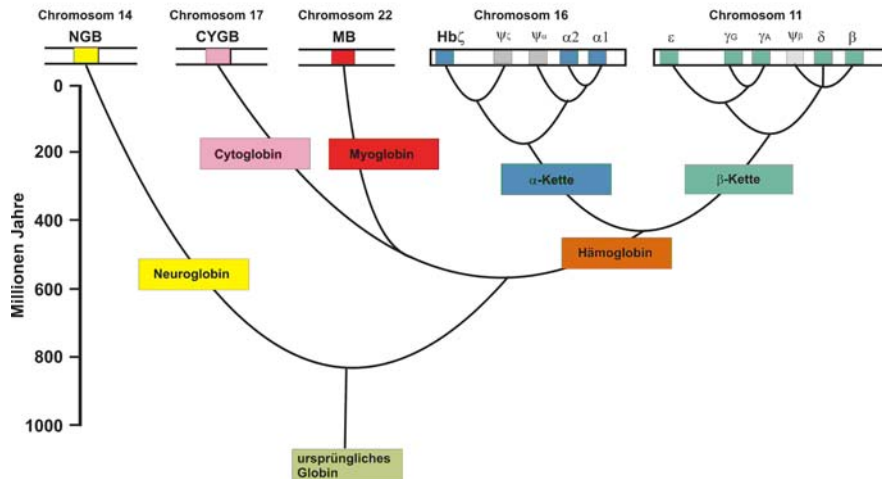


Abb. A 7: Evolution der Globingene des Menschen
(verändert nach Burmester et al., 2002).

6 Zielsetzung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Diversität der Fischglobine durchgeführt. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Identifizierung neuer Globintypen.

Während die meisten Säugetiere aufgrund der konstanten Sauerstoffkonzentration der Atmosphäre nicht an wechselnde Sauerstoffpartialdrücke angepasst sind, ist der Lebensraum von Fischen natürlichen Schwankungen des Sauerstoffgehalts unterworfen. Aus diesem Grund haben Fische verschiedene Anpassungen entwickelt, um in Zeiten des Sauerstoffmangels zu überleben. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, wie sich niedrige Sauerstoffkonzentrationen auf die Expression der Globine auswirken.

B Material und Methoden

1 Tiere

1.1 *Danio rerio* (Zebrafisch)

Die für allgemeine Untersuchungen verwendeten Zebrafische entstammten der eigenen Zucht und wurden bei 26°C gehalten. Adulte Zebrafische, die für die Hypoxieexperimente eingesetzt wurden, stammten aus Aquarienfachgeschäften (Juma Aquaristik und Hornbach, Mainz). Diese Zebrafische wurden durch langsames Reduzieren der Wassertemperatur (1°C pro Tag) an eine Temperatur von 21-22°C akklimatisiert. Hierzu wurde ein Thermofilter (Ekip 350, Hydor, Bassano del Grappa, Italien) verwendet. Beide Gruppen wurden in einem Licht / Dunkel Zyklus von 14 h / 10 h gehalten und mit TetraMin Trockenfutter (Tetra, Melle) gefüttert. Zur besseren Sauerstoffversorgung wurde das Aktivkohle-gefilterte Wasser mit gefilterter Luft begast. Durch regelmäßige Wasserwechsel wurde die Wasserqualität konstant gehalten.



Abb. B 1: *Danio rerio* (Zebrafisch)
(Quelle: <http://www.JensRoesner.de>).

1.2 *Carassius auratus* (Goldfisch)

Die Goldfische für die Hypoxieexperimente wurden bei Juma Aquaristik in Mainz gekauft und in 100 l Aquarien bei 20°C und einem Licht / Dunkel Zyklus von 14 h / 10 h gehalten. Das Wasser wurde mit Thermofiltern (Ekip 350, Hydor, Stadt) temperiert und gefiltert, sowie mit gefilterter Luft begast. Die Wasserqualität wurde wöchentlich überprüft (Multi Check, Amtra, Rodgau) und es wurden regelmäßig Teilwasserwechsel durchgeführt.

Bei allen anderen Untersuchungen wurden Goldfische aus eigener Zucht verwendet. Die Zuchttiere wurden 2002 im Zoopalast (Wiesbaden) gekauft und seitdem artgerecht in einem großen Wasserbecken im Botanischen Garten der Universität Mainz gehalten.



Abb. B 2: *Carassius auratus* (Goldfisch)
(Quelle: <http://www.JensRoesner.de>).

1.3 *Tetraodon nigroviridis* (Grüner Kugelfisch)

Der Grüne Kugelfisch ist in tropischen Brackgewässern in Asien (Indonesien, Malaysia, Philippinen, Sri Lanka) heimisch. Er kommt dort im Bereich der Mangrovenwälder vor und verträgt verschiedene Salzkonzentrationen von Süßwasser bis Meerwasser. Die verwendeten Kugelfische stammten aus dem Aquarienfachhandel (Zoopalast, Wiesbaden) und wurden in Brackwasser bei 26°C mit einem Licht / Dunkel Zyklus von 14 h / 10 h gehalten. Die Fütterung erfolgte mit kleinen Posthornschncken und mit getrockneten Bachflohkrebsen.



Abb. B 3: *Tetraodon nigroviridis* (Grüner Kugelfisch)
(eigene Aufnahme).

1.4 Systematik der Fische

(nach den Angaben bei NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>)

Stamm	Chordata (Chordatiere)		
Unterstamm	Vertebrata (Wirbeltiere)		
Überklasse	Gnathostomata (Kiefertragende)		
Klasse	Osteichthyes (Knochenfische)		
Unterklasse	Actinopterygii (Strahlenflosser)		
Überordnung	Teleostei (höhere Knochenfische)		
Ordnung	Cypriniformes (Karpfenartige)		Tetraodontiformes (Kugelfischartige)
Familie	Cyprinidae (Karpfenfische)		Tetraodontidae (Kugelfische)
Unterfamilie	Rasborinae (Bärblinge)	Cyprininae (Kärpflinge)	---
Art	<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	<i>Carassius auratus</i> (Goldfisch)	<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Grüner Kugelfisch)

2 Chemikalien und Geräte

Alle für die Laborarbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München). Die Kits wurden von den Firmen PeqLab (Erlangen), QIAGEN (Hilden), Macherey-Nagel (Düren), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma Aldrich (München) und ABgene (Hamburg) bezogen.

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Geräte verwendet:

Zentrifugen:	Heraeus Biofuge pico, Rotor 3325 (Kendro GmbH, Hanau) Eppendorf Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) Heraeus Megafuge 1.0R, Rotor 3360 (Langenselbold) Sorvall (RC5B), GSA- und SS34-Rotor (Langenselbold) Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen)
Photometer:	Ultrospec [®] (Amersham Pharmacia biotech, Freiburg) Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer (Varian, Darmstadt)
Autoklav:	Technoclav (Integra Biosciences, Fernwald)
pH-Meter:	Digital-pH-Meter (Knick, Berlin)
Thermocycler:	Techne Progene (Techne, Cambridge, UK) Biometra T Gradient (Biometra, Göttingen) Biometra T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) ABI 7000 Real-time PCR Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt)
Aquarien:	Hypoxieexperimente: <i>D. rerio</i> : Beckengröße 30x20x20 cm (10 Liter) <i>C. auratus</i> : Beckengröße 35x35x35 cm (40 Liter) Hälterungsaquarien: 50x60x50 cm (150 Liter)
Sauerstoffelektrode:	Oxi 340i (WTW, Weilheim)

3 Hypoxieexperimente

Vor der Durchführung der Experimente wurden die Zebraärblinge und Goldfische zunächst für mindestens 10 Tage an die beschriebenen Haltungsbedingungen adaptiert (siehe 1). Die Hypoxieexperimente wurden in Glasaquarien (10 Liter, 40 Liter) mit lose abdichtenden Deckeln aus durchsichtigem PVC durchgeführt. Aktivkohle-gefiltertes Wasser wurde mit Hilfe von Thermofiltern temperiert und ventiliert (Ekip 200, Ekip 350, Hydor, Bassano del Grappa, Italien). Durch ein kleines Loch im Deckel wurden verschiedene Gasmischungen (2% Sauerstoff in Stickstoff, 5% Sauerstoff in Stickstoff, 100% Stickstoff; Air Liquide, Düsseldorf) eingeleitet und durch einen Ausströmerstein fein verteilt. Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) des Wassers wurde alle 5 Minuten mit einer Sauerstoffelektrode (Oxi 340i, WTW, Weilheim) gemessen. Die Messwerte wurden im Messgerät gespeichert und konnten anschließend am Computer mit Hilfe der Programme MultiLab[®] Pilot (WTW, Weilheim) und Microsoft[®] Excel 2003 (Microsoft, USA) ausgewertet werden.

Die Fische wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn das letzte Mal gefüttert. Auf Futtergabe während dem Versuch wurde verzichtet, da es durch Unterschiede in der Menge der aufgenommenen Nahrung zur Verfälschung der Versuchsergebnisse kommen kann. Bei jedem Experiment wurden die Fische zufällig in eine Hypoxie- und eine Kontrollgruppe aufgeteilt. Es wurde darauf geachtet, dass stets alle Tiere eines Experiments aus derselben Zuchtgruppe kamen, um zu garantieren, dass Hypoxie- und Kontrollfische das gleiche Alter hatten. Es wurden vier Tiere pro Gruppe gewählt, so dass sich ein Verhältnis von zweieinhalb Liter Wasser pro Zebraärbling und zehn Liter Wasser pro Goldfisch ergab. Dies entsprach auch der Besatzdichte in den Hälterungsaquarien. Beide Gruppen wurden gleich behandelt, der einzige Unterschied lag in der Zusammensetzung des eingeleiteten Gases. Zu Beginn des Versuches lag in beiden Becken ein O_2 -Partialdruck von 140 Torr vor. Durch langsames Einleiten von 2% bzw. 5% Sauerstoff wurde nach einer Stunde ein O_2 -Partialdruck von etwa 31 (27-35) Torr bzw. 65 (60-70) Torr erreicht. Die Kontrolltiere wurden mit gefilterter Frischluft (21% Sauerstoff, 78% Stickstoff, ~0,9% Argon, 0,04% Kohlendioxid) begast. Die Begasung wurde über den gesamten Zeitraum des Versuches konstant gehalten, so dass sich der O_2 -Partialdruck nur geringfügig veränderte. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Hypoxieexperimente des Zebraärbling beendet. Hierzu wurde der Fisch auf Eis betäubt und direkt in Stickstoff eingefroren oder ausgewählte Organe präpariert (siehe dazu auch 5.1).

Bei den Experimenten mit Goldfischen wurde nach 48 Stunden mit einem Partialdruck von 50 Torr reiner Stickstoff eingeleitet und der O_2 -Partialdruck von 13 Torr für 8 Stunden konstant gehalten. Danach wurde für 12 Stunden wieder ein pO_2 von 50 Torr eingestellt, die Fische auf Eis betäubt, dekapitiert, einzelne Organe präpariert und in Stickstoff eingefroren.

Es wurde stets zunächst ein Genickschnitt durchgeführt und dann die Organe in der Reihenfolge Auge, Hirn, Herz, Kieme und Eingeweide entfernt.

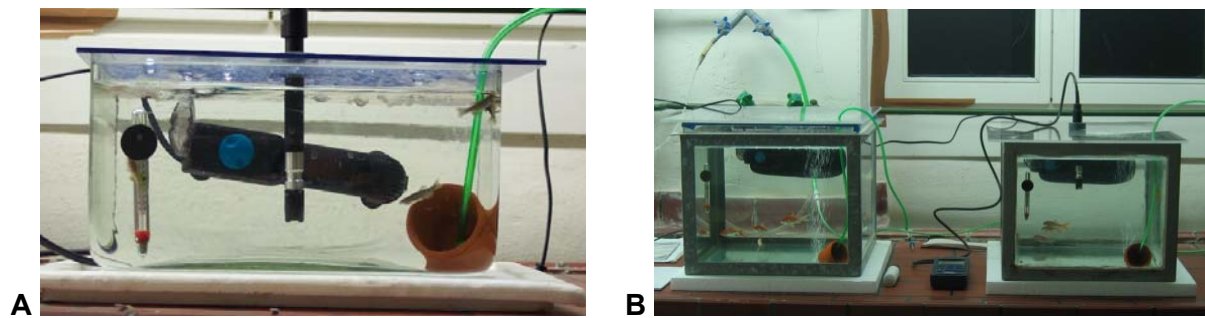


Abb. B 4: Hypoxiebecken

Aufbau der Hypoxiebecken für Experimente mit Zebraabärblingen (A) und Goldfischen (B, rechtes Becken, linkes Becken = Kontrolle). Durch den grünen Schlauch wurde eine Gasmischung mit geringem Sauerstoffgehalt eingeleitet und der Sauerstoffpartialdruck mit Hilfe einer Sauerstoffsonde bestimmt, die in der Mitte des Beckens angebracht war.

Die Tierhaltung und die Durchführung der Experimente erfolgte gemäß der vorliegenden Tierversuchsgenehmigung der Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz, AZ 1.5 177-07/021-30.

4 Mikrobiologische Methoden

4.1 Bakterienstämme

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

- *E. coli* Top10 (Invitrogen, Groningen); Resistenz gegen Tetracyclin
- *E. coli* BL21 (DE3)pLys (Stratagene, Heidelberg); Resistenz gegen Chloramphenicol

Beide Stämme sind Sicherheitsstämme (K12 Derivate), denen die für die Pathogenität verantwortlichen Gene fehlen.

4.2 Nährmedien und Agarplatten

Es wurden folgende Nährmedien verwendet:

- LB-Medium (pro Liter)

1% NaCl	10 g
1% Trypton	10 g
0,5% Hefeextrakt	5 g
pH 7,4	

- LB-Agar

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

- L-Medium (pro Liter)

0,5% NaCl	5 g
1% Trypton	10 g
0,5% Hefeextrakt	5 g
pH 7,4	

Alle Medien wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung für 30 min bei 121°C (1,0 bar) autoklaviert. Der Agar wurde danach auf ca. 55°C abgekühlt und 5 mm hoch in Petrischalen (Ø 85 mm) gegossen.

Um ein selektives Wachstum der gewünschten Bakterien zu ermöglichen, wurden Medien und Agar nach dem Autoklavieren und Abkühlen mit Antibiotika versetzt. Dabei wurden folgende Antibiotikakonzentrationen verwendet:

- Ampicillin (Amp) 100 mg / l
- Kanamycin (Kan) 12,5 mg / l
- Chloramphenicol (Chl) 34 mg / l

4.3 Flüssigkulturen

Zur Herstellung einer Flüssigkultur wurde eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in ca. 5 ml LB-Medium, das zuvor mit Antibiotika (siehe 4.2) versetzt wurde, überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

4.4 Expressionskulturen

Die rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* erfolgte in ca. vier Liter Expressionskultur in L-Medium bei ca. 25°C. Siehe dazu 7.8.

4.5 Glycerinkulturen

Um Bakterien über längere Zeit aufbewahren zu können, wurden Glycerinkulturen angesetzt. 700 µl Bakterienflüssigkultur wurden mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren. Glycerinkulturen sind eingefroren mehrere Monate haltbar.

5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.1 Präparation von RNA

Vor der Präparation wurden die Fische mit Eis betäubt und anschließend durch einen scharfen Schnitt durch das Rückenmark dekapitiert. Die gesamte Präparation wurde auf Eis durchgeführt, präparierte Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Präparation von Gesamtfisch-RNA wurde der Fisch nach dem Betäuben direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um eine Degradation der RNA durch RNasen zu vermeiden, wurde das verwendete Präparationsbesteck durch Abflammen sterilisiert und nur autoklavierte oder sterilisierte, RNase freie Gefäße und Pipettenspitzen verwendet. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt und autoklaviert.

- DEPC-H₂O: 1 l H₂O_{dd}
1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)
über Nacht schütteln bei 37°C , autoklavieren

5.1.1 RNA-Präparation mit der GITC-Methode

Die Präparation größerer Mengen an RNA erfolgte mit der GITC-Methode (Chirgwin et al., 1979). Hierbei wurde das Gewebe direkt in 10 ml GITC-Puffer mit Hilfe eines Ultra-Turraxes (IKA, Staufen) homogenisiert und nacheinander 1 ml 2 M Natriumacetat, 10 ml saures Phenol und 10 ml CIA (Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1) zugegeben. Die Lösung wurde für 1 h (mindestens 15 min) auf Eis gekühlt und im Anschluss für 60-90 min bei 4.332 g und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgezogen, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und bei -20°C über Nacht (mindestens 1 h) präzipitiert. Das entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert (60 min, 4332 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 7 ml GITC-Puffer gelöst. Nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde erneut für eine Stunde bei -20°C präzipitiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0,5 ml Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen (ca. 45 Minuten) wurde das Pellet in 1-2 ml DEPC-Wasser gelöst und für 30 Minuten bei 9.000 g und 4°C abzentrifugiert. Die RNA befand sich im Überstand. Konzentration und Reinheit wurden photooptisch (siehe 5.3) und mittels RNA-Gelelektrophorese bestimmt (siehe 5.5.2).

- GITC-Puffer : 100 g Guanidinisothiocyanat in 117 ml H₂O_{dd} lösen
 7,0 ml 0,75 M Natriumcitrat, pH 7,0
 10,6 ml 10% Natrium-N-Lauroylsarcosinat
 1,52 ml β-Mercaptoethanol

5.1.2 RNA-Präparation mit dem "RNeasy-Kit" (Qiagen, Hilden)

Zur Isolierung von DNA-freier RNA wurde das "RNeasy Mini-Kit" der Firma Qiagen verwendet, welches auf einer reversiblen Bindung der RNA an eine Silikamembran beruht. Das Gewebe (Gesamtfisch oder einzelne Organe) wurde in der entsprechenden Menge RLT-Puffer (Qiagen) mit Hilfe eines Ultra-Turraxes (IKA, Staufen) oder mit Micro-Glasmörsern (Roth, Karlsruhe) homogenisiert. Für die Isolation der RNA wurden ca. 200 µl Homogenisat eingesetzt (20 mg Gewebe). Die weitere Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers und beinhaltete einen DNase-Verdau. Die RNA wurde zweimal mit 30 µl sterilem, RNase-freiem Wasser eluiert.

5.2 Präparation von genomischer DNA

Die DNA-Präparation erfolgte mit dem "DNA Extraction Kit" (Stratagene, Heidelberg), die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerschnitten (ca. 0,3 cm x 0,3 cm) und mit 14 ml Lösung 2 und 6,16 µl Pronase (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C in einem Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 5 ml Lösung 3 hinzugegeben, invertiert und für 15 min bei 2.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer weiten Pipette abgenommen und mit zwei Volumen absolutem Ethanol versetzt. Die dabei ausfallende DNA wurde mit einem sterilen Glasstab aufgewickelt, mit Ethanol gewaschen und in sterilen H₂O_d gelöst.

5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren haben aufgrund der aromatischen Ringe der Basen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Bei Messungen in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gilt:

1 OD₂₆₀ ~ 50 µg/ml doppelsträngige DNA

1 OD₂₆₀ ~ 35 µg/ml einzelsträngige RNA

Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt (siehe 7.2.1), lässt sich anhand des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure treffen.

$OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ für reine DNA-Lösung

$OD_{260}/OD_{280} = 2,0$ für reine RNA-Lösung

$OD_{260}/OD_{280} < 1,8$ für mit Proteinen verunreinigte DNA- oder RNA-Lösung

5.4 PCR-Techniken

5.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäureabschnitten. Sie beruht auf der Synthese von DNA-Sequenzen zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die an einer einzelsträngigen Nukleinsäure binden. Ein PCR-Lauf besteht aus drei Temperaturstufen, die zyklisch durchlaufen werden. Zu Beginn der Reaktion wird der Ansatz auf 94°C erhitzt, um die doppelsträngige DNA der Probe in ihre Einzelstränge zu denaturieren. Im zweiten Schritt kommt es zur Anlagerung (Annealing) der Primer an ihre komplementäre Sequenz des denaturierten DNA-Stranges. Die Temperatur hierfür beträgt, abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer, 45-60°C. In der dritten Stufe kommt es durch die Taq-Polymerase, einer temperaturstabilen DNA-Polymerase, zur Synthese des komplementären DNA-Abschnittes ausgehend vom 3'-Ende des Primers. Diese Elongation erfolgt bei 72°C, dem Aktivitätsoptimum der Taq-Polymerase. Im Anschluss erfolgt ein neuer Zyklus, der mit der Denaturierung des entstandenen DNA-Doppelstranges beginnt. Während der folgenden 30-35 Zyklen kommt es zur exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes. Nach dem letzten Zyklus wird für 10 Minuten nachelongiert, damit die Polymerase alle amplifizierten Stränge vervollständigen kann.

Bei allen PCR-Ansätzen wurde die Taq-Polymerase von Invitrogen (Karlsruhe) nach Angabe des Herstellers verwendet. Diese Polymerase hängt charakteristisch ein einzelnes, überhängendes Adenosinnukleosidtriphosphat an das 3'-Ende der DNA an, was für nachfolgende Klonierungsschritte von Vorteil ist.

5.4.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird als Template RNA eingesetzt, die in einem der PCR vorgeschalteten Schritt in einzelsträngige cDNA umgeschrieben wird. Hierfür verwendet man Enzyme, die als Reverse Transkriptasen bezeichnet werden. In der folgenden Amplifikation wird die gewünschte cDNA-Sequenz von der Taq-Polymerase vervielfältigt. Die RT-PCR wurde mit dem "OneStep RT-PCR" Kit von QIAGEN (Hilden) durchgeführt. Hierbei erfolgen Reverse Transkription (RT) und PCR nacheinander im selben Reaktionsgefäß. Die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers.

5.5 Gelelektrophorese

5.5.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden horizontale, 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TBE, die Elektrodenspannung betrug 120 V (8 V/cm Elektrodenabstand). Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der Nukleinsäuren wandert die DNA dabei zu der Anode. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 0,5 x TBE aufgeköcht und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt und nach Abkühlen in Minigelkammern (Biotec Fischer, Reiskirchen) gegossen.

Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Nach Anregung mit UV-Licht (254-366 nm) wird Licht im orangeroten Bereich emittiert, so dass die aufgetrennten DNA-Fragmente angefärbt sind. Mit Hilfe eines Molekulargewichtstandards (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas) kann eine Aussage über Größe und Konzentration der DNA-Fragmente getroffen werden. Ethidiumbromid ist aufgrund seiner interkalierenden Wirkung ein starkes Mutagen.

▪ 10 x TBE (pro Liter):	0,9 M Tris/HCl	108 g
	0,9 M Borsäure	55,6 g
	20 mM EDTA	4,65 g
	pH 8,3	

5.5.2 RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in horizontalen, 1%igen Agarosegelen. Um die RNA zu denaturieren, wurde dem Gel Formaldehyd zugesetzt, welches die Wasserstoffbrückenbindung blockiert und somit die Ausbildung einer Sekundärstruktur verhindert. Des Weiteren hemmt es die Aktivität von RNasen. Die RNA-Proben wurden mit Beladungspuffer versetzt, bei 70°C für 5 min. denaturiert und auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x MOPS-Puffer. Durch zugesetztes Ethidiumbromid konnte die RNA nach der Elektrophorese (100 Volt) mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden.

- RNA-Minigel: 0,4 g Agarose
4 ml 10 x MOPS-Puffer
30 ml H₂O
aufkochen und abkühlen auf ca. 50°C
6,8 ml Formaldehyd

- 10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS, pH 7
0,05 M Natriumacetat, pH 7
0,01 M EDTA, pH 8

- 10x RNA-Probenpuffer: 100 µl Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml)
720 µl Formamid
260 µl Formaldehyd
100 µl H₂O_d
50% Glycerin
0,4% Bromphenolblau
0,4% Xylencyanol

5.6 DNA-Isolierung aus Agarosegelen und PCR-Produktreinigung

Nach der DNA-Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen wurden Banden, die die gewünschte Fragmentgröße hatten, ausgeschnitten. Die Isolierung aus dem Agarosegel erfolgte mit einem Extraktionskit ("Nucleotrap", Macherey und Nagel GmbH, Düren), das auch zur Reinigung dephosphorylierter Vektoren (siehe 5.7.2) verwendet wurde. Die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers, die DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert. Die Ausbeute wurde anschließend photooptisch bestimmt (siehe 5.3).

5.7 Klonierungsmethoden

5.7.1 Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden in den pCR[®]4-TOPO TA[®]- (Invitrogen, Groningen, Resistenz gegen Ampicillin und Kanamycin) oder der pGEM-Teasy-Vektor (Promega, Mannheim, Resistenz gegen Ampicillin) kloniert. Beide Vektoren lagen bereits linearisiert vor. Das gewünschte PCR-Fragment wurde, sofern keine anderen Banden vorhanden waren, direkt ohne Aufreinigung des PCR-Produktes eingesetzt. Alternativ wurden die PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und das entsprechende Fragment durch Gelextraktion isoliert.

- Klonierungsreaktion: 4,5 µl PCR-Produkt
1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)
0,5 µl pCR[®] 4-TOPO[®] Vektor (5 ng)
- oder
- 4 µl PCR-Produkt
0,4 µl pGEM-Teasy Vektor
1 µl Ligase
1 µl Ligationspuffer
3,6 µl H₂O_d

Der Reaktionsansatz wurde nach vorsichtigem Mischen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in chemisch kompetente "One Shot[®] TOP10" *E. coli* Zellen transformiert (siehe 5.8).

5.7.2 Klonierung in pET-3a und pET-15b

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die Vektoren pET-3a und pET-15b (Novagen, Darmstadt) verwendet. Vor der Klonierung musste der Vektor linearisiert und dephosphoryliert werden. Durch die Dephosphorylierung wird eine Selbstligation des Vektors verhindert. Ein Verdau des Vektors mit Restriktionsenzymen schafft definierte Enden, die zur Ligation von PCR-Fragmenten benötigt werden.

Zunächst wurde der zirkuläre Vektor mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI geschnitten (siehe 5.10.1) und im Anschluss die freien 5'-OH-Gruppen der überhängenden Enden dephosphoryliert. Dazu wurde der Vektor für 30 min bei 37°C mit Alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) inkubiert und diese nach Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA für 10 Minuten bei 72°C inaktiviert.

Die zu klonierende cDNA wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen (NdeI und BamHI) aus dem Sequenziervektor pCR[®]4-TOPO[®] TA ausgeschnitten, der Verdau mittels Gelelektrophorese (siehe 5.5.1) überprüft und über Gelextraktion (siehe 5.6) isoliert und aufgereinigt. Der Dephosphorylierungsansatz wurde vor der Ligation ebenfalls aufgereinigt (siehe 5.6).

Der Ligationsansatz wurde für 2-3 Tage im Kühlraum bei 4-7°C inkubiert, um eine effiziente Ligation zu erzielen.

- Dephosphorylierungsansatz: 4-5 µg Vektor
10 µl 10 x Phosphatasepuffer
1 µl Alkalische Phosphatase
ad 100 µl H₂O_{dd}

- Ligationsansatz: 175 ng cDNA
100 ng pET-3a oder pET-15b Vektor
2 µl 10 x Ligationspuffer
2 µl Ligase
ad 20 µl H₂O_{dd}

5.8 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation wurden 25-100 µl der kompetenten Bakterien (*E. coli* Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) und *E. coli* BL21 (DE3)pLys (Stratagene, Heidelberg)) mit den zu transformierenden Plasmiden (10-100 ng zirkuläre Plasmid-DNA) versetzt und für 30 min auf Eis gehalten. Nach kurzem Hitzeschock bei 42°C (30 sec bei *E. coli* Top10, 20 sec bei *E. coli* BL21 (DE3)pLys) und Abkühlen auf Eis wurden dem Ansatz 250 µl bzw. 900 µl LB-Medium zugegeben. Anschließend wurden die Bakterien zur Erholung für mindestens 1,5 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde bei 200 g für 3 Minuten abzentrifugiert, der Großteil des Mediums abgezogen und verworfen und das Pellet im restlichen Volumen resuspendiert. Danach konnten die Bakterien auf LB-Platten ausplattiert werden, die zur Selektion der plasmidtragenden Bakterien mit entsprechenden Antibiotika versetzt worden waren. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden 10 Klone gepickt und Flüssigkulturen angesetzt (siehe 4.3).

5.9 Präparation von Plasmid-DNA

Um aus den Bakterienkulturen die Plasmid-DNA zu isolieren, wurde das "E.Z.N.A Miniprep Kit" der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet. Dieses System beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Die Plasmid-DNA wird dabei reversibel an eine Silikat-Matrix gebunden und kann mit Wasser oder einem speziellen Elutionspuffer eluiert werden. Die Präparation erfolgte nach dem Isolierungsprotokoll für "High Copy-Number"-Plasmide, es wurden 4 ml Flüssigkultur eingesetzt. Nach Elution mit 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) wurde die Konzentration der Plasmid-DNA photooptisch bestimmt (siehe 5.3).

5.10 Überprüfung des Klonierungserfolgs

Um zu überprüfen, ob die isolierten Plasmide das gewünschte Insert tragen, wurden verschiedene Methoden angewandt.

5.10.1 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsanalyse dient der Charakterisierung und Identifizierung von Klonierungsprodukten sowie zur Vorbereitung von Insert und Vektor auf die Ligation. Restriktionsenzyme spalten die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungsstellen. Die entstehenden Fragmente können durch Gelelektrophorese (siehe 5.5.1) aufgetrennt und so ihre Größe abgeschätzt werden. Die für den DNA-Verdau benötigte Menge an Restriktionsenzym wird in Units angegeben: Ein Unit Enzym ist die Menge, die benötigt wird, um ein μg DNA bei optimalen Bedingungen (Temperatur, Salzkonzentration) zu spalten. Der Restriktionsverdau wurde bei 37°C , dem Temperaturoptimum der Endonukleasen durchgeführt, es wurde auf die jeweilige optimale Salzkonzentration geachtet. Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

- Standard-Restriktionsansatz: 0,4 – 1 μg Plasmid-DNA
 1 μl 10 x Puffer
 1 Unit Enzym / μg DNA
 ad 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Im Anschluss an die Restriktion wurden die Größe der Inserts über ein 1%iges Agarosegel überprüft. Die Klone, die das erwartete Insert trugen, wurden sequenziert (siehe 5.12).

5.10.2 PCR mit Vektorprimern

Alternativ zum Restriktionsverdau konnte das Insert mit Hilfe einer PCR amplifiziert werden. Diese Methode kann direkt mit einzelnen Bakterienkolonien angewandt werden und erfordert somit keine vorherige Präparation der Plasmid-DNA.

Es wurde der "ReadyMix™REDTaq™" der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. In dem Mix sind bereits die für die PCR benötigten Komponenten Taq-Polymerase, dNTPs, MgCl_2 und der Puffer enthalten, es müssen nur noch die Vektorprimer, die DNA und Wasser zugegeben werden. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde der Ansatz halbiert. Die Template-DNA entstammte einer Bakterienkolonie, die gepickt und kurz im Reaktionsgemisch abgestreift wurde. Nach Abstrich auf einer LB-Masterplatte wurde die Kolonie in LB-Medium überführt, um eine Flüssigkultur (siehe 4.3) zu erhalten.

Es wurde eine PCR mit 30 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 55°C durchgeführt und die entstandenen Produkte mittels eines 1%igen Agarosegels überprüft. Bei den positiven Klonen wurde eine Flüssigkultur angesetzt, die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert (siehe 5.6 und 5.12).

5.11 Oligonukleotidprimer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma ARK (Darmstadt) bezogen und in sterilem HPLC-Wasser gelöst, so dass die Konzentration des Primers 100 pmol/μl (100 μM) betrug. Eine Auflistung aller Primer befindet sich im Anhang (siehe G4).

5.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten erfolgte nach dem Sanger-Verfahren (Sanger et al., 1977; Prober et al., 1987). Das Insert befindet sich in einem doppelsträngigen Vektor, und kann somit von zwei Seiten sequenziert werden. Nach Denaturieren des Doppelstranges kommt es zum Anlagern des Sequenzierprimers, eine DNA-Polymerase beginnt mit der Synthese eines komplementären Stranges. Im Reaktionsgemisch liegen neben den normalen 2'-Desoxynukleotiden auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxynukleotide vor. Wird ein Dideoxynukleotid in den komplementären Strang eingebaut, kommt es zu einem Kettenabbruch, da das für eine weitere Verknüpfung der Nukleotide notwendige 3'-OH nicht mehr vorhanden ist. Es entstehen Strangfragmente unterschiedlicher Länge, die nach Probenaufbereitung über ein Sequenziergel aufgetrennt und ausgewertet werden. Alle Sequenzierungen wurden im BYOS™-Verfahren von der Firma GENterprise (Mainz) durchgeführt.

5.13 Auswertung der Sequenzen

5.13.1 Verwendete Datenbanken und Computerprogramme

Um die erhaltenen Sequenzen auszuwerten, wurden verschiedene Computerprogramme und Datenbanken verwendet, die als "Freeware" im Internet erhältlich sind.

- BLAST NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Chromas 1.55 <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- ClustalX 1.64 <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>
- GeneDoc 2.6 <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>
- PHYLIP 3.6 <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- Treeview 1.6 <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Compute pl/Mw tool <http://www.expasy.ch>

5.13.2 Alignment und Sequenzanalyse

Um eine erhaltene Sequenz zu identifizieren, wurde sie zunächst mit Informationen aus Online-Datenbanken (GenBank) verglichen, welche mit dem BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) durchsucht wurden. Danach wurde mit GeneDoc ein manuelles Alignment erstellt, anhand dessen Vergleiche mit bekannten Sequenzen nah verwandter Organismen durchgeführt werden können. Das so erhaltene Alignment diente als Grundlage für Stammbaumanalysen.

5.13.3 Phylogenie und statistische Auswertung

Zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen wurden die Programme PHYLIP 3.6b (Felsenstein, 2004), Tree-Puzzle 5.2 (Strimmer & von Haeseler, 1996) und MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) verwendet. Distanzmatrices wurden mit Tree-Puzzle unter Verwendung des PAM- (Dayhoff et al., 1978) und WAG-Modells (Whelan & Goldman, 2001) der Aminosäureevolution unter Annahme einer Gamma-Verteilung der Substitutionsraten mit acht Kategorien berechnet. Neighbor-joining Stammbäume wurden mit dem Programm NEIGHBOR des PHYLIP Programmpaketes erstellt. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Stammbäume wurde mittels Bootstrapping mit 100 "Pseudosamples" überprüft (Felsenstein, 1985). Hierzu wurde das Programm PUZZLEBOOT (<http://www.tree-puzzle.de/#puzzleboot>) verwendet. Zudem wurden phylogenetische Analysen mit MrBayes unter der Verwendung des PAM- und WAG-Modells und der Annahme einer Gamma-Verteilung der Substitutionsraten durchgeführt. Es wurde ein "Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) sampling" mit vier Ketten für 200.000 bzw. 300.000 Generationen durchgeführt. Das Sampling der Bäume fand alle zehn Generationen statt, im Anschluss wurden von den letzten 15.000 bzw. 5.000 (burn-in = 5.000 bzw. 25.000) die "posterior probabilities" abgeschätzt. Molekulare Stammbäume wurden mit dem Programm Treeview dargestellt.

6 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR, qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von Genexpression auf mRNA-Ebene. Es wurde ausschließlich die SYBR-Green Methode verwendet, bei der der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green in die amplifizierte doppelsträngige DNA interkaliert. Durch Messung der Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus ("real-time") kann die Menge an amplifizierter DNA quantifiziert werden. Diese ist proportional zu der eingesetzten Menge an mRNA. Alle qRT-PCR Experimente wurden als Two-Step-PCRs durchgeführt.

6.1 cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkription von mRNA in cDNA wurden 0,7-1 µg DNase-behandelte Gesamt-RNA eingesetzt. Damit die Effizienz der cDNA-Synthese vergleichbar ist, wurde darauf geachtet, dass für gleiche Gewebe immer dieselbe Menge an Gesamt-RNA eingesetzt wurde. Es wurde die Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet, für manche Gewebe wurde aufgrund der großen Anzahl zu untersuchender Gene der Ansatz verdoppelt. Alle cDNAs wurden direkt im Anschluss mit einem Volumen sterilem HPLC-Wasser verdünnt.

6.2 Entwerfen der qRT-PCR Primer

Die für die qRT-PCR verwendeten Primerpaare wurden so gewählt, dass mindestens einer der Primer auf einer Exon-Intron-Grenze lag. Hierdurch wird vermieden, dass es durch eventuell vorhandene genomische Verunreinigungen der eingesetzten Gesamt-RNAs zu einer Amplifikation von genomischer DNA kommt. Zudem wäre ein solches Amplifikat leicht durch seine abweichende Größe von den spezifischen Produkten zu unterscheiden. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Amplifikate zwischen 80 und 150 bp groß waren und möglichst nah am 3'-Ende des Gens lagen.

Zur Vermeidung von Primerdimeren wurden die Primer nicht nur auf Selbstkomplementarität, sondern auch auf die mögliche Bildung von Heterodimeren getestet. Hierzu wurde der "IDT SciTools OligoAnalyser3.0" (Integrated DNA Technologies, <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) verwendet. Die Schmelztemperatur wurde durch das Programm "Oligonucleotide Properties Calculator" (<http://www.cmbn.no/tonjum/oligocalculator.html>) überprüft und lag bei allen Primern zwischen 63 und 70°C. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma ARK (Darmstadt) synthetisiert, eine Liste der Primer befindet sich im Anhang (siehe G4).

6.3 Durchführung der qRT-PCR

Bei der Durchführung der Messungen wurden zwei verschiedene Kits verwendet. Alle qRT-PCRs mit Proben des Zebraärbings *Danio rerio* erfolgten mit dem "ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix" (ABgene, Hamburg). Hier wurde der Ansatz von 50 µl auf 30 µl reduziert. Bei allen Experimenten mit dem Goldfisch *Carassius auratus* und bei den Expressionsvergleichen zwischen *D. rerio* und *C. auratus* wurde der "Power SYBR® Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems, Foster City, USA) eingesetzt, für den der Ansatz von 50 µl auf 25 µl halbiert wurde. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Die Primerkonzentration betrug jeweils 100 nM und es wurde pro Ansatz 1 µl der verdünnten cDNAs eingesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen. Zur Bestimmung der Effizienz der Reaktion wurden so genannte Standardkurven pipettiert. Hierzu wurden entweder serielle 10-fach Verdünnungen von Plasmidstandards (10^3 - 10^8 Kopien pro µl) oder serielle 5-fach Verdünnungen von cDNAs (1-1/625) verwendet.

Die Messung erfolgte in einem Vier-Schritt-Protokoll (15 min 95°C, 15 sec 95°C, 30 sec 60°C, 30 sec 72°C), die Schritte 2-4 wurden dabei 40-mal wiederholt. Die Fluoreszenz wurde in jedem Zyklus nach dem 72°C Schritt bestimmt. Im Anschluss an die gesamte qRT-PCR erfolgte die Messung einer thermischen DNA-Dissoziationskurve. Hierdurch lässt sich erkennen, ob während der PCR unspezifische Produkte wie Primerdimere oder Amplifikate von genomischer DNA entstanden sind. Zudem kann die Reinheit der Negativkontrolle ("no template control", NTC) überprüft werden.

6.4 Auswertung der quantitativen real-time PCR

Eine erste Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse erfolgte mit dem Programm "ABI PRISM® 7000" (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die typische Darstellungsform der Messergebnisse der quantitativen real-time PCR ist der so genannte Amplifikationsplot, in dem der Logarithmus des normalisierten Fluoreszenzsignals (Delta Rn) gegen die PCR-Zyklenzahl aufgetragen wird (Abb. B 5). Jeder Probe wird dabei ein Ct-Wert ("Cycle of threshold") zugewiesen, der denjenigen Zyklus angibt, bei dem das Fluoreszenzsignal einen manuell oder automatisch festgelegten Schwellenwert erreicht. Anhand dieser Ct-Werte lässt sich nun die Expression eines Gens bei verschiedenen Individuen vergleichen. Der Ct-Wert ist die Grundlage für die Berechnung der relativen Quantitäten der cDNAs mit dem Programm qBase (<http://medgen.ugent.be/qbase>). Dieses Programm ermöglicht die Normalisierung der Proben auf ein Referenzgen sowie die Einbeziehung der Effizienz der einzelnen Reaktionen. Die Ct-Werte eines Triplets sollten nicht mehr als 0,5 Zyklen auseinander liegen. Im Normalfall wurde ein Unterschied von weniger als 0,2 Zyklen beobachtet, so dass Werte, die weiter als 0,5 Zyklen auseinander lagen, vor der weiteren

Auswertung ausgeschlossen wurden. Die weitere statistische und grafische Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft® Excel 2003 (Microsoft, USA).

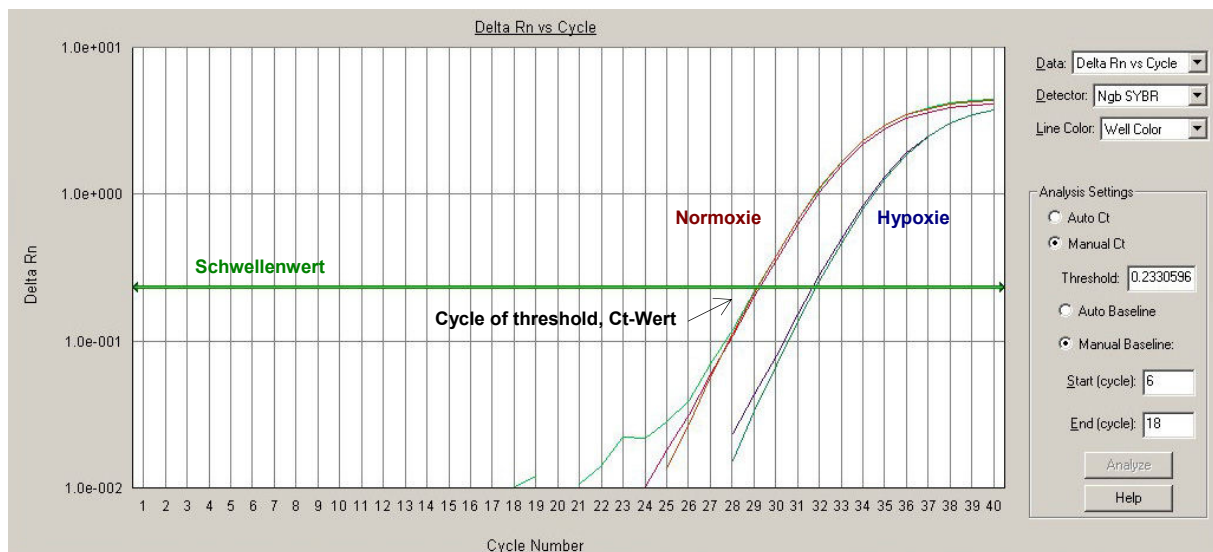
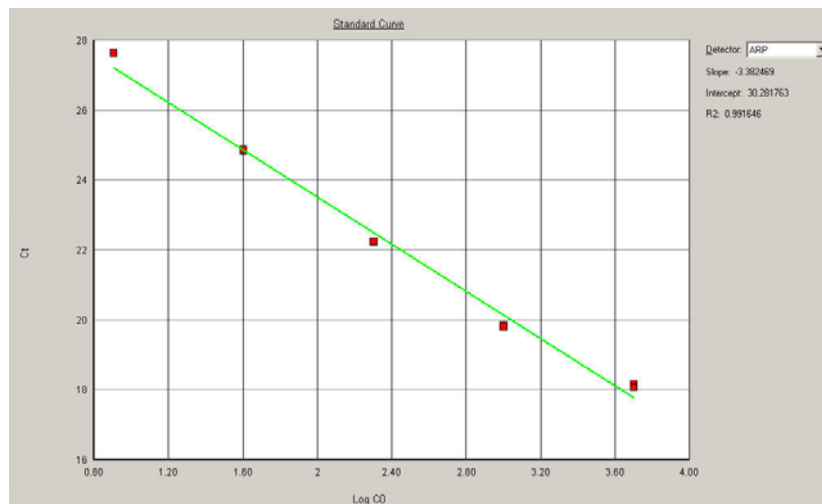


Abb. B 5: Amplifikationsplot

Exemplarisch dargestellt ist ein Amplifikationsplot für Neuroglobin. Der Schwellenwert wird durch die horizontale grüne Linie symbolisiert. Deutlich zu erkennen ist die hohe Übereinstimmung zwischen den drei Messwerten eines Triplets.

Zur Bestimmung der Effizienz der jeweiligen PCR-Reaktion wurden Standardgeraden mit seriellen Verdünnungen von Plasmidstandards oder cDNA-Proben gemessen. Da es bei einem PCR-Zyklus zu einer Verdopplung der PCR-Produkte kommt, beträgt im optimalen Fall die Effizienz der Reaktion $E = 2$. Mit Hilfe der Steigung der Standardgeraden lässt sich die Effizienz mit der Formel $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ berechnen. Für eine 100%ige Effizienz der PCR-Reaktion muss demnach die Steigung der Standardgeraden -3,32 sein (siehe Abb. B 6).

**Abb. B 6: Standardgerade**

Exemplarisch dargestellt ist die Standardgerade des Gens ARP ("Acidic ribosomal protein", nach neuer Nomenklatur "ribosomal protein, large, P0", rplp0), gemessen wurde eine serielle 5-fach Verdünnung einer Goldfisch cDNA-Probe. Aufgetragen wurde der Ct-Wert ("Cycle of threshold") gegen den Logarithmus der Ausgangskopienzahl der cDNA-Probe. Mit Hilfe der Steigung der Standardgerade (-3,38) wurde eine PCR-Effizienz von fast 98% errechnet.

Zur Untersuchung der Expression der Positivkontrollen Lactatdehydrogenase (LDH-A) und Phosphoglyceratkinase (PGK-1) des Zebraäbrblings wurden anstelle von Plasmidverdünnungen serielle 5-fach Verdünnungen von cDNA-Proben zur Ermittlung der Effizienz der PCR-Reaktionen eingesetzt. Da bei dieser Methode eine bessere Übereinstimmung innerhalb der Dubletts und Tripletts eines Ansatzes beobachtet wurde, wurde für die Untersuchung der Genexpression des Goldfisches für alle Gene die Effizienz der PCR-Reaktion durch serielle 5-fach Verdünnungen von cDNA-Proben bestimmt. Eine Liste der eingesetzten Standards befindet sich im Anhang (siehe G5).

7 Proteinbiochemische Methoden

7.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebeproben

Zur Isolierung von Gesamtprotein aus einzelnen Organen wurden diese in 1 x PBS mit Protease-Inhibitor (Complete Protease Inhibitor-Mix, Roche) homogenisiert. Hierzu wurde ein Ultraschallstab (Labsonic 1510, B. Braun, Melsungen AG) verwendet und auf Eis gearbeitet. Das Homogenisat wurde anschließend 5-10 min bei 10.000 g abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert.

- 10 x PBS: 1,4 M NaCl
27 mM KCl
81 mM Na₂HPO₄
15 mM KH₂PO₄

7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, wurden photooptische Messungen durchgeführt. Waren exaktere Werte erforderlich, wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) angewandt.

7.2.1 Extinktionsmessung

Bei der photooptischen Proteinbestimmung macht man sich die Absorptionen der Aminosäuren zu Nutze. Aromatische Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin haben eine starke Absorption bei 260 bis 280 nm. Proteine mit einer durchschnittlichen Verteilung dieser beiden Aminosäuren haben bei einer Konzentration von 1 mg/ml eine Absorption bei 280 nm von etwa 1 (Schichtdicke 1 cm). In der Praxis ist es üblich, statt der durchschnittlichen Zahl an Tryptophan und Tyrosin, die für das jeweilige Protein bekannte Anzahl der beiden Aminosäuren einzubeziehen.

Für Neuroglobin gilt näherungsweise: 1 OD₂₈₀ ~ 0,7 mg/ml.

7.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Proteinbestimmung (Bradford, 1976) beruht auf Wechselwirkungen des Säurefarbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 mit den Proteinen, besonders mit kationischen Seitenketten (Arginin). Nach Ausbildung des Farbstoff-Protein-Komplexes verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 zu

595 nm. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Methode, die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 µg Protein, eignet sie sich besonders zur Bestimmung kleiner Proteinmengen unter 20 µg. Anhand einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin (BSA) kann die Konzentration der Proteinproben bestimmt werden.

- Bradford-Lösung: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva)
in 50 ml 95% Ethanol p.a. lösen
100 ml 85% H₃PO₄
ad 1000 ml mit H₂O_d

7.3 Aufnahme eines Absorptionsspektrums

Zur Aufnahme eines kompletten Spektrums der Proteinproben wurde ein Scann von 380 bis 600 nm durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinprobe verdünnt und die Absorption im angegebenen Bereich in 0,5 nm Schritten bestimmt.

Um ein deoxy-Spektrum zu erhalten, wurde der Probe Natriumdithionit zugesetzt, welches den vorhandenen Sauerstoff reduziert. Die Spektren wurden mit dem Computer aufgezeichnet und mit dem Programm Microsoft® Excel 2003 (Microsoft, USA) ausgewertet.

7.4 Entsalzen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

An verschiedenen Stellen der Aufreinigung bakteriell exprimierter Proteine war es nötig, die Proteinlösung auf ein geringeres Volumen einzuengen und zu entsalzen. Hierzu wurden Amicon Ultra Zentrifugenfilter der Firma Millipore (Schwalbach) verwendet. Die Membran der Zentrifugenfiltereinheiten ist für Moleküle mit einer maximalen Größe von 10 kDa durchlässig. Durch Zentrifugation (4.000 g) können somit Wasser, Salzionen und kleine Proteine aus der Proteinlösung entfernt werden. Vor dem Einengen wurde die Proteinlösung für 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert, um zu vermeiden, dass Schwebstoffe die Filtermembran verdichten. Um die Proteinlösung vollständig von Ionen, die bei den nächsten Reinigungsschritten stören würden, zu befreien, wurde die aufkonzentrierte Proteinprobe mit dem zwei- bis dreifachen des Ausgangsvolumens an 20 mM Tris-HCl (pH 8,5) gewaschen.

7.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde das denaturierende und diskontinuierliche System von Laemmli (1970) verwendet. Durch Zugabe von β-Mercaptoethanol erfolgt eine Reduktion der Disulfidbrücken. Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) erzeugt eine negativ geladene Hülle um die Proteinmoleküle und maskiert somit die Eigenladung der Proteine.

Die Wanderungstrecke der denaturierten, negativ maskierten Proteine bei der SDS-PAGE ist proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Anhand von Molekulargewichtsstandards (Unstained Protein Molecular Weight Marker, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot), lässt sich die Größe der Proteine bestimmen.

7.5.1 Gelherstellung

Es wurden vertikale Elektrophoresekammern (Biotec Fischer, Reiskirchen) und 15%ige SDS-Gele verwendet.

Gelmischungen für 4 Minigele

	Trenngel 15%	Sammelgel 3,9%
Rotiphorese-Gel (Roth)	10 ml	0,9 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,6 ml
10% SDS	200 µl	60 µl
H ₂ O _d	5 ml	4 ml
Temed	20 µl	6 µl
10% APS	200 µl	60 µl

- Rotiphorese-Gel: Ultra Pure (Acrylamidlösung) 37,5 : 1
(30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid)

7.5.2 Proteindenaturierung

Zur Denaturierung wurden die Proteine mit 4 x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

- 4 x Probenpuffer: 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
2 ml 10% SDS
1 ml Glycerin
0,1 ml 1% Bromphenolblau
0,5 ml β-Mercaptoethanol
0,15 ml H₂O_d

7.5.3 Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100-120 Volt und konstanter Stromstärke solange, bis die blaue Lauffront das untere Gelende erreicht hatte.

- SDS-Laufpuffer: 23 mM Tris, pH 8,4
190 mM Glycin
0,2% (w/v) SDS

7.5.4 Coomassie-Färbung

Die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 beruht auf Interaktionen zwischen dem Farbstoff und den Proteinen (siehe 7.2.2). Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode liegt bei ca. 0,5 µg Protein pro Bande. Durch die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure werden die Proteine fixiert.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 1-2 h in Coomassie gefärbt, anschließend wurde der Hintergrund entfärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Gele wurden in 7% Essigsäure aufbewahrt.

- Färbelösung: 400 ml Ethanol
170 ml Essigsäure (60%)
430 ml H₂O_d
2 g Coomassie Brilliant Blue R-250
- Entfärbelösung: 200 ml Isopropanol
116 ml Essigsäure (60%)
ad 1000 ml H₂O_d

7.6 Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)

7.6.1 Elektrotransfer

Durch den Vorgang des ElektrobloTTings lassen sich Proteine, die zuvor mit Hilfe einer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und fokussiert wurden, durch ein senkrecht zum Gel angelegtes Feld auf eine Nitrocellulose-Membran transferieren. Die Lage der Proteine zueinander bleibt hierbei unverändert. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit der Proteine für Antikörper, sind spezifische Nachweisreaktionen (Antikörperdetektion) möglich. Es wurde das Semidry-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) verwendet.

- Transferpuffer (pro Liter):

39 mM Glycin	2,9 g
48 mM Tris	5,8 g
0,037% SDS	0,37 g
20% Methanol	200 ml
pH 8,3	

7.6.2 Färbung der Proteine mit PonceauS

Um die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran reversibel zu färben, wurde die Membran kurz mit 1:10 verdünnter PonceauS-Lösung (Sigma-Aldrich, München) inkubiert und der Hintergrund mit H₂O_d entfärbt. Die Markerbanden wurden mit Bleistift markiert und anschließend die PonceauS-Färbung vollständig entfernt.

7.6.3 Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern

Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran wurden mit 2% BSA in 1 x TBS für 45 Minuten abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:500 in 2% BSA in 1 x TBS) erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit 1 x TBS gewaschen, um den Primärantikörper vollständig zu entfernen, und für 45 Minuten mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörper (polyklonaler anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege, Dianova, Hamburg) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Bindungsstellen des Sekundärantikörpers durch eine Farbreaktion (10 ml AP-Puffer, 33 µl BCIP, 66 µl NBT) detektiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran mit H₂O_d gespült.

- 10 x TBS (pro Liter):

100 mM Tris	12,1 g
1,4 M NaCl	81,8 g
pH 8,0	

- AP-Puffer (pro Liter):

100 mM Tris	12,1 g
100 mM NaCl	5,85 g
pH 9,5	

- BCIP: 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid
- NBT: 50 mg/ml in 70% Dimethylformamid

7.7 Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern

Antikörper gegen rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes Protein wurden von den Firmen Charles River (Kißleg) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt.

7.7.1 Immunisierung

Zur Synthese von polyklonalen Antikörpern wurden Kaninchen mit verschiedenen Antigenen (> 0,2 mg rekombinant exprimiertes Protein) nach folgendem Schema immunisiert.

Tag	Prozedur	Bemerkungen
0	1. Injektion	Präimmunserum vor der 1. Injektion
28	2. Injektion	
38	1. Serumprobe	ca. 2-4 ml
42	3. Injektion	
52	2. Serumprobe	ca. 2-4 ml
56	4. Injektion	
70	Entblutung	

7.7.2 Affinitätsreinigung

Zur Reinigung der Antikörperseren wurde das "HiTrap™ NHS-activated HP-Kit" der Firma Amersham Biosciences (München) verwendet. Antigene mit primären Aminogruppen können kovalent an die Säulenmatrix binden und bilden so die Basis für eine Affinitätschromatographie. Durch Inkubation der vorbereiteten Säule mit Antikörperserum können die Antikörper an das an der Säule gebundene Antigen binden und nach einigen Waschschritten eluiert werden. Die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers.

7.8 Rekombinante Expression in Bakterien

Um Aussagen über die Struktur und Funktion von Proteinen treffen zu können, werden Proteinmengen im Milligramm-Bereich benötigt. Hierzu werden die Proteine in einem geeigneten bakteriellen Expressionssystem überexprimiert und anschließend durch eine Abfolge von Reinigungsschritten aufgereinigt.

7.8.1 Bakteriell Expressionssystem

Die rekombinante Expression in Bakterien erfolgte mit dem *E. coli* T7 Expressionssystem (Studier et al., 1990). Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wurde in den Expressionsvektor pET-3a oder pET-15b ("plasmid for expression by T7 RNA polymerase")

ligiert (Novagen, Darmstadt) und anschließend in Zellen des Bakterienstammes BL21 (DE3)pLys (F⁻ ompT⁻ r_Bm_B) (Stratagene, Heidelberg) transformiert (siehe 5.8). Bei den Bakterienzellen handelt es sich um einen lysogenen Tochterstamm von BL21, der die DNA des Bakteriophagen DE3 im Genom trägt. DE3 ist ein Derivat des Lambda-Phagen, der die Immunitätsregion des Phagen 21 trägt. Der lacUV5-Promotor des Lambda-Phagen lässt sich mit Hilfe des Lactose-Derivates IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induzieren. Der Vorteil von IPTG gegenüber Lactose liegt darin, dass IPTG nicht abgebaut wird, da es nur als Induktor und nicht als Substrat fungiert. Durch die Induktion wird durch das in den Bakterien enthaltene pLys-Plasmid neben dem gewünschten Protein zusätzlich Lysozym exprimiert. Durch die hohe Lysozymkonzentration kann der Zellaufschluss bereits durch Einfrieren und Auftauen erfolgen.

7.8.2 Bakterielle Expression

Für die Expression der Globine wurden 3 ml Flüssigkultur des rekombinanten Bakterienklons (siehe 4.3) in einen Liter L-Medium überimpft. Zur Selektion der gewünschten Bakterien wurden dem Medium zwei Antibiotika (Chloramphenicol und Ampicillin) zugesetzt. Damit die Bakterien die prosthetische Gruppe der Globine, das Häm, in die exprimierten Proteine einbauen können, wurde die Bakteriensuspension mit einer Vorstufe des Häms, 5'-Aminolaevulinsäure (ALA, Endkonzentration 1 mM), versetzt. Zwei Moleküle ALA kondensieren dabei zu einem Pyrrolderivat, von denen vier nach einer weiteren Kondensationsreaktion zunächst ein lineares Tetrapyrrol und nach anschließender Zyklisierung einen Porphyrinring bilden. Nach Veränderungen der Seitenketten und Ausbildung eines Chelatkomplexes mit Eisen entsteht schließlich das Häm, die prosthetische Gruppe der Globine.

Die vier Liter Bakterienkultur wurden zu gleichen Teilen auf acht 2 Liter Erlenmeyerkolben verteilt und bei ca. 25°C unter Schütteln inkubiert, bis die optische Dichte OD₆₀₀ den für die Induktion optimalen Wert von 0,4-0,8 erreicht hatte. Nach Abnahme einer Induktionskontrolle wurde mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) eine Endkonzentration von 0,4 mM eingestellt und beide Kulturen über Nacht bei 25°C inkubiert.

Um die Bakterien aus der Kultur zu ernten, wurde bei 4.332 g für 20 min unter Kühlung zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem Volumen Protease-Inhibitor-Puffer (PI-Puffer) resuspendiert. Für einen Ansatz von 4 Liter Bakterienkultur wurden 100 ml PI-Puffer benötigt, der neben zwei Protease-Inhibitoren (Complete PI-Mix der Firma Roche und Pefabloc der Firma Roth) noch DNase und RNase enthielt, um die in den Bakterien vorhandene DNA und RNA zu verdauen.

▪ Protease-Inhibitor-Puffer: (für 100 ml)	50 mM Tris-HCl pH 8,0	100 ml 50 mM Tris
	1 mM DTT (Dithiotreitol)	160 mg
	2 Tabletten Complete Protease Inhibitor-Mix	
	1 mM Pefabloc	24 mg
	1 mM MgCl ₂	100 µl 1 M MgCl ₂
	800 µg DNase	160 µl (50 mg/ml)
	1 Spatelspitze RNase	

DNase: 50 mg/ml in TE-Puffer, pH 8,0 (10 mM Tris, 1 mM EDTA)

7.8.3 Aufbrechen der Bakterienzellen

Um die exprimierten Globine aus den Bakterienzellen zu isolieren, wurden die Zellwände durch zwei Methoden aufgebrochen. Zunächst wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut, hierbei werden die Zellwände durch Deformationen zerstört, und der zelluläre Inhalt wird freigesetzt. Diese Prozedur wurde 2-3-mal wiederholt, bis die Lösung nur noch mäßig viskos war.

Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf Eis mit Ultraschall behandelt (Labsonic 1510, B. Braun, Melsungen AG), dieser Vorgang wird als Sonifizieren bezeichnet. Der Ultraschallstab tauchte dabei direkt in die Zellsuspension ein. Starke Druckänderungen bewirken ein effektives Aufbrechen der Zellen und Organellen, auch DNA wird unter diesen Bedingungen teilweise fragmentiert. Die Beschallung erfolgte in 30 Sekunden-Intervallen, gefolgt von 30 Sekunden Pause, um eine zu starke lokale Erwärmung zu vermeiden. Es wurden sovieler Beschallungen (ca. 10-20) durchgeführt, bis die Suspension flüssig war.

7.8.4 Verdau von Nukleinsäuren

Da in der Zellsuspension vorliegende DNA und RNA die spätere Aufreinigung der Proteine stört und die Nukleinsäuren durch die Ultraschallbehandlung nicht vollständig fragmentiert waren, wurde nach dem Sonifizieren ein DNA- und RNA-Verdau angeschlossen. Dazu wurden die Proben für 2 h bei 37°C inkubiert. Die dem Protease-Inhibitor-Puffer zugesetzten Nukleasen konnten so optimal die DNA und RNA verdauen. Ein gleichzeitiger Abbau der Proteine durch in den Bakterien enthaltenen Proteasen wurde durch zwei Inhibitoren (Complete Protease Inhibitor-Mix und Pefabloc) wirkungsvoll verhindert. Um Zelltrümmer, Organellen und verdaute Nukleinsäuren von der Proteinlösung abzutrennen, wurde anschließend bei 5.500 g und 4°C für mindestens 1 Stunde zentrifugiert.

7.8.5 Reinigung der rekombinanten Proteine ohne His-Tag

7.8.5.1 Ammoniumsulfatpräzipitation

Durch Ammoniumsulfat lassen sich Proteine aus Lösungen schonend ausfällen. Ammoniumsulfat schützt die biologische Aktivität der Proteine und lässt sich leicht wieder von den Proteinen trennen (siehe 7.4). Da die Löslichkeit der Proteine von der Salzkonzentration abhängig ist, können die Proteine durch schrittweise Zugabe des Ammoniumsulfates fraktioniert ausgefällt werden. Zur Präzipitation wurde die Proteinlösung mit steigenden Mengen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (in der Regel 20-80%) versetzt, zur vollständigen Fällung auf Eis 20 min gerührt und anschließend bei 4°C und 4.332 g für 20 min abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in einem Volumen 1 x PBS resuspendiert und der Überstand solange weiter ausgesalzt, bis ein dunkelrotes Pellet vorlag. Es wurde nach der Ammoniumsulfattabelle aus "Methods of Enzymology" (Deutscher, 1990) präzipitiert. Das Pellet mit der höchsten Konzentration des gewünschten Proteins wurde mit Hilfe von Zentrifugenfiltereinheiten entsalzt und aufkonzentriert (siehe 7.4).

7.8.5.2 Anionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf Wechselwirkungen geladener Ionen. In basischem Milieu treten Proteine aufgrund der negativen Ladungen der Aspartat- und Glutamatseitenketten als Anionen auf, welche an die positiv geladene funktionelle Gruppe der Ionenaustauscher-Matrix binden. Je stärker das Protein geladen ist, desto größer ist auch seine Affinität zum Ionenaustauscher. In einem zweiten Schritt kommt es durch Zugabe steigender Salzkonzentrationen zu einer Elution des gebundenen Proteins. Fest gebundene Proteine werden dabei zunächst zurückgehalten und erst bei hohen Ionenstärken von der Matrix verdrängt.

Zur Reinigung der Proteine wurde eine Flüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt, als Trägermaterial diente dabei DEAE-Sepharose (Diethylaminoethylsepharose) mit der funktionellen Gruppe $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^{\oplus}\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$. Vor Verwendung wurde die mit DEAE-Sepharose gefüllte Säule mit Tris-HCl (20 mM, pH 8,5, filtriert) äquilibriert. Die auf 4-8 ml Volumen eingeeengte und entsalzte Proteinprobe wurde auf die Säule aufgetragen und mit gradueller Erhöhung der NaCl-Konzentration (0-1 M in 20 mM Tris-HCl, pH 8,5, filtriert) eluiert. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde auf 0,5 ml Puffer/min eingestellt und ein Fraktionssammler (6 min/Fraktion) an die Säule angeschlossen. Vor dem Fraktionssammler befindet sich ein Photometer, welches die Absorption des Eluates misst. Über einen angeschlossenen Computer kann der Verlauf der Absorption in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt, und so eine Aussage über die Proteinkonzentration getroffen werden. Des Weiteren kann über den Computer ein Elutionsprofil erstellt werden. Im Anschluss an den Säulenlauf

wurde die Reinheit der globinhaltigen Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft (siehe 7.5). Fraktionen, die ein angemessenes Verhältnis von Globin zu Restproteinen hatten, wurden vereinigt und auf ein Volumen von 1-2 ml eingeeengt (siehe 7.4).

7.8.5.3 Gelfiltrationschromatographie

Um das gewünschte Protein in reiner Form zu erhalten, wurde nach der DEAE-Säule eine Gelfiltrationschromatographie angeschlossen, bei der die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Größenfraktionierung). Die Gelfiltrationsmatrix wird dabei von kleinen porösen Kügelchen eines Kohlenhydratpolymers gebildet. Kleine Moleküle können in die Poren eindringen, wohingegen größeren nur das wässrige Medium zwischen den Kügelchen zur Verfügung steht. Dies führt dazu, dass große Proteine die Säule schneller passieren können als kleine Proteine, die eine weitere Wegstrecke zurücklegen müssen.

Die Gelfiltration wurde mit einer "High Load™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade" Säule der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Säule wurde mit 20 mM Tris-HCl (pH 8,5, filtriert) äquilibriert. Nach Auftragen der Probe wurde mit dem gleichen Puffer in einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert und 80 Fraktionen (6 min/Fraktion) aufgefangen. Die Absorption des Eluates wurde mit Hilfe eines eingebauten Photometers bestimmt und über einen Schreiber wiedergegeben. Im Anschluss wurde die Reinheit der Proben bestimmt (siehe 7.5) und ihre Konzentration gemessen (siehe 7.2).

7.8.6 Reinigung von rekombinanten Proteinen mit His-Tag

Rekombinant exprimierte Proteine mit His-Tag wurden mit Hilfe einer Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt ("Protino® Ni 2000 prepacked columns", Macherey und Nagel, Düren). Hierbei bindet ein Chelatligand der Silikat-Matrix der Säule an fünf Koordinationsstellen eines Ni²⁺-Ions. Der Histidin-Tag des rekombinanten Proteins wird von der sechsten Koordinationsstelle des Nickel-Ions gebunden und kann nach verschiedenen Waschschritten mit einem Imidazol-Puffer eluiert werden. Für die rekombinante Expression von Proteinen mit His-Tag wurde der pET-15b-Vektor (Novagen, Darmstadt) in BL21 (DE3)pLys Bakterien (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Nach Anzucht der Bakterien (siehe 7.8.2) wurden diese pelletiert und in 1 x LEW-Puffer (Macherey und Nagel, Düren) resuspendiert. Die weitere Aufreinigung des Proteins erfolgte nach Angaben des Herstellers.

C Ergebnisse

1 Identifikation von neuartigen Fischglobinen

1.1 Globin X

Mit Hilfe von Datenbanksuchen nach neuroglobinähnlichen Sequenzen konnte zu Beginn meiner Arbeit ein neuartiges Globin identifiziert werden, welches lediglich in Fischen und Amphibien präsent ist. In den DNA-Sequenzen anderer Vertebraten (Amnioten) konnten keine orthologen Gene nachgewiesen werden. Da über Funktion und Vorkommen des Globins zunächst nichts bekannt war, bekam es den vorläufigen Namen "Globin X" (GbX).

1.1.1 Molekulare Charakterisierung von Globin X

In den NCBI-Datenbanken konnten partielle Sequenzen der cDNA des Globin X-Gens für die Fische *Danio rerio* (Zebrafisch), *Tetraodon nigroviridis* (Grüner Kugelfisch) und *Tetraodon rubripes* (Japanischer Kugelfisch) identifiziert werden. Des Weiteren lagen Teile der genomischen Sequenz des Globin X-Gens des Grünen Kugelfisches vor. Ziel war es, diese Sequenz zu vervollständigen und Aussagen über die Globin X-cDNA verschiedener Fische zu treffen.

1.1.1.1 Genomische Sequenz für Globin X des *Tetraodon nigroviridis*

Nach Alinierung der in den Datenbanken vorhandenen genomischen Teilsequenzen von *T. nigroviridis* war ersichtlich, dass die DNA-Sequenz für Globin X etwa 4.700 bp lang ist. Da Fragmente dieser Größe nur schwer zu klonieren sind, wurden die Primer so gewählt, dass zwei Teilsequenzen (2.427 bp für den 5'-Bereich und 2.332 bp für den 3'-Bereich) mit Überlappung (133 bp) durch PCR amplifiziert werden konnten (für die Lage der Primer siehe Anhang G6.1.7). Beide Fragmente wurden kloniert und die Sequenz durch mehrfaches Sequenzieren mit verschiedenen Primern verifiziert. Nach Zusammenfügen der Teilsequenzen konnten zwei sehr ähnliche Sequenzen identifiziert werden. Aufgrund der hohen Identität (98%) der beiden genomischen Sequenzen handelt es sich vermutlich um zwei verschiedene Allele des Globin X-Gens. Vom Startcodon ATG bis zum Stopcodon beträgt die Länge der genomischen Sequenz 4.301 bp (Allel 1) bzw. 4.302 bp (Allel 2). Aus Datenbank Einträgen kann die Länge des Globin X-Gens bei *T. rubripes* und *D. rerio* auf mindestens 4.390 bp bzw. 47.200 bp geschätzt werden, weshalb auf die Klonierung der genomischen Sequenz des Zebrafisches verzichtet wurde.

Ein Alignment der genomischen Sequenzen mit der entsprechenden cDNA (siehe Anhang G6.1.7) zeigt, dass der kodierende Bereich des Globin X auf fünf Exons aufgeteilt ist, der von vier Introns unterbrochen wird. Hierbei sind die beiden Introns B12.2 (zwischen der 2. und 3. Base des 12. Codons in der B-Helix) und G7.0, die in allen Vertebratenglobinen zu finden sind, konserviert. Zusätzlich finden sich in den genomischen Globin X-Sequenzen noch zwei weitere Introns an den Positionen E10.2 und H11.0. Abbildung C 1 veranschaulicht die Länge und Lage der Exons und Introns. Ein komplettes Alignment der genomischen Sequenz des Globin X-Gens von *T. nigroviridis* befindet sich im Anhang (siehe G6.1.7).

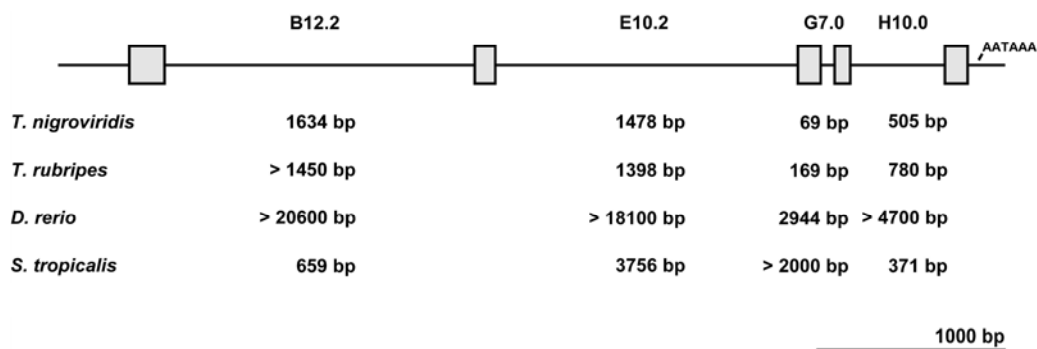


Abb. C 1: Genomische Struktur der Globin X-Gene

Dargestellt sind in grau die Exons und als Linie die Introns, deren Position in der Globinstruktur angegeben ist (B12.2 bedeutet nach der 2. Base des 12. Codons der B-Helix). Der Größenstandard bezieht sich auf das Globin X-Gen von *T. nigroviridis*. > = Mindestgröße der jeweiligen Introns, die exakte Länge kann aufgrund der zum Teil nicht bekannten Genomsequenzen nicht angegeben werden. *T. nigroviridis* = Grüner Kugelfisch, *T. rubripes* = Japanischer Kugelfisch, *D. rerio* = Zebraquarienfisch, *S. tropicalis* = *Silurana tropicalis* = Krallenfrosch (Roesner et al., 2005).

1.1.1.2 Kodierende Sequenz für Globin X

Die cDNA-Sequenzen für Globin X der Fische *D. rerio*, *Carassius auratus* (Goldfisch) und *T. nigroviridis* wurden durch RT-PCR aus Gesamt-RNA amplifiziert. Hierzu wurden die Primer basierend auf der jeweiligen Sequenz aus der Datenbank gewählt. Zur Amplifikation der Globin X-Sequenz des Goldfisches wurden aufgrund der nahen Verwandtschaft die gleichen Primer wie beim Zebraquarienfisch verwendet. Die Identifikation der Globin X-cDNA des Krallenfrosches *Silurana (Xenopus) tropicalis* erfolgte am Institut für Molekulargenetik, Universität Mainz. Nach Klonierung in Standardvektoren und Sequenzierung wurde ein Alignment erstellt (Abb. C 2). Der kodierende Bereich des Globin X-Gens bei *T. nigroviridis* beträgt 618 bp, während der der anderen Globin X-Gene nur 603 bp lang ist.

```

*          20          *          40          *          60          *          80
TniGbX : ATGGGCTGCGCGATATCAAGCTCTGGCGCAAAAGCGGAGTGGAGACAGAGCCAGAGGAGGAGACCGAGCTGCTCC : 80
DreGbX : ATGGGCTGCGCTATTTCCGGCTCCGCACTGACAGCGGAGCCCGGAGATCAGACCCCGGAGGAGAGACTCCGGCGGG : 80
CauGbX : ATGGGCTGCGCTATTTCCGGCTCCGCACTGACAGCGGAGCCCGGAGATCAGACCCCGGAGGAGAGACTCCGGCGGG : 80
XtrGbX : ATGGGCTGCTATCCATATCCAGCTTGGGCTGCAATGGAGAGAC---TCACAGAC---CACACAGAACCTCACCTTTGTT : 74

*          100         *          120         *          140         *          160
TniGbX : TGCTGCTGCGGTTGGTATCCAGACAAGATCAGATTGAGATCATCAAAGACTCTGGAAAGTTATCCGGGATGACATCG : 160
DreGbX : A-----CTCACCACCAATCATCCGCCCTCATCAAAGAGTCTGGAGGCTCATTCAGAGGACATCG : 142
CauGbX : A-----CTCACCACCAATCATCCGCCCTCATCAAAGAGTCTGGAGGCTCATTCAGAGGACATCG : 142
XtrGbX : G-----CAACCCTTAACCTCTCAGCAGCAGCAACTACTTGTGAGTCCCTGGAGGCTGATTTCAGCACGACATCG : 148

*          180         *          200         *          220         *          240
TniGbX : CCAAAGTTGGGATATATTTGTTTCGTTAGGTTGTTTCGAGACTCATCCGAAATGCAAAGACGTCCTTCTTCTCTTCGAGAT : 240
DreGbX : CCAAAGTGGGCATCATCATGTTTCGTTAGGTTGTTTCGAGACTCATCCAGACTGTAAGAGATGTTTCTTCTCTTTCGGGAC : 222
CauGbX : CCAAAGTGGGCATCATCATGTTTCGTTAGGTTGTTTCGAGACTCATCCAGACTGTAAGAGATGTTTCTTCTCTTTCGGGAC : 222
XtrGbX : CCAAAGTGGGGTATATCTTTCGTTAGGTTGTTTCGAGACTCACCCGAGTGCAAAGATGTCCTTCTTCTCTTCGGGAT : 228

*          260         *          280         *          300         *          320
TniGbX : GTGGAGGACCTGGAGAGGTTGGCGGAGCAGCCTGAGCTCAGGCGCCACGGCCTGCGGGTGTGATGTCCTTTATTGAGAAAAG : 320
DreGbX : GTGGAGGACCTGGAGAGGCTGCGCACAAAGCAGAGGCTTCGAGCCACGGCCTGCGGTGTGATGTCCTTTATTGAGAAAGAG : 302
CauGbX : GTGGAGGACCTGGAGAGGCTGCGCACAAAGCAGAGGCTTCGAGCCACGGCCTGCGGTGTGATGTCCTTTATTGAGAAAGAG : 302
XtrGbX : GTGGATCATTTGAGGACCTCAGGGCAAAACAAGGATCTAAGGCTCATGGGCTGAGGGTCTGTCTTTCGAGGAGAGAG : 308

*          340         *          360         *          380         *          400
TniGbX : CGTGGCGAGGCTGACAGCAGCAGCAGCGGCTGGAAAGCTCTGGCTGTGGAGCTGGGAAAAGCCATTAATCACTACAAAGCTC : 400
DreGbX : TGTGGCCAGACTGATCAGCTGGAGCGTTTAGAGACTCTGGGCTGGAACTGGGAAAGCCACTACAGATACAAAGCTC : 382
CauGbX : TGTGGCCAGACTGATCAGCTGGAGCGTTTAGAGACTCTGGGCTGGAACTGGGAAAGCCACTACAGATATAAAGCTC : 382
XtrGbX : CGTTCGCCGATACAGACTGCGCTCGTCTGGAAGAACTGGCCTGGAGCTTGGCAGAGCCACTACAGATACAAATGCTC : 388

*          420         *          440         *          460         *          480
TniGbX : CACCCAAAGTATTACAGCTATGTCGGAGCTGAATTCATCTGTGCCGTGCAGCCCATCCTCAAGGACAGGTTACATCCGAG : 480
DreGbX : CACCCAAAGTATTACGGGTATGTAAGGAGCTGAGTTTATCTGTGGGGTACGGCCGATCCTTAAAGGACAGATGGACTCCTGAA : 462
CauGbX : CACCCAAAGTATTACGGGTATGTAAGGAGCTGAGTTTATCTGTGGGGTACGGCCGATCCTTAAAGGACAGATGGACTCCTGAA : 462
XtrGbX : CTCCAGATATTACAGCTATGTTGGAACTGAGTTTATCTGTGCTGTCTGCCCATGTTGCATGACAAATGGACACGGGAA : 468

*          500         *          520         *          540         *          560
TniGbX : CTGGAGGAGGCTGGAAAGACCTTGTTCACGTACCTGACCGGGCTGATGACGAAGGGCCACAGGAGGAG---GCCAGCGG : 557
DreGbX : CTGGAGGAGGCTGGAAAGACTCTGTTCCAGTACCTGACCTCCATCATGACAGAGGGATTTCTGGAGGAAAGAAACAA : 542
CauGbX : CTGGAAAGGCTGGAAAGACTCTGTTCCAGTACCTGACCTCCATCATGACAGAGGGATTTCTGGAGGAAAGAAACAA : 542
XtrGbX : CTGGAGGAGGCTGGAAAGGCTGTTTGCATATATCTGCAAGTGTGAGGAGAGGATACCAAGGAAAGAG-----AG : 542

*          580         *          600         *          620
TniGbX : ACAGCCCACTAGCGCTGCCCGGAGGAGCGCCAGAGAAAGAGACCAAGCGCCCTGTAG : 618
DreGbX : ACAGCAACACACAGAGCTCCAGCAGAGAGCCACCAACAAAGAGGAGCAAGCCATCTGA : 603
CauGbX : ACAGCAACACACAGAGCTCCAGCAGAGAGCCACCAACAAAGAGGAGCAAGCCATCTGA : 603
XtrGbX : CGGGCAGATGATGGGAGGAGCTGATCCGATGGGCTACAGGGGAATTAAGATTATATAA : 603

```

Abb. C 2: cDNA-Sequenz für Globin X

Dargestellt ist ein Alignment der cDNA für Globin X des Kugelfisches (TniGbX), des Zebraäbrblings (DreGbX), des Goldfisches (CauGbX) und des Krallenfrosches (XtrGbX).

Nach Translation ergibt sich für den Kugelfisch *T. nigroviridis* ein Protein mit 205 Aminosäuren und einer errechneten molekularen Masse von 23,4 kDa (Abb. C 3), während das der Karpfenfische (DreGbX, CauGbX) und des Krallenfrosches (XtrGbX) lediglich 200 Aminosäuren und eine errechnete molekulare Masse von jeweils 23,1 kDa aufweist. Ein Vergleich der Globin X-Aminosäuresequenzen mit anderen Globinen zeigt, dass die typische Globinstruktur mit 140 bis 150 Aminosäuren und den acht α -Helices A bis H konserviert ist. Durch Verlängerungen am N-Terminus (24 Aminosäuren im Vergleich mit dem Neuroglobin des Zebraäbrblings) und C-Terminus (17 Aminosäuren) ist das Globin X der Fische und Amphibien größer als typische Globine der Vertebraten. Die für die Sauerstoffbindung wichtigen Aminosäuren wie das proximale und das distale Histidin an den Positionen E7 und F8 sind genauso konserviert wie das Phenylalanin CD1.

```

TniGbX : MGCATISLCAKA*EFGDRSAEEED*AAAAAAVVYPREDQIQMIKDSW*KVIRDDIAKVGII*MFVRLFETHPECKDVFFLFRD : 80
DreGbX : MGCATISGSLTAGAPEIRPGE*ETPAG-----LTTNHIRLIKESWRLIQE*DIKVGII*MFVRLFETHPECKDVFFLFRD : 74
CauGbX : MGCATISGSLTARAPETRAGE*ETPAG-----LTANHIRLIKESWRLTQE*DIKVGII*MFVRLFETHPECKDVFFLFRD : 74
XtrGbX : MGCILISLLEWQWRD-SLD-HT*ETSPLL--PTLNLS*EQQQQLLVESWRLIQE*DIKVGVI*LFVRLFETHPECKDVFFLFRD : 76

TniGbX : VEDLERLRSSRELRAH*G*LRVMSFIEKSVARLDQODRLEALAVELGKSHY*RYNAPPKYYSYVGA*EFFICAV*OPILKERFTSE : 160
DreGbX : VEDLERLRRTSRELRAHGLRVMSFIEKSVARLDQLERLETLAELGKSHYRYNAPPKYVGYVGAEFFICAVRPI*LKDRWTPE : 154
CauGbX : VEDLERLRRTSRELRAHGLRVMSFIEKSVARLDQLERLETLAELGKSHYRYNAPPKYVGYVGAEFFICAVRPI*LKDRWTPE : 154
XtrGbX : VDDLQALRANKDLRAHGLRVLSFV*EKSVAR*IADCARLELAL*ELGKSHYRYNAPP*RYVGYVGL*EFISAVCPMLHDKWTPE : 156

TniGbX : LEEAWKTLFQYVVTGLMRK*CHQEE*-GSRQRHLALPPKDGPEKRTSAL : 205
DreGbX : LEEAWKTLFQYVTSIMREGFL*EEERNKRSNTQTSSRERPKRSTAI : 200
CauGbX : LEEAWKTLFQYVTSIMREGFL*EEERNKRSNTQTSSRERPKRSTAI : 200
XtrGbX : VEEAWKGLFAMICTVMER*GYOEE*--RRHSDGRSLIDGLQGNKGLI : 200

```

Abb. C 3: Aminosäuresequenz für Globin X

Vergleich der Aminosäuresequenzen des Globin X von Kugelfisch (TniGbX), Zebrabärbling (DreGbX), Goldfisch (CauGbX) und Krallenfrosch (XtrGbX). Konservierte Aminosäuren sind schwarz markiert. Die zur Häm-Bindung benötigten Histidine E7 und F8 sowie das Phenylalanin CD1 sind farbig hervorgehoben.

1.1.1.3 Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse

Die Identität der Aminosäuresequenz von Globin X des Kugelfisches *T. nigroviridis* mit den Sequenzen der Karpfenfische (*D. rerio* und *C. auratus*) beträgt jeweils 68,8%. Bezieht man die isofunktionellen Aminosäureaustausche mit ein, ergibt sich eine Ähnlichkeit von 89% (basierend auf einer PAM 250 Matrix). Die Identität zwischen Fisch- und Amphibien-Globin X beträgt 54,5% bis 59,4%. 98 Aminosäuren sind in allen vier Globin X-Sequenzen strikt konserviert, wobei 90 davon in der 140 Aminosäuren langen Globindomäne zu finden sind. Wenn man davon ausgeht, dass die Trennung von Teleostiern (Höhere Knochenfische) und Tetrapoden vor 420 Millionen Jahren erfolgte und die Abspaltung der Cypriniden (Karpfenartige) von den percomorphen Kugelfischen vor 120 Millionen Jahren stattfand (Benton, 1990; Wittbrodt et al., 2002), ergibt sich innerhalb der Fische eine Substitutionsrate von $1,65 \cdot 10^{-9}$ Aminosäuresubstitutionen pro Position und Jahr. Vergleicht man Fische und Amphibien miteinander, beträgt die Substitutionsrate $0,63 \cdot 10^{-9}$ Aminosäuren pro Position und Jahr. Reduziert man diese Vergleiche ausschließlich auf die Globindomäne, halbiert sich die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position und Jahr auf $0,72 \cdot 10^{-9}$ innerhalb der Fische und $0,31 \cdot 10^{-9}$ im Vergleich der Globin X-Domänen von Fischen und Amphibien.

Um eine Aussage über den Selektionsdruck zu erhalten, wurde das Verhältnis der synonymen zu den nichtsynonymen Nukleotidaustauschen (ds/dn-Verhältnis) berechnet (Tabelle C 1). In Fischen liegt für die kodierende Sequenz des Globin X das ds/dn-Verhältnis zwischen 5,2 und 10,5, während in der Globindomäne eine geringere Anzahl an nichtsynonymen Austauschen auftritt. Somit ist für die Globindomäne das ds/dn-Verhältnis (8,4 bis 34,9) deutlich größer als in der gesamten kodierenden Sequenz.

Tabelle C 1: Mittlere Substitutionsraten in ausgewählten Fischglobinen

Die Evolutionsrate der Aminosäuren wurde nach dem PAM-Modell (Dayhoff et al., 1978) unter der Voraussetzung berechnet, dass sich die Linien der Ostariophysi (Zebraquariabläher, Goldfisch) und der Acanthopterygii (Kugelfische) vor 120 Millionen Jahren aufgespalten haben. Nichtsynonyme (dn) und synonyme (ds) Nukleotidsubstitutionen wurden nach Ota und Nei (1994) berechnet. Angegeben sind jeweils die Substitutionen pro Position und Jahr (verändert nach Roesner et al., 2005).

	Substitutionsraten ($\times 10^{-9}$)			
	Aminosäuren	dn	ds	ds/dn
Globin X	1,65	0,88	8,21	9,6
Globin X-Domäne	0,72	0,38	11,00	28,6
Neuroglobin	0,95	0,46	9,69	21,3
Cytoglobin	3,09	1,67	5,61	3,4
Hämoglobin α	4,02	2,13	6,00	2,8
Hämoglobin β	2,12	1,29	4,95	3,9
Myoglobin	1,55	0,75	5,25	7,0

Ein Vergleich der Globin X-Aminosäuresequenzen mit ausgewählten Globinsequenzen verschiedener Vertebraten und Invertebraten verdeutlicht, dass die größte Identität mit den Neuroglobinen der Vertebraten vorliegt (26% bis 34,6%). Die Übereinstimmung mit anderen Globinen ist deutlich geringer; so sind nur 15% bis 25% der Aminosäuren der Vertebraten-Hämoglobine, 18% bis 26% der Vertebraten-Myoglobine und 22% bis 26% der Aminosäuren der Cytoglobine in Globin X konserviert.

Bei den phylogenetischen Analysen wurden verschiedene Stammbäume mit Hilfe der Neighbor-Joining- und der Bayes'schen Methode berechnet. Aufgrund der hohen Divergenz von Pflanzen-, Pilz- und Bakterioglobinen konnten diese nicht als Außengruppe eines Metazoen-Stammbaumes gewählt werden. In einem radiären Phylogramm gruppieren die Globin X-Proteine mit den Neuroglobinen der Vertebraten, den intrazellulären Globinen der Invertebraten (*Glycera*-Hämoglobin und Nerven-Myoglobin von *Aphrodite*) und den Hämoglobinen von *Ciona intestinalis*. Die Monophylie dieses Astes (Abb. C 4, Verzweigung A) wird lediglich durch sehr geringe Bootstrap-Werte von 43% bis 48% und mäßige Bayes'sche Wahrscheinlichkeiten (0,83 und 0,78) unterstützt, konnte jedoch durch verschiedene andere phylogenetische Analysen ebenfalls nachgewiesen werden. Diese Globine (Verzweigung A) separieren sich dabei von den Protostomierglobinen der Anneliden und Arthropoden (Verzweigung C) und den anderen Vertebratenglobinen, in denen die Hämoglobin α - und β -Ketten, die Myoglobine und die Cytoglobine der Gnathostomata (Kiefermäuler) sowie die Hämoglobine der Agnathen (Kieferlose) zu finden sind (Knoten B).

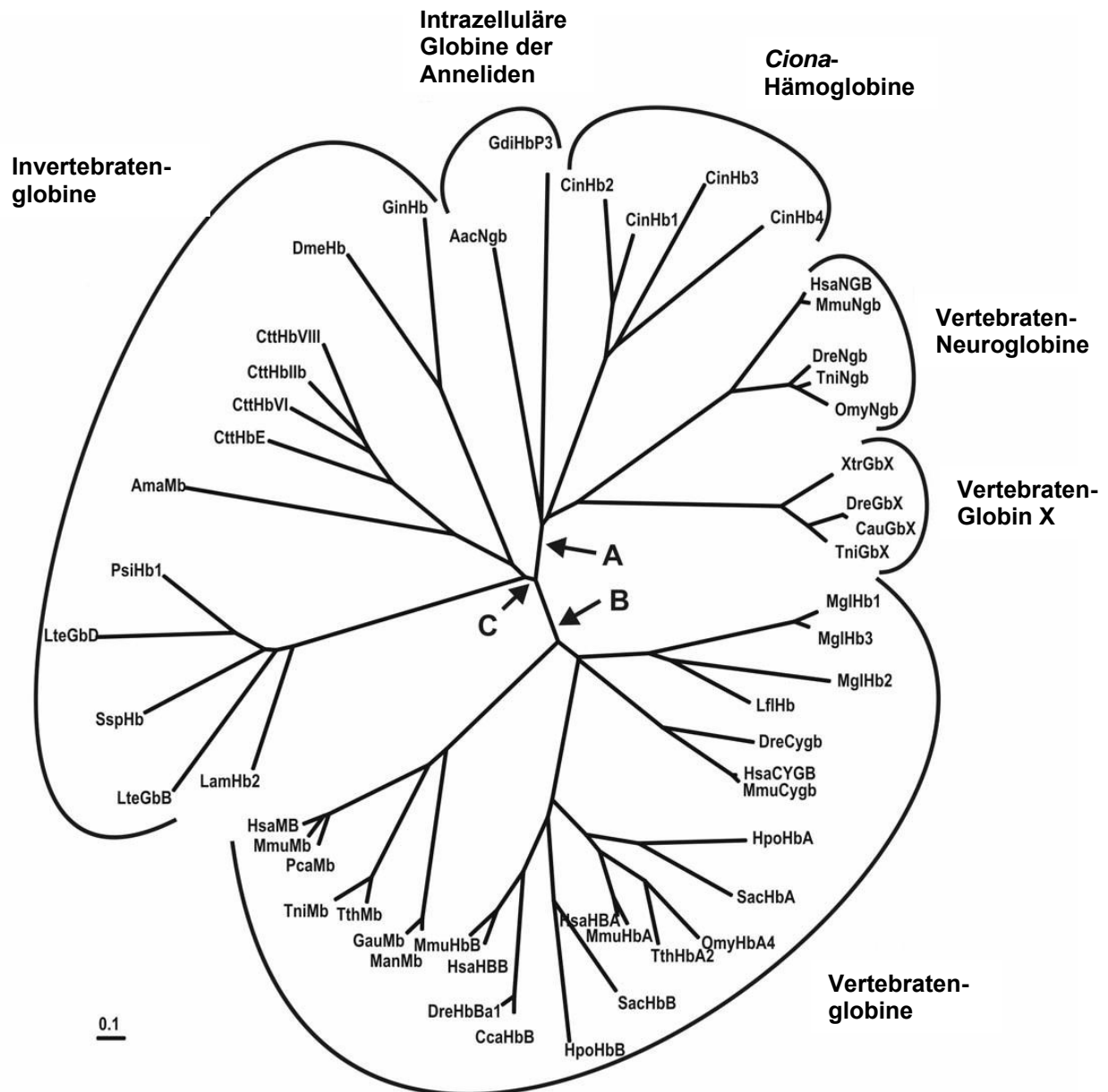


Abb. C 4: Neighbor-Joining Stammbaum der Globine im Tierreich

Der Stammbaum basiert auf einer WAG Substitutions-Matrix mit Gamma-Korrektur. Neighbor-Joining Bootstrapping Werte für Verzweigung A sind 43% (PAM-Modell) und 48% (WAG-Modell), für B 68% / 73% und für C 37% / 33%. Bayes'sche Wahrscheinlichkeiten sind für A 0,83 (PAM-Modell) und 0,78 (WAG-Modell), für B 1,00 / 1,00 und für C 0,58 / 0,48. Cygb = Cytoglobin, GbX = Globin X, Hb = Hämoglobin, Mb = Myoglobin, Ngb = Neuroglobin, Abkürzungen der Tiernamen siehe Anhang (G7.1) (verändert nach Roesner et al., 2005).

1.1.1.4 Expression von Globin X-mRNA

Zur Untersuchung der Globin X mRNA-Expression in verschiedenen Geweben wurde aus neun Organen eines adulten Goldfisches Gesamt-RNA isoliert. Mit Hilfe zweier Primerpaare wurde durch RT-PCR die Globin X-cDNA amplifiziert. Zur Kontrolle der PCR und der Qualität der RNA wurde eine RT-PCR für β -Actin durchgeführt, welches in allen Geweben exprimiert wird. Schwache Globin X-Signale konnten in Kieme, Muskel, Herz, Darm, Niere, Milz und Leber des Goldfisches detektiert werden, jedoch nicht in Hirn und Auge (Abb. C 5). Da es sich hierbei nur um eine semi-quantitative Expressionsanalyse handelt, kann kein direkter Rückschluss auf die Stärke der Expression in verschiedenen Geweben gezogen werden, allerdings lässt sich sagen, dass Globin X-mRNA in allen Geweben relativ gering exprimiert wird. Dies wird gestützt durch die Anzahl an Einträgen in EST-Datenbanken des Zebraärbflings. Eine Blast-Suche in EST-Datenbanken ergab bei 1.157.650 Einträgen (Januar 2007) lediglich vier Übereinstimmungen mit der Globin X-Sequenz, während für Neuroglobin 21, für Cytoglobin 57 und für Myoglobin ebenso wie für die Hämoglobine jeweils mehrere hundert Sequenzen gefunden wurden.

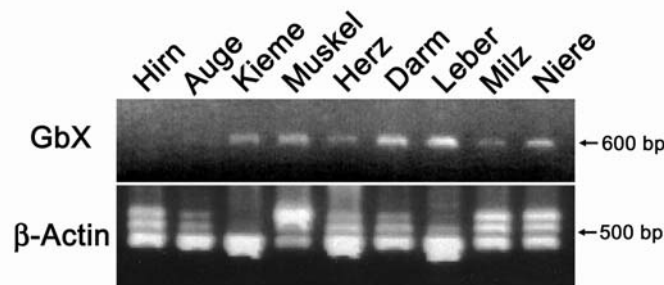


Abb. C 5: Expressionsanalyse von Globin X-mRNA

RNA wurden von den angegebenen Geweben des Goldfisches isoliert und die Expression von Globin X-mRNA durch RT-PCR bestimmt. β -Actin diente als Kontrolle für Konzentration und Qualität der RNA, verschiedene Bandengrößen von β -Actin resultieren aus verschiedenen gewebespezifischen Isoformen (verändert nach Roesner et al., 2005).

Mit Hilfe einer quantitativen real-time PCR (siehe B6) gelang es, Globin X-mRNA in sehr schwacher Konzentration auch in Hirn und Auge des Zebraärbfling nachzuweisen, allerdings ist das Expressionsniveau hier deutlich niedriger als im Gesamtfisch (Abb. C 6 A). Ein Vergleich mit Neuroglobin ergab, dass die mRNA-Menge von Globin X im Auge nur 4% und im Hirn lediglich 2% der Neuroglobin-Konzentration beträgt (Abb. C 6 B).

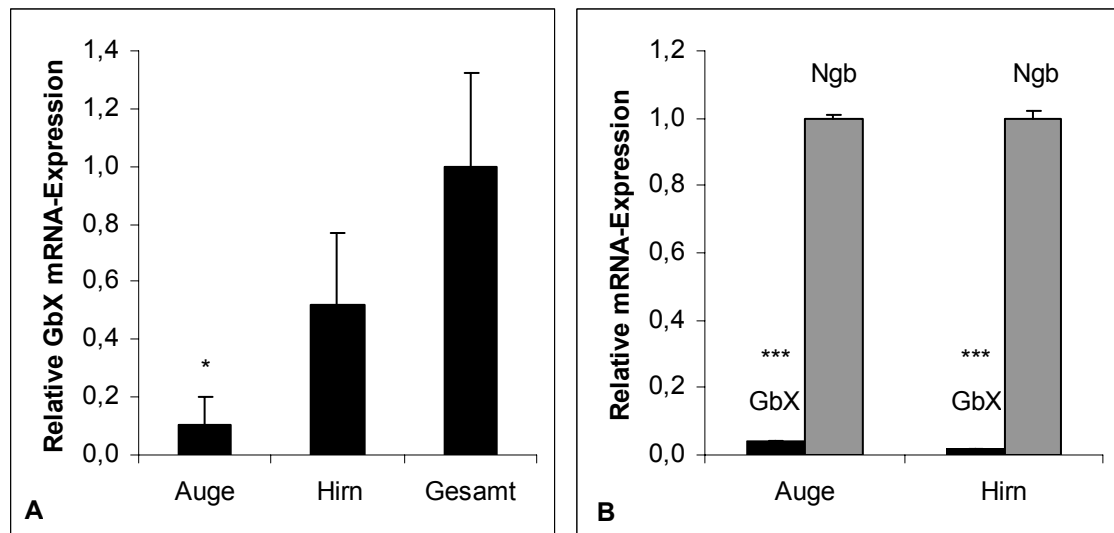


Abb. C 6: Expressionsanalyse von Globin X-mRNA durch quantitative real-time PCR

A: Durch quantitative real-time PCR konnte Globin X-mRNA in schwachen Konzentrationen auch in Hirn und Auge des Zebrafährblings nachgewiesen werden. Es wurde auf die Konzentration an Globin X im Gesamtfisch normalisiert. B: Ein Vergleich der Expressionsniveau von Globin X (schwarze Balken) und Neuroglobin (graue Balken) verdeutlicht, dass es sich bei Globin X nicht um ein neuronales Protein handelt. N = 4, *** P < 0,001, * P < 0,05.

Ferner konnte gezeigt werden, dass Globin X-mRNA im Zebrafährbling entwicklungsabhängig exprimiert wird. Experimente an verschiedenen Individuen einer Zuchtgruppe zeigten, dass sich bei adulten Tieren innerhalb von fünf Monaten das Expressionsniveau von Globin X-mRNA im Gesamtfisch mehr als verzehnfachte (Abb. C 7).

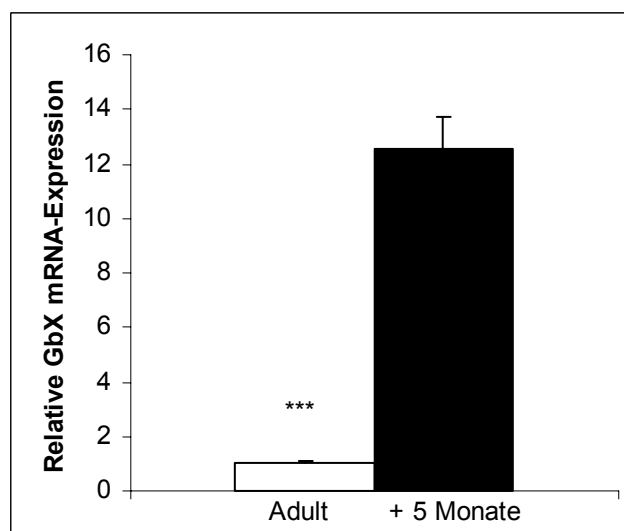


Abb. C 7: Entwicklungsabhängige Expression von Globin X-mRNA

Ein Vergleich der Expression von Globin X-mRNA in adulten Zebrafährblingen verschiedener Entwicklungsstufen ergab für die älteren Individuen (schwarzer Balken, N = 4) eine mehr als 10-fach erhöhte Globin X-Konzentration. *** P < 0,001.

1.1.2 Proteinbiochemische Charakterisierung von Globin X

Um Aussagen über proteinbiochemische und biophysikalische Eigenschaften von Globin X treffen zu können, wurde das Protein rekombinant in *E. coli* Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Das gereinigte Protein wurde zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern (siehe B7.7) verwendet, mit denen Aussagen über die Lokalisation des Proteins im Fisch getroffen werden sollten. Des Weiteren stand das Protein für verschiedene Experimente zur biophysikalischen Charakterisierung zur Verfügung.

1.1.2.1 Rekombinante Expression von Globin X des Zebrafischlings

Globin X besitzt, wie bereits beschrieben, im Vergleich zu andern Globinen Verlängerungen am N- und C-Terminus. Aus früheren Expressionsversuchen war bekannt, dass N- und C-terminale Verlängerungen die Expression und das Aufreinigungsverhalten der Globine verändern können. So bewirken zusätzliche Aminosäuren an der A- oder H-Helix bei der Expression *in vitro* häufig eine Konformationsänderung, was darin resultiert, dass das Globin keine Häm-Gruppe und somit auch keinen Sauerstoff mehr binden kann. Zudem werden Globine mit N- und C-terminalen Verlängerungen häufig in "Inclusion Bodies" (Einschlußkörpern) exprimiert und sind nur sehr schwer in nativer Form aufzureinigen. Aus diesem Grund wurde ein Klon konstruiert, der nicht die komplette kodierende Sequenz, sondern nur die Globindomäne des Globin X exprimiert. Diesem Klon (Globin X Δ NC) fehlen N-terminal 24 Aminosäuren, der C-Terminus wurde um 16 Aminosäuren verkürzt und die letzte Aminosäure durch ein Stopcodon ersetzt. Abbildung C 8 verdeutlicht den Unterschied der Aminosäurestrukturen von Globin X (23,1 kDa) und Globin X Δ NC (19,1 kDa). Die Sequenz von *Danio rerio* Globin X Δ NC wurde mittels einer PCR auf einem Globin X-Plasmid amplifiziert, in den Expressionsvektor pET-3a ligiert und in *E. coli* Bakterien exprimiert.

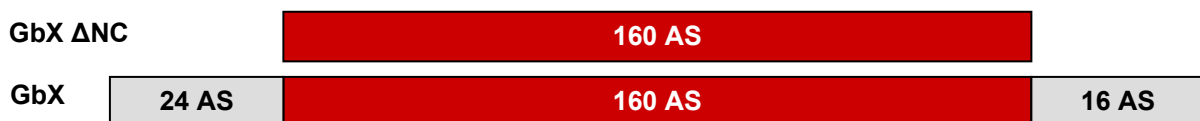


Abb. C 8: Vergleich der Aminosäurestruktur von Globin X und Globin X Δ NC

Schematisch dargestellt ist die Aminosäurestruktur von Globin X und Globin X Δ NC des Zebrafischlings. Zur rekombinanten Expression wurde der Klon Globin X Δ NC konstruiert, dem im Vergleich zum nativen Globin X die N- und C-terminalen Verlängerungen fehlen und der lediglich die Globindomäne des Globin X exprimiert.

Durch einen Nukleinsäureverdau wurden die pelletierten Bakterien von DNA- und RNA-Verunreinigungen befreit, die eine weitere Aufreinigung stören würden. Eine Reinigung des Globin X erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustauschchromatographie und Größenfraktionierung. Hierbei konnte das Globin X schrittweise von bakteriellen Proteinen

separiert werden, so dass es abschließend in reiner Form vorlag. Nach jedem Reinigungsschritt wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, um das Verhältnis von Globin zu bakteriellen Proteinen zu bestimmen und so eine Aussage über Reinigungserfolg und Konzentration des Globins treffen zu können. Wie in Abbildung C 9 zu erkennen, gelang es, Globin X Δ NC mit einer molekularen Masse von ca. 17 kDa in sehr reiner Form zu gewinnen. Aus vier Liter Bakterienkultur wurden 20 mg rekombinantes Protein aufgereinigt.

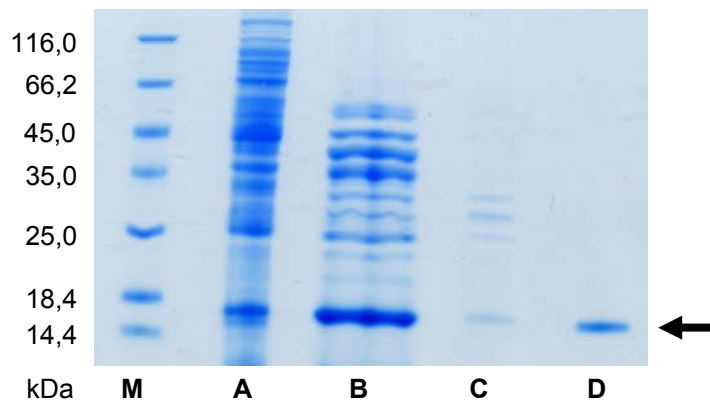


Abb. C 9: Reinigung von rekombinant exprimierten Globin X Δ NC

Globin X Δ NC des Zebrafischblutwurms wurde rekombinant in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. M = Marker, A = Bakterienpellet, B = Ammoniumsulfatpellet (70% und 80%), C = Anionenaustauschchromatographie, D = Größenfraktionierung.

Das rekombinant exprimierte Globin X Δ NC ist in seiner oxygenierten Form rot gefärbt, so dass während der Aufreinigung globinhaltige Fraktionen leicht an der Farbe erkannt werden konnten (Abb. C 10). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass Globin X Δ NC wie andere Globine in der Lage ist, eine Häm-Gruppe und damit Sauerstoff zu binden.

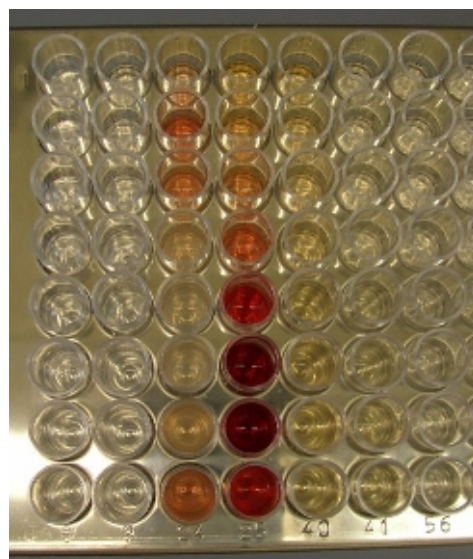


Abb. C 10: Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie von Globin X Δ NC

Fractionen der Anionenaustauschchromatographie, die Globin X Δ NC enthalten, lassen sich durch die rote Farbe des Proteins leicht identifizieren.

1.1.2.2 Absorptionsspektrum von rekombinantem Globin X Δ NC des Zebrafärbings

Globine haben in Abhängigkeit von ihrem Oxygenierungszustand unterschiedliche Absorptionseigenschaften. Von aufgereinigtem Globin X Δ NC wurde zunächst ein Absorptionsspektrum des oxygenierten Proteins aufgenommen. Anschließend wurde der gebundene Sauerstoff mit Natriumdithionit reduziert, um ein Absorptionsspektrum von deoxygeniertem Globin X Δ NC zu erhalten. Abbildung C 11 zeigt deutlich den Unterschied der beiden Spektren. Während oxygeniertes Globin X Δ NC neben dem Maximum bei 415 nm lediglich zwei schwache Nebenmaxima (536 nm und 562 nm) aufweist, zeigt das deoxy-Spektrum neben dem Hauptmaximum bei 428 nm noch zwei weitere Maxima bei 531 nm und 561 nm. Das Spektrum von Globin X ähnelt somit stark dem Spektrum von Neuroglobin (Burmester et al., 2000; Fuchs et al., 2004).

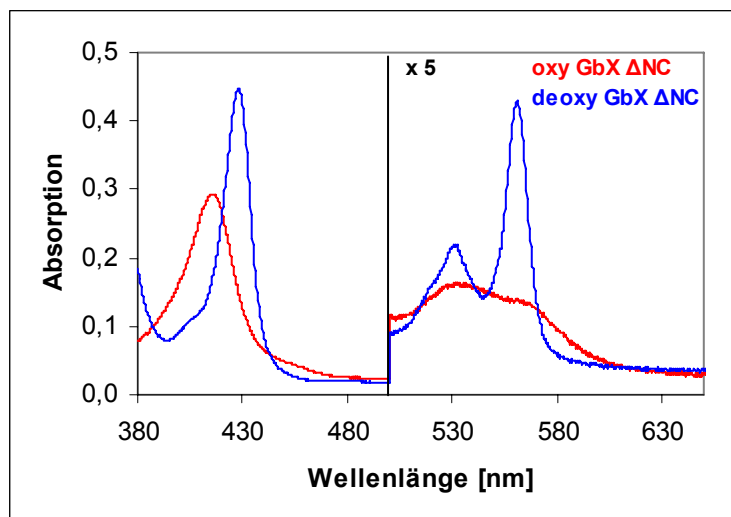


Abb. C 11: Absorptionsspektrum von Globin X Δ NC des Zebrafärbings

1.1.2.3 Sauerstoffaffinität und Hill-Koeffizient von Globin X Δ NC

Mit dem aufgereinigten Globin X Δ NC wurden verschiedene Experimente von einem Kooperationspartner durchgeführt. Die Sauerstoffaffinität (p_{50}) von Globin X Δ NC liegt in Abhängigkeit vom pH-Wert im Bereich von 1 bis 12,5 Torr. In neutralem Milieu ist die Sauerstoffaffinität von Globin X Δ NC höher als im Basischen, was auf einen reversen Bohr-Effekt schließen lässt (Abb. C 12). Der p_{50} -Wert von Globin X Δ NC ist damit deutlich geringer als der für Hämoglobin beobachtete von 26 Torr (McCarthy, 1943). Der Hill-Koeffizient von Globin X Δ NC zwischen 1,2 und 2,3 lässt eine Kooperativität von mehreren Untereinheiten vermuten (Abb. C 12).

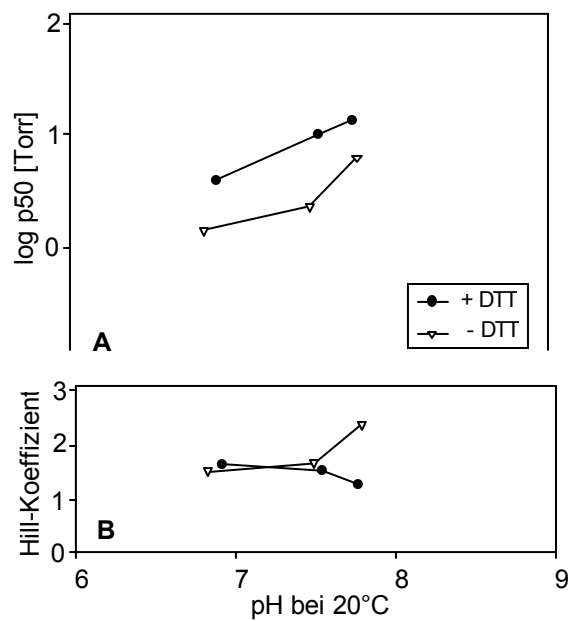


Abb. C 12: Sauerstoffaffinität und Hill-Koeffizient von Globin X Δ NC

Dargestellt sind in A die Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität vom pH-Wert und in B der Hill-Koeffizient von rekombinatem Globin X Δ NC. Die Messungen wurden von einem Kooperationspartner durchgeführt.

1.1.2.4 Expression von Globin X-Protein in unterschiedlichen Geweben

Um die Lokalisierung von Globin X auf Proteinebene untersuchen zu können, wurden zunächst polyklonale Antikörper gegen rekombinantes *Danio rerio* Globin X Δ NC in Kaninchen hergestellt. Aufgrund der hohen Identität von Goldfisch- und Zebraäbrbling-Globin X und der nahen Verwandtschaft der beiden Karpfenfische, konnten die anti-Zebraäbrbling Antikörper für beide Spezies eingesetzt werden. Proteinextrakte aus verschiedenen Geweben eines adulten Goldfisches wurden elektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Als Primärantikörper diente anti-Globin X-Serum aus Kaninchen, welches in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde. Durch einen mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper konnten in allen untersuchten Geweben des Goldfisches (Muskel, Herz, Leber) Signale für Globin X detektiert werden. Die höchste Konzentration an Globin X-Protein liegt im Muskel vor, hier zeigt der Western Blot auch deutlich Banden nicht nur für ein Monomer bei 23 kDa, sondern auch für ein Dimer mit der molekularen Masse von 46 kDa (Abb. C 13).

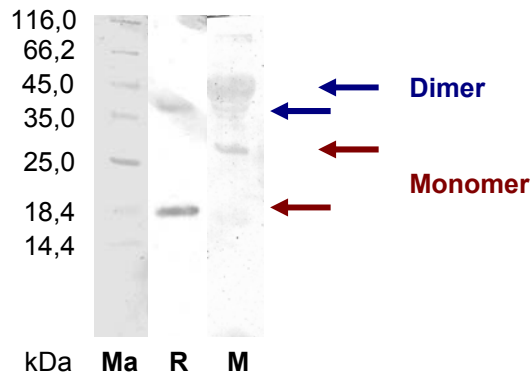


Abb. C 13: Western Blot-Analyse zur Expression von Globin X in Goldfischgewebe
 Proteinextrakte von Goldfischgewebe wurde durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und Globin X mittels eines Western Blots mit anti-Zebrabärbling Globin X-Antikörperserum (1:500 verdünnt) nachgewiesen. Ma = Marker, M = Muskel, R = rekombinantes Globin X Δ NC. Deutlich sind sowohl Monomer- als auch Dimerbanden zu erkennen. Das rekombinante Protein ist durch die fehlenden Aminosäuren am N- und C-Terminus entsprechend kleiner als das aus dem Zebrabärbling isolierte Globin X.

1.2 Myoglobine der Karpfenfische

Vor kurzem wurde gezeigt, dass Myoglobin nicht nur im Muskelgewebe lokalisiert ist, sondern dass Myoglobin auf mRNA-Ebene auch in zahlreichen anderen Geweben des Karpfens *Cyprinus carpio* exprimiert wird (Fraser et al., 2006). Zudem konnte im Karpfen eine hirspezifische Isoform des Myoglobins identifiziert werden (Fraser et al., 2006). Die ubiquitäre Expression von Myoglobin sollte für den Goldfisch verifiziert und die kodierende Sequenz der Myoglobin 2-Isoform identifiziert werden.

1.2.1 Molekulare Charakterisierung von Myoglobin 2 des Goldfisches

Die molekulare Identifizierung von Myoglobin 2 erfolgte durch eine RT-PCR auf Hirngewebe des Goldfisches. Hierzu wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. In der anschließenden PCR wurden Primer eingesetzt, die für das *Cyprinus carpio* Myoglobin 2 kodieren. Nach Klonierung konnte die cDNA sequenziert und als Myoglobin 2-Isoform des Goldfisches identifiziert werden (Abb. C 14). Nach Translation ergibt sich ein Protein mit 147 Aminosäuren und einer errechneten molekularen Masse von 16,2 kDa (Abb. C 15).

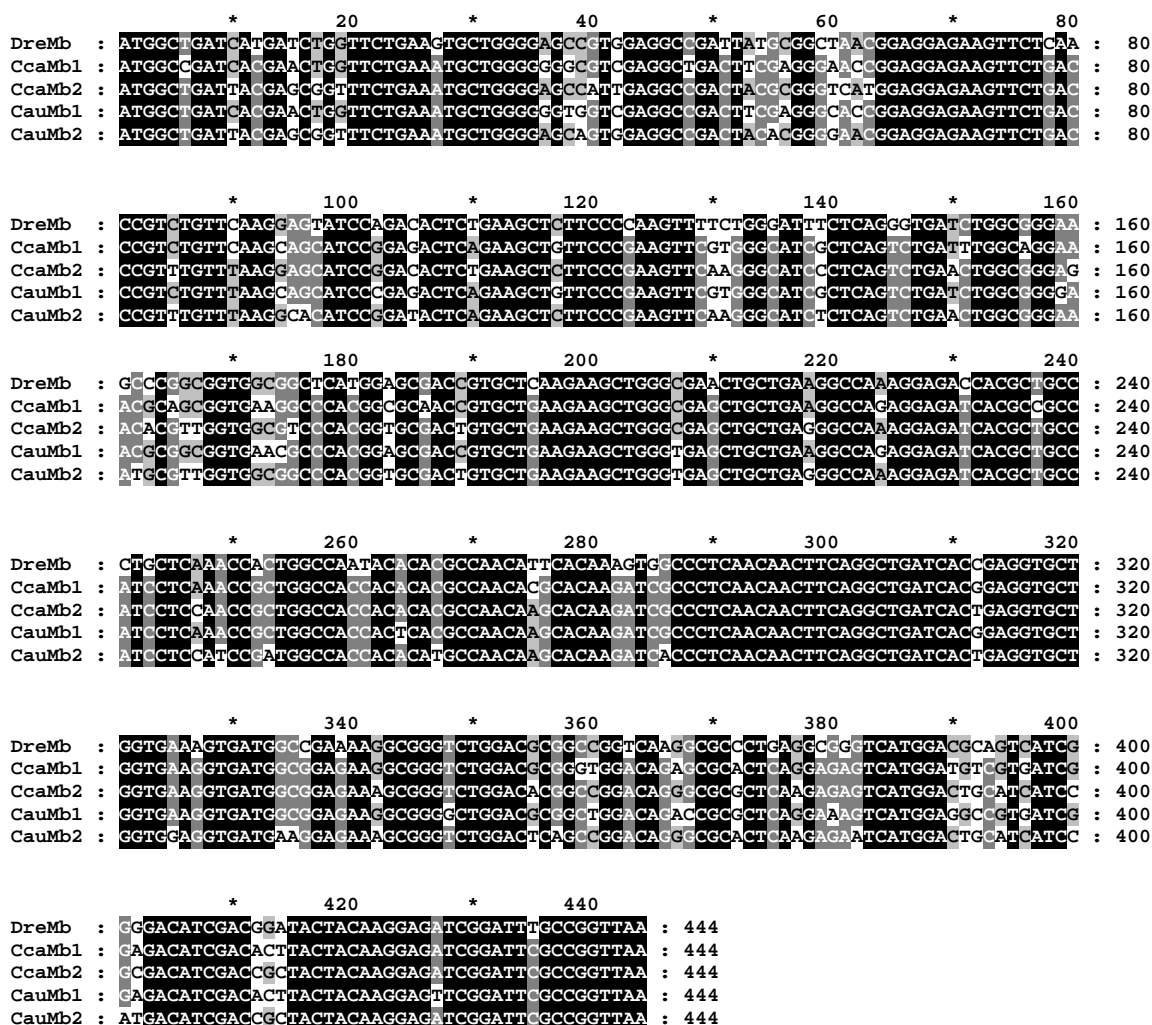


Abb. C 14: Nukleotidalignment der Karpfenfisch-Myoglobine

Dargestellt sind die Myoglobin-Isoformen (Mb) verschiedener Karpfenfische. Cau = *Carassius auratus* (Goldfisch), Cca = *Cyprinus carpio* (Karpfen), Dre = *Danio rerio* (Zebrafisch). Entsprechend des Konservierungsgrades sind die Nukleotide farbig markiert, schwarz = 100%, dunkelgrau = 80%, hellgrau = 60% Identität.

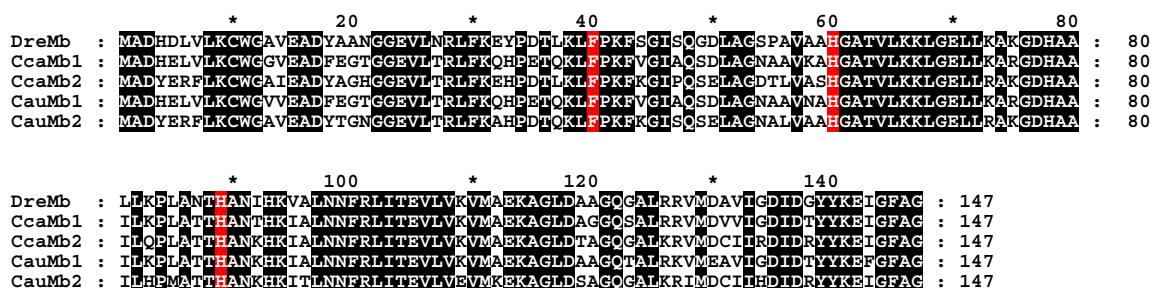


Abb. C 15: Aminosäurealignment der Karpfenfisch-Myoglobine

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Myoglobine (Mb) ausgewählter Karpfenfische. Abkürzungen siehe Abb. C 14. Konservierte Aminosäuren sind schwarz unterlegt, farbig hervorgehoben sind die für die Häm-Bindung benötigten Histidine E7 und E8 sowie das Phenylalanin CD1.

Die Identität zwischen beiden Isoformen des Goldfisch-Myoglobins beträgt auf Nukleotidebene 85 %, auf Aminosäureebene 78 % (Tabelle C 2). Ein Vergleich mit den Myoglobinen des Karpfens verdeutlicht, dass sich die jeweiligen Isoformen verschiedener Spezies ähnlicher sind, als die beiden Isoformen einer Art. Die Identität auf Nukleotidebene beträgt für das Myoglobin 1 von Karpfen und Goldfisch 94% (Aminosäureebene 94%), die für Myoglobin 2 der beiden Kärpflinge (Karpfen und Goldfisch) 93% (88%). Im Gegensatz dazu beträgt die Übereinstimmung zwischen dem Myoglobin des Zebraäbrlings und den Myoglobinen der Kärpflinge lediglich ca. 80%.

Tabelle C 2: Identitäten der Karpfenfisch-Myoglobine

Ein Vergleich der Karpfenfisch-Myoglobine auf Nukleotid- (blau) und Aminosäureebene (dunkelrot) verdeutlicht die große Identität der Isoformen verschiedener Spezies.

		Identität der Nukleotide				
Identität der Aminosäuren		DreMb	CcaMb1	CcaMb2	CauMb1	CauMb2
	DreMb	---	82%	83%	82%	79%
	CcaMb1	82%	---	86%	94%	84%
	CcaMb2	80%	79%	---	86%	93%
	CauMb1	82%	94%	78%	---	85%
	CauMb2	78%	79%	88%	78%	---

1.2.2 Phylogenie der Fisch-Myoglobine

Die Stammbaum-Analyse der Fisch-Myoglobine erfolgte mit Hilfe des Programmpakets von MrBayes (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>) (siehe B5.13.3). Zunächst wurde ein Alignment mit den Sequenzen ausgewählter Fisch-Spezies erstellt, als Außengruppe dienten die Myoglobine der Knorpelfische.

Der Stammbaum der Fisch-Myoglobine verdeutlicht, dass die einzelnen Myoglobin-Isoformen (CauMb1 mit CcaMb1, CauMb2 mit CcaMb2) der Cyprininae (Kärpflinge) näher miteinander verwandt sind als die verschiedenen Isoformen innerhalb einer Art (CauMb1 mit CauMb2, CcaMb1 mit CcaMb2). Diese Aufspaltung ist mit Bayes'schen Wahrscheinlichkeiten von 0,99 und 1,00 sehr gut abgesichert. Das Verwandtschaftsverhältnis zwischen den Isoformen Myoglobin 1 und 2 von Karpfen und Goldfisch sowie deren Beziehung zum Myoglobin von Zebraäbrling (DreMb) und Goldelritze (PprMb) ist jedoch mit Werten von 0,94 und 0,81 nicht gut unterstützt. Des Weiteren zeigt der Stammbaum die nahe Verwandtschaft innerhalb der verschiedenen Scombridae-Arten (Makrelenfische) ebenso wie die innerhalb der Tetraodontidae (Kugelfische), Nototheniidae (Antarktisdorsche) und

Channichthyidae (Krokodileisfische), wobei die Auflösung zum Teil ebenfalls ungenau ist. Zur Diskussion des Stammbaumes siehe D 1.2.

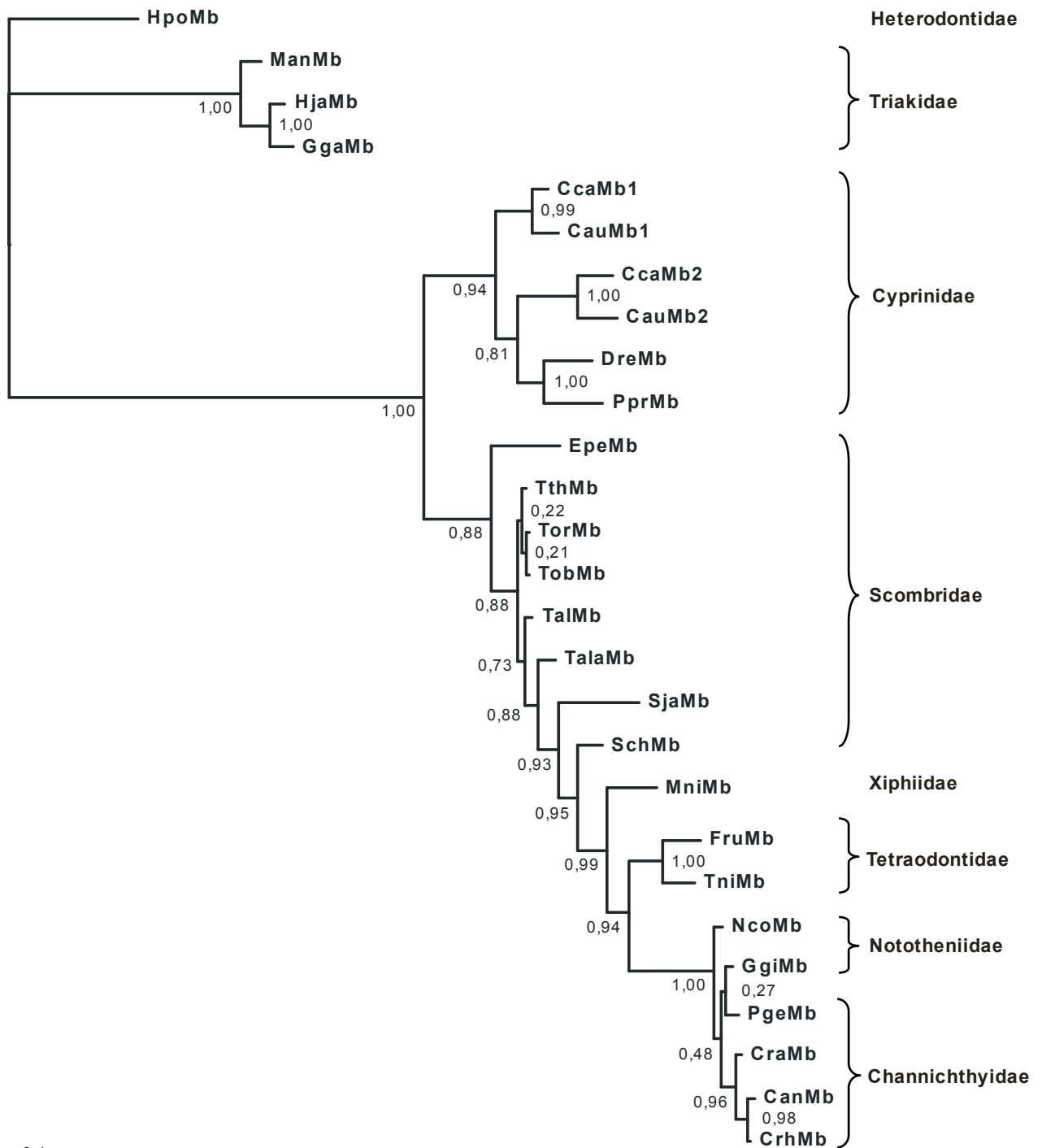


Abb. C 16: Stammbaum der Fisch-Myoglobine nach MrBayes

Basierend auf einem Aminosäurealignment ausgewählter Fisch-Myoglobine wurde ein Stammbaum nach MrBayes erstellt. Die Bayes'schen Wahrscheinlichkeiten der jeweiligen Verzweigungen sind angegeben (1,00 = 100%). Abkürzungen siehe Anhang (G7.2). Heterodontidae = Stierkopfaie, Triakidae = Hundshaie, Cyprinidae = Karpfenfische, Scombridae = Makrelenfische, Xiphiidae = Schwerfische, Tetraodontidae = Kugelfische, Nototheniidae = Antarktisdorsche, Channichthyidae = Krokodileisfische.

1.2.3 Expression von Myoglobin

Zur genauen Lokalisierung von Myoglobin-Protein in verschiedenen Geweben wurde zunächst das Myoglobin des Zebrafisches rekombinant in Bakterien exprimiert. Anschließend wurden polyklonale Antikörper gegen Myoglobin in Kaninchen erzeugt. Mit dem Antikörperserum wurden Western Blot-Analysen auf verschiedenen Geweben des Zebrafisches und des Goldfisches durchgeführt.

1.2.3.1 Rekombinante Expression von Myoglobin des Zebrafisches

Für die rekombinante Expression wurde zunächst die cDNA des Zebrafisch-Myoglobins in den Expressionsvektor pET-15b kloniert und das Plasmid in Bakterien des Stammes BL21 (DE3)pLys transformiert. In diesem Expressionssystem wird das Protein mit einem N-terminalen 6 x His-Tag versehen, so dass die Aufreinigung mit Hilfe von Metallionen-Affinitätschromatographie erfolgen kann. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu der herkömmlichen, klassischen Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, wie sie für Globin X angewandt wurde, liegt in der leichten Handhabung der verwendeten Ni^{2+} -Silikat-Säulen und der damit verbundenen schnelleren Aufreinigung des Proteins. Allerdings eignet sich diese Methode nicht so gut für die Synthese von großen Mengen Protein, da die Säulen nur eine begrenzte Kapazität haben. Auch kann es durch die zusätzlichen Histidine und die neun weiteren Aminosäuren am N-Terminus zu geringen Änderungen der Konformation kommen, was zum Beispiel die O_2 -Bindungseigenschaften des Globins beeinflussen kann. Da das aufgereinigte Myoglobin lediglich zur Synthese von polyklonalen Antikörpern dienen sollte, waren diese Nachteile zu vernachlässigen.

Nach dem Ernten der Bakterienkultur wurde das Pellet in Lyse-Puffer resuspendiert und die Zellwände durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff sowie durch Ultraschall-Behandlung aufgebrochen. Nach Zentrifugation wurde der lösliche Überstand auf die Affinitätssäule aufgetragen. Mehrmaliges Waschen entfernte unspezifisch gebundene Proteine, so dass schließlich aufgereinigtes Myoglobin eluiert werden konnte. Abbildung C 17 zeigt sehr deutlich den guten Reinigungserfolg des rekombinant exprimierten Myoglobins. Aufgrund der 15 zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus erhöht sich die molekulare Masse des Myoglobins von 15,5 kDa auf rechnerisch 17,2 kDa. Alle Fraktionen der Elution zeigten klare Banden bei ca. 18 kDa, wobei in den Fraktionen 2 und 3 die höchste Myoglobin-Konzentration zu erkennen ist. Insgesamt wurden aus 500 ml Expressionskultur ca. 5 mg Myoglobin aufgereinigt.

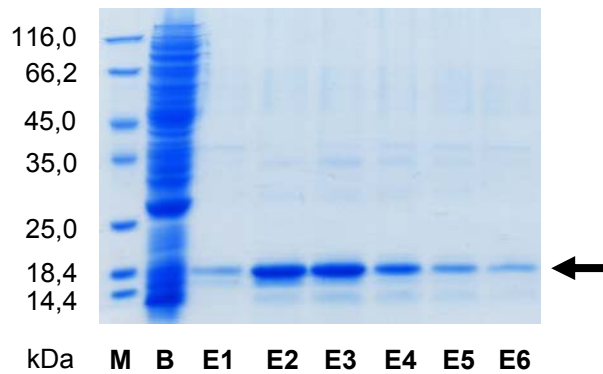


Abb. C 17: Rekombinante Expression von Myoglobin des Zebrafischlings

Das Ergebnis einer SDS-Gelelektrophorese verdeutlicht den Reinigungserfolg der Ni²⁺-Silikat-Säulen. M = Marker, B = Bakterienpellet (2 µl), E = Eluat (5 µl)

Anders als erwartet, zeigte das aufgereinigte Myoglobin nicht die für Globine typische rote Färbung. Zu Beginn der Aufreinigung war die Proteinlösung noch rötlich gefärbt, was auf gebundenes Häm schließen ließ. Offensichtlich löste sich das Häm durch Veränderungen des pH-Wertes oder durch die geringe Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer aus der hydrophoben Tasche des Myoglobins. Aus diesem Grund konnte von Myoglobin kein Spektrum in Abhängigkeit des Oxygenierungszustandes aufgenommen werden. Auch bei der Expression von Myoglobin ohne His-Tag und der klassischen Aufreinigung gelang es nicht, Myoglobin mit gebundener Häm-Gruppe aufzureinigen. Während in allen Fällen die Farbe des Bakterienpellets noch auf eine Häm-Bindung schließen ließ, verschwand die Färbung spätestens nach der Anionenaustauschchromatographie.

1.2.3.2 Expression von Myoglobin in Geweben des Goldfisches

Die ubiquitäre Expression von Myoglobin-Protein wurde mit Hilfe von Western Blot-Analysen überprüft. Hierzu wurden verschiedene Gewebe eines Goldfisches (Hirn, Kieme, Herz, Leber, Niere, Schwimmblase) in PBS homogenisiert und der Proteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einem Elektrottransfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde Myoglobin durch anti-Myoglobin Antikörperserum nachgewiesen. Abb. C 18 zeigt, dass in allen untersuchten Geweben des Goldfisches Signale für Myoglobin detektiert werden konnten. Durch die hohe Identität von Myoglobin 1 und 2 des Goldfisches ist es allerdings nicht möglich, auf Proteinebene zwischen den beiden Isoformen zu differenzieren.

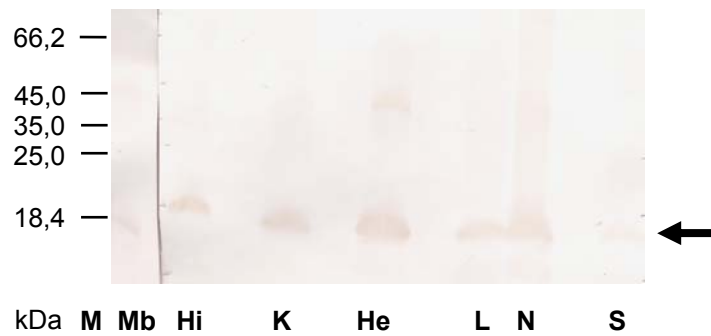


Abb. C 18: Western Blot-Analyse zur Expression von Myoglobin

Proteinextrakte von verschiedenen Goldfischgeweben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis für Myoglobin erfolgte mit Myoglobin-Antikörperserum in 1:500-facher Verdünnung. M = Marker, Mb = rekombinantes Myoglobin (0,5 µg), Hi = Hirn, K = Kieme, He = Herz, L = Leber, N = Niere, S = Schwimmblase, jeweils 100 µg Proteinextrakt (für Herz und Schwimmblase nur 50 µg).

2 Sauerstoffabhängige Globinexpression in Karpfenfischen

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit soll die Expression von Globinen in Fischen unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen sowohl auf molekularer als auch auf proteinbiochemischer Ebene charakterisiert und eine Aussage über mögliche Präadaptationen in hypoxietoleranten Organismen getroffen werden.

2.1 Hypoxieexperimente

Bei den Hypoxieexperimenten wurden zwei verschiedene Spezies der Karpfenfische eingesetzt: zum einen der relativ hypoxiesensitive Zebraäbrbling, der dennoch in der Lage ist, für mehrere Stunden eine Sauerstoffkonzentration von bis zu einem Sauerstoffpartialdruck von $pO_2 = 15$ Torr zu überleben (Rees et al., 2001); zum anderen der hypoxietolerante Goldfisch, der bei 20°C mehrere Stunden ohne Sauerstoff auskommt und bei geringen Temperaturen lange Zeit bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen leben kann (van den Thillart et al., 1976).

Zebraäbrlinge und Goldfische wurden für verschiedene Zeitspannen mit geringen Sauerstoffkonzentrationen inkubiert. Nach dem Ende des jeweiligen Versuches wurden die Fische auf Eis betäubt und entweder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren oder es wurden nach Dekapitation einzelne Organe präpariert und in Stickstoff eingefroren. Aus den Geweben wurde anschließend Gesamt-RNA oder Protein extrahiert und für quantitative real-time PCR oder Western Blot-Analysen eingesetzt.

2.1.1 Hypoxieexperimente mit Zebraäbrblingen

Zu Beginn der Versuche wurde zunächst das Minimum des Sauerstoffgehalts im Wasser bestimmt, bei dem die Fische noch überleben. Hierzu wurden die Fische in zwei Gruppen und in zwei gleichgestaltete Aquarien aufgeteilt. In das eine Aquarium wurde eine Gasmischung mit niedrigem Sauerstoffgehalt (2% O_2 in 98% N_2) eingeleitet, in das andere gefilterte Normalluft (21% O_2). Innerhalb einer Stunde wurde so der Sauerstoffpartialdruck im Hypoxiebecken von 138 Torr auf 18 Torr reduziert und für weitere 23 Stunden konstant gehalten. Anders als erwartet (vergleiche Rees et al., 2001), war dieser Wert für die meisten Zebraäbrlinge letal: mehr als 80% der Versuchstiere starben innerhalb der ersten 24 Stunden. Aus diesem Grund wurde für den Zebraäbrbling ein etwas höherer Sauerstoffpartialdruck von 31 Torr (Schwankungsbreite 27-35 Torr) als unterste Grenze der Hypoxieexperimente gewählt. Dieser Grenzwert war jedoch für ca. 20% der Zebraäbrlinge immer noch zu niedrig, so dass in einem Fall sogar eine komplette Versuchsgruppe innerhalb der ersten 20 Stunden einging. Im Normalfall überlebten aber mindestens 80% der Hypoxietiere den Versuch.

Beim Zebrabärbling wurden neben verschiedenen Zeitspannen bei 31 Torr auch Experimente mit einem Sauerstoffpartialdruck von 65 Torr (60-70 Torr) durchgeführt, um eine Aussage über die Expression der Globine in Abhängigkeit von der Stärke des Sauerstoffmangels treffen zu können.

2.1.2 Hypoxieexperimente mit Goldfischen

Beim Goldfisch sollte an eine 48-stündige Inkubation mit ungefähr 50 Torr eine nahezu anoxische Phase angeschlossen werden. Dies wurde durch Einleiten von reinem Stickstoff (100% N₂) erreicht. Allerdings zeigte sich hier, dass die Goldfische bei 21°C nicht in der Lage waren, diese Bedingungen lange zu überleben, so waren nach spätestens 16 Stunden bei 5 Torr alle Individuen an Sauerstoffmangel gestorben. Aus diesem Grund wurde die stark hypoxische Phase abgeschwächt (pO₂ = 13 Torr), auf lediglich acht Stunden reduziert und im Anschluss daran für weitere 16 Stunden mit einem Sauerstoffpartialdruck von 50 Torr begast. Diese Bedingungen überlebten alle eingesetzten Goldfische.

2.2 Verhalten der Fische während der Hypoxieexperimente

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erläutert, stellte der gewählte Sauerstoffpartialdruck von 31 Torr eine kritische Konzentration für den Zebrabärbling dar. Zu erkennen war dies nicht nur daran, dass 31 Torr für ca. 20% der Individuen letal waren, sondern auch am Verhalten der Tiere in der Hypoxiegruppe. Bereits bei einem Sauerstoffpartialdruck von 65 Torr erhöhte sich die Atemfrequenz der Zebrabärblinge deutlich, ab 50 Torr versuchten manche Tiere, durch Luftatmung mehr Sauerstoff aufzunehmen. Im Laufe des Versuches schien allerdings ein Gewöhnungseffekt einzusetzen, so dass sich die Tiere die meiste Zeit am Boden des Aquariums aufhielten, und sich wenig bewegten. Ein koordiniertes Schwimmen war einigen Zebrabärblingen unterhalb eines Sauerstoffpartialdrucks von 50 Torr nicht mehr möglich. Da dies besonders in Bereichen mit stärkerer Strömung zu beobachten war, wurde darauf geachtet, dass sich keine Fische im direkten Ansaugbereich der Umwälzpumpe aufhalten konnten. Während starke Hypoxie (31 Torr) deutliche Auswirkungen auf das Verhalten der Zebrabärblingen hatte, konnte bei schwacher Hypoxie (65 Torr) lediglich eine erhöhte Atemfrequenz beobachtet werden.

Im Vergleich dazu bewirkte beim Goldfisch der Sauerstoffpartialdruck von 50 Torr keine starke Veränderung des Verhaltens. Im Verlauf der ersten 48 Stunden schwammen die Goldfische der Hypoxiegruppe im gesamten Aquarium umher und es war kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren zu beobachten. Während den acht Stunden bei 13 Torr allerdings zeigten die Goldfische die gleichen Verhaltensanpassungen wie die Zebrabärblinge bei 31 Torr, und hielten sich bevorzugt am Boden des Aquariums auf. Deutlich war, dass die Goldfische bei einem Sauerstoffpartialdruck von 13 Torr fast blind

waren und nicht mehr auf optische Reize außerhalb des Aquariums reagierten. In den folgenden 16 Stunden bei 50 Torr normalisierte sich das Verhalten wieder, ebenso konnten sie wieder optische Reize wahrnehmen.

2.3 Vorbereitung der quantitativen real-time PCR-Experimente

Zur Durchführung der quantitativen real-time PCR waren zunächst einige Vorbereitungen erforderlich. Um die Effizienz der PCR-Reaktion ermitteln zu können, ist es notwendig, mit Verdünnungen von Plasmiden oder cDNAs so genannte Standardgeraden zu messen. Bei Verwendung der Plasmidstandard-Methode musste zunächst die cDNA der zu untersuchenden Gene als Plasmid vorliegen. Aus diesem Grund wurden vor Beginn der Experimente die cDNAs der Referenzgene ARP ("Acidic ribosomal protein", nach neuer Nomenklatur "ribosomal protein, large, P0", rplp0) und CP (Cyclophilin) des Zebraärbings und des Goldfisches kloniert. Ebenso wurden die verschiedenen Globine von Zebraärbing und Goldfisch kloniert, sofern die Plasmide nicht vorhanden waren. Für alle untersuchten Gene sind Sequenz und Datenbank-Zugangsnummer im Anhang (siehe G6.1.7) angegeben. In manchen Fällen ergab die Auswertung der quantitativen real-time PCR, dass die Amplifikation nur mit einer schlechten Effizienz stattgefunden hatte, oder dass durch die Bildung von Primerdimeren die Auswertung nicht möglich war. In diesen Fällen wurden verschiedene Primer ausgetestet und für weitere Experimente nur die Primer eingesetzt, die eine gute Amplifikationseffizienz aufwiesen und nur geringe Mengen oder keine Primerdimere bildeten. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich ebenfalls im Anhang (siehe G4).

2.4 Normalisierung der quantitativen real-time PCR-Daten

Bei der cDNA-Synthese wurde stets für ein Experiment für alle Proben dieselbe Menge an Gesamt-RNA eingesetzt. Um Unterschiede in der Effizienz der cDNA-Synthese vernachlässigen zu können, wurden alle Messergebnisse der quantitativen real-time PCR auf so genannte Referenzgene normalisiert. Die Verwendbarkeit der Gene ARP und CP als Referenzgene in Hypoxieexperimenten wurde bereits beschrieben (Simpson et al., 2000). Allerdings konnte durch quantitative real-time PCR-Experimente gezeigt werden, dass im Fall der gewählten Versuchsbedingungen lediglich die Expression von ARP unabhängig von der Sauerstoffkonzentration erfolgte, während für CP eine schwache, aber signifikante Hochregulation unter Hypoxie beobachtet wurde (Abb. C 19). Aus diesem Grund wurden alle Messwerte auf die Expression von ARP normalisiert, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

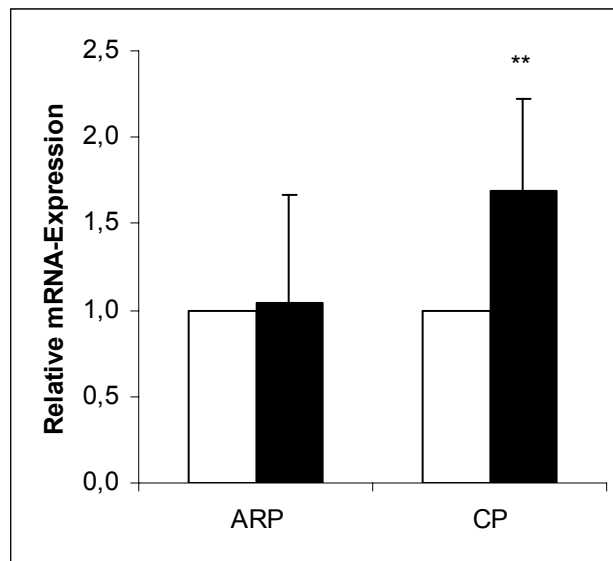


Abb. C 19: Expression von ARP und CP unter Normoxie und Hypoxie
mRNA-Expression von ARP ("Acidic ribosomal protein") und CP (Cyclophilin) des Zebrafischlings, normalisiert auf die eingesetzte Menge an Gesamt-RNA. Deutlich zu erkennen ist die Hochregulation von Cyclophilin unter Hypoxie (schwarze Balken, 48 h, 31 Torr) im Vergleich zur Normoxie (weiße Balken, 138 Torr). ** P < 0,01.

2.5 Hypoxieinduzierte Veränderung der Globinexpression in Zebrafischlingen

2.5.1 Expression von Globin-mRNA

Zebrafischlinge wurden einer Sauerstoffkonzentration von 65 Torr (milde Hypoxie, 48 h) oder 31 Torr (starke Hypoxie, 48 h und 24 h) ausgesetzt. Im Anschluss an den Versuch wurde aus den einzelnen Individuen Gesamt-RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und die Expression verschiedener Gene mittels quantitativer real-time PCR untersucht. Die Expression wurde auf das Referenzgen ARP normalisiert. Bei den Kontrolltieren wurde die RNA vor der cDNA-Synthese gepoolt und die jeweilige Genexpression gleich eins gesetzt. In Tieren, die für 48 h einer milden Hypoxie (65 Torr) ausgesetzt waren, wurden nur geringe Veränderungen der Globin-mRNA Expression beobachtet (Abb. C 20). Lediglich eine 50%ige Abnahme der Hämoglobin α (Hb α) und Hämoglobin β (Hb β) Konzentration sowie eine Verdopplung der Cytoglobin 1 (Cygb1) Expression traten auf, während die Expression der anderen Globine nahezu konstant blieb. Allerdings waren beide Veränderungen nicht signifikant, da zwischen den einzelnen Individuen der Hypoxiegruppe zum Teil deutliche Unterschiede der Genexpression beobachtet wurden.

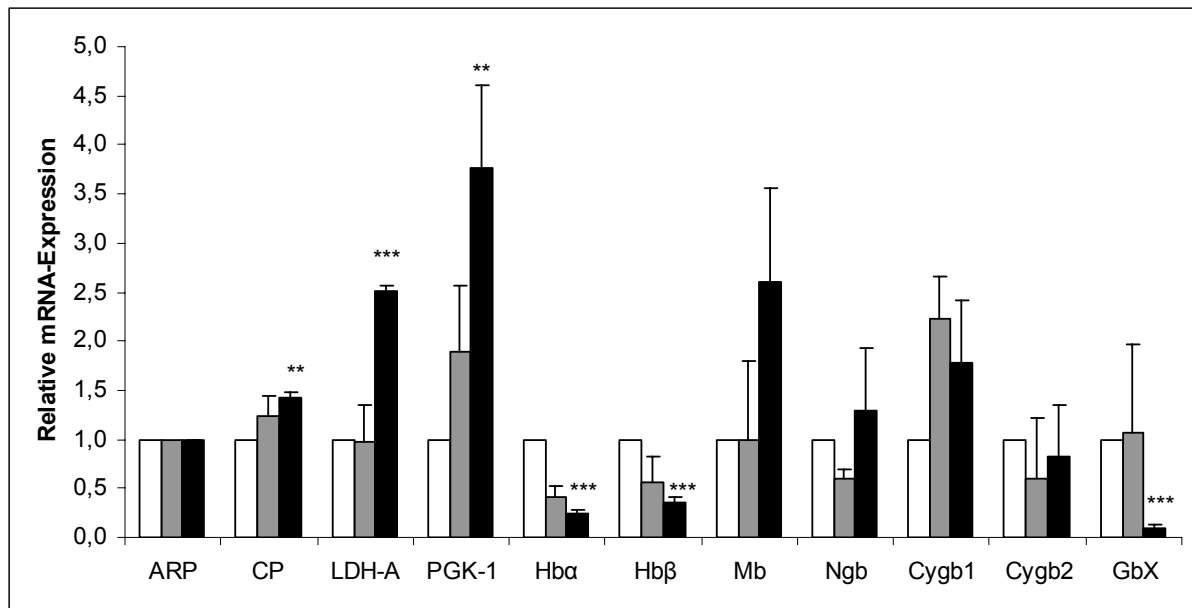


Abb. C 20: Expression von Globinen des Zebrafischlings bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Die Expression der mRNA wurde durch quantitative real-time PCR ermittelt. Verglichen werden die mRNA-Mengen von normoxischen Zebrafischlingen (48 h, 138 Torr, weiße Balken), von Zebrafischlingen bei milder Hypoxie (48 h, 65 Torr, graue Balken) und von Zebrafischlingen bei starker Hypoxie (48 h, 31 Torr, schwarze Balken). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte von drei bis vier Individuen und die dazugehörige Standardabweichung. Die Signifikanz der Messwerte wurde mittels eines Student'schen *t*-Tests ermittelt. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$. ARP = "Acidic ribosomal protein", CP = Cyclophilin, Cygb = Cytoglobin, GbX = Globin X, Hb = Hämoglobin, LDH-A = Lactatdehydrogenase A, Mb = Myoglobin, Ngb = Neuroglobin, PGK-1 = Phosphoglyceratkinase 1 (nach Roesner et al., 2006).

In den Versuchen bei starker Hypoxie (31 Torr) waren die Veränderungen wesentlich stärker ausgeprägt (Abb. C 21). Die Hämoglobin mRNA-Konzentration reduzierte sich innerhalb von 24 Stunden auf 70% bis 80% und betrug nach 48 Stunden lediglich 25% bis 35% der mRNA Menge der jeweiligen Kontrolltiere (Signifikanz $P < 0,001$ bzw. $P < 0,01$). Die Expression von Myoglobin-mRNA (Mb) erhöhte sich sowohl bei kurzzeitiger als auch bei andauernder Hypoxie ungefähr 2,5-fach, wobei diese Veränderung aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Nach 24 Stunden wurde eine 4-fache Hochregulation der Neuroglobin-mRNA beobachtet, wobei durch die starken Unterschiede der Expression in den einzelnen Individuen auch hier keine Signifikanz vorlag. Nach 48 Stunden bei 31 Torr wurde nahezu das Ausgangsniveau der Neuroglobin-Expression erreicht, und die mRNA-Konzentration war lediglich um 30% erhöht. Zebrafischlinge sind im Besitz zweier paraloger Cytoglobin-Gene (Fuchs et al., 2005), von denen lediglich Cytoglobin 1 (Cygb1) eine leichte Hochregulation unter Hypoxie zeigt. Das Expressionsniveau von Cygb2 blieb nahezu unverändert. Es wurden nur geringe Veränderungen der Expression von Globin X-mRNA unter schwacher Hypoxie (65 Torr) beobachtet, bei starker Hypoxie (31

Torr) allerdings nahm die Konzentration an Globin X-mRNA auf 30% bzw. 10% der normoxischen Kontrolle ab (Signifikanz $P < 0,01$ und $P < 0,001$).

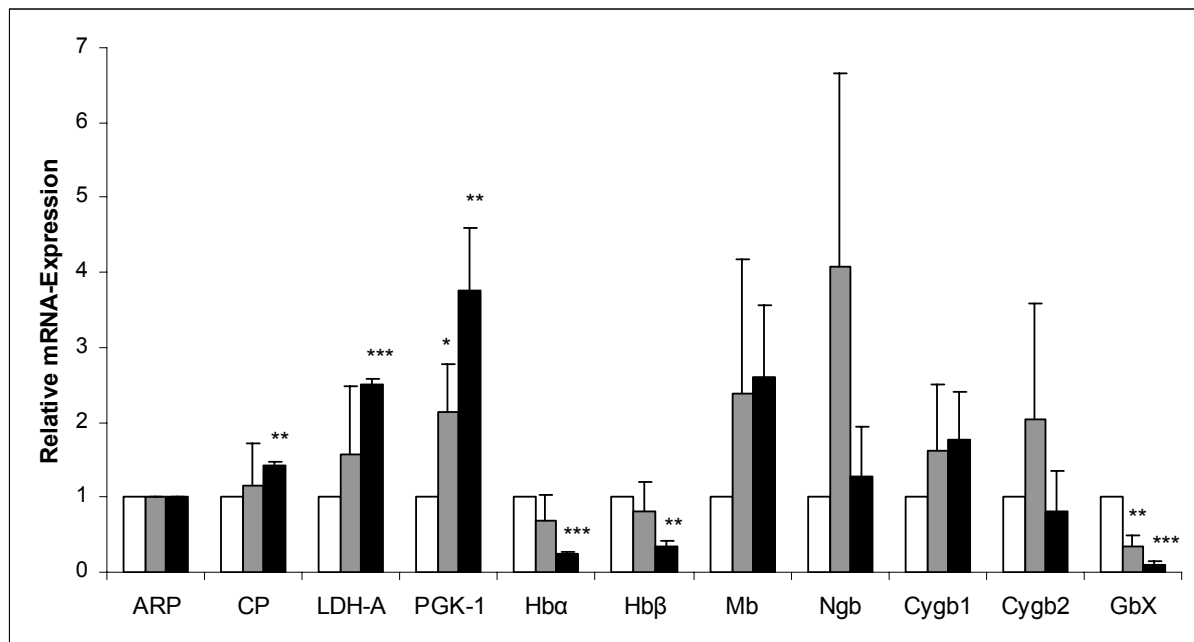


Abb. C 21: Expression von Globin-mRNA des Zebrafischlings bei unterschiedlich lang andauernder starker Hypoxie

Zebrafischlinge wurden bei 31 Torr für 24 h (graue Balken) oder 48 h (schwarze Balken) gehalten. Weiße Balken symbolisieren die normoxische Kontrolle (138 Torr). Die mRNA-Mengen wurden durch quantitative real-time PCR bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte von drei bis vier Individuen, die dazugehörigen Standardabweichungen sind angegeben. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$. Abkürzungen siehe Abbildung C 20 (verändert nach Roesner et al., 2006).

2.5.2 Expression von Neuroglobin-mRNA in Hirn und Auge des Zebrafischlings

Neben der mRNA-Expression der Globine im Gesamt-Zebrafischling wurde die Expression von Neuroglobin in Hirn und Auge in einem weiteren Versuch getrennt untersucht. Hierzu wurden Zebrafischlinge für 24 h bei einem Sauerstoffpartialdruck von 31 Torr gehalten. Nach Ende des Versuchs wurden die Tiere der Hypoxie- und der Normoxiegruppe auf Eis betäubt, das Hirn sowie die Augen präpariert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch quantitative real-time PCR wurde die Expression ausgewählter Gene untersucht. Als Referenzgen diente wie schon in den vorherigen Versuchen ARP. Auch bei diesem Versuch zeigte sich eine große Variabilität zwischen den einzelnen Individuen einer Gruppe, so dass die Signifikanz der Werte sehr gering ist. Die beiden Positivkontrollen LDH-A und PGK-1 zeigten eine starke Hochregulation in beiden Geweben (Daten nicht gezeigt). Während die Neuroglobin mRNA-Menge in normoxischen und hypoxischen Augen nahezu konstant war (Abb. C 22), war im Hirn der hypoxischen Tiere eine 3-fach höhere Neuroglobin mRNA-Konzentration zu beobachten als bei den Kontrolltieren ($P < 0,05$).

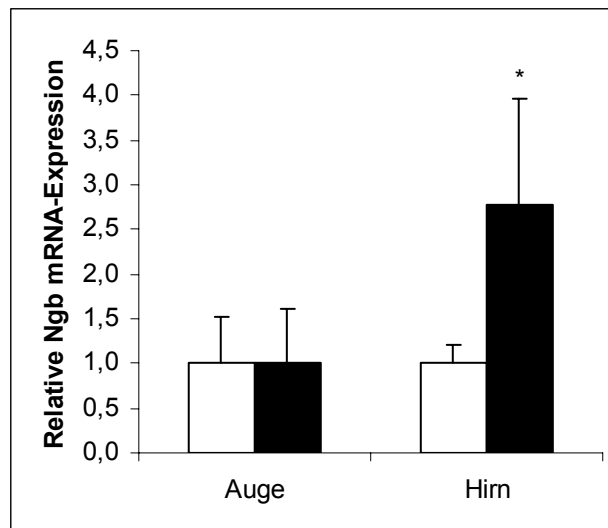


Abb. C 22: Expression von Neuroglobin-mRNA des Zebrafischlings in Hirn und Auge bei Hypoxie

Zebrafischlinge wurden für 24 h bei einem $pO_2 = 31$ Torr (schwarze Balken) gehalten, weiße Balken symbolisieren die normoxische Kontrolle (138 Torr). Neuroglobin mRNA-Mengen von Auge und Hirn wurden getrennt durch real-time PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Individuen und die dazugehörigen Standardabweichungen. * $P < 0,05$ (t -Test) (verändert nach Roesner et al., 2006).

2.5.3 Quantitative Western Blot-Analyse

Zur Untersuchung der Veränderung der Proteinexpression in Zebrafischlingen bei Hypoxie wurden diese zunächst für 48 h bei 31 Torr gehalten. Im Anschluss wurden aus Hirn, Auge und Herz die Gesamt-Proteine extrahiert. Um eine Aussage über Veränderungen der Neuroglobin- und Myoglobin-Konzentration auf Proteinebene zu erlangen, wurden quantitative Western Blots mit einer konstanten Menge an Protein (100 μ g Proteinextrakt pro Spur) durchgeführt. Exemplarisch dargestellt ist der Western Blot zur Untersuchung der Neuroglobin-Expression in Hirngewebe des Zebrafischlings (Abb. C 23). Bei der Hypoxiegruppe ist eine deutlich höhere Konzentration an Neuroglobin (14 kDa) zu erkennen.

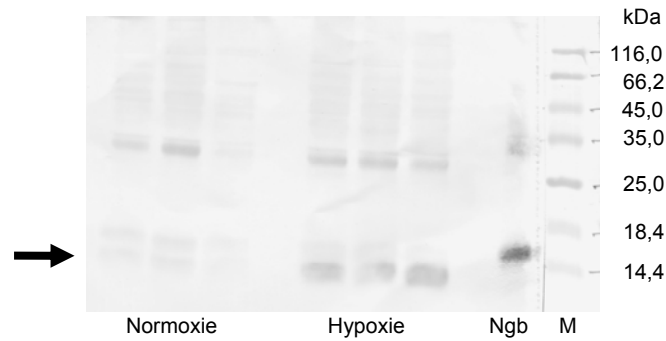


Abb. C 23: Western Blot zur Bestimmung der Neuroglobin-Expression in Zebrafärblingen bei Hypoxie

Exemplarisch dargestellt ist der Western Blot mit Hirn-Proteinextrakt von normoxischen und hypoxischen Zebrafärblingen (jeweils 100 µg). Verdünnung des Primärantikörpers 1:500, M = Marker, Ngb = rekombinantes Neuroglobin (0,5 µg). Deutlich zu erkennen ist die stärkere Neuroglobin-Expression (14 kDa) im Hirngewebe der hypoxischen Tiere.

Mit Hilfe des Programms "Scion Image" (<http://www.scioncorp.com/>, Scion Corporation, USA) wurden die Grauwertintensitäten der Globinbanden berechnet, um eine Aussage über die Globinkonzentration im jeweiligen Gewebe treffen zu können. Von allen Werten wurde zur Grauwertkorrektur die mittlere Intensität des Hintergrundes von leeren Gelspuren abgezogen. Nach Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanz mit dem Programm Microsoft® Excel 2003 (Microsoft, USA) wurde auf die Expressionsrate der Kontrolltiere normalisiert. Bei allen weiteren Western Blot-Analysen wird auf die Abbildung der Originalbilder verzichtet und stattdessen lediglich das Ergebnis der Auswertung gezeigt.

Im Hirn konnte eine hoch signifikante ($P < 0,001$) 5-fache Erhöhung der Neuroglobin-Proteinexpression für die hypoxischen Tiere nachgewiesen werden, während die Neuroglobin-Expression in den Augen der Hypoxiegruppe nur leicht erhöht (1,9-fach, nicht signifikant) war (Abb. C 24). Bei Myoglobin konnte im Herzgewebe eine schwache (20%), aber dennoch signifikante ($P < 0,05$) Hochregulation auf Proteinebene unter Hypoxie nachgewiesen werden (Abb. C 24).

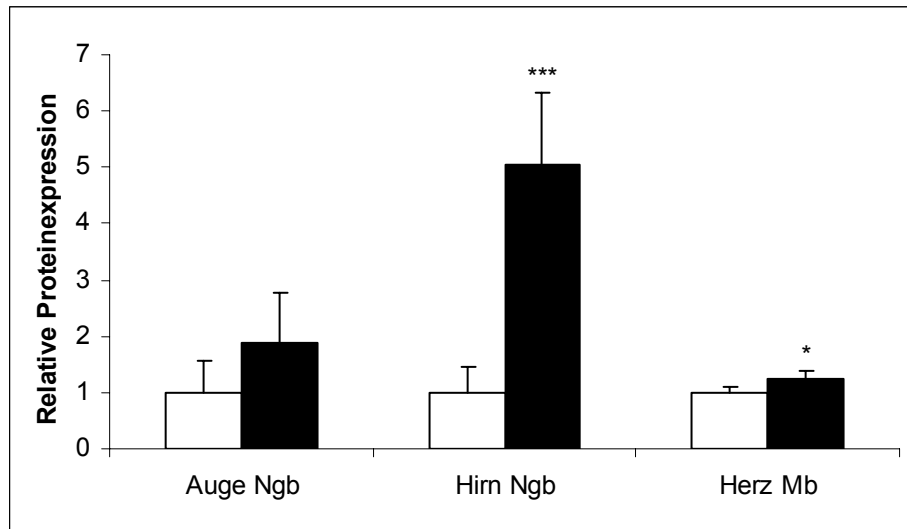


Abb. C 24: Expression von Neuroglobin- und Myoglobin-Protein in Auge, Hirn und Herz des Zebrafischlings

Zebrafischlinge wurden für 48 h unter Normoxie (weiße Balken) oder pO₂ = 31 Torr (schwarze Balken) gehalten. Die Konzentrationen von Neuroglobin in Auge und Hirn sowie von Myoglobin im Herz wurden separat durch quantitative Western Blot-Analyse bestimmt (100 µg Proteinextrakt pro Spur, N = 3 oder 4). *** P < 0,001, * P < 0,05 (*t*-Test) (verändert nach Roesner et al., 2006).

2.6 Hypoxieinduzierte Veränderung der Globinexpression im Goldfisch

2.6.1 Expression von Globin-mRNA

Die Goldfische wurden zunächst für 48 Stunden einem pO_2 von 50 Torr ausgesetzt, anschließend folgte eine achtstündige Phase bei 13 Torr. Nach weiteren 16 Stunden bei 50 Torr wurden die Fische auf Eis betäubt und Hirn, Auge sowie das Herz präpariert. Von diesen Organen sowie vom restlichen Fischkörper wurde RNA isoliert und die Expression verschiedener Gene für jedes Tier der Kontroll- und der Hypoxiegruppe einzeln durch quantitative real-time PCR-Analysen untersucht. Die mRNA-Expression wurde für den Fischkörper und für das Herzgewebe auf ARP normalisiert, da in diesen Geweben die ARP-Expression sauerstoffunabhängig war. In Auge und Hirn des Goldfisches wurde allerdings eine deutliche Hochregulation von ARP unter Hypoxie beobachtet, so dass die Expression in diesen Geweben auf die eingesetzte Menge an RNA normalisiert wurde.

Im Fischkörper wurde unter den gewählten Bedingungen eine leichte Hochregulation der Positivkontrolle LDH-A beobachtet (Abb. C 25). Die Hämoglobin mRNA-Menge reduzierte sich auf ca. 80% im Vergleich zur normoxischen Kontrolle, ebenso wurde eine leichte Abnahme der Cygb1-Expression (60%) beobachtet. Allerdings waren alle Veränderungen aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Eine signifikante Hochregulation zeigte lediglich Myoglobin 1, dessen mRNA-Konzentration sich unter Hypoxie verzwanzigfachte (Abb. C 25).

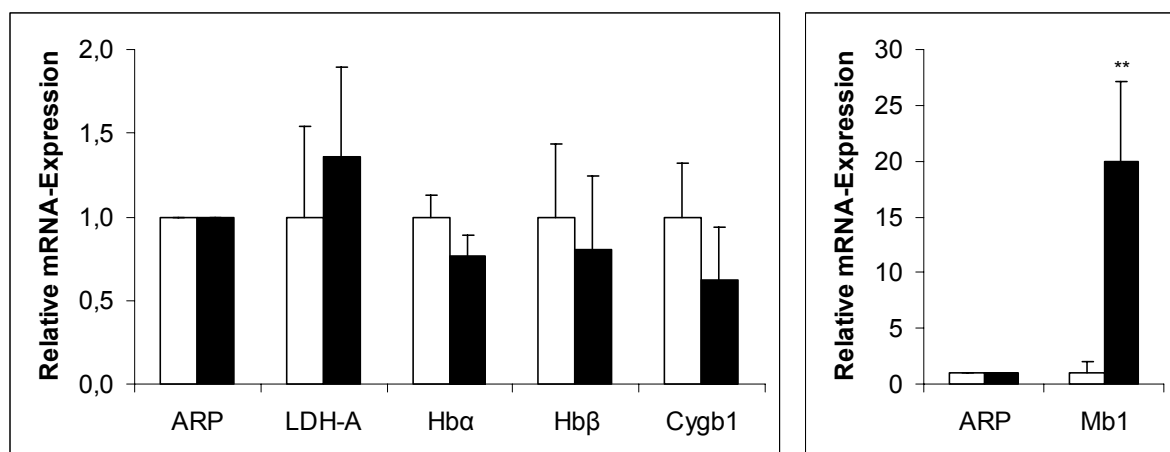


Abb. C 25: mRNA-Expression im Goldfischgewebe unter Hypoxie

Goldfische wurden für 72 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (48 h 50 Torr, 8 h 13 Torr, 16 h 50 Torr, schwarze Balken). Die mRNA-Expression wurde durch real-time PCR bestimmt und mit der normoxischen Kontrolle (138 Torr, weiße Balken) verglichen. Dargestellt ist die Veränderung der Genexpression in Fischkörper (ohne Augen, Hirn und Herz). Die Balken symbolisieren jeweils den Mittelwert von vier Individuen, die Standardabweichung ist angegeben, Abkürzungen siehe Abb. C 20, ** $P < 0,01$ (t -Test).

Im Herzgewebe erhöhte sich sowohl das mRNA-Expressionsniveau der Positivkontrolle LDH-A (120%) als auch die Menge an Myoglobin 1-mRNA (150%) leicht, aber nicht signifikant (Abb. C 26).

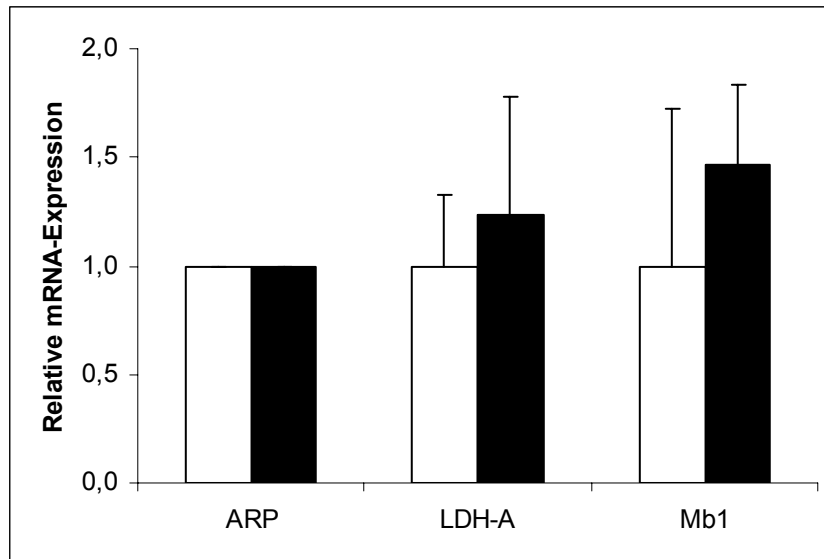


Abb. C 26: mRNA-Expression im Herzgewebe des Goldfisches unter Hypoxie
Goldfische wurden für 72 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (48 h 50 Torr, 8 h 13 Torr, 16 h 50 Torr, schwarze Balken). Die mRNA-Expression wurde durch real-time PCR bestimmt und mit der normoxischen Kontrolle (138 Torr, weiße Balken) verglichen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von vier Individuen, die Standardabweichung ist angegeben. Abkürzungen siehe Abb. C 20.

Im Auge der hypoxischen Goldfische betrug die Neuroglobin-Konzentration lediglich 20% der mRNA-Menge, wie sie für die Kontrolltiere beobachtet wurde (Abb. C 27). Um Aussagen über eine Funktion von Neuroglobin im ROS-Stoffwechsel treffen zu können, wurde eine mögliche co-Regulation mit der Expression der Superoxiddismutase (SOD-1) untersucht. Die Superoxiddismutase zeigte auf mRNA-Ebene eine hypoxieinduzierte Hochregulation (1,5-fach, Abb. C 27).

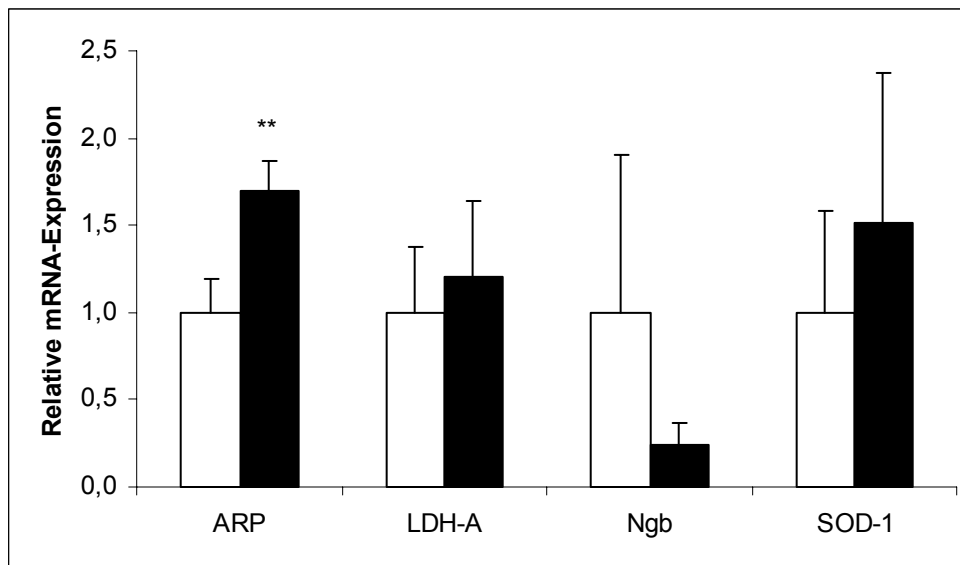


Abb. C 27: mRNA-Expression im Auge des Goldfisches unter Hypoxie

Goldfische wurden für 72 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (48 h 50 Torr, 8 h 13 Torr, 16 h 50 Torr, schwarze Balken). Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte durch real-time PCR. Es wurde auf die Expression der normoxischen Kontrolle (138 Torr, weiße Balken) normalisiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von vier Individuen. Abkürzungen siehe Abb. C 20, SOD-1 = Superoxiddismutase 1, ** P < 0,01 (t-Test).

Im Hirngewebe wurde neben Neuroglobin und Superoxiddismutase noch die Expression der beiden Myoglobine des Goldfisches untersucht. Während die Myoglobin 1-Konzentration lediglich leicht erhöht wurde (1,2-fach), ergab sich für das Myoglobin 2 eine hochsignifikante Verdopplung der mRNA-Konzentration (Abb. C 28). Die Stärke der Expression von Neuroglobin (130%) und SOD-1 (110%) veränderte sich nur geringfügig.

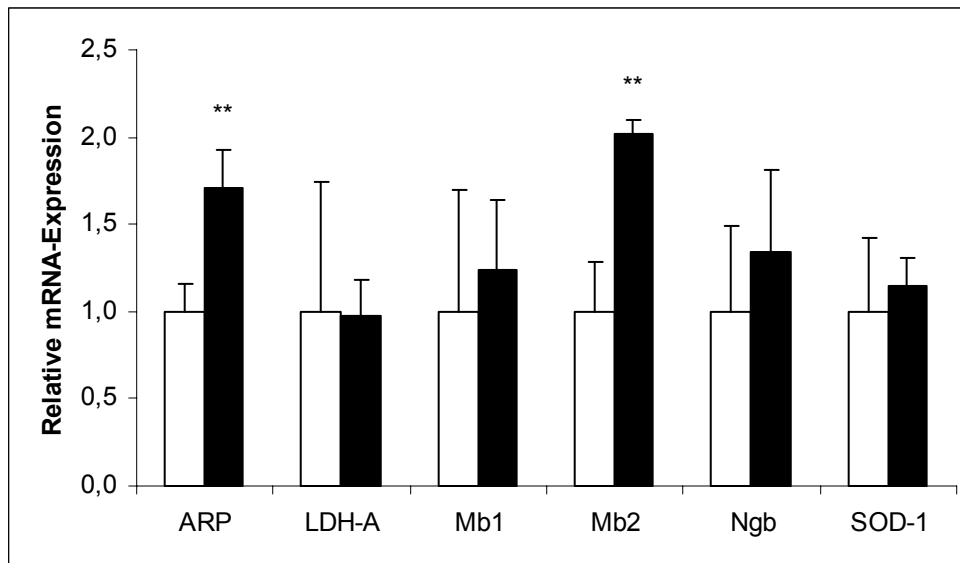


Abb. C 28: mRNA-Expression im Hirn des Goldfisches unter Hypoxie

Goldfische wurden für 72 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (48 h 50 Torr, 8 h 13 Torr, 16 h 50 Torr, schwarze Balken). Die mRNA-Expression wurde durch real-time PCR bestimmt und mit der normoxischen Kontrolle (138 Torr, weiße Balken) verglichen. Angegeben ist jeweils der Mittelwert von vier Individuen und die dazugehörige Standardabweichung. Abkürzungen siehe Abb. C 20 und Abb. C 27. ** $P < 0,01$ (t -Test).

2.6.2 Expression von Neuroglobin und Myoglobin auf Proteinebene

Zur Untersuchung der Proteinexpression bei Goldfischen wurden diese denselben Versuchsbedingungen ausgesetzt wie die Goldfische, deren mRNA-Expression untersucht wurde (48 h 50 Torr; 8 h 13 Torr; 16 h 50 Torr). Im Anschluss an den Versuch wurden die Fische auf Eis betäubt und dekapitiert. Nach Präparation von Auge, Hirn, Herz und Leber wurde aus diesen Geweben Gesamtprotein isoliert. Durch quantitative Western Blots war es möglich, Veränderung der Proteinexpression von Neuroglobin und Myoglobin unter Hypoxie zu untersuchen. Es wurden jeweils konstante Mengen an Gesamtprotein eingesetzt (100 μg für Auge, Hirn und Leber, 20 μg für Herz). Die Grauwertintensität der Globinbanden wurde wie beim Zebrafisch mit dem Programm "Scion Image" (Scion Corporation, USA, <http://www.scioncorp.com/>) bestimmt. Zur Grauwertkorrektur wurde jeweils die Intensität einer leeren Gelspur abgezogen. Mit dem Programm Microsoft® Excel 2003 (Microsoft, USA) wurden die Werte statistisch abgesichert und es erfolgte eine Normalisierung auf die Expression der Kontrolltiere.

Während beim Zebrafisch deutliche Veränderungen der Proteinexpression unter Hypoxie auftraten (Abb. C 24), zeigte der Goldfisch auf Proteinebene nahezu keine Reaktion auf den Sauerstoffmangel (Abb. C 29). Der verwendete Myoglobin-Antikörper detektierte aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Sequenz von Myoglobin 1 und 2 beide Myoglobine des

Goldfisches. Da das Myoglobin 2 lediglich im Hirn exprimiert wird, ist dies für die Gewebe Herz und Leber nicht von Bedeutung. Im Hirn kann allerdings durch Western Blot-Analyse keine Aussage darüber getroffen werden, ob beide Myoglobine in gleicher Weise reguliert werden.

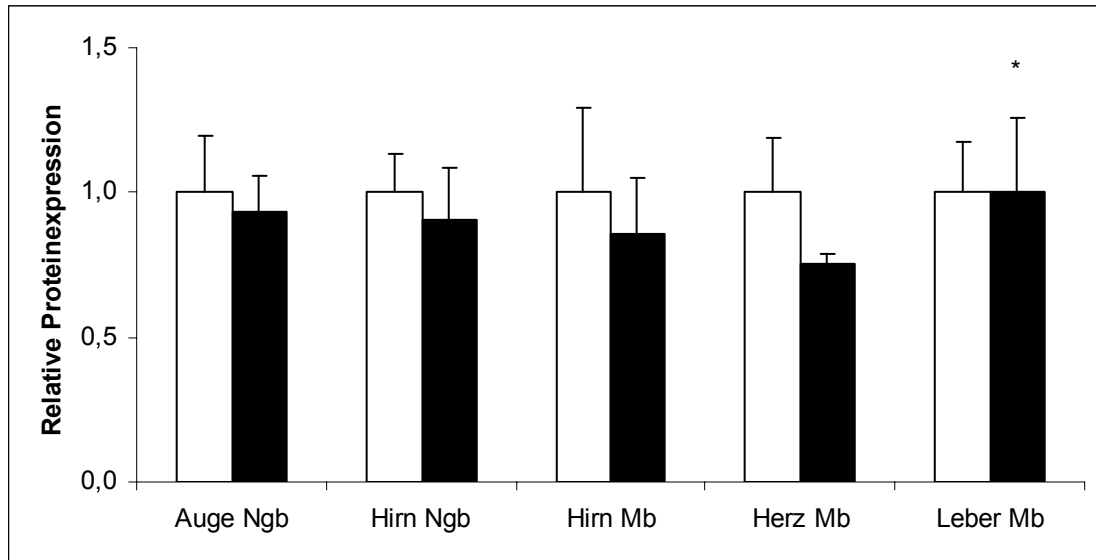


Abb. C 29: Expression von Neuroglobin- und Myoglobin-Protein im Goldfisch nach Sauerstoffmangel

Goldfische wurden für 72 h unter Normoxie (weiße Balken, 138 Torr) oder Hypoxie (schwarze Balken, 48 h 50 Torr, 8 h 13 Torr, 16 h 50 Torr) gehalten. Neuroglobin-Konzentration in Auge und Hirn (100 µg Proteinextrakt je Spur) und Myoglobin-Mengen in Hirn (100 µg), Herz (20 µg) und Leber (100 µg) wurden einzeln durch Western Blot-Analysen bestimmt. Dargestellt ist stets der Mittelwert von vier Individuen und die Standardabweichung. * $P < 0,05$ (t -Test).

3 Vergleichende Untersuchung zur konstitutiven Globinexpression in Zebrabärbling und Goldfisch

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass der Zebrabärbling auf Sauerstoffmangel mit einer Hochregulation von Myoglobin 1-mRNA und -Protein reagiert. Ebenso konnte eine starke Erhöhung der Neuroglobin-Konzentration im Hirn sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Im Goldfisch wurde lediglich eine Hochregulation der Myoglobin 1-mRNA beobachtet. Abweichend zum Zebrabärbling wurde im Goldfisch sogar eine deutliche Abnahme der Neuroglobin-mRNA im Auge und nur eine geringe Erhöhung der mRNA-Menge im Hirn beobachtet. In beiden Fällen hatte die Regulation keinen Einfluss auf die Konzentration an Neuroglobin-Protein. Eine Untersuchung der konstitutiven Globinexpression sollte Aufschluss darüber geben, ob es Gründe für die unterschiedlichen Reaktionen von Zebrabärbling und Goldfisch auf Sauerstoffmangel gibt.

Hierzu wurden von normoxischen Zebrabärblingen und Goldfischen die Gewebe Auge, Hirn und Herz präpariert und Gesamt-RNA oder -protein extrahiert. Durch real-time PCR-Experimente mit Primern im konservierten Bereich sollte eine Aussage über die in Auge und Hirn der Fische vorhandene Konzentration an Neuroglobin-mRNA getroffen werden. Bei Myoglobin war eine Untersuchung auf mRNA-Ebene nicht möglich, da aufgrund der hohen Sequenzunterschiede keine Primer gefunden werden konnten, die in einem konservierten Bereich lagen und die Kriterien für real-time PCR-Primer erfüllten. Des Weiteren sollten durch quantitative Western Blot-Analysen die Neuroglobin- und Myoglobin-Konzentrationen in beiden Spezies verglichen werden.

3.1 Konstitutive Neuroglobin mRNA-Expression

Durch quantitative real-time PCR-Experimente sollte ermittelt werden, ob signifikante Unterschiede des Neuroglobin mRNA-Mengen in Auge und Hirn von normoxischen Zebrabärblingen und Goldfischen vorliegen. Mit Primern im konservierten Bereich der Neuroglobin-Sequenz wurde die konstitutive Neuroglobin mRNA-Expression in Zebrabärbling und Goldfisch untersucht (Abb. C 30).

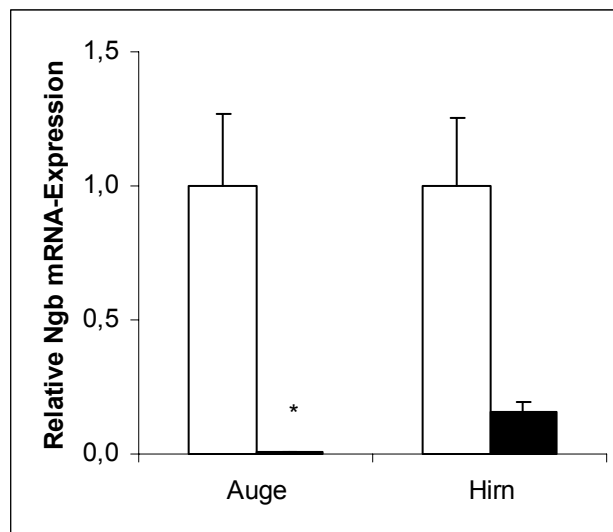


Abb. C 30: Konstitutive Neuroglobin mRNA-Expression

Dargestellt ist die Neuroglobin mRNA-Mengen in Zebrabärbling (weiße Balken, N = 3) und Goldfisch (schwarze Balken, N = 4). * P < 0,05 (t-Test).

Deutlich zu erkennen ist die sehr viel geringere Neuroglobin mRNA-Menge in Geweben des Goldfisches, der im Auge nur 1% und im Hirn nur 15% der Menge an Neuroglobin-mRNA zu besitzen scheint wie der Zebrabärbling.

Allerdings muss das Ergebnis der Auswertung angezweifelt werden, da offensichtlich bei beiden Fischen sehr starke Unterschiede in der Effizienz der PCR-Reaktion auftraten (Abb. C 31). Beim Zebrabärbling zeigt der Amplifikationsplot einen normalen Verlauf mit einer exponentiellen Phase, wie er auch für andere Untersuchungen der Neuroglobin mRNA-Expression beobachtet wurde. Für Hirn und Auge des Goldfisches ist jedoch nur eine sehr schwache Amplifikation zu erkennen, was sich in einem flachen Kurvenverlauf im Amplifikationsplot äußert. Diese Abweichung der Effizienz der PCR-Reaktion ist vermutlich auf unterschiedlich gute Primerbindung zurück zu führen. Eine schlechte Qualität der cDNA-Proben des Goldfisches kann ausgeschlossen werden, da die Proben zur selben Zeit in anderen Untersuchungen sehr gute Amplifikationen ergaben.

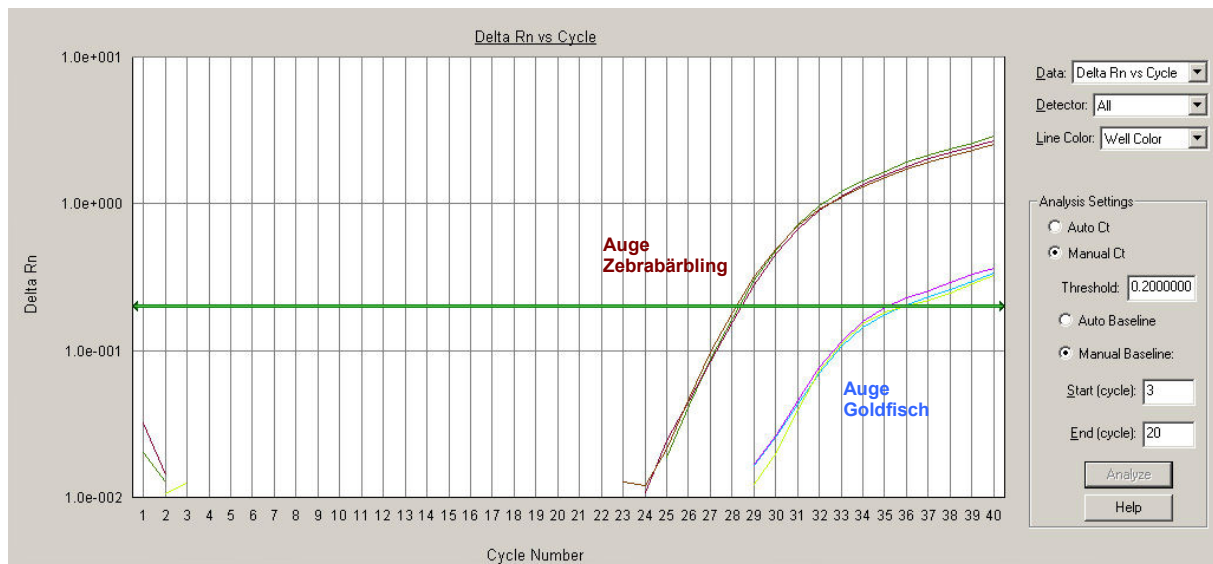


Abb. C 31: Amplifikationsplot zur Untersuchung der konstitutiven Neuroglobin-Expression

Gezeigt ist ein Amplifikationsplot der Auswertung der Expression von Neuroglobin im Auge von Zebrafisch und Goldfisch. Deutlich zu erkennen ist der typische exponentielle Verlauf der Zunahme der PCR-Produkte beim Zebrafisch, während für den Goldfisch eine wesentlich geringere Effizienz der PCR-Reaktion vorliegt.

3.2 Konstitutive Neuroglobin-Proteinexpression

Aufgrund der geringen Aussagekraft des Vergleichs der Neuroglobin mRNA-Expression wurde zusätzlich die Proteinexpression in den Geweben Auge und Hirn untersucht. Hierzu wurden jeweils 100 µg Proteinextrakt elektrophoretisch aufgetrennt und Neuroglobin durch Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Neuroglobin des Zebrafisches nachgewiesen. Exemplarisch dargestellt (Abb. C 32) ist der Western Blot zum Vergleich der Neuroglobin-Proteinexpression im Hirngewebe von Zebrafisch und Goldfisch. Deutlich zu erkennen ist die höhere Neuroglobin-Expression im Goldfisch.

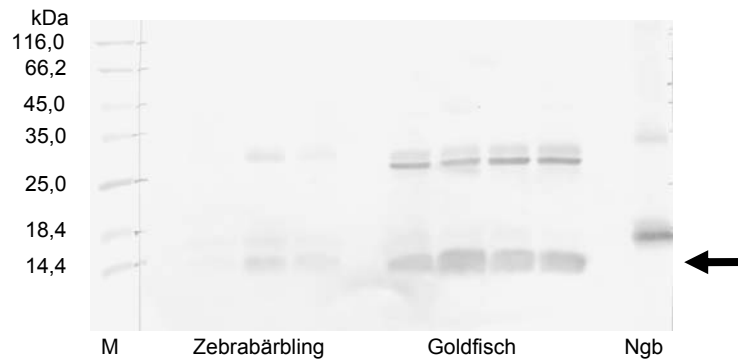


Abb. C 32: Western Blot-Analyse zur konstitutiven Neuroglobin-Expression

Exemplarisch dargestellt ist der Western Blot zur Untersuchung der Neuroglobin-Expression im Hirn von normoxischen Zebrabärblingen (N = 3) und Goldfischen (N = 4). Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Proteinextrakt, Verdünnung des Primärantikörpers 1:500, M = Marker, Ngb = rekombinantes Neuroglobin (0,5 µg). Die Neuroglobin-Konzentration im Hirn des Goldfisches ist deutlich höher als im Zebrabärbling.

Die Auswertung mit dem Programm "Scion Image" (Scion Corporation, USA, <http://www.scioncorp.com/>) ergab eine deutlich erhöhte Neuroglobin-Proteinexpression in Geweben des Goldfisches verglichen mit dem Zebrabärbling (Abb. C 33). So wurde in normoxischen Augen eine 3-fach erhöhte Neuroglobin-Konzentration für den Goldfisch beobachtet. Im Hirngewebe besitzt der Goldfisch eine signifikant 5-fach höhere Neuroglobin-Proteinkonzentration als der Zebrabärbling.

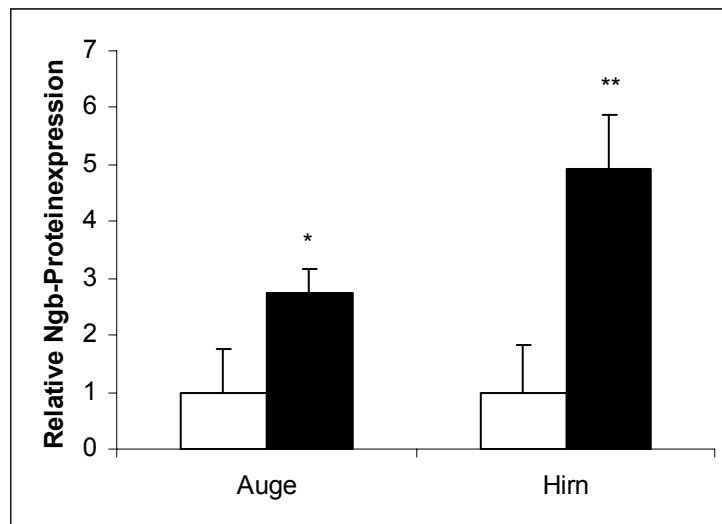


Abb. C 33: Konstitutive Neuroglobin-Proteinexpression

Dargestellt ist ein Vergleich der Neuroglobin-Proteinexpression in Geweben von normoxischen Zebrabärblingen (weiße Balken, N = 3) und Goldfischen (schwarze Balken, N = 4). Es wurde auf die Expression des Zebrabärblings normalisiert. * P < 0,05, ** P < 0,01 (t-Test).

3.3 Konstitutive Myoglobin-Proteinexpression

Die Myoglobin-Expression in Herz- und Hirngewebe von normoxischen Zebrabärblingen und Goldfischen wurde durch quantitative Western Blot-Analysen mit 15 µg (Herz) oder 100 µg (Hirn) Proteinextrakt untersucht. Während der Antikörper in beiden Herzgeweben ein Protein der gleichen Größe detektierte, waren für das Myoglobin-Signal im Hirngewebe von Zebrabärblingen und Goldfischen leichte Größenunterschiede zu erkennen (Abb. C 34), die vermutlich auf Unterschiede der molekularen Masse und des isoelektrischen Punktes der Myoglobine zurückzuführen sind. Die Intensität des Myoglobin-Signals wurde mit dem Programm "Scion Image" (Scion Corporation, USA, <http://www.scioncorp.com/>) ausgewertet (siehe 2.5.3).

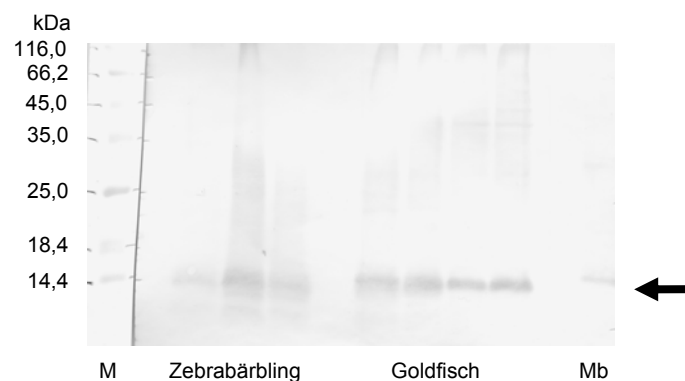


Abb. C 34: Western Blot-Analyse zur konstitutiven Myoglobin-Expression

Dargestellt ist der Western Blot zur Untersuchung der Myoglobin-Expression im Hirn von normoxischen Zebrabärblingen (N = 3) und Goldfischen (N = 4). Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Proteinextrakt, Verdünnung des Primärantikörpers 1:500, M = Marker, Mb = rekombinantes Myoglobin (0,5 µg).

Es konnten nur geringe Unterschiede der Myoglobin-Mengen in beiden Fischen in beiden Geweben beobachtet werden (Abb. C 35). Zum Teil wurden große Abweichungen zwischen den einzelnen Individuen beobachtet, so dass in beiden Fällen keine Signifikanz vorlag.

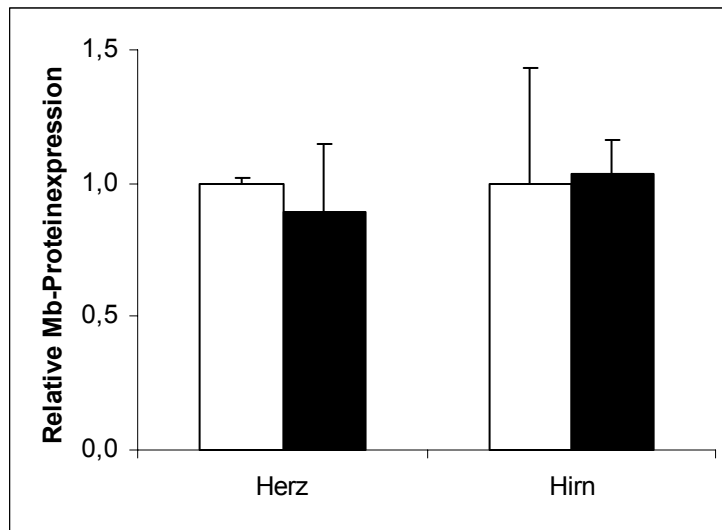


Abb. C 35: Konstitutive Expression von Myoglobin-Protein

Durch quantitative Western Blot-Analyse wurde die Myoglobin-Konzentration in Herz- und Hirngewebe von normoxischen Zebrabärblingen (weißer Balken, N = 3) und Goldfischen (schwarzer Balken, N = 4) verglichen.

D Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Datenbanken nach neuartigen globinähnlichen Sequenzen durchsucht. Deren Analyse erlaubte Rückschlüsse auf die Evolution der Globinfamilie. Die neu identifizierten Globintypen wurden hinsichtlich ihrer proteinbiochemischen Eigenschaften und ihrer Lokalisation in verschiedenen Fischgeweben untersucht. Des Weiteren wurde die Veränderung der Expression aller bekannten Fischglobine unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in den Karpfenfischen *D. rerio* (Zebraabärbling) und *C. auratus* (Goldfisch) bestimmt. Durch den Vergleich der konstitutiven Globinexpression beider Fische ergaben sich erste Hinweise auf mögliche Präadaptationen an Sauerstoffmangel.

1 Identifikation und Charakterisierung neuartiger Globine in Fischen

1.1 Globin X: Ein fünfter Globintyp der Wirbeltiere!

Seit vielen Jahren sind Globine gleichermaßen ein wichtiges Modell zur Untersuchung der Protein- und Genevolution als auch zur Aufklärung der Verwandtschaft verschiedener Tierarten (Graur & Li, 2000). Zu Beginn meiner Arbeit waren vier Globine bekannt, die in allen Wirbeltierklassen präsent sind. Neben Hämoglobin und Myoglobin besitzen die Wirbeltiere noch zwei weitere Globine, das Neuroglobin und das Cytoglobin (Burmester et al., 2000; 2002; 2004; Hankeln et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte in Fischen und Amphibien noch ein weiteres, fünftes Globin identifiziert werden (Roesner et al., 2005). Weil über die Funktion des Globins zunächst noch nichts bekannt war, bekam es den vorläufigen Namen Globin X. Durch phylogenetische Analysen und durch die geringe Ähnlichkeit zu Sequenzen anderer Globine wurde gezeigt, dass Globin X keine nahe Verwandtschaft zu der α - oder β -Kette der Hämoglobine, zu Myoglobin oder zu den Cytoglobinen von Fischen, Amphibien oder anderen Vertebraten aufweist.

1.1.1 Ubiquitäre Expression von Globin X

Globin X wird in zahlreichen Geweben exprimiert (Abb. C 5), jedoch muss die Lokalisation auf zellulärer Ebene noch genauer untersucht werden. Trotz seiner relativ nahen phylogenetischen Verwandtschaft zu Neuroglobin konnte gezeigt werden, dass Globin X kein primär neuronales Protein ist. Durch semi-quantitative PCR konnte in Auge und Hirn des Goldfisches keine Expression von Globin X nachgewiesen werden, eine quantitative PCR ergab jedoch in beiden Geweben des Zebraabärblings eine sehr geringe Konzentration von Globin X, die weniger als 5% der mRNA-Menge von Neuroglobin entsprach (Abb. C 6). Es

konnte weiterhin eine verstärkte Expression von Globin X-mRNA in älteren Tieren gezeigt werden (Abb. C 7), was darauf hindeutet, dass Globin X möglicherweise eine entwicklungsabhängige Funktion einnimmt. Obwohl zurzeit noch keine Funktionen von Globin X bekannt sind, lassen sich durch die Identifikation von Globin X wichtige Aussagen über die Globinevolution auf Protein- und Genebene treffen.

1.1.2 Charakterisierung der Protein- und Genomstruktur von Globin X

Ähnlich wie Cytoglobin (Burmester et al., 2002) und wie einige Invertebratenglobine (Neuwald et al., 1997) besitzt das Globin X-Protein Verlängerungen am N- und C-Terminus. Ein Vergleich dieser Anhänge mit Datenbanksequenzen ergab keine erkennbaren Ähnlichkeiten. Der N-terminale Bereich wird größtenteils von einfachen Sequenzabschnitten gebildet. In manchen Sequenzen des Kugelfisch-Globin X wurde ein "Indel" (Insertion oder Deletion) einer Aminosäure in der Alanin-reichen Region beobachtet (siehe auch Abb. C 3). Kurze Sequenzduplikationen, die möglicherweise durch "replication slippage" verursacht wurden, sind bereits für die N-terminale Region der Cytoglobine von Säugern beschrieben worden (Burmester et al., 2002).

Muster und Verhältnis der Aminosäure- und Nukleotidsubstitutionen geben einen Hinweis auf die Stärke des Selektionsdrucks, der die Evolution der Globin X-Sequenzen geprägt hat. Ähnlich wie bei anderen Vertebratenglobinen liegt die Aminosäuresubstitutionsrate der Globin X-Sequenzen im Bereich von 10^{-9} Substitutionen pro Position und Jahr (Graur & Li, 2000; Wystub et al., 2004). Die Globindomäne ist hochkonserviert, mit vergleichbaren Substitutionsraten, wie sie bei Neuroglobin und Cytoglobin beschrieben wurden (Wystub et al., 2004). Aus diesem Grund resultiert die geringe Ähnlichkeit von Globin X mit Hämoglobin, Myoglobin und Cytoglobin wahrscheinlich eher aus der frühzeitigen Entstehung des Globin X als aus einer erhöhten Evolutionsrate (siehe unten). Der Selektionsdruck kann auch durch das Verhältnis von synonymen zu nichtsynonymen Austauschungen bestimmt werden (Nei & Gojobori, 1986), die zwischen verschiedenen Globinen sehr stark variieren können (Wystub et al., 2004). Ein starker Selektionsdruck innerhalb einer kodierenden Region bedeutet, dass mehr synonyme (d_s) als nichtsynonyme (d_n) Nukleotidsubstitutionen stattfinden (siehe Tabelle C 1). Betrachtet man die gesamte Globin X-Sequenz ($d_s/d_n = 9,6$), liegt das d_s/d_n -Verhältnis in dem für Vertebraten-Hämoglobine ($d_s/d_n = 2,8 - 3,9$) und -Myoglobine ($d_s/d_n = 7,0$) beschriebenen Bereich (Wystub et al., 2004; Roesner et al., 2005). Innerhalb der Globindomäne ist das Verhältnis ($d_s/d_n = 28,6$) durch die geringere Anzahl der nicht-synonymen Austausche jedoch wesentlich größer. Dies deutet darauf hin, dass auf der Globindomäne ein starker Selektionsdruck gelegen hat, der die Struktur des Globin X und sehr wahrscheinlich auch seine Funktion beeinflusst hat.

Der Vergleich der Globin X-Sequenz des Grünen Kugelfisches mit den Sequenzen der Karpfenfische ergibt eine deutlich höhere Evolutionsrate als man durch den Vergleich der

Sequenzen von Fischen und Amphibien erwarten würde. Die gleiche Diskrepanz existiert auch bei den anderen Vertebratenglobinen (Wystub et al., 2004). Während es einerseits möglich erscheint, dass innerhalb der Fische eine erhöhte Substitutionsrate auftritt, ist es auf der anderen Seite auch denkbar, dass die Trennung der Cypriniformes (Karpfenartige) von den Tetraodontiformes (Kugelfischartige) zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden hat als bislang angenommen. Bei der Berechnung der Evolutionsrate wurde die Trennung dieser beiden Ordnungen auf vor 120 Millionen Jahren datiert (Benton, 1990; Wittbrodt et al., 2002), neuere Untersuchungen gehen jedoch von einer früheren Trennung vor 256 bis 312 Millionen Jahren der beiden Taxa innerhalb der Knochenfische aus (Thomas & Touchman, 2002). Diese deutlich längere Zeitspanne nach der Trennung der Cypriniformes und der Tetraodontiformes würde die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position und Jahr mehr als halbieren, und die zunächst beschriebene scheinbar höhere Substitutionsrate erklären.

Die Konservierung der Genanordnung (Reihenfolge und Orientierung) in einem Abschnitt des Genoms (Synthetie) gibt Hinweise auf die Evolution einzelner Gene. Eine Betrachtung der Genomsequenzen erlaubt es, eine Aussage über benachbarte Gene des Globin X-Lokus zu treffen. Das Globin X-Gen des Japanischen Kugelfisches *Tetraodon rubripes* ist nicht komplett sequenziert, es fehlen Teile des ersten Introns und das zweite Exon. Das Globin X-Gen des Japanischen Kugelfisches befindet sich auf dem "scaffold" M000153 und liegt zwischen den Genen, die für den Hepatocyten Wachstumsfaktor-Aktivator Inhibitor 1 ("hepatocyte growth factor activator inhibitor 1") und für die Phospholipase D3 kodieren. Die orthologen Gene des Menschen befinden sich auf den Chromosomen 15q5 und 19q13.2, und weder diese, noch mögliche paraloge Gene sind im humanen Genom mit dem Genlokus eines Globins assoziiert. Die chromosomale Lage des Globin X-Gens liefert somit kaum Information zum chromosomalen Ursprung in einem ursprünglichen Taxon.

1.1.3 Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von Globin X

Zur biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung wurde zunächst die Globindomäne von Globin X (Globin X Δ NC, Aminosäuren 25-184, pI-Wert = 7,79) des Zebraäblings rekombinant in Bakterien exprimiert. Anhand der globintypischen Rotfärbung der Proteinlösung (Abb. C 10) konnte schon früh geschlossen werden, dass das rekombinante Protein eine Hämgruppe gebunden hatte. Das aufgenommene Absorptionsspektrum des oxygenierten und deoxygenierten Globin X Δ NC (Abb. C 11) ähnelt stark dem des Neuroglobins (Burmester et al., 2000; Fuchs et al., 2004). Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei Globin X Δ NC ebenso wie bei Neuroglobin um ein im deoxygenierten Zustand hexakoordiniertes Globin handelt. Auffällig ist, dass sowohl bei Neuroglobin als auch bei Globin X Δ NC das Maximum der deoxygenierten Form im Vergleich zur oxygenierten Form stark in den langwelligeren Bereich verschoben ist. Da bei

hexakoordinierten Globinen nach Dissoziation des Sauerstoffs das distale Histidin die sechste Koordinationsstelle des Eisens einnimmt, wird das delokalisierte π -Elektronensystem des Häm-Ringes vergrößert. Hieraus resultieren eine stärkere Absorption des Proteins sowie eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums. Dieser Effekt war auch deutlich an der Proteinlösung zu erkennen. Während oxygeniertes Globin X Δ NC intensiv rot gefärbt ist (siehe Abb. C 10), ist die deoxygenierte Proteinlösung lediglich leicht orange gefärbt. Das nahezu identische Absorptionsspektrum von Neuroglobin und Globin X Δ NC lässt Rückschlüsse auf mögliche weitere Ähnlichkeiten der biochemischen Eigenschaften (Ligandenkinetik, Sauerstoffaffinität) zu.

Hexakoordination wurde neben Neuroglobin und Cytooglobin auch für Globine der Bakterien, Pflanzen und Invertebraten beschrieben (Kundu et al., 2003), doch obwohl diese weite Verbreitung im Organismenreich eine konservierte Funktion vermuten lässt, ist über die physiologische Bedeutung der Hexakoordination noch nichts bekannt. Kürzlich konnte für das Neuroglobin von Maus und Mensch gezeigt werden, dass bereits geringe Veränderungen des pH-Wertes einen großen Einfluss auf die Bindung von externen Liganden wie O_2 haben (Fago et al., 2004; Nienhaus et al., 2004). In Globin X Δ NC bewirkt eine Zunahme des pH-Wertes von pH 7 zu pH 8 eine 10-fache Verringerung der Sauerstoffaffinität (Abb. C 12). Dieser reverse Bohr-Effekt erleichtert die Bindung von Sauerstoff im stoffwechselaktiven Gewebe. Ein reverser Bohr-Effekt wurde ebenfalls beim Neuroglobin des Zebrafisches bei niedrigen Temperaturen und einem pH-Wert unter 6,5 beschrieben (Hundahl et al., 2006 a), während die Sauerstoffaffinität von pentakoordiniertem Myoglobin keinen Bohr-Effekt zeigt, also unabhängig vom pH-Wert ist.

Der bei hexakoordinierten Globinen beobachtete reverse Bohr-Effekt lässt sich durch eine Protonierung des distalen Histidin E7 bei niedrigen pH-Werten erklären, woraufhin das Histidin aus der Häm-Tasche heraus schwingt und demzufolge die Sauerstoffaffinität des Globins ansteigt (Fago et al., 2004). Möglicherweise bewirkt diese Öffnung der Häm-Tasche zusätzlich den Bruch der Bindung zwischen der Aminosäure E10 (Arginin bei Globin X, Lysin bei Neuroglobin) und dem Propionat des Häms, die den Zugang von externen Liganden zum Häm blockiert, wie es bei humanem und murinem Neuroglobin der Fall ist (Fago et al., 2004; Nienhaus et al., 2004). Der reverse Bohr-Effekt ist umso stärker ausgeprägt, je fester die Aminosäure E10 an das Häm gebunden ist. Die Bindung zwischen dem Arginin des Globin X und dem Propionat des Häms dürfte ähnlich stark sein wie die Bindung zwischen Lysin und Propionat im Neuroglobin des Zebrafisches. Hexakoordination bewirkt nicht nur eine Verringerung der Sauerstoffaffinität, sondern reduziert auch die Temperaturempfindlichkeit der Ligandbindung (Uzan et al., 2004; Hundahl et al., 2006 a). Dies könnte die Bindung von externen Liganden wie O_2 unabhängig von der Temperatur machen, was besonders in poikilothermen Tieren wie Fischen und Amphibien von großer physiologischer Relevanz sein könnte, da die Körpertemperatur dieser Tiere starken Schwankungen unterworfen ist

(Hankeln et al., 2005). Das Neuroglobin des Zebrafisches zeigt zum Beispiel eine deutlich geringere Temperaturempfindlichkeit der Oxygenierung als humanes Neuroglobin oder pentakoordiniertes Myoglobin (Hundahl et al., 2006 a).

Durch die Zugabe von DTT verringert sich die Sauerstoffaffinität von Globin X Δ NC bei pH 7,5 4-fach (Abb. C 12), was vermuten lässt, dass die Bildung einer Disulfidbrücke die Sauerstoffaffinität des Globin X kontrolliert. Der Hill-Koeffizient ($n = 1,2-2,3$) von Globin X Δ NC lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Kooperativität zu. Durch Röntgenstrukturanalyse konnte bei Cytoglobin die Bildung eines Homodimers nachgewiesen werden, eine derartige Orientierung der zwei Untereinheiten war zuvor bei Vertebratenglobinen noch nicht bekannt (de Sanctis et al., 2004). Eine ähnliche dimere oder sogar tetramere Struktur von Globin X ist ebenfalls möglich.

1.1.4 Möglicher Verlust von Globin X in der Evolution der Amniota

Globin X-Sequenzen konnten sowohl in Fischen als auch in Amphibien nachgewiesen werden, so dass die Entstehung dieses Gens auf einen Zeitpunkt vor der Trennung der Tetrapoden und der Knochenfische vor 420 Millionen Jahre (Benton, 1990) datiert werden kann. Datenbanksuchen ergaben keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines homologen Gens in den verfügbaren Sequenzen von Säugetieren und Vögeln. Aus diesem Grund erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das Globin X-Gen in der Evolution der Amnioten verloren gegangen ist. Mit dem Übergang zum Landleben war die Funktion von Globin X möglicherweise obsolet, da den Tieren mit Luft als Atemmedium eine konstante, höhere Sauerstoffkonzentration zur Verfügung stand, als dies zuvor in ihrem aquatischen Lebensraum der Fall war (siehe auch A 1). Der Verlust von Globin X in Säugern und Vögeln deutet auf eine mögliche sauerstoffabhängige Funktion hin, jedoch müssen hierzu noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

1.1.5 Mögliche Hinweise für eine Intronverschiebung in Globinen

Intronpositionen werden als wichtige Hinweise für die Evolution von Genen angesehen, jedoch ist die Herkunft der Introns in Globingenen und die Stabilität ihrer Positionen zum Teil umstritten (Hankeln et al., 1997; Logsdon et al., 1998). Die Globin X-Gene besitzen die globintypischen Introns an den Positionen B12.2 und G7.0, die auch in den meisten Vertebraten- und Invertebratenglobinen konserviert sind, inklusive aller bekannten Hämoglobine, Myoglobine, Neuroglobine und Cytoglobine der Vertebraten (Hardison, 1996; Hankeln et al., 1997; Burmester et al., 2000; 2002). Aus diesem Grund werden die Introns B12.2 und G7.0 als phylogenetisch ursprünglich angesehen (Dixon & Pohajdak, 1992; Hardison, 1996). Das Globin X-Gen besitzt zusätzlich zwei weitere Introns. Während das Intron in der H-Helix an Position H10.0 in keinem anderen Globin beobachtet werden konnte,

und somit sehr wahrscheinlich erst nach der Trennung von Globin X von den anderen Globinen erworben wurde, verdient das zentrale Intron an Position E10.2 nähere Betrachtung. In verschiedenen Globingenen konnten Introns in der E-Helix gefunden werden, die sich jedoch in ihrer genauen Position unterscheiden (siehe Abb. D 1).

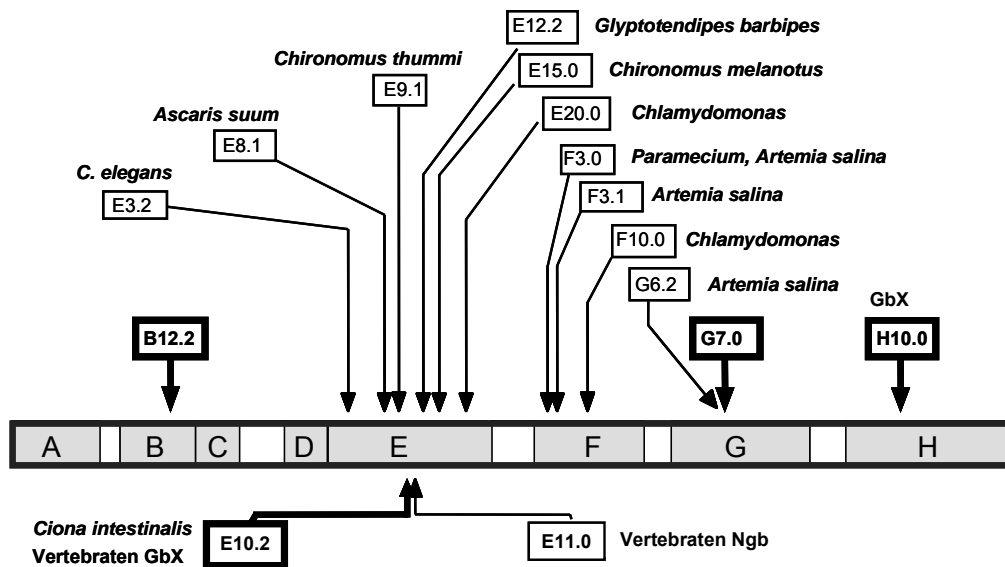


Abb. D 1: Intronpositionen in Globingenen der Metazoa

Dargestellt ist die Lage der Introns relativ zu den α -Helices A-H. Introns von Globin X sind hervorgehoben (verändert nach Roesner et al., 2005).

Alle vier Hämoglobine von *Ciona intestinalis*, die eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zu Globin X zeigen (siehe Abb. C 4), besitzen ebenfalls ein Intron an Position E10.2 (Ebner et al., 2003). Interessanterweise ist das entsprechende Intron der Vertebraten-Neuroglobine, welches die nächsten Verwandten von Globin X sind, an Position E11.0 lokalisiert und damit im Vergleich zur Position E10.2 lediglich um ein Basenpaar verschoben. Obwohl es denkbar erscheint, dass beide Introns voneinander unabhängig durch ein Insertionsevent entstanden sind, muss die Möglichkeit der Intronverschiebung ("intron sliding") ebenfalls in Betracht gezogen werden (Rogers, 1986; Stoltzfus et al., 1997). Im Moment gibt es keine einfache Erklärung für die Verschiebung der Intron-Exon-Grenze um lediglich ein Basenpaar. Kein bekannter Mechanismus, außer einem zeitgleichen Auftreten zweier unabhängiger Mutationen, existiert, der eine solche Verschiebung des Introns hervorrufen könnte (Stoltzfus et al., 1997). Aufgrund der nahen phylogenetischen Verwandtschaft von Neuroglobin, Globin X und den Hämoglobinen von *Ciona* ist die Hypothese möglich, dass das zentrale Intron frühzeitig in der Evolution entstanden ist (möglicherweise an Position E10.2). Neuroglobin wäre damit ein Beispiel für das sehr selten auftretende Phänomen der Intronverschiebung (Rogozin et al., 2000).

1.1.6 Zwei Globinfamilien im Tierreich?

Die Proteinsuperfamilie der Globine ist im Tierreich weit verbreitet. Eine Aufklärung der Globin-Phylogenie könnte dabei helfen, auch die Evolution der Globinfunktionen zu verstehen. Zurzeit ist es nicht möglich, eine Außengruppe zu definieren, die eine sinnvolle Wurzelung des phylogenetischen Stammbaumes der Metazoenglobine ergibt. Des Weiteren ist die Auflösung des Baumes, unabhängig von der angewandten Methode, sehr schlecht, was sich in niedrigen Bootstrapping-Werten und geringen Bayes'schen Wahrscheinlichkeiten widerspiegelt (siehe Abb. C 4). Dies wird größtenteils durch die sehr geringe Konservierung der Globine über eine längere Evolutionszeitspanne und die kurze Sequenzlänge hervorgerufen. Trotzdem zeigt der Stammbaum der Metazoenglobine deutlich die Existenz von drei Hauptästen (Abb. C 4). Der eine Ast (Abzweigung C) beinhaltet die meisten Globine der Protostomia, im zweiten Ast (Abzweigung B) sind die Hämoglobine, Myoglobine und Cytoglobine der Vertebraten zu finden, jedoch nicht die Neuroglobine und die Globin X-Proteine. Diese beiden Äste divergierten zu dem Zeitpunkt, als sich die Protostomia vor mehr als 600 Millionen Jahren von den Deuterostomia trennten. Im Gegensatz dazu befinden sich die Neuroglobine und Globin X in einem dritten, wesentlich ursprünglicheren Ast (Verzweigung A), der sowohl Proteine der Protostomia als auch der Deuterostomia enthält. Der phylogenetische Stammbaum der Globine liefert somit deutliche Hinweise darauf, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Bilateria mindestens zwei distinkte Globine besessen hat. Das Vorläuferglobin an Verzweigung A führte letztendlich unter anderem zu den Neuroglobinen und Globin X-Proteinen der Vertebraten, wohingegen das andere ursprüngliche Gen als Vorläufer der Metazoenglobine der Äste B und C angesehen werden kann.

Zurzeit lassen sich keine funktionellen oder strukturellen Gemeinsamkeiten erkennen, die diese Globinfamilien voneinander abgrenzen. So sind in beiden Familien pentakoordinierte Globine wie die Hämoglobine der Vertebraten und des Invertebraten *Glycera* genauso zu finden wie hexakoordinierte Globine (Neuroglobin, Cytoglobin und Globin X) (Pesce et al., 2002; Burmester & Hankeln, 2004). Ebenso sind in allen Ästen myoglobinähnliche sauerstoffspeichernde Proteine und hämoglobinähnliche Sauerstofftransportproteine vertreten. Dies veranschaulicht die große strukturelle und funktionelle Flexibilität der Globine, deren Aufklärung in dem Maße voranschreitet, indem genomische Daten aus verschiedenen Taxa für Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Der in der Einleitung gezeigte Stammbaum zur Phylogenie der Globine (Abb. A 7) muss aufgrund des identifizierten fünften Mitglieds der Globinfamilie für die Fische entsprechend modifiziert werden (Abb. D 2). Vor mehr als 600 Millionen Jahren erfolgte die Trennung der Nervenglobine (unter anderem Neuroglobin und Globin X) von den anderen Globinen, die sich vor ca. 500-600 Millionen Jahren in die Hämoglobine und ein extrazelluläres Vorläuferglobin der Myoglobine und Cytoglobine aufgespalten haben. Innerhalb der Nervenglobine kam es vor ca. 550-500 Millionen Jahren zur Trennung der Neuroglobine und der Globin X-Proteine.

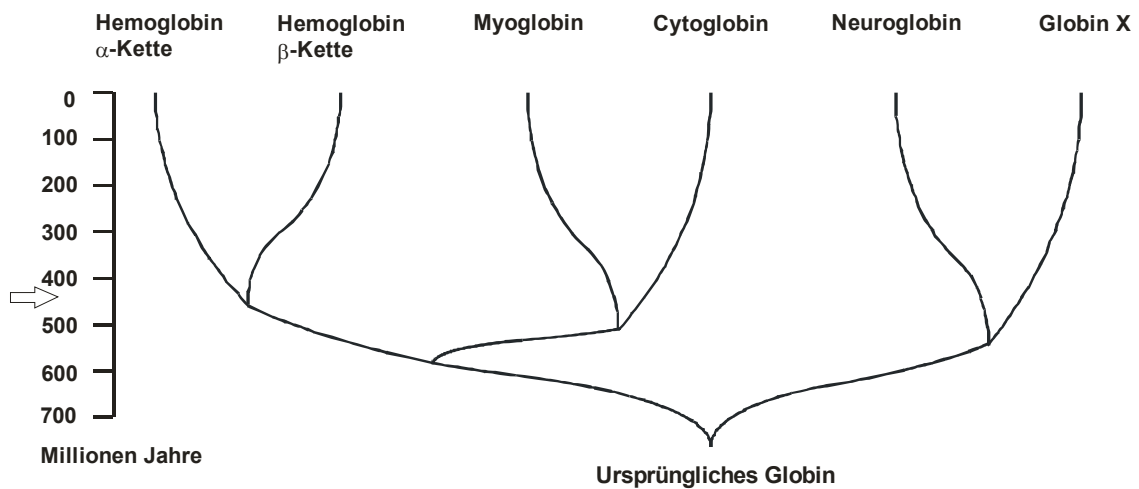


Abb. D 2: Evolution der Fischglobine

Phylogenetische Beziehung der bisher bekannten Globine der Fische. Der Pfeil symbolisiert den ungefähren Zeitpunkt, an dem die Trennung der Knochenfische von den Tetrapoden stattgefunden hat (verändert nach Roesner et al., 2006).

1.2 Zwei Myoglobine der Karpfenfische

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass Myoglobin lediglich in Muskelgewebe exprimiert wird. Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von A. Cossins (Fraser et al., 2006) ergaben allerdings, dass im Karpfen *Cyprinus carpio* Myoglobin auch in zahlreichen anderen Geweben vorhanden ist. Zudem konnte diese Arbeitsgruppe ein weiteres Myoglobin identifizieren, welches lediglich im Hirn exprimiert wird (Fraser et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die Expression von Myoglobin in verschiedenen Geweben des Zebrabärblings und des Goldfisches verifiziert als auch die kodierende Sequenz für das Myoglobin 2 des Goldfisches aufgeklärt werden.

1.2.1 Molekulare und biochemische Charakterisierung der Myoglobine

Mittels RT-PCR wurde im Hirngewebe des Goldfisches die Myoglobin 2-Isoform identifiziert (Abb. C 14). Der Goldfisch ist somit neben dem Karpfen (Fraser et al., 2006) das einzige Tier, bei dem zwei Myoglobin-Isoformen bekannt sind. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Isoformen zeigt, dass die meisten Substitutionen im Bereich der A- und der H-Helix sowie in der flexiblen Region der C- und D-Helix zu finden sind. Die zur Fixierung des Häms benötigten Aminosäuren (Phe CD1, His E7 und F8) sind ebenso wie zahlreiche hydrophobe Aminosäuren der Häm-Tasche konserviert. Die substituierten Aminosäuren befinden sich größtenteils auf der Oberfläche des Proteins, wo sie nur einen geringen Einfluss auf die Flexibilität der Proteinkette und die Häm-Bindung haben.

Eine hohe Konzentration von Myoglobin 2 im Gehirn des Goldfisches könnte, wie für Neuroglobin vorgeschlagen (Burmester et al., 2000; Hankeln et al., 2005), die Sauerstoffversorgung dieses Gewebes unter Hypoxie verbessern. Im Skelettmuskel von Säugetieren wurde eine Beteiligung von Myoglobin am Abbau von toxischen reaktiven Stickstoffverbindungen wie NO beobachtet (Flögel et al., 2001; Wittenberg & Wittenberg, 2003). Eine solche Funktion kommt möglicherweise auch für die Myoglobine der Fische in Betracht.

Die beschriebene ubiquitäre mRNA-Expression von Myoglobin 1 im Karpfen (Fraser et al., 2006) konnte auf Proteinebene auch für verschiedene Goldfischgewebe nachgewiesen werden. Die Expression in Hirn, Kieme, Leber und Schwimmblase war ungefähr vergleichbar stark, eine deutlich höhere Konzentration war im Herzgewebe zu beobachten (Abb. C 18). Dies entspricht der ursprünglichen Annahme, dass besonders hohe Myoglobin-Konzentrationen im Muskelgewebe vorhanden sind. Durch die hohe Identität der beiden Isoformen erkennt der Antikörper beide Myoglobine, so dass auf Proteinebene zunächst keine Aussage über die unterschiedlich starke Expression der beiden Isoformen im Hirn

getroffen werden kann. Allerdings besitzt das im Hirn des Goldfisches detektierte Myoglobin eine etwas höhere molekulare Masse als das Myoglobin in den anderen Geweben (CauMb1; Abb. C 18). Die errechnete molekulare Masse von Myoglobin 2 des Goldfisches (CauMb2, 16,16 kDa) ist nur geringfügig größer als die von Myoglobin 1 (CauMb1, 15,85 kDa), jedoch unterscheiden sich beide Myoglobin-Isoformen des Goldfisches hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes deutlich (CauMb1 $pI = 8,85$; CauMb2 $pI = 7,89$). Dies könnte ebenso wie posttranslationale Veränderungen einen Einfluss auf die Laufeigenschaften beider Myoglobine bei der elektrophoretischen Auftrennung haben. Das im Hirn des Goldfisches auf Proteinebene nachgewiesene Myoglobin kann somit der Myoglobin 2-Isoform (CauMb2) zugeordnet werden, während im Hirn keine oder lediglich eine sehr geringe Expression der Myoglobin 1-Isoform (CauMb1) nachgewiesen werden konnte (Abb. C 18 und C 34). Dieses Verhältnis der Expression beider Myoglobin-Isoformen im Hirn des Goldfisches deckt sich mit der von Fraser et al. (2006) beschriebenen starken mRNA-Expression von Myoglobin 2 (CcaMb2) und der geringen Konzentration an Myoglobin 1-mRNA (CcaMb1) im Hirngewebe des Karpfens.

Ein Vergleich der konstitutiven Myoglobin-Expression im Zebrabärbling und im Goldfisch ergab weder im Herz- noch im Hirngewebe deutliche Unterschiede bezüglich der Proteinkonzentration (Abb. C 35). Das im Hirngewebe des Zebrabärblings detektierte Myoglobin (DreMb, 15,83 kDa) ist jedoch geringfügig kleiner als das im Hirn des Goldfisches (CauMb2, 16,16 kDa) nachgewiesene Protein. Die Expression des Myoglobins ist somit auch im Zebrabärbling nicht auf das Muskelgewebe beschränkt.

1.2.2 Phylogenie der Myoglobine

Phylogenetische Untersuchungen (Abb. C 16) haben ergeben, dass die einzelnen Myoglobin-Isoformen (CauMb1 mit CcaMb1, CauMb2 mit CcaMb2) der Cyprininae (Karpflinge) näher miteinander verwandt sind als die verschiedenen Isoformen innerhalb einer Art (CauMb1 mit CauMb2, CcaMb1 mit CcaMb2). Zweifel gibt es jedoch bezüglich der Stellung des Myoglobins von Zebrabärbling (Bärblinge, Rasborinae) und Goldelritze (Eigentliche Weißfische, Leuciscinae). Die Aufspaltung der Karpfenfisch-Myoglobine in dem von mir gezeigte Stammbaum (Abb. C 16) ähnelt der des von Fraser et al. (2006, Abb. D 3) publizierten Stammbaumes. Er impliziert, dass das Myoglobin des Zebrabärblings näher mit der hirnspezifischen Myoglobin 2-Isoform verwandt ist als mit der ubiquitär exprimierten Myoglobin 1-Isoform, zudem müsste der Zebrabärbling nach dieser Aufspaltung ebenfalls zwei Isoformen besitzen.

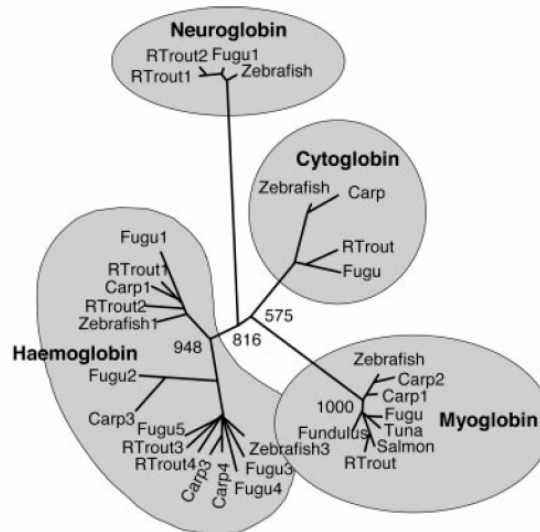


Abb. D 3: Phylogenetische Analyse der Fischglobine

Dargestellt ist der Stammbaum der Fischglobine aus Fraser et al. (2006). Die Bootstrapping-Werte der Verzweigungen sind angegeben (100% = 1000).

Durch Datenbanksuchen (Fraser et al., 2006, eigene Daten Februar 2007) konnte für den Zebraäbrling keine zweite Myoglobin-Sequenz identifiziert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass der Zebraäbrling, ebenso wie die beiden Kärpflinge, zwei Myoglobin-Gene besessen hat, eines davon jedoch im Verlauf der Evolution verloren hat. Dies erscheint allerdings sehr unwahrscheinlich, da das Myoglobin des Zebraäbrlings zwar phylogenetisch mit der zweiten Isoform des Myoglobins der Kärpflinge gruppiert, das ubiquitäre Expressionsmuster jedoch der Myoglobin 1-Isoform entspricht. Der gezeigte phylogenetische Stammbaum der Fisch-Myoglobine (Abb. C 16) erscheint aber nicht nur wegen der falschen Auflösung innerhalb der Cypriniden unwahrscheinlich. Ein weiterer Kritikpunkt ist sicherlich die falsche paraphyletische Anordnung der Makrelenfische (Thunfische, Scombridae), die durch die schwach unterstützte, falsche Abspaltung der Kugelfische (Tetraodontidae), Antarktisdorsche (Nototheniidae) und Krokodileisfische (Channichthyidae) hervorgerufen wird. Mit einer richtigen Aufspaltung der Acanthopterygii (Stachelflosser) würden die Makrelenfische eine monophyletische Gruppe bilden. Durch die Verwendung anderer phylogenetischer Methoden (Neighbor-Joining statt MrBayes) konnte hier keine bessere Auflösung erzielt werden. Phylogenetische Untersuchungen mit kurzen Sequenzlängen führen häufig zu ungenauen Auflösungen im Stammbaum wie es in diesem Fall für den Myoglobin-Stammbaum sehr deutlich wird. Die Richtigkeit des Stammbaumes (Abb. C 16) muss somit stark angezweifelt werden. Eine andere Überlegung zur Entstehung der beiden Myoglobin-Isoformen in Kärpflingen ist notwendig.

Während der Evolution der Fische kam es zu verschiedenen Zeitpunkten zu Duplikationen des Genoms (Zhou et al., 2002). Während die erste Duplikation des Genoms vor ungefähr 440 Millionen Jahren und damit vor der Aufspaltung der Knochenfische in die Fleisch- und Strahlenflosser stattfand, wird das zweite Duplikationsevent der Strahlenflosser auf einen Zeitpunkt vor ungefähr 360 Millionen Jahren datiert. Die meisten höheren Strahlenflosser besitzen somit einen doppelten Chromosomensatz ($2n = 50$). Innerhalb der Karpfenfische (Cyprinidae) kam es zu einer weiteren Genomduplikation, die allerdings auf einzelne Unterfamilien beschränkt ist (Leggatt & Iwama; 2003). Während zahlreiche Vertreter der Kärpflinge (Cyprininae), darunter alle *Cyprinus*-Arten und zahlreiche *Carassius*-Spezies, ein tetraploides Genom ($4n = 100$) aufweisen (Ojima et al., 1966; Ohno et al., 1967; David et al., 2003), sind sowohl der Zebraäbrbling (Rasborinae) als auch die Goldelritze (Leuciscinae) nur diploid ($2n = 50$) (Endo & Ingalls, 1968; Sola & Gornung, 2001; Zhou et al., 2002; Leggatt & Iwama, 2003). Ein Sequenzvergleich verschiedener duplizierter Genloki des Karpfens (Larhammar & Risinger, 1994) datiert ebenso wie eine Untersuchung von Mikrosatelliten-Markern der Cyprinidae (David et al., 2003) die Genomduplikation innerhalb dieser Familie auf einen Zeitpunkt vor 12-16 Millionen Jahren. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass die Genomduplikation innerhalb der Karpfenfische nach der Trennung der Cyprininae von den Rasborinae und den Leuciscinae erfolgte, und das Vorkommen der Myoglobin 2-Isoform somit auf einzelne Unterfamilien der Cyprinidae beschränkt ist. Der letzte gemeinsame Vorfahre von Karpfen und Goldfisch vor der Trennung vor 10,7 Millionen Jahren (David et al., 2003) hatte demnach bereits beide Myoglobin-Isoformen, während der letzte gemeinsame Vorfahre der Cyprininae und der Rasborinae lediglich eine Myoglobin-Isoform besessen hat. Das Myoglobin des Zebraäbrblings müsste deshalb basal zu den beiden Isoformen von Karpfen und Goldfisch stehen.

2 Sauerstoffabhängige Globinexpression in Karpfenfischen

Der Lebensraum von Fischen ist häufig geprägt von niedrigen oder wechselnden Sauerstoffkonzentrationen. Viele Fisch-Spezies haben aus diesem Grund spezielle Anpassungen entwickelt, die ihnen das Leben in sauerstoffarmen Gewässern ermöglichen. Neben Veränderungen ihres Verhaltens, der Anatomie ihrer Kiemen und ihres Stoffwechsels sind auch molekulare und biochemische Adaptationen an Sauerstoffmangel (Hypoxie) beobachtet worden (Nikinmaa, 2002; Nilsson & Renshaw, 2004; Cossins & Crawford, 2005; Nikinmaa & Rees 2005). Daher wurde die Expression von Globinen in Fischen unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen sowohl auf molekularer als auch auf proteinbiochemischer Ebene untersucht und eine Aussage über mögliche Adaptationen in hypoxietoleranten Organismen getroffen.

2.1 Verhaltensänderungen unter Sauerstoffmangel

Unter Sauerstoffmangel zeigen viele Fische deutliche Veränderungen ihres Verhaltens: neben einer generellen Abnahme der Aktivität wird eine Zunahme der Oberflächen- und Luftatmung beschrieben (Kramer, 1987). Diese Anpassungen waren im Falle des Zebraärbings deutlich zu beobachten. Bei starker Hypoxie ($pO_2 < 50$ Torr) hielten sich die Fische bevorzugt am Boden des Aquariums auf und verzichteten fast vollständig auf ein Schwimmen in der Vertikalen. Wahrscheinlich erhöht die verringerte Aktivität aufgrund des damit einhergehenden reduzierten Energieverbrauchs die Überlebensfähigkeit des Fisches unter Sauerstoffmangel. Lediglich die gesteigerte Ventilationsfrequenz der Kiemen ($pO_2 < 65$ Torr) verbraucht größere Mengen Energie als unter normoxischen Bedingungen, trägt jedoch wegen der hiermit verbundenen erhöhten Sauerstoffaufnahme weiter zu einer verbesserten Hypoxietoleranz bei. Bei einigen Zebraärbingen war bei einem pO_2 ab etwa 50 Torr die Tendenz zur Oberflächen- und Luftatmung zu beobachten. Der Aufenthalt an der Wasseroberfläche ermöglicht es den Fischen, eine eventuell höhere lokale Sauerstoffkonzentration auszunutzen. Bei sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen wird die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser zunehmend energieaufwändiger, so dass durch Luftatmung Energie gespart werden kann (Kramer, 1987). Das Phänomen der Oberflächenatmung ist bereits bei zahlreichen anderen Fischen beschrieben worden, die an temporäre Schwankungen des Sauerstoffgehalts des Wassers angepasst sind (Kramer, 1983; Affonso et al., 2005; Tobler et al., 2006). Allerdings ist zu erwähnen, dass die Tiere, die sich zu Beginn der Hypoxieexperimente häufig an der Wasseroberfläche aufgehalten haben, zunächst keine deutliche Verringerung ihrer Aktivität zeigten. Erst mit zunehmender Dauer des Sauerstoffmangels (ab 2-3 Stunden) kam es auch bei diesen Tieren zu einer

Reduktion des Schwimmverhaltens. Möglicherweise erklärt das anfangs unterschiedliche Verhalten der Fische die in manchen Versuchen sehr ausgeprägten individuellen Unterschiede der Regulation der Globinexpression. Da die Zebrabärblinge in ihrem natürlichem Habitat auch unter Sauerstoffmangelbedingungen freien Zugang zur Wasseroberfläche haben, kann davon ausgegangen werden, dass die durch die gewählten Versuchsbedingungen hervorgerufenen Veränderungen der Globinexpression auch unter natürlichen Bedingungen zu beobachten sind.

Die Verhaltensänderungen des Goldfisches waren wesentlich schwächer ausgeprägt. Während der insgesamt 64 Stunden bei einem $pO_2 \sim 50$ Torr waren keine Veränderungen zwischen den Tieren der Hypoxiegruppe und der Kontrollgruppe zu erkennen. Erst bei einem sehr starken Sauerstoffmangel ($pO_2 \sim 13$ Torr) zeigten die Goldfische ein eingeschränktes Schwimmverhalten in der Vertikalen. Offensichtlich ist der Goldfisch durch Veränderungen auf Ebene des Stoffwechsels (modifizierte Glykolyse mit Ethanol als Endprodukt; Shoubridge & Hochachka, 1980) oder durch andere physiologische Anpassungen dazu in der Lage, auch unter Sauerstoffmangel eine unveränderte Aktivität aufrecht zu erhalten. Erst bei sehr starker Hypoxie ($pO_2 \sim 13$ Torr) muss er seine Aktivität reduzieren, um Energie zu sparen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen zeigte keiner der Goldfische die beim Zebrabärbling beobachtete Luft- und Oberflächenatmung. Die Anpassung an einen Lebensraum, der sehr häufig geringe Sauerstoffkonzentrationen aufweist, führt offensichtlich dazu, dass der Goldfisch, ähnlich wie andere bevorzugt am schlammigen Grund von stehenden Gewässern lebende Fische, nicht auf eine Sauerstoffaufnahme an der Wasseroberfläche angewiesen ist. Verschiedene Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass lediglich die Fische, die temporären, kurzfristigen Sauerstoffmangelbedingungen ausgesetzt sind, unter Hypoxie auf Oberflächen- oder Luftatmung ausweichen (Kramer & McClure, 1982; Kramer, 1983; 1987; Weber & Kramer, 1983; Affonso et al., 2005; Tobler et al., 2006).

2.2 Rolle der respiratorischen Proteine in der Hypoxieantwort

Die Aufrechterhaltung eines konstanten Sauerstoffflusses vom Wasser zu der Atmungskette der Mitochondrien ist für die Fische unter Sauerstoffmangel besonders wichtig. Respiratorische Proteine erhöhen die Menge des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs bereits unter Normoxie deutlich (Schmidt & Thews, 1997), so dass Veränderungen ihrer Konzentration oder ihrer physiologischen Eigenschaften unter Hypoxie wahrscheinlich sind. Hämoglobin transportiert den an den respiratorischen Epithelien aufgenommenen Sauerstoff über das Kreislaufsystem im Körper und gewährleistet so die Versorgung aller Zellen mit Sauerstoff. Myoglobin als Sauerstoffspeicherprotein verbessert die Sauerstoffversorgung der quergestreiften Muskulatur. Bisher ist wenig bekannt über die Funktion der kürzlich entdeckten weiteren Mitglieder der Globinfamilie, Neuroglobin, Cytoglobin und Globin X

(Burmester & Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005), die ebenfalls in Fischen exprimiert werden (Awenius et al., 2001; Burmester et al., 2002; Fuchs et al., 2004; 2005; Roesner et al., 2005). Die Expression der respiratorischen Proteine in Tieren, die in ihrer Evolution Adaptationen an phasenweise geringe Sauerstoffkonzentrationen entwickelt haben, kann auch Hinweise auf ihre generelle physiologische Funktion und ihre besondere Rolle in der Hypoxieantwort geben.

2.3 Zebrabärblinge bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen

In einer früheren Untersuchung wurde gezeigt, dass adulte Zebrabärblinge in der Lage sind, bei einem Sauerstoffpartialdruck von 15 Torr (2 kPa) bei 22°C für 48 Stunden zu überleben (Rees et al., 2001). In meinen Versuchen betrug allerdings die Mortalität bei einem $pO_2 = 18$ Torr (2,4 kPa) bereits mehr als 80% nach 24 Stunden. Dieser deutliche Unterschied lässt sich möglicherweise durch Unterschiede in den Zuchtlinien der verwendeten Zebrabärblingen erklären. Eventuell könnten auch andere Versuchsparameter wie Wasserwerte, Beckengröße und Strömung des Aquarienwassers sowie das Alter der adulten Tiere einen Einfluss auf ihre Widerstandskraft gegen Sauerstoffmangel haben. Zudem wurde von einer Abhängigkeit der Überlebensfähigkeit von den Jahreszeiten berichtet, die in Herbst und Winter höher war als in Frühjahr und Sommer; auch scheint das Geschlecht der Tiere einen gewissen Einfluss auf die Hypoxietoleranz zu haben (Rees et al., 2001).

In den Experimenten unter starker Hypoxie wurde die Sauerstoffkonzentration des Wassers auf 31 Torr eingestellt, die deutliche Hochregulation der Kontrollgene Lactatdehydrogenase A und Phosphoglyceratkinase 1 (Abb. C 21), deren Hypoxieantwort bereits in Microarray-Studien belegt wurde (Ton et al., 2003), demonstriert, dass die Zebrabärblinge auch unter diesen Bedingungen einem hypoxischen Stress ausgesetzt waren.

In den quantitativen real-time PCR-Experimenten wurde eine große Standardabweichung zwischen den einzelnen Individuen des Zebrabärblings beobachtet. Eine ähnliche Variabilität wurde bereits bei verschiedenen Fisch-Spezies in Microarray-Studien beschrieben (Oleksiak et al., 2002; Cossins & Crawford, 2005). Abweichungen auf mRNA-Ebene verdeutlichen die genetischen, physiologischen und verhaltensbasierten Unterschiede zwischen einzelnen Individuen. Nichtsdestotrotz waren die meisten Veränderungen der Globinexpression auf mRNA-Ebene signifikant, und konnten im Fall von Neuroglobin und Myoglobin auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. C 24). Zudem wurde eine sehr ähnliche Expressionsstärke von Hämoglobin α und β beobachtet, wie es bei solchen co-regulierten Genen zu erwarten war (Hardison, 1998). Die Variationen der Myoglobin- und Neuroglobin-Proteinexpression waren wesentlich geringer als die Abweichungen auf mRNA-Ebene, was eine zusätzliche Regulation auf der Ebene der Translation vermuten lässt.

2.3.1 Reduzierte Expression von Hämoglobin unter Hypoxie

Ein sehr überraschendes Ergebnis der vorliegenden Studie ist die deutliche Abnahme der mRNA-Menge von Hämoglobin α und β nach zwei Tagen Hypoxie im Vergleich zur Normoxiekontrolle (Abb. C 20). Die Hypoxieantwort von Hämoglobin in Fischen ist nicht einheitlich (Nikinmaa & Rees, 2005). Während manche Untersuchungen über eine Zunahme der Hämoglobin-Expression unter Hypoxie berichten (zum Beispiel Timmerman & Chapman, 2004), beobachten andere keine Veränderung der Hämoglobin-Konzentration (zum Beispiel Person-Le Ruyet et al., 1998) oder eine Abhängigkeit der Hypoxieantwort von der Expositionsdauer (Affonso et al., 2002). Die Hypoxieantwort ist somit vermutlich speziesspezifisch. Eine Abnahme der Hämoglobin mRNA-Expression im Zebraäbrbling wurde bisher nur in Microarray-Studien mit Embryonen nachgewiesen (Ton et al., 2003). Als Erklärung für die Abnahme der Hämoglobin-Expression führten die Autoren an, dass Embryonen des Zebraäbrblings 24 Stunden nach der Befruchtung (24 hpf) keine Blutzirkulation benötigen, weil bereits durch Diffusion die Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. Ohne Zweifel kann dieses Argument für die vergleichbare Abnahme der Hämoglobin-Konzentration in adulten Zebraäbrblingen nicht angebracht werden, da diese sehr wohl von einem Blutkreislaufsystem zur Sauerstoffversorgung abhängig sind. Eine alternative Hypothese zur Erklärung der Hämoglobin-Regulation unter Hypoxie muss in Erwägung gezogen werden.

Zunächst muss betont werden, dass die Regulation von Hämoglobin lediglich auf mRNA-Ebene untersucht wurde, auf Proteinebene könnte sich ein anderes Ergebnis zeigen. Zudem könnte die Induktion der distinkten Hämoglobin-Ketten eine Erklärung sein. Datenbanksuchen haben ergeben, dass Zebraäbrblinge sechs Kopien des Hämoglobin α -Gens und fünf des β -Gens besitzen. Entsprechend der Angaben in den Datenbanken sind zwei der α - und drei der β -Hämoglobine embryonale Hämoglobine, so dass zahlreiche Kopien jedes Gens auch im adulten Zebraäbrbling vorhanden sind und möglicherweise exprimiert werden können. Die in der quantitativen real-time PCR verwendeten Primer waren so gewählt, dass sie alle adulten Hämoglobin α - oder β -Ketten amplifizieren konnten. Ein differentielles Verhalten der verschiedenen adulten Hämoglobin-Gene würde allerdings die beobachtete generelle Abnahme der Hämoglobin-Expression nicht verändern. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter Hypoxie eine Expression embryonaler Hämoglobinketten induziert wird. In der Tat konnte durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden, dass Hypoxie das Expressionsmuster der Hämoglobinketten in der Regenbogenforelle verändert (Marinsky et al., 1990). Da allerdings bereits in Embryonen des Zebraäbrblings eine Abnahme der Expression embryonaler Hämoglobine nach Sauerstoffmangel beobachtet wurde (Ton et al., 2003), erscheint eine hypoxieinduzierte Expression embryonaler Hämoglobine in adulten Zebraäbrblingen unwahrscheinlich, weshalb eine andere Erklärung in Betracht gezogen werden muss.

Möglich wäre, dass unter Hypoxie die Menge des Hämoglobins höher ist als die des verfügbaren Sauerstoffs. Ein Anstieg der Hämoglobin-Konzentration und damit eine Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität hätte nur einen geringen Effekt auf die Sauerstoffversorgung, würde aber durch die Proteinbiosynthese sehr viel Energie verbrauchen. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Hypoxie in Fischen eine Veränderung der Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämoglobins hervorruft (Weber & Jensen, 1988; Nikinmaa, 2001; Jensen, 2004). Unter Sauerstoffmangel kommt es zu einer Abnahme der Konzentration der Regulatoren Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) in den roten Blutzellen, was eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bewirkt. Dies ist ein effizienterer Weg, um die Sauerstoffaufnahme des Blutes zu erleichtern. Die Abnahme der Hämoglobin mRNA-Konzentration kann durch einen energiesparenden Mechanismus erklärt werden, der die Synthese von Hämoglobin beendet.

Allerdings wurden in den durchgeführten Experimenten lediglich kurzzeitige Veränderungen nach maximal 2 Tagen Hypoxie untersucht. Es ist möglich, dass andere Versuchsbedingungen und eine längere Exposition ein verändertes Bild der Hämoglobin-Expression unter Sauerstoffmangel bewirken. Weitere Studien sind somit notwendig, um das Verhalten von Hämoglobin-mRNA unter Hypoxie genauer zu verstehen.

2.3.2 Hypoxie induziert die Myoglobin-Expression

Myoglobin erleichtert die Diffusion des Sauerstoffs von den Blutkapillaren zu den Mitochondrien und speichert Sauerstoff, aber es kann möglicherweise auch NO detoxifizieren (Flögel et al., 2001; Wittenberg & Wittenberg, 2003). In Säugetieren sind die Ergebnisse zur Regulation der Myoglobin-Expression unter Sauerstoffmangel nicht schlüssig. Während unter geringen Sauerstoffkonzentrationen, wie sie zum Beispiel im Höhentraining von Athleten vorkommen, erhöhte Myoglobin-Konzentrationen beobachtet wurden (Hoppeler & Vogt, 2001), gibt es auch Untersuchungen, die diese Auswirkung nicht bestätigen konnten (zum Beispiel Levine & Stray-Gundersen, 2001). In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass im Zebraäbrbling unter starker Hypoxie eine Hochregulation von Myoglobin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erfolgt (Abb. C 20, C 21 und C 24). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der wichtigen Rolle, die Myoglobin in der Sauerstoffversorgung des Gewebes einnimmt. Myoglobin ist ein monomeres Protein und besitzt somit keine hämoglobinähnliche Kooperativität, die seine Sauerstoffaffinität erhöhen könnte. Die einzige Möglichkeit, die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels und anderer Gewebe unter Hypoxie aufrecht zu erhalten, ist demzufolge eine Erhöhung der Myoglobin-Konzentration.

2.3.3 Gewebespezifische Neuroglobin-Regulation unter Sauerstoffmangel

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal die Veränderung der Neuroglobin-Expression unter Sauerstoffmangel in Fischen untersucht. Obwohl dieses respiratorische Protein in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht wurde, ist seine genaue Funktion noch nicht bekannt (Burmester & Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005). Die phylogenetische Verwandtschaft von Neuroglobin zu den Nerven-Hämoglobinen der Invertebraten (Burmester et al., 2000), die positive Korrelation mit der Intensität des zellulären Stoffwechsels (Schmidt et al., 2003), die co-Lokalisation mit Mitochondrien (Bentmann et al., 2005) und seine Fähigkeit, das Überleben von Neuronen unter Hypoxie oder Ischämie zu fördern (Sun et al., 2001; 2003) deuten auf eine myoglobinähnliche Funktion von Neuroglobin hin. Des Weiteren erscheinen auch andere Funktionen von Neuroglobin, wie die Detoxifikation von reaktiven Stickstoffverbindungen und von NO ebenso möglich wie eine Funktion als Sauerstoffsensor (Burmester & Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005; siehe auch Kapitel A 6.3).

Die bisherigen Publikationen zur Regulation der Neuroglobin-Expression in Säugetieren unter Sauerstoffmangel zeigen unterschiedliche Ergebnisse (siehe dazu auch Kapitel D 3). Von Fordel et al. (2004) und Li et al. (2006) wurde in Maus und Ratte eine 2- bis 3-fache Hochregulation von Neuroglobin auf mRNA-Ebene nach moderater Hypoxie (7-12% für 4-5 Tage) beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigten nach Mammen et al. (2002) Mäuse nach einer zweiwöchigen Hypoxie (10% O₂) keine Veränderung der Neuroglobin mRNA-Expression. Andere Untersuchungen ergaben sogar eine Halbierung der Neuroglobin mRNA-Konzentration in Ratten nach 5 Stunden bei 6% O₂ und nach 44 Stunden bei 10% O₂ (Burmester & Hankeln, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Neuroglobin im Hirn und Auge des Zebraäbrblings unter Hypoxie unterschiedlich reguliert wird. Im Hirn konnte nach 24 Stunden bei 31 Torr eine kurzzeitige Hochregulation der Neuroglobin-mRNA beobachtet werden, während im Auge unter diesen Bedingungen keine Veränderungen auftraten (Abb. C 22). Diese Beobachtung deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen der quantitativen Western Blot-Analysen (siehe Abb. C 23, C 24), die im Hirn nach 48 Stunden bei pO₂ = 31 Torr eine signifikante 5,7-fache Erhöhung der Proteinkonzentration von Neuroglobin zeigten, während sich die Expression im Auge lediglich verdoppelte. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise durch das gegensätzliche Verhalten dieser beiden Organe unter Hypoxie erklären. Der Karpfen *Cyprinus carpio*, der ebenfalls zu den Cypriniformes (Karpfenartige) zählt, wird unter Hypoxie blind (Johansson et al., 1997), während das Gehirn aktiv bleibt (Nilsson, 2001). Hieraus lässt sich folgern, dass unter Sauerstoffmangel die Stoffwechselaktivität im Auge des Zebraäbrblings möglicherweise ebenfalls abnimmt, aber im Hirn aufrechterhalten wird. In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von Neuroglobin in Säugetieren sehr stark mit der Stoffwechselaktivität und dem Sauerstoffverbrauch der Zellen korreliert ist (Schmidt et al.,

2003; Bentmann et al., 2005). Hohe Neuroglobin-Konzentrationen erleichtern vermutlich die Aufrechterhaltung des oxidativen Stoffwechsels im Gehirn des Zebrafisches.

Die Genregulation unter Sauerstoffmangel erfolgt häufig über so genannte HREs ("hypoxia responsive elements"), die Bindestellen für den hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 ("hypoxia-inducible transcription factor") aufweisen (Wenger & Gassmann, 1997). Typischerweise besteht ein HRE aus zwei HIF-1-Motiven (5'-RCGTG-3') in direkter oder gegenläufiger Orientierung oder aus einer HIF-1-Bindestelle in Verbindung mit einer benachbarten Bindestelle für einen anderen co-stimulatorischen Transkriptionsfaktor (Semenza et al., 1996; Wystub et al., 2004). Im Neuroglobin-Gen des Zebrafisches konnten fünf Bindestellen für HIF-1 identifiziert werden, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe zueinander ein mögliches funktionelles HRE ausbilden könnten (Fuchs et al., 2004). Ein Charakteristikum von HREs ist die zwischen nah verwandten Arten konservierte Position der Bindestellen der Transkriptionsfaktoren. Über die Konservierung der HIF-1-Bindestellen in Fisch-Neuroglobinen kann aufgrund der entfernten Verwandtschaft des Zebrafisches mit den Kugelfischen keine Aussage getroffen werden (Wystub et al., 2004). Meine Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass Neuroglobin des Zebrafisches *in vivo* ein durch Hypoxie induzierbares Gen ist. Eine Regulation der Neuroglobin-Expression durch die HIF-1-Signalkaskade könnte diese Beobachtung erklären. Eine verstärkte Expression von Neuroglobin unter Sauerstoffmangel passt sehr gut zu der Hypothese, dass Neuroglobin an der Sauerstoffversorgung der Neuronen beteiligt ist, ähnlich wie Myoglobin in Muskelzellen (Burmester et al., 2000; Sun et al., 2001; Schmidt et al., 2003; Bentmann et al., 2005). In der Tat verhält sich Neuroglobin im Gehirn ähnlich wie Myoglobin im Herzen. Nichtsdestotrotz muss auch in Betracht gezogen werden, dass diverse Studien gezeigt haben, dass unter Sauerstoffmangel (Hypoxie und Ischämie) vermehrt reaktive Sauerstoffverbindungen und NO gebildet werden (Jezek & Hlavata, 2005; Wenger, 2006). Es ist denkbar, dass Neuroglobin an einer Verringerung der hohen Konzentration dieser Verbindungen beteiligt ist (Herold et al., 2004; Brunori et al., 2005). Unabhängig von der genauen Funktion auf molekularer Ebene ist Neuroglobin wahrscheinlich neuroprotektiv sowohl für Fische als auch für Säugetiere.

2.3.4 Regulation von Cytochrom c und Globin X

Fische besitzen zwei paraloge Cytochrom c-Gene, die früh in der Evolution der Knochenfische durch Duplikation entstanden sind (Fuchs et al., 2005). In Säugetieren, die lediglich eine Kopie des Cytochrom c-Gens besitzen (Burmester et al., 2002), steigt die Expression von Cytochrom c bei Sauerstoffmangel in verschiedenen Geweben (Leber, Herz, Muskel und Hirn) deutlich an (Schmidt et al., 2004; Fordel et al., 2004; Mammen et al., 2006). Im Zebrafisch konnte keine signifikante Veränderung der Expression von Cytochrom c 1 und 2

auf mRNA-Ebene beobachtet werden (siehe Abb. C 20, C 21), was darauf hindeutet, dass Cytoglobin nicht an einer akuten Hypoxieantwort des Zebrafisches beteiligt ist.

Globin X konnte erst vor kurzem als fünftes Mitglied der Vertebratenglobine ausschließlich in Fischen und Amphibien identifiziert werden (Roesner et al., 2005; siehe auch Abschnitte C 1 und D 1). Globin X wird in zahlreichen Geweben in geringer Konzentration exprimiert, allerdings ist über seine Funktion noch nichts bekannt. Die deutliche Verringerung der Globin X mRNA-Konzentration in hypoxischen Zebrafischen (Abb. C 20, C 21) deutet auf eine enge Verknüpfung mit einem sauerstoffabhängigen Stoffwechselweg hin. Aufgrund der geringen Expression von Globin X unter Normoxie und der weiteren Abnahme der Expression unter Hypoxie erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass Globin X an der Sauerstoffversorgung der Gewebe beteiligt ist. Um die genaue Funktion von Globin X aufzuklären, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

2.4 Goldfische unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen

Während im Zebrafisch eine zum Teil deutliche hypoxieinduzierte Regulation der Globinexpression stattfand, traten im Goldfisch bei den meisten Globinen nur geringe, nicht signifikante Veränderungen der mRNA-Konzentrationen nach Sauerstoffmangel auf.

Im Fischkörper (ohne Auge, Hirn und Herz) wurde lediglich Myoglobin 1 signifikant um den Faktor 20 erhöht (Abb. C 25). Diese Hochregulation ist deutlich stärker als die Zunahme der Myoglobin-mRNA beim Zebrafisch. Allerdings sind die verschiedenen Experimente aufgrund der unterschiedlichen gewählten Versuchsbedingungen beim Goldfisch und beim Zebrafisch nicht direkt vergleichbar, wenn auch in beiden Fischen die gleiche Tendenz einer deutlichen Induktion von Myoglobin vorlag. Die beobachtete Zunahme der Myoglobin-Konzentration im Fischkörper und im Herzen passt zu der Funktion dieses Proteins, die Sauerstoffversorgung im Muskel und in anderen Geweben zu gewährleisten.

Im Hirngewebe verdoppelte sich die mRNA-Konzentration von Myoglobin 2 signifikant, während sich die von Myoglobin 1 lediglich leicht erhöhte (Abb. C 28). Im Karpfen konnte unter Hypoxie allerdings keine verstärkte Expression von Myoglobin 2 beobachtet werden (Fraser et al., 2006). Möglicherweise kommt diese Diskrepanz durch die verschiedenen Versuchsbedingungen oder durch unterschiedliche Anpassungen der beiden Fische an Sauerstoffmangel zu Stande. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die hypoxieinduzierte Expression von Myoglobin in den verschiedenen Geweben des Karpfens temperaturabhängig ist (Fraser et al., 2006). Während im Muskel nur bei 30°C eine deutliche Zunahme der mRNA-Konzentration von Myoglobin 1 nach 8 Tagen beobachtet wurde, erhöhte sich die mRNA-Konzentration in der Leber sowohl bei 30°C als auch bei 17°C. In Kieme und Hirn hatte ein Sauerstoffmangel nur geringe Auswirkungen auf die mRNA-Konzentration (Fraser et al., 2006). Über die Funktion von Myoglobin 2 ist noch nichts bekannt. Die Expression dieses Globins im Hirn lässt vermuten, dass Myoglobin 2 in diesem

Gewebe eine ähnliche Rolle wie Myoglobin 1 im Muskel einnimmt und als sauerstoffspeicherndes Protein eine Aufrechterhaltung des aeroben Stoffwechsels auch unter hypoxischen Bedingungen ermöglicht.

Nach Hypoxie konnte im Hirn des Goldfisches lediglich eine geringe, nicht signifikante Veränderung der Neuroglobin-Expression auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abb. C 27). Dieses Ergebnis ist in Anbetracht der starken Hochregulation von Neuroglobin im Hirn des Zebraärbblings unter Sauerstoffmangel verwunderlich und erfordert weitere Untersuchungen, zumal bekannt ist, dass im Karpfen die Hirnfunktionen unter Hypoxie aufrechterhalten werden (Nilsson, 2001). Im Auge des Goldfisches war sogar eine deutliche Abnahme der Neuroglobin-Expression auf mRNA-Ebene zu erkennen (Abb. C 27). Das Auge von Wirbeltieren hat unter normoxischen Bedingungen einen sehr hohen Sauerstoffbedarf (Anderson, 1968; Yu & Cringle, 1996; Osborne et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass der Karpfen unter hypoxischen Bedingungen nahezu blind wird (Nilsson, 2001). Dies lässt eine reduzierte Stoffwechselrate im Auge vermuten, so dass der Sauerstoffbedarf dieses Gewebes unter Hypoxie stark abnimmt. Eine Aufrechterhaltung oder Erhöhung der Konzentration an respiratorischen Proteinen wie Neuroglobin im Auge wäre somit nicht notwendig und würde lediglich Energie verbrauchen. Das Wiedererlangen der Sehkraft nach der achtstündigen starken Hypoxie ($pO_2 = 13$ Torr) deutet darauf hin, dass die Degradation des Neuroglobins möglicherweise so langsam abläuft, dass der Goldfisch aufgrund der hohen konstitutiven Neuroglobin-Konzentration im Auge (Abb. C 33) bei kurzzeitigem starkem Sauerstoffmangel keine Überexpression der mRNA benötigt.

Im Auge ist die Regulation von Neuroglobin und Superoxiddismutase genau gegenläufig (Abb. C 27), was zunächst gegen eine Beteiligung von Neuroglobin im ROS-Stoffwechsel spricht. Unter Sauerstoffmangel werden verstärkt reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet (Jezek & Hlavata, 2005; Wenger, 2006). Eine verstärkte Expression der Superoxiddismutase könnte den Abbau dieser Verbindungen beschleunigen und so die durch reaktive Sauerstoffverbindungen verursachten Zellschädigungen verringern. Im Hirn jedoch wurde nur eine geringe Zunahme der Superoxiddismutase-mRNA beobachtet (Abb. C 28), allerdings zeigten die Ergebnisse der quantitativen PCR, dass die Konzentration der Superoxiddismutase-mRNA im Hirn konstitutiv deutlich höher ist als im Auge.

Die Untersuchung der Proteinexpression von Neuroglobin und Myoglobin nach Sauerstoffmangel ergab in allen Fällen nur eine gering reduzierte oder konstantbleibende Globinkonzentration in den untersuchten Geweben des Goldfisches (Abb. C 29). Im Vergleich dazu zeigte der Zebraärbbling bei beiden Proteinen eine deutlich gesteigerte Proteinexpression nach Hypoxie (siehe Abb. C 24 und D 2.3). Im Karpfen konnte unter Hypoxie nach 5 Tagen eine 2,8-fach erhöhte Proteinexpression von Myoglobin beobachtet werden (Fraser et al., 2006). Aufgrund der bekannten unterschiedlich ausgeprägten Hypoxietoleranz der verschiedenen Karpfenfische (van den Thillart et al., 1976; van den

Thillart, 1977 Rees et al., 2001; van der Meer et al., 2005; Fraser et al., 2006) ist eine Diskrepanz der Regulation der Proteinexpression nicht verwunderlich. Der größte Vorteil der hypoxie- und anoxietoleranten Lebewesen beruht darin, dass sie die Proteinbiosynthese, die große Mengen an Energie verbraucht, frühzeitig reduzieren oder sogar ganz einstellen können (Hochachka, 1996 a, b).

2.5 Konstitutive Neuroglobin-Expression im Zebrafisch und im Goldfisch

Um die Frage zu klären, weshalb der Goldfisch auf eine verstärkte Expression von Neuroglobin bei Hypoxie verzichten kann, ohne von einer Schädigung des neuronalen Gewebes bedroht zu sein, wurde die konstitutive Globinexpression in Zebrafisch und Goldfisch bestimmt (siehe C 3).

Aufgrund unterschiedlicher Effizienzen der PCR-Reaktion ergab die Untersuchung der konstitutiven Neuroglobin-Expression in Hirn und Auge auf mRNA-Ebene kein aussagekräftiges Ergebnis (Abb. C 30). Eine hohe mRNA-Konzentration muss jedoch durch mögliche Unterschiede auf Translationsebene nicht zwangsläufig mit einer hohen Proteinkonzentration korreliert sein. Aus diesem Grund ist ein Vergleich der mRNA-Mengen zwischen zwei verschiedenen Spezies weniger aussagekräftig als ein Vergleich auf Proteinebene. Während die Myoglobin-Konzentrationen in Herz und Hirn in normoxischen Goldfischen und Zebrafischen vergleichbar waren (Abb. C 35), ergaben sich bei Neuroglobin deutliche Unterschiede. Auf Proteinebene konnte im Goldfisch im Auge eine 3-fach, im Hirn sogar eine 5-fach höhere Neuroglobin-Konzentration im Vergleich zum Zebrafisch nachgewiesen werden (Abb. C 33). Aufgrund dieser deutlich stärkeren Proteinexpression von Neuroglobin in beiden neuronalen Geweben kann der Goldfisch wahrscheinlich auf eine Hochregulation dieses Proteins unter Sauerstoffmangel verzichten. Ein Vergleich der normoxischen Neuroglobin-Expression in Ratte und einem an Sauerstoffmangel angepassten Vertreter der Blindmäuse konnte ebenfalls eine erhöhte Neuroglobin-Expression in der hypoxietoleranten Spezies nachweisen (Hankeln, persönliche Mitteilung). Ähnlich erhöhte Konzentrationen respiratorischer Proteine wurden auch in anderen hypoxieadaptierten Tieren wie tauchenden Säugetieren (Pottwal, Seeelefant, Klappmützenrobbe) und tauchenden Vögeln (Pinguinen) beschrieben (Ramirez et al., 2007). Die Myoglobin-Konzentration im Skelettmuskel ist bei tauchenden Säugern generell höher als bei den meisten terrestrischen Arten, und ist zudem bei Tieren, die tiefe Tauchgänge zur Nahrungssuche durchführen, besonders stark erhöht (Ramirez et al., 2007). Eine hohe konstitutive Expression von Globinen erhöht demzufolge die Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel und ermöglicht im Fall von Neuroglobin ein Überleben unter hypoxischen Bedingungen ohne Schädigung des neuronalen Gewebes.

3 Neuroglobin und seine Bedeutung für die Hypoxietoleranz

Die vorliegende Arbeit liefert eine umfassende Studie zur Untersuchung der Regulation von Globinen unter Hypoxie in einem Organismus *in vivo*. Weil Fische in ihrem natürlichen Habitat vorübergehend hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sein können, ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Veränderungen auf mRNA- und Proteinebene physiologische Antworten auf Sauerstoffmangel reflektieren. Dies steht im Gegensatz zu zahlreichen Studien an Säugetieren (zum Beispiel Mammen et al., 2002; Fordel et al., 2004; Li et al., 2006), deren untersuchte Spezies sehr wahrscheinlich in ihrem adulten Leben keine hypoxischen Bedingungen vorfinden werden. Viele der Ergebnisse basieren auch auf Studien mit Zellkulturen (zum Beispiel Sun et al., 2001; Schmidt-Kastner et al., 2006) und sind somit nicht direkt vergleichbar mit Untersuchungen an lebenden Organismen.

Die in meinen Versuchen gezeigte Abnahme der Hämoglobin-mRNA im Zebraäbrbling unter Hypoxie erfordert weitere Studien. Die Zunahme der Expression von Myoglobin und Neuroglobin des Zebraäbrblings unter Sauerstoffmangel ist konsistent mit der vorgeschlagenen Beteiligung der beiden Proteine an der Sauerstoffversorgung von Herz beziehungsweise Gehirn. Diese Beobachtung ist im Fall von Neuroglobin besonders bemerkenswert, da dessen Funktion heiß debattiert wird. Zudem konnte durch die Hypoxieexperimente mit Zebraäbrblingen zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Hochregulation von Myoglobin und Neuroglobin auf mRNA-Ebene auch eine Zunahme der Proteinkonzentration bewirkt. Die Expression von Globin X nimmt unter Hypoxie deutlich ab, was einen ersten Hinweis auf eine mögliche physiologische Rolle dieses Proteins liefert.

Im Vergleich zum Zebraäbrbling konnte beim Goldfisch lediglich eine deutliche Zunahme der Myoglobin 1-Expression im Fischkörper beobachtet werden. Alle anderen untersuchten Globine zeigten nahezu keine Veränderung der Expression auf mRNA- und Proteinebene. Im Fall von Neuroglobin wurde sogar eine deutliche Abnahme der mRNA-Expression im Auge des Goldfisches beobachtet, was zunächst gegen die oben postulierte Beteiligung von Neuroglobin an der Sauerstoffversorgung neuronaler Gewebe sprach. Der Nachweis der hohen konstitutiven Neuroglobin-Expression in Hirn und Auge des Goldfisches erklärt jedoch die unterschiedliche Regulation des Proteins in beiden Karpfenfischen.

Hohe Konzentrationen an respiratorischen Proteinen erleichtern die Sauerstoffversorgung der Gewebe und ermöglichen einen effektiven aeroben Stoffwechsel auch in Sauerstoffmangelsituationen. Zebraäbrlinge und Goldfische nutzen hierbei zwei unterschiedliche Strategien. Während im relativ hypoxiesensitiven Zebraäbrbling eine deutliche Zunahme der Myoglobin- und Neuroglobin-Expression auf mRNA- und Proteinebene nach Hypoxie zu beobachten war (Abb. C 20, C 21, C 22 und C 24), besitzt der hypoxietolerante Goldfisch eine hohe konstitutive Konzentration an Neuroglobin-Protein

(Abb. C 33), so dass er auf eine energieverbrauchende Neusynthese dieses Proteins unter Sauerstoffmangel verzichten kann (Abb. C 29). Durch beide Strategien wird das gleiche Resultat erzielt: eine hohe Konzentration des respiratorischen Proteins in den jeweiligen Geweben. Die Regulation der Globinexpression spiegelt die unterschiedlichen Lebensräume der beiden Karpfenfische wider. Im tropischen Habitat des Zebrabärblings wechseln sich Phasen mit normaler Sauerstoffkonzentration des Wassers und zwischenzeitliche kurze Phasen geringerer Sauerstoffkonzentration ab (Talwar & Jhingran, 1991; Wu, 2002). Unter diesen Bedingungen wäre eine dauerhaft erhöhte Konzentration von Neuroglobin und Myoglobin nicht von Vorteil, sondern würde vielmehr aufgrund der energieaufwändigen Proteinbiosynthese einen Nachteil für den Zebrabärbling darstellen. Die bessere Alternative stellt hier eine hypoxieinduzierte Expression von Neuroglobin und Myoglobin dar, die nur zum Tragen kommt, wenn die Sauerstoffversorgung der Gewebe anders nicht aufrechterhalten werden kann. Allerdings ist der Zebrabärbling durch diesen Mechanismus nicht in der Lage, ähnlich niedrige Sauerstoffkonzentrationen wie der Goldfisch zu überleben. Im Gegensatz zum Lebensraum des Zebrabärblings ist das Habitat der *Carassius*-Arten sehr häufig von Hypoxie oder Anoxie bedroht (Lushchak et al., 2001; Nilsson & Renshaw, 2004; Sollid et al., 2005). In diesem Fall ist eine hohe konstitutive Expression von respiratorischen Proteinen wie Neuroglobin sinnvoll und erlaubt im Auge sogar ein Einstellen der Synthese dieses Proteins unter Hypoxie. Hierdurch kann der Goldfisch Energie in Form von ATP einsparen und so länger unter Sauerstoffmangelbedingungen überleben (Hochachka et al., 1996).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Untersuchungen zur Regulation der Neuroglobin-Expression in Säugetieren nach Hypoxie oder Ischämie durchgeführt, die jedoch nicht zu einheitlichen Ergebnissen kamen. Einige Untersuchungen beschreiben eine hypoxieinduzierte Neuroglobin-Expression *in vivo* und *in vitro* und stützen damit die Hypothese, dass Neuroglobin die Sauerstoffversorgung neuronaler Gewebe bei Sauerstoffmangel verbessert. In hypoxischem Hirngewebe von Maus und Ratte konnte nach moderater Hypoxie (7-12% O₂, 48-72 Stunden) eine 2- bis 3-fach erhöhte Neuroglobin mRNA-Konzentration beobachtet werden (Fordel et al., 2004; Li et al., 2006). Ischämie erhöht die Neuroglobin-Expression im Hirn von Ratten und mongolischen Rennmäusen um den Faktor 1,5 (Sun et al., 2001; Li et al., 2006). Shang et al. (2006) konnten hierbei zeigen, dass die Induktion der Neuroglobin-Expression nach Ischämie und Reperfusion auf den cerebralen Cortex beschränkt ist, der im Vergleich zum Hippocampus eine erhöhte Toleranz gegenüber Hypoxie und Ischämie aufweist. In verschiedenen Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass unter nahezu anoxischen Bedingungen (0,25-1% O₂) eine deutliche Zunahme der Neuroglobin-Expression auf mRNA-Ebene erfolgt (Sun et al., 2001; Fordel et al., 2004; Rayner et al., 2006; Schmidt-Kastner et al., 2006). Allerdings sind *in vitro* und *in*

in vivo Experimente nicht direkt vergleichbar, da in den Geweben *in vivo* häufig auch unter Normoxie nur geringe Sauerstoffkonzentrationen vorliegen. So liegt die Sauerstoffkonzentration im Hirn bereits unter normoxischen Bedingungen *in vivo* bei 1-5 Vol% (Sharp & Bernaudin, 2004). Aufgrund der in diesen Untersuchungen gezeigten Induktion der Neuroglobin-Expression unter Sauerstoffmangel in Nagetieren erscheint eine Beteiligung von Neuroglobin an der Sauerstoffversorgung neuronaler Gewebe dennoch wahrscheinlich.

Die weiter oben beschriebene verstärkte Neuroglobin-Expression unter Hypoxie im Zebraäbrbling sowie die hohe konstitutive Neuroglobin-Konzentration in Hirn und Auge des Goldfisches lassen die Annahme zu, dass Neuroglobin eine entscheidende Rolle bei der Hypoxietoleranz spielt. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass humanes Neuroglobin *in vitro* eine interne Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen CD7 und D5 ausbilden kann, die unter reduzierenden Bedingungen, zum Beispiel durch Ansammlung von NADH-Reduktionsäquivalenten als Folge eines eingeschränkten aeroben Stoffwechsels, aufgebrochen werden kann (Hamdane et al., 2003). Die Reduktion der internen Disulfidbrücke verringert die Sauerstoffaffinität von humanem Neuroglobin um den Faktor 10 (Hamdane et al., 2003), was bei hypoxischem Stress die Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe erleichtern würde. Da dem Neuroglobin der Nagetiere das Cystein CD7 fehlt, ist nicht klar, ob dieser Mechanismus *in vivo* auftritt, oder ob er auf einzelne Tiergruppen beschränkt ist (Hankeln et al., 2005). Im Neuroglobin von Zebraäbrbling und Goldfisch sind die beiden Cysteine CD7 und D5 konserviert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Neuroglobine ebenfalls eine interne Disulfidbrücke ausbilden. Eine erleichterte Abgabe des an Neuroglobin gebundenen Sauerstoffs unter hypoxischen Bedingungen stellt eine weitere Anpassung an die im Habitat der Fische häufig auftretenden Sauerstoffmangelsituationen dar. Die vorliegenden Ergebnisse zur Regulation von Neuroglobin der Fische stützen die Hypothese, dass dieses Protein der Atmungskette Sauerstoff zur Aufrechterhaltung eines aeroben Metabolismus zur Verfügung stellt. Eine solche Funktion wurde aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität Neuroglobin exprimierender Zellen (Burmester et al., 2000; Reuss et al., 2002; Geuens et al., 2003; Schmidt et al., 2003) und der co-Lokalisation von Neuroglobin und Mitochondrien (Bentmann et al., 2005) bereits mehrfach postuliert.

Andere Publikationen zeigten jedoch, dass *in vivo* im Hirngewebe der Maus nach milder Hypoxie (7-12% O₂, Expositionsdauer 2 Stunden bis 2 Wochen) und nach globaler Ischämie im Rattenhirn keine Veränderung der Neuroglobin mRNA-Konzentration zu beobachten war (Mammen et al., 2002; Hundahl et al., 2005; Schmidt-Kastner et al., 2006). In Hypoxie- und Ischämieexperimenten unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem gezeigt werden, dass unter

den gewählten Bedingungen eine deutliche Abnahme der Neuroglobin mRNA-Konzentration im Hirn von Ratten auftrat (Burmester & Hankeln, persönliche Mitteilungen). Diese Ergebnisse widersprechen einer möglichen Funktion des Neuroglobins als typisches respiratorisches Protein, das der Sauerstoffspeicherung oder dem Sauerstofftransport dient. Ein Protein, welches durch die Bereitstellung von Sauerstoff die Aufrechterhaltung eines aeroben Stoffwechsels auch unter Sauerstoffmangelbedingungen gewährleisten soll, sollte unter Hypoxie eine ähnliche Induktion der Expression erfahren, wie dies bereits bei Myoglobin beschrieben wurde (Grange et al., 2001). Möglicherweise muss eine andere Funktion von Neuroglobin in Betracht gezogen werden. Herold et al. (2004) und Fago et al. (2004) postulierten eine Beteiligung von Neuroglobin an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Eine solche Funktion in der zellulären Abwehr von oxidativem Stress benötigt nicht zwangsläufig eine verstärkte Expression unter Sauerstoffmangel und könnte so den neuroprotektiven Effekt von Neuroglobin erklären (Fordel et al., 2004; Hundahl et al., 2005). Herold et al. (2004) haben gezeigt, dass Neuroglobin *in vitro* eventuell an der Entgiftung von reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS) wie NO und Peroxynitrit, die bei Sauerstoffmangel verstärkt gebildet werden, beteiligt sein könnte. Eine solche Funktion wurde bereits bei Myoglobin und Hämoglobin beschrieben (Flögel et al., 2001; Herold et al., 2002; Fago et al., 2003). Gegen eine Funktion als NO-Dioxygenase spricht allerdings, dass eine Verringerung der Neuroglobin-Expression durch Antisense-Oligonukleotide keinen Effekt auf die Toxizität von NO-Donatoren *in vitro* hat (Sun et al., 2001). NO-Bindungskinetiken konnten eine mögliche Funktion als NO-Dioxygenase ebenfalls nicht bestätigen, da durch die Hexakoordination im deoxy-Zustand eine effektive Bindung von NO an Neuroglobin durch das distale Histidin verhindert wird (van Doorslaer et al., 2003). Zudem konnte keine co-Lokalisation von Neuroglobin und der neuronalen NO-Synthase auf Proteinebene nachgewiesen werden (Reuss et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit ist die Beteiligung von Neuroglobin an der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Eine erhöhte Energieladung in der Zelle im Zusammenhang mit einer hohen Stoffwechselaktivität führt zu einer verstärkten Bildung solcher Verbindungen (Boveris et al., 1972; Valdez et al., 2006). Die Expression von Neuroglobin in stoffwechselaktiven Geweben könnte somit nicht (nur) der Sauerstoffversorgung der Zellen dienen, sondern könnte auch mit einer Beteiligung an der Entgiftung von ROS wie H₂O₂ erklärt werden (Hankeln et al., 2005; Fordel et al., 2007). Besonders nach Ischämie kommt es durch Reperfusion zu einer verstärkten Bildung von ROS, hier könnte eine Funktion als Antioxidantien-Enzym den neuroprotektiven Effekt von Neuroglobin erklären (Chan, 1996; Lei et al., 1997; Sun et al., 2001; 2003).

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse zur Regulation von Neuroglobin in Säugern unter Hypoxie kann vermutet werden, dass der Grad der Induktion von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Neben den genauen Versuchsbedingungen (zum Beispiel Intensität des Sauerstoffmangels, Expositionsdauer) spielt die Wahl des Versuchstieres eine große Rolle. Die meisten Säugetiere sind im Normalfall keinen schwankenden Sauerstoffkonzentrationen ihrer Umwelt ausgesetzt. Ausnahmen sind zum Beispiel hypoxietolerante Nagetiere wie die Blindmäuse, die in unterirdischen Bauen leben und somit temporär geringen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sind (Shams et al., 2005). Ergebnisse, die durch Hypoxieexperimente mit Ratten und Mäusen erzielt wurden, lassen eventuell falsche Rückschlüsse in Bezug auf eine Beteiligung von Neuroglobin an einer Hypoxieantwort zu, da diese Tiere keine ausgeprägten Adaptationen an Sauerstoffmangel besitzen. Untersuchungen zur Veränderung der Neuroglobin-Expression in Tieren, die auch unter natürlichen Bedingungen häufig mit Sauerstoffmangel konfrontiert sind (zum Beispiel Fische), sind deshalb aussagekräftiger.

Meine Ergebnisse zur Regulation von Neuroglobin unter Sauerstoffmangel im Zebrafisch sowie die verstärkte konstitutive Expression von Neuroglobin im hypoxietoleranten Goldfisch im Vergleich mit dem relativ hypoxiesensitiven Zebrafisch deuten darauf hin, dass Neuroglobin tatsächlich eine wichtige Rolle im sauerstoffabhängigen Metabolismus spielt. Es ist wahrscheinlich, dass es eine myoglobinähnliche Funktion einnimmt und den aeroben Metabolismus im neuronalen Gewebe auch unter Sauerstoffmangel aufrechterhält, indem es den Mitochondrien Sauerstoff zur Verfügung stellt. Allerdings kann auch eine mögliche Rolle bei der Detoxifikation der unter Sauerstoffmangel gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

E Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich die Diversität und die sauerstoffabhängige Expression der Globine von Karpfenfischen.

Mit Globin X konnte ein fünfter Globintyp identifiziert werden, dessen Vorkommen auf Fische und Amphibien beschränkt ist. Globin X wird sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in zahlreichen Geweben exprimiert. Zur Aufklärung der genauen Funktion müssen noch weitere Analysen durchgeführt werden. Phylogenetische Untersuchungen ergaben eine ursprüngliche Verwandtschaft zwischen Neuroglobin und Globin X und deuten darauf hin, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Protostomia und Deuterostomia bereits zwei verschiedene Globintypen besessen hat.

Im Zebraäbrbling und im Goldfisch konnte ich eine Myoglobin-Expression neben dem Herzen auch in Hirn, Kieme, Leber und Niere nachweisen und somit zeigen, dass Myoglobin nicht nur im Muskelgewebe lokalisiert ist. Des Weiteren konnte eine hirsnspezifische Myoglobin-Isoform im Goldfisch identifiziert werden, deren Funktion noch unklar ist und weiterer Untersuchungen bedarf. Das Vorhandensein der zweiten Isoform ist innerhalb der Cyprinidae (Karpfenfische) aufgrund einer Genomduplikation bei den Cyprininae (Kärpflinge) auf diese Unterfamilie beschränkt.

Durch Hypoxieexperimente konnte gezeigt werden, dass die Expression der Globine von der Intensität des Sauerstoffmangels abhängig ist und gewebe- und artspezifisch erfolgt. Im Zebraäbrbling wurde eine Abnahme der Hämoglobin- und Globin X-Konzentration beobachtet, während das Cytoglobin-Expressionsniveau nahezu unverändert blieb. Im Fall von Myoglobin und Neuroglobin konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die hypoxieinduzierte Zunahme der mRNA-Menge auch mit einer verstärkten Expression des jeweiligen Proteins korreliert ist. Im Vergleich dazu war die Veränderung der Expression der meisten Globine im Goldfisch gering, lediglich Myoglobin wurde im Fischkörper auf mRNA-Ebene nach Hypoxie deutlich verstärkt exprimiert. Durch einen Vergleich der konstitutiven Neuroglobin-Expression beider Karpfenfische konnte in Auge und Hirn des hypoxietoleranten Goldfisches eine 3- bzw. 5-fach höhere Neuroglobin-Konzentration als im hypoxiesensitiven Zebraäbrbling nachgewiesen werden. Meine Ergebnisse stützen somit die Hypothese, dass Neuroglobin eine myoglobinähnliche Funktion einnimmt und den aeroben Stoffwechsel im neuronalen Gewebe auch unter Sauerstoffmangel aufrechterhält.

F Literaturverzeichnis

- Affonso EG, Polez VL, Correa CF, Mazon AF, Araujo MR, Moraes G, Rantin FT (2002).** Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp Biochem Physiol [C] Toxicol Pharmacol* 133:375-382.
- Affonso EG, Rantin FT (2005).** Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. *Comp Biochem Physiol [C] Toxicol Pharmacol* 141:275-280.
- Almeida-Val VM, Val AL, Duncan WP, Souza FC, Paula-Silva MN, Land S (2000).** Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp Biochem Physiol [B] Biochem Mol Biol* 125:219-226.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Anderson B Jr (1968).** Ocular effects of changes in oxygen and carbon dioxide tension. *Trans Am Ophthalmol Soc* 66:423-474.
- Atkins PW, de Paula J (2006).** *Physikalische Chemie*. 4. Auflage. Wiley-VCH-Verlag.
- Awenius C, Hankeln T, Burmester T (2001).** Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem Biophys Res Commun* 287:418-421.
- Bailey JR, Val AL, Almeida-Val VMF, Driedzic WR (1999).** Anoxic cardiac performance in Amazonian and north-temperate-zone teleosts. *Can J Zool* 77:683-689.
- Bentmann A, Schmidt M, Reuss S, Wolfrum U, Hankeln T, Burmester T (2005).** Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration. *J Biol Chem* 280:20660-20665.
- Benton MJ (1990).** *Vertebrate Paleontology*. Unwin Hyman Ltd., London.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2003).** *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag; 5. Auflage.
- Berner RA (1999).** Atmospheric oxygen over Phanerozoic time. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10955-10957.
- Bickler PE, Buck LT (2007).** Hypoxia Tolerance in Reptiles, Amphibians, and Fishes: Life with Variable Oxygen Availability. *Annu Rev Physiol* 69:5.1-5.26.
- Blazka P (1958).** The anaerobic metabolism of fish. *Physiol Zool* 31:117-128.
- Bolognesi M, Bordo D, Rizzi M, Tarricone C, Ascenzi P (1997).** Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. *Prog Biophys Mol Biol* 68:29-68.
- Bosworth CA 4th, Chou CW, Cole RB, Rees BB (2005).** Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure. *Proteomics* 5:1362-371.
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972).** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128:617-630.
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Briggs JP (2002).** The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R3-9.
- Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B (2005).** Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: Functional pathways and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8483-8488.
- Buck LT, Hochachka PW (1993).** Anoxic suppression of Na⁺-K⁺-ATPase and constant membrane potential in hepatocytes: support for channel arrest. *Am J Physiol* 265:R1020-1025.
- Burmester T, Hankeln T (2004).** Neuroglobin: A respiratory protein of the nervous system. *News Phys Sci* 19:110-113.
- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T (2000).** A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* 407:520-523.

- Burmester T, Ebner B, Weich B, Hankeln T (2002).** Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* 19:416-421.
- Burmester T, Haberkamp M, Mitz S, Roesner A, Schmidt M, Ebner B, Gerlach F, Fuchs C, Hankeln T (2004).** Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution. *IUBMB Life* 56:703-707.
- Bushnell PG, Brill RW (1992).** Oxygen transport and cardiovascular responses in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) exposed to acute hypoxia. *J Comp Physiol [B]* 162:131-143.
- Bushnell PG, Brill RW, Bourke RE (1990).** Cardiorespiratory responses of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), and bigeye tuna (*Thunnus obesus*) to acute reductions of ambient oxygen. *Can J Zool* 68:1857-1865.
- Chan PH (1996).** Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27:1124-1129.
- Chapman LG, Galis F, Shinn J (2000).** Phenotypic plasticity and the possible role of genetic assimilation: Hypoxia-induced trade-offs in the morphological traits of an African cichlid. *Ecology Letters* 3:387-393.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979).** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
- Cossins AR, Crawford DL (2005).** Fish as models for environmental genomics. *Nat Rev Genet* 6:324-333.
- Dalla Via J, van den Thillart G, Cattani O, de Zwaan A (1994).** Influence of longterm hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II Intermediary metabolism in blood, liver, and muscle. *Marine Ecology* 111:17-27.
- David L, Blum S, Feldman MW, Lavi U, Hillel J (2003).** Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Mol Biol Evol* 20:1425-1434.
- Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC (1978).** A model of evolutionary change in proteins. Pp. 345-352 in Dayhoff, M. O., ed. *Atlas of Protein Sequence Structure*, Vol. 5, Suppl. 3. National Biomedical Research Foundation, Washington DC.
- de Sanctis D, Dewilde S, Pesce A, Moens L, Ascenzi P, Hankeln T, Burmester T, Bolognesi M (2004).** Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination. *J Mol Biol* 336:917-927.
- Deutscher MP (1990).** Guide to Protein Purification. *Methods Enzymol* 182:1-894.
- Dewilde S, Kiger L, Burmester T, Hankeln T, Baudin-Creuzat V, Aerts T, Marden MC, Caubergs R, Moens L (2001).** Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J Biol Chem* 276:38949-38955.
- Dickerson RE, Geis I (1983).** Hemoglobin: Structure, function, evolution, and pathology. Benjamin/Cummings Publ. Co., Ca.
- Dixon B, Pohajdak B (1992).** Did the ancestral globin gene of plants and animals contain only two introns? *TIBS* 17:486-488.
- Dooley K, Zon LI (2000).** Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 10:252-256.
- Ebner B, Burmester T, Hankeln T (2003).** Globin genes are present in *Ciona intestinalis*. *Mol Biol Evol* 20:1521-1525.
- Einstein A (1905).** Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* 17:549-560.
- Eise PL, Hulbert AJ (1987).** Evolution of mammalian endothermic metabolism: "leaky" membranes as a source of heat. *Am J Physiol* 253:R1-7.
- Endo A, Ingalls TH (1968).** Chromosomes of the zebra fish. A model for cytogenetic, embryologic, and ecologic study. *J Hered* 59:382-384.
- Fago A, Crumbliss AL, Peterson J, Pearce LL, Bonaventura C (2003).** The case of the missing NO-hemoglobin: spectral changes suggestive of heme redox reactions reflect changes in NO-heme geometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12087-12092.

- Fago A, Hundahl C, Dewilde S, Gilany K, Moens L, Weber RE (2004).** Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *J Biol Chem* 279:44417-44126.
- Falkowski PG, Katz ME, Milligan AJ, Fennel K, Cramer BS, Aubry MP, Berner RA, Novacek MJ, Zapol WM. (2005).** The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science* 309:2202-2204.
- Felsenstein J (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Felsenstein J (2004).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6b. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fick A (1855).** Über Diffusion. *Annalen der Physik* 94:59-86.
- Flögel U, Merx MW, Goedecke A, Decking U, Schrader J (2001).** Myoglobin: a scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:735-740.
- Fordel E, Geuens E, Dewilde S, Rottiers P, Carmeliet P, Grooten J, Moens L (2004).** Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 319:342-348.
- Fordel E, Thijs L, Moens L, Dewilde S (2007).** Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging. *FEBS J* 274:1312-1317.
- Foss A, Evensen TH, Oiestad V (2002).** Effects of hypoxia and hyperoxia on growth and food conversion efficiency in the spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen) *Aquaculture Research* 33:437-444.
- Fraser J, de Mello LV, Ward D, Rees HH, Williams DR, Fang Y, Brass A, Gracey AY, Cossins AR (2006).** Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2977-2981.
- Freitas TA, Hou S, Dioum EM, Saito JA, Newhouse J, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, Alam M (2004).** Ancestral hemoglobins in Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6675-6680.
- Freitas TA, Saito JA, Hou S, Alam M (2005).** Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor. *J Inorg Biochem* 99:23-33.
- Fuchs C, Heib V, Kiger L, Haberkamp M, Roesner A, Schmidt M, Hamdane D, Marden, MC, Hankeln T, Burmester T (2004).** Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern and ligand binding. *J Biol Chem* 279:24116-24122.
- Fuchs C, Luckhardt A, Gerlach F, Burmester T, Hankeln T (2005).** Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes. *Biochem Biophys Res Commun* 337:216-223.
- Fuchs C, Burmester T, Hankeln T (2006).** The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome. *Cytogenet Genome Res* 112:296-306.
- Gamperl AK, Todgham AE, Parkhouse WS, Dill R, Farrell AP (2001).** Recovery of trout myocardial function following anoxia: preconditioning in a non-mammalian model. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1755-1763.
- Garbett K, Johnson CE, Klotz IM, Okamura MY, Williams RJ (1971).** Hemerythrin: further studies of Mossbauer spectra. *Arch Biochem Biophys* 142:574-583.
- Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Salzman AL (1998).** Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10378-10383.
- Gesser H (1977).** The effects of hypoxia and reoxygenation on force development in myocardia of carp and rainbow trout: protective effects of CO₂/HCO₃. *J Exp Biol* 69:199-206.
- Geuens E, Brouns I, Flamez D, Dewilde S, Timmermans JP, Moens L (2003).** A globin in the nucleus! *J Biol Chem* 278:30417-30420.
- Giardina B, Ascenzi P, Clementi ME, De Sanctis G, Rizzi M, Coletta M (1996).** Functional modulation by lactate of myoglobin. A monomeric allosteric hemoprotein. *J Biol Chem* 271:16999-17001.
- Goodman M, Pedwaydon J, Czelusniak J, Suzuki T, Gotoh T, Moens L, Shishikura F, Walz D, Vinogradov S (1988).** An evolutionary tree for invertebrate globin sequences. *J Mol Evol* 27:236-249.

- Gracey AY, Troll JV, Somero GN (2001).** Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. Proc Natl Acad Sci USA 98:1993-1998.
- Grange RW, Meeson A, Chin E, Lau KS, Stull JT, Shelton JM, Williams RS, Garry DJ (2001).** Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. Am J Physiol Cell Physiol 281:C1487-1494.
- Graur D, Li WH (2000).** Fundamentals of molecular evolution, 2nd edition. Sinauer Sunderland, Mass
- Haffter P, Nüsslein-Volhard C (1996).** Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. Int J Dev Biol 40:221-7.
- Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, Green BN, Pesce A, Uzan J, Burmester T, Hankeln T, Bolognesi M, Moens L, Marden MC (2003).** The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. J Biol Chem 278:51713-51721.
- Hankeln T, Friedl H, Ebersberger I, Martin J, Schmidt ER (1997).** A variable intron distribution in globin genes of *Chironomus*: evidence for recent intron gain. Gene 205:151-160.
- Hankeln T, Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Gerlach F, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Burmester T (2004).** The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin – a clue to their function? IUBMB Life 56:671-679.
- Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs T, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Bolognesi M, de Sanctis D, Marden MC, Kiger L, Moens L, Dewilde S, Nevo E, Avivi A, Weber RE, Fago A, Burmester T (2005).** Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. J Inorg Biochem 99:110-119.
- Hardison RC (1996).** A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 93:5675-5679.
- Hardison RC (1998).** Hemoglobins from bacteria to man: Evolution of different patterns of gene expression. J Exp Biol 201:1099-1117.
- Herold S, Exner M, Nauser T (2001).** Kinetic and mechanistic studies of the NO*-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. Biochemistry 40:3385-3395.
- Herold S, Fago A, Weber RE, Dewilde S, Moens L (2004).** Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. J Biol Chem 279:22841-22847.
- Hochachka PW (1986a).** Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 231:234-241.
- Hochachka PW (1986b).** Metabolic arrest. Intensive Care Med 12:127-133.
- Hochachka P, Buck L, Doll C, Land S (1996).** Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. Proc Natl Acad Sci USA 93:9493-9498.
- Holopainen IJ, Hyvarinen H, Piironen J (1986).** Anaerobic wintering of crucian carp (*Carassius carassius* L.)--II. Metabolic products. Comp Biochem Physiol A 83:239-242.
- Hoppeler H, Vogt M (2001).** Muscle tissue adaptations to hypoxia. J Exp Biol 204:3133-3139.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001).** MRBAYES Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17:754-755.
- Huey RB, Ward PD (2005).** Hypoxia, global warming, and terrestrial late Permian extinctions. Science 308:398-401.
- Hughes GM (1984a).** Measurement of gill area in fishes: practices and problems. J Mar Biol Assoc UK 64:637-655.
- Hughes GM (1984b).** General anatomy of the gills. In: Hoar WH, Randall DJ (eds) Fish physiology, vol XA. Academic Press, New York, pp 1-71.
- Hundahl C, Stoltenberg M, Fago A, Weber RE, Dewilde S, Fordel E, Danscher G (2005).** Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues. Neuropathol Appl Neurobiol 31:610-617.
- Hundahl C, Fago A, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, Burmester T, Weber RE (2006a).** Oxygen binding properties of non-mammalian nerve globins. FEBS J 273:1323-1329.

- Hundahl C, Kelsen J, Kjaer K, Ronn LC, Weber RE, Geuens E, Hay-Schmidt A, Nyengaard JR (2006b).** Does neuroglobin protect neurons from ischemic insult? A quantitative investigation of neuroglobin expression following transient MCAo in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1085:19-27.
- Jensen, FB (2004).** Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand* 182:215–227.
- Jensen FB, Nikinmaa M, Weber RE (1993).** Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In *Fish Ecophysiology* (ed. Rankin, J. C. and Jensen, F. B.), pp. 161-179, London: Chapman and Hall.
- Jezeq P, Hlavata L (2005).** Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2478-2503.
- Johansson D, Nilsson GE, Døving KB (1997).** Anoxic depression of light-evoked potentials in retina and optic tectum of crucian carp. *Neurosci Lett* 237:73-76.
- Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K (2001).** Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 276:25318-25323.
- Kendrew JC (1963).** Myoglobin and the structure of proteins. *Science* 139:1259-1266.
- Kleinschmidt T, Weber RE (1998).** Primary structures of *Arenicola marina* isomyoglobins: molecular basis for functional heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 1383:55-62.
- Klippenstein GL (1980).** Structural Aspects of Hemerythrin and Myohemerythrin. *Amer Zool* 20:39-51.
- Kramer DL (1983).** Aquatic surface respiration in the fishes of Panama: distribution in relation to risk of hypoxia. *Env Biol Fish* 8:49-54.
- Kramer DL (1987).** Dissolved oxygen and fish behaviour. *Env Biol Fish* 18:81-92.
- Kramer DL, Mehegan JP (1981).** Aquatic surface respiration, an adaptive response to hypoxia in the guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae). *Env Biol Fish* 6:299-313.
- Kramer DL, McClure M (1982).** Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. *Env Biol Fish* 7:47-55.
- Kugelstadt D, Haberkamp M, Hankeln T, Burmester T (2004).** Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochem Biophys Res Commun* 325:719-725.
- Kundu S, Trent JT 3rd, Hargrove MS (2003).** Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci* 8:387-393.
- Kyhse-Andersen J (1984).** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-209.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lankester ER (1871).** Ueber das Vorkommen von Haemoglobin in den Muskeln der Mollusken und die Verbreitung desselben in den lebendigen Organismen. *Pflügers Arch Ges Physiol* 4:315–320.
- Larhammar D, Risinger C (1994).** Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol Phylogenet Evol* 3:59-68.
- Laufs TL, Wystub S, Reuss S, Burmester T, Saaler-Reinhardt S, Hankeln T (2004).** Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neurosci Lett* 362:83-86.
- Leggatt RA, Iwama GK (2003).** Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13:237-246.
- Lei B, Adachi N, Arai T (1997).** The effect of hypothermia on H₂O₂ production during ischemia and reperfusion: a microdialysis study in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 222:91-94.
- Levine BD, Stray-Gundersen J (2001).** The effects of altitude training are mediated primarily by acclimatization, rather than by hypoxic exercise. *Adv Exp Med Biol* 502:75-88.
- Li RC, Lee SK, Pouranfar F, Brittian KR, Clair HB, Row BW, Wang Y, Gozal D (2006).** Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain. *Brain Res* 1096:173-179.

- Logsdon JM, Stoltzfus A, Doolittle WF (1998).** Molecular evolution: Recent cases of spliceosomal intron gain? *Curr Biol* 8:R560-563.
- Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M. (2001).** Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 28:R100-7.
- Lutz PL, Nilsson GE (1997).** Contrasting strategies for anoxic brain survival—glycolysis up or down. *J Exp Biol* 200:411-419.
- Lutz PL, Prentice HM, Milton SL (2003).** Is turtle longevity linked to enhanced mechanisms for surviving brain anoxia and reoxygenation? *Exp Gerontol* 38:797-800.
- Mammen PPA, Shelton JM, Goetsch SC, Williams SC, Richardson JA, Garry MG, Garry DJ (2002).** Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J Histochem Cytochem* 50:1591-1598.
- Mammen PP, Shelton JM, Ye Q, Kanatous SB, McGrath AJ, Richardson JA, Garry DJ (2006).** Cytochrome b is a stress-responsive hemoprotein expressed in the developing and adult brain. *J Histochem Cytochem* 54:1349-1361.
- Marinsky CA, Houston AH, Murad A (1990).** Effect of hypoxia on hemoglobin isomorph abundances in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can J Zool* 68:884-888.
- Markl J, Decker H (1992).** Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv Comp Environ Physiol* 13:325-376
- McCarthy EF (1943).** The oxygen affinity of human maternal and foetal haemoglobin. *J Physiol* 102:55-61.
- Milton SL, Nayak G, Lutz PL, Prentice HM (2006).** Gene transcription of neuroglobin is upregulated by hypoxia and anoxia in the brain of the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*. *J Biomed Sci* 13:509-514.
- Minning DM, Gow AJ, Bonaventura J, Braun R, Dewhirst M, Goldberg DE, Stamler JS (1999).** *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature* 401:497-502.
- Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, Saeki S, Kim DH, Nakajima Y, Seki S, Kawada N, Yoshizato K (2004).** Cytochrome b/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest* 84:91-101.
- Nei M, Gojobori T (1986).** Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 3:418-426.
- Neuwald AF, Liu JS, Lipman DJ, Lawrence CE (1997).** Extracting protein alignment models from the sequence database. *Nucleic Acids Res* 25:1665-1677.
- Nienhaus K, Kriegl JM, Nienhaus GU (2004).** Structural dynamics in the active site of murine neuroglobin and its effects on ligand binding. *J Biol Chem* 279:22944-22952.
- Nikinmaa M (2001).** Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respir Physiol* 128:317-329.
- Nikinmaa M (2002).** Oxygen-dependent cellular functions - why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comp Biochem Physiol [A] Mol Integr Physiol* 133:1-16.
- Nikinmaa M, Ree RB (2005).** Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R1079-1090.
- Nilsson GE (2001).** Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci* 16:217-221.
- Nilsson GE, Renshaw GMC (2004).** Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J Exp Biol* 207:3131-3139.
- Nilsson GE, Rosén P, Johansson D (1993).** Anoxic depression of spontaneous locomotor activity in crucian carp quantified by a computerized imaging technique. *J Exp Biol* 180:153-162.
- Ohno S, Muramoto J, Christian L, Atkin NB (1967).** Diploid-tetraploid relationship among Old World members of the fish family Cyprinidae. *Chromosoma (Berl.)* 23:1-9.
- Ojima Y, Hitotsumachi S, Makino S (1966).** Cytogenetic studies in lower vertebrates. I. A preliminary report on the chromosomes of the funa (*Carassius auratus*) and goldfish (A revised study). *Proc Japan Acad [B] Phys Biol Sci* 42:62-66.

- Oleksiak MF, Churchill GA, Crawford DL (2002).** Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature Genet* 32:261-266.
- Ordway GA, Garry DJ (2004).** Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* 207:3441-3446.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J (2004).** Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91-147.
- Ota T, Nei M (1994).** Variance and covariances of the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions per site. *Mol Biol Evol* 11:613-619.
- Padilla PA, Roth MB (2001).** Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7331-7335.
- Pelster B (2002).** Developmental plasticity in the cardiovascular system of fish, with special reference to the zebrafish. *Comp Biochem Physiol [A] Mol Integr Physiol* 133:547-553.
- Person-Le Ruyet J, Boeuf G, Zambonino-Infante J, Helgason S, Le Roux A (1998).** Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comp Biochem Physiol [A] Mol Integr Physiol* 119:511-518.
- Perutz MF (1979).** Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu Rev Biochem* 48:327-386.
- Pesce A, Bolognesi M, Ascenzi P, Bocedi A, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, Burmester T. (2002).** Neuroglobin and cytoglobin: Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep* 3:1146-1151.
- Pesce A, Dewilde S, Nardini M, Moens L, Ascenzi P, Hankeln T, Burmester T, Bolognesi M (2003).** Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure* 11:1087-1095.
- Pesce A, Nardini M, Dewilde S, Hoogewijs D, Ascenzi P, Moens L, Bolognesi M (2005).** Modulation of oxygen binding to insect hemoglobins: the structure of hemoglobin from the botfly *Gasterophilus intestinalis*. *Protein Sci* 14:3057-3063.
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987).** A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238:336-341.
- Ramirez JM, Folkow LP, Blix AS (2007).** Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annu Rev Physiol* 69:113-143.
- Raymond J, Segre D (2006).** The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science* 311:1764-1767.
- Rayner BS, Duong TT, Myers SJ, Witting PK (2006).** Protective effect of a synthetic anti-oxidant on neuronal cell apoptosis resulting from experimental hypoxia re-oxygenation injury. *J Neurochem* 97:211-221.
- Rees BB, Sudradjat FA, Love JW (2001).** Acclimation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. *J Exp Zool* 289:266-272.
- Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss M, Burmester T, Hankeln, T (2002).** Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience* 115:645-656.
- Rösner A (2003).** Klonierung, Expression und Analyse von Fischglobinen. Diplomarbeit. Universität Mainz.
- Roesner A, Fuchs C, Hankeln T, Burmester T (2005).** A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Mol Biol Evol* 22:12-22.
- Roesner A, Hankeln T, Burmester T (2006).** Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol* 209:2129-2137.
- Rogers JH (1986).** Introns between protein domains: selective insertion or frameshifting? *Trends Genet* 2:223.
- Rogozin IB, Lyons-Weiler J, Koonin EV (2000).** Intron sliding in conserved gene families. *Trends Genet* 16:430-432.
- Ruud JT (1954).** Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. *Nature* 173:848-850.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Saroglia M, Terova G, de Stradis A, Caputo A (2002).** Morphometric adaptations of sea bass gills to different dissolved oxygen partial pressures. *Journal of Fish Biology* 60:1423-1430.
- Schmidt M, Gießl A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T (2003).** How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply of the mammalian retina. *J Biol Chem* 278:1932-1935.
- Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, Nevo E, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Hankeln T, Burmester T (2004).** Cytoglobin is a respiratory protein expressed in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 279:8063-8069.
- Schmidt M, Laufs T, Reuss S, Hankeln T, Burmester T (2005).** Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye. *Neurosci Lett* 374:207-211.
- Schmidt RF, Thews G (1997).** *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Schmidt-Kastner R, Haberkamp M, Schmitz C, Hankeln T, Burmester T (2006).** Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture. *Brain Res* 1103:173-180.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concorde JP, Maire P, Giallongo A (1996).** Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:32529-32537.
- Shams I, Avivi A, Nevo E (2005).** Oxygen and carbon dioxide fluctuations in burrows of subterranean blind mole rats indicate tolerance to hypoxic-hypercapnic stresses. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142:376-382.
- Shang A, Zhou D, Wang L, Gao Y, Fan M, Wang X, Zhou R, Zhang C (2006).** Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults. *Brain Res* 1078:219-226.
- Shirai M, Pearson JT, Shimouchi A, Nagaya N, Tsuchimochi H, Ninomiya I, Mori H (2003).** Changes in functional and histological distributions of nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 139:899-910.
- Shoubridge EA, Hochachka PW (1980).** Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science* 209:308-309.
- Shoubridge EA, Hochachka PW (1981).** The origin and significance of metabolic carbon dioxide production in the anoxic goldfish. *Molec Physiol* 1:315-338.
- Sidell BD, Vayda ME, Small DJ, Moylan TJ, Londraville RL, Yuan ML, Rodnick KJ, Eppley ZA, Costello L (1997).** Variable expression of myoglobin among the hemoglobinless Antarctic icefishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3420-3424.
- Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW (2000).** Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis* 6:178-183.
- Sloman KA, Wood CM, Scott GR, Wood S, Kajimura M, Johannsson OE, Almeida-Val VM, Val AL (2006).** Tribute to R. G. Boulter: the effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. *J Exp Biol* 209:1197-1205.
- Smith RW, Houlihan DF, Nilsson GE, Brechin JG (1996).** Tissue-specific changes in protein synthesis rates in vivo during anoxia in crucian carp. *Am J Physiol* 271, R897-R904.
- Sola L, Gornung E (2001).** Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. *Genetica* 111:397-412.
- Sollid J, De Angelis P, Gundersen K, Nilsson GE (2003).** Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J Exp Biol* 206:3667-3673.
- Sollid J, Kjærnsli A, De Angelis PM, Røhr AK, Nilsson GE (2005).** Cell proliferation and gill morphology in anoxic crucian carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:1196-1201.
- Sowa AW, Duff SMG, Guy PA, Hill RD (1998).** Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10317-10321.
- Stoltzfus A, Logsdon JM Jr., Palmer JD, Doolittle WF (1997).** Intron "sliding" and the diversity of intron positions. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10739-10744.

- Strimmer K, von Haeseler A (1996).** Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol Biol Evol* 13:964-969.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60-89.
- Stryer L (1997).** *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA (2001).** Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15306-15311.
- Sun Y, Jin K, Peel A, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2003).** Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3497-3500.
- Talwar PK, Jhingran AG (1991).** *Inland Fishes of India And Adjacent Countries: Vols 1-2*. A.A. Balkema.
- Thomas JW, Touchman JW (2002).** Vertebrate genome sequencing: building a backbone for comparative genomics. *Trends Genet* 18:104-108.
- Tobler M, Schlupp I, Heubel KU, Riesch R, de Leon FJ, Giere O, Plath M (2006).** Life on the edge: hydrogen sulfide and the fish communities of a Mexican cave and surrounding waters. *Extremophiles* 10:577-585.
- Timmerman CM, Chapman LJ (2004).** Behavioral and physiological compensation for chronic hypoxia in the sailfin molly (*Poecilia latipinna*). *Physiol Biochem Zool* 77:601-610.
- Ton C, Stamatiou D, Liew CC (2003).** Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiol Genomics* 13:97-106.
- Trent JT 3rd, Hargrove M S (2002).** A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem* 277:19538-19545.
- Uzan J, Dewilde S, Burmester T, Hankeln T, Moens L, Hamdane D, Marden MC, Kiger L (2004).** Neuroglobin and other hexacoordinated hemoglobins show a weak temperature dependence of oxygen binding. *Biophys J* 87:1196-1204.
- Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A (2006).** Mitochondrial metabolic states and membrane potential modulate mtNOS activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757:166-172.
- van den Thillart G (1977).** Influence of oxygen availability on the energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.). PhD thesis, State University of Leiden.
- van den Thillart G, Kesbeke F (1978).** Anaerobic production of carbon dioxide and ammonia by goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Comp Biochem Physiol [A]* 59:393-400.
- van den Thillart G, Kesbeke F, van Waarde A (1976).** Influence of anoxia on the energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Comp Biochem Physiol [A]* 55:329-336.
- van den Thillart G, van Waarde A, Dobbe F, Kesbeke F (1982).** Anaerobic energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.): Effects of anoxia on the measured and calculated NAD^+/NADH ratios in muscle and liver. *J Comp Physiol* 146:41-49.
- van den Thillart G, van Berge-Henegouwen M, Kesbeke F (1983).** Anaerobic metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.): Ethanol and CO_2 excretion rates and anoxia tolerance at 20, 10 and 5°C. *Comp Biochem Physiol [A]* 76:295-300.
- van der Meer DLM, van den Thillart G, Witte F, de Bakker MAG, Besser J, Richardson MK, Spaik HP, Leito JTD, Bagowski CP (2005).** Gene expression profiling of the long-term adaptive response to hypoxia in the gills of adult zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1512-1519.
- van Doorslaer S, Dewilde S, Kiger L, Nistor SV, Goovaerts E, Marden MC, Moens L (2003).** Nitric oxide binding properties of neuroglobin. A characterization by EPR and flash photolysis. *J Biol Chem* 278:4919-4925.
- van Holde KE, Miller KI. (1995).** Hemocyanins. *Adv Protein Chem* 47:1-81.
- van Waarde A (1983).** Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp. Biochem. Physiol [B]* 74:675-684.
- van Waarde A (1988).** Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comp Biochem Physiol [B]* 91:207-228.

- van Waarde A, van den Thillart G, Dobbe F (1982).** Anaerobic metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Influence of anoxia on mass action ratios of transaminase reactions and levels of ammonia and succinate. *J Comp Physiol* 147:53-59.
- van Waarde A, van den Thillart G, Erkelens, C, Addink, A, Lugtenburg J. (1990).** Functional coupling of glycolysis and phosphocreatine utilization in anoxic fish muscle: An in vivo ³¹P-NMR study. *J Biol Chem* 265:914-923.
- van Waarde A, de Graaff I, van den Thillart G, Erkelens C (1991).** Acidosis (Measured by Nuclear Magnetic Resonance) and Ethanol Production in Anoxic Goldfish Acclimated to 5 and 20°C *J Exp Biol* 159: 387-405.
- van Waversveld J, Addink A, van den Thillart G (1989a).** Simultaneous direct and indirect calorimetry on normoxic and anoxic goldfish. *J Exp Biol* 142:325-335.
- van Waversveld, J, Addink, A, van den Thillart G (1989b).** The anaerobic energy metabolism of goldfish measured by simultaneous direct and indirect calorimetry during anoxia and hypoxia. *J Comp Physiol* 159:263-268.
- Vinogradov SN, Machlik CA, Chao LL (1970).** The intracellular hemoglobins of a polychaete. Some properties of the hemoglobins of *Glycera dibranchiata*. *J Biol Chem* 245:6533-6538.
- Walker RM, Johanson PH (1977).** Anaerobic metabolism in goldfish *Carassius auratus*. *Can J Zool* 55:1304-1311.
- Weber JM, Kramer DL (1983).** Effects of hypoxia and surface access on growth, mortality, and behavior of juvenile guppies, *Poecilia reticulata*. *Can J Fish Aquat Sci* 40:1583-1588.
- Weber RE, Jensen FB (1988).** Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Annu Re Physiol* 50:161-179.
- Weber RE, Vinogradov SN (2001).** Nonvertebrate hemoglobins: Functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* 81:569-628.
- Wenger RH (2006).** Mitochondria: Oxygen sinks rather than sensors? *Med Hypotheses* 66:380-383.
- Wenger RH, Gassmann M. (1997).** Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378:609-616.
- Whelan S, Goldman N (2001).** A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol* 18:691-699.
- Wittbrodt J, Shima A, Schartl M (2002).** *Medaka* - a model organism from the far east. *Nat Rev Genet* 3:53-64.
- Wittenberg JB (1992).** Functions of cytoplasmatic hemoglobins and myohemerythrin. *Adv Comp Environ Physiol* 13:60-85.
- Wittenberg JB, Wittenberg BA (2003).** Myoglobin function reassessed. *J Exp Biol* 206:2011-2020.
- Wixon J (2000).** Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast* 17:225-231.
- Wu RS. (2002).** Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar Pollut Bull* 45:35-45.
- Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Burmester T, Maas U, Saaler-Reinhardt S, Hankeln T, Reuss S (2003).** Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci Lett* 346:114-116.
- Wystub S, Ebner B, Fuchs C, Weich B, Burmester T, Hankeln T (2004).** Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet Genome Re* 105:65-78.
- Yu DY, Cringle SJ (2001).** Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 20:175-208.
- Yu DY, Cringle SJ, Alder VA, Su EN, Yu PK (1996).** Intraretinal oxygen distribution and choroidal regulation in the avascular retina of guinea pigs. *Am J Physiol* 270:H965-973.
- Zhang C, Wang C, Deng M, Li L, Wang H, Fan M, Xu W, Meng F, Qian L, He F (2002).** Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1411-1419.
- Zhou R, Cheng H, Tiersch TR (2002).** Differential genome duplication and fish diversity. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 11:331-337.

G Anhang

1 **Abkürzungsverzeichnis**

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp	Acidic ribosomal protein; ribosomal protein, large, P0; rplp0
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolyolphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Cau	<i>Carassius auratus</i> (Goldfisch)
Cca	<i>Cyprinus carpio</i> (Karpfen)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CP	Cyclophilin
Ct	Cycle of threshold
Cygb	Cytoglobin
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dn	Nichtsynonyme Nukleotidaustausche
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
Dre	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)
ds	Synonyme Nukleotidaustausche
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GbX	Globin X
GITC	Guanidinisothiocyanat
Hb	Hämoglobin
H₂O_d	destilliertes Wasser
H₂O_{dd}	doppeltdestilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

L	Luria
Lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
LDH-A	Lactatdehydrogenase A
M	Molar
Mb	Myoglobin
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure-Natriumsalz
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
Ngb	Neuroglobin
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pET	plasmid for expression by T7 RNA polymerase
PGK-1	Phosphoglyceratkinase 1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription oder real-time
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD-1	Superoxiddismutase 1
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tni	<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Grüner Kugelfisch)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen

2 Abkürzungscodes der Aminosäuren

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

3 Genetischer Standardcode

Triplett	Aminosäure	Triplett	Aminosäure	Triplett	Aminosäure	Triplett	Aminosäure
TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys
TTC	Phe	TCC	Ser	TAC	Tyr	TGC	Cys
TTA	Leu	TCA	Ser	TAA	Stop	TGA	Stop
TTG	Leu	TCG	Ser	TAG	Stop	TGG	Trp
CTT	Leu	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg
CTC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CTA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CTG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
ATT	Ile	ACT	Thr	AAT	Asn	AGT	Ser
ATC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
ATA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
ATG	Met / Start	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly
GTC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GTA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GTG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

4 Verwendete Primer

4.1 PCR und RT-PCR

4.1.1 Globin X

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)
DreGbX 5	CAGGGCTGGTTTCAGGATGGGC
DreGbX 5 nested	GGATGGGCTGCGCTATTTCCGG
DreGbX 3	TACATGTCTGAGATGGTCTTCA
DreGbX 3 nested	TGAGATGGTCTTCAGATGGCTGTGC
DreGbX Nde mini	GAGCATATGGCGGGACTCACCCTAATC
DreGbX Bam mini	GGACGGATCCGTTTCAGCTGCGTTTGTTC
DreGbX Nde lang	CCTCATATGGGCTGCGCTATTTCCG
DreGbX Bam lang	TTGGGATCCCTTCAGATGGCTGTGC
TniGbX 5	CCGTGTTTTCCGTTTCATAATGGGC
TniGbX 5 nested	CATAATGGGCTGCGCGATATCAAGTC
TniGbX 3	GCAGCGGGCCCTCCTACAG
TniGbX 3 nested	CTCCTACAGGGCGCTGGTCCCTCT
TniGbX 5.1 genDNA	CACAGATTTCCCGTGGAGCAAG

TniGbX 5.1 nested genDNA	CCGTGGAGCAAGATCTACCATTTTAC
TniGbX 3.1 genDNA	GAGGGTGAGGAGTTCATGGTTC
TniGbX 3.1 nested genDNA	GGAGTTCATGGTTCTGGTTTATTTAATC
TniGbX 5.2 genDNA	CGTGTGGCGATGTCATGGAAGG
TniGbX 5.2 nested genDNA	CATGGAAGGGTAATAACAGGTAGCG
TniGbX 3.5 genDNA	GTCAAGCAGCAGGTCTTCTC

4.1.2 Myoglobin

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)
DreMb Nde	GCGACAGCATATGGCTGATCATGATC
DreMb Bam	AGCGGATCCACCGCAAATCCG
CyprinidenMb2 5 1	ATGGCTGATTACGAGCGGTTTCTGAA
CyprinidenMb2 3 1	ACCGGCGAATCCGATCTCCTTGTAGTAGCG

4.1.3 Andere

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)
Karpfen bActin 5	GTCCGTGACATCAAGGAGAAGC
Karpfen bActin 3	CAGACTCATCGTACTCCTGCTTG
DreArp cDNA 5	ATGCCAGGGAAGACAGGG
DreArp cDNA 3	TTAATCAAACAGGCCGAAGCC
DreCP cDNA 5	ATGGCAAACCCCAAAGTGTTT
DreCP cDNA 3	TTAGAGCTGGCCGAGTTGG

4.2 Quantitative real-time PCR

4.2.1 Zebraärbling *Danio rerio*

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)
DreArp_qPCR_F	CATCCAGCAGGTGTATGATAACGG
DreArp_qPCR_R	CTCACACCCTCCAGGAACCTC
DreCP_qPCR_F	TCACACTGAAACACGGAGGCA
DreCP_qPCR_R	GCTTACCGTCCAGCCAGTTG
DreLDHA_qPCR_F	ATTGGAATGTCTGTAGCTGACCTGT
DreLDHA_qPCR_R	TACACCATGCATTCCCTTGACCAAAG
DrePGK_qPCR_F	GTAACAAGACCAAAGCAAGTCAGG
DrePGK_qPCR_R	TGTGAGCTCTATGTGCAGTTCCGA
DreHbAa_qPCR_F	CTGATACGGACAAGGCTGTTGT
DreHbAa_qPCR_R	AGACGGTCAGCATTCTGGCGA
DreHbBa_qPCR_F	ATGGTTGAGTGGACAGATGC
DreHbBa_qPCR_R	TACACGATCAGACATCTGGATAG
DreMb_qPCR_F	GAAGTTCTCAACCGTCTGTTCAA
DreMb_qPCR_R	GCTTCCCAGGATCACCTT
DreNgb_qPCR_F	AAGGTGATGTTAGTGATTGATGCAG
DreNgb_qPCR_R	GGACTCTCCAACCAAAGCGAA
DreCauNgb_qPCR_F	TGTTACGAGGTTATTTGAGCTGG

DreCauNgb_qPCR_R	TAGGTCATCAAGATGGCTCACAGC
DreCygb1_qPCR_F	GTGCTGGTCAGGTTTTTCACAA
DreCygb1_qPCR_R	TGTGTTGAGAGCGTTCAAGAC
DreCygb2_qPCR_F	ACATGACCCAGAGAAAGTATCATCTG
DreCygb2_qPCR_R	CTCTCCAAACTCCTCTGCAAG
DreGbX_qPCR_F	GACTCATCCAGAGTGTAAGATGT
DreGbX_qPCR_R	GAGTCTCTAAACGCTCCAGC

4.2 Goldfisch *Carassius auratus*

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)
DreArp_qPCR_F	CATCCAGCAGGTGTATGATAACGG
DreArp_qPCR_R	CTCACACCCTCCAGGAACCTC
DreLDHA_qPCR_F	ATTGGAATGTCTGTAGCTGACCTGT
DreLDHA_qPCR_R	TACACCATGCATTCCCTTGACCAAAG
CauHbA_qPCR_F	CTGTCCGGTGATGCCGTTTC
CauHbA_qPCR_R	ACATTGAGAGCGAGGATCTTG
CauHbB_qPCR_F	CTGGAGAGAGCCATCAAGAACA
CauHbB_qPCR_R	AGCCAGGAGCCTGAAGTTGT
CauMb_qPCR_F	GAAGTTCTGACCCGTCTGTTTAA
CauMb_qPCR_R	GTTCCCCGCCAGATCAGACT
CauMb2_qPCR_F	GTTCTGACCCGTTTGTTTAAGGCA
CauMb2_qPCR_R	CGCCACCAACGCATTTCCCGCCAGT
CauNgb_qPCR_F	AAGGTGATGTTAGTGATCGATGCTG
CauNgb_qPCR_R	AGGGACTCTCCAACCAAAGTGAA
DreCauNgb_qPCR_F	TGTTACGAGGTTATTTGAGCTGG
DreCauNgb_qPCR_R	TAGGTCATCAAGATGGCTCACAGC
CauCygb1_qPCR_F	GTGCTCATCAGGTTCTTCTCCA
CauCygb1_qPCR_R	CCGCAGGGCGTGTTTCTTTCAGC
DreSOD1_qPCR_F	CAACACAAACGGCTGCATCAGTGC
DreSOD1_qPCR_R	GTCTCCGACGTGTCTCACAATATC

4.3 Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)
TniGbX 5.3 genDNA	CCTCTTATCGCTCCACATCGC
TniGbX 5.4 genDNA	GCGTCAACCATAATGTCAGATTAG
TniGbX 3.3 genDNA	GGTTTATCCTCCTCATGTCTTC
TniGbX 3.4 genDNA	CTCCAGCTCGGATGTGAACC
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
pet03	GCAGCAGCCAACTCAGCTTC
pet05	ACCACAACGGTTTCCCTCTAG

5 Untersuchte Gene bei der quantitativen real-time PCR

Gen	Standard	Zugangsnummer mRNA	Zugangsnummer genomische DNA
DreArp	Plasmid	BC049058	Gene ID: 58101
DreCP	Plasmid	AY391451; BC059470	Gene ID: 335519
DreLDHA	cDNA	NM_131246; 30496	Gene ID: 30496
DrePGK	cDNA	NM_213387	Gene ID: 406696
DreHbAa	Plasmid	NM_131257	Gene ID: 30507
DreHbBa	Plasmid	NM_131020	Gene ID: 30216
DreMb	Plasmid	AY337025	NW_634308
DreNgb	Plasmid	NM_131853	Gene ID: 117233
DreCygb1	Plasmid	AJ320232	Gene ID: 246090
DreCygb2	Plasmid	AJ635229	Gene ID: 554176
DreGbX	Plasmid	NM_001012261	Gene ID: 497122
CauArp	cDNA	siehe DreArp	siehe DreArp
CauLDHA	cDNA	siehe DreLDHA	siehe DreLDHA
CauSOD1	cDNA	NM_131294 (DreSOD1)	Gene ID: 30553 (DreSOD1)
CauHbA	cDNA	AF528157	siehe DreHbAa
CauHbB	cDNA	AF528159	siehe DreHbBa
CauMb1	cDNA	Rösner, 2003	siehe DreMb
CauMb2	cDNA	eigene Daten	siehe DreMb
CauNgb	cDNA	Burmester, persönliche Mitteilung	siehe DreNgb
CauCygb1	cDNA	Rösner, 2003	siehe DreGbX

6 Alignments

In allen Alignments ist die Lage der Primer blau bzw. grün markiert. Die Exon-Intron-Grenzen sind gelb hervorgehoben. Sofern nicht anders angegeben, sind die Nukleotide entsprechend ihrer Konservierung angefärbt: schwarz = 100%, dunkelgrau = 80%.

6.1 Globalalignments

6.1.1 Hämoglobin α

```

DreHbAa : ATGAGTCTCTCTGATACGGACAAGGCTGTGTTAAAGCCCATCTGGGCTAAGATCAGCCCAAGGCCGATGAATGGCTGC : 80
CauHbA  : ATGAGTCTCTCTCGATCCGGACAAGGCTGTGTTGAAAGCCCTATGGGCTAAGATCGGCTCCAGA GCCGATGAGATCGCCGC : 80

DreHbAa : TGAAGCCCTCGCCA GAATGCTGACCGTCTACCCCTCAGACCAAGACCTATTCTCTCTATGGGCTGACTTGAGCCCTGGGT : 160
CauHbA  : TGAAGCCCTGGCCA GAATGCTGACCGTCTACCCCTCAGACCAAGACCTATTCTCTCTCTGGTCTGACTTGAGCCCTGGGT : 160

```

```

*           180           *           200           *           220           *           240
DreHbAa : CTGGTCCCTGTGAAGAAGCA*CGGAAGACTATCATGGGTGC*CGTCGGCGAAGCT*GTTTCAAAAATAGACGACCTTGTGGGA : 240
CauHbA  : CTGGTCCCTGTGAAGAAGCA*GGCAAGACTATCATGGGTGC*GTGTCGGTGA*TCGGT*TTCAAAGCATAGACGACCTTGTGGGA : 240

*           260           *           280           *           300           *           320
DreHbAa : GGACTGCGCGCCCTGAGCGAACTCCATGCTTTCAA*GCTGGCGT*GTGACCGGCCAACTTCAA*GATTCCTGT*CA*CAATGT : 320
CauHbA  : GCTCTGTCTCCCTGAGCGAACTCCATGCTTTCAA*CGTGGCGT*ATTGACCGGCCAACTTCAA*GATTCCTCGCTCTCAATGT : 320

*           340           *           360           *           380           *           400
DreHbAa : CATTCTGGTCATCCG*CATGCTCTTCCTCTCAGACTTCACCCCTCAGGTTCA*GCTGTGAGT*CGACAAGTTCTTTAATACT : 400
CauHbA  : GATCTGGTCATCCG*CATGCTCTTCCTCTCAGACTTCACCCCA*GAGGTTCA*ATGTCAGT*TGACAAGTTCTTTAATACT : 400

*           420           *
DreHbAa : TGGCCCTGGCTCTCTCTGAA*GTACCGCTAA : 432
CauHbA  : TGGCTCTGGCTCTCTCTGAA*ATACCGCTAA : 432
    
```

6.1.2 Hämoglobin β

```

*           20           *           40           *           60           *           80
DreHbBa : ATGCTTCACTGGACAGATCC*CGAGCCCA*CGCATCTTGGCCCTGTGGGAAAAGCT*CAATAT*CGATGAA*TCGGACCTCA : 80
CauHbB  : ATGCTTCACTGGACAGATGCT*GAGCGAA*GTCATCTTGGCCCTGTGGGAAAAGCT*TAAT*CCGATGAA*TCGGACCTCA : 80

*           100          *           120          *           140          *           160
DreHbBa : GGCCCTATCCA*GATGCTCTGATCGTGTATCCCTGGACTCAGAGATATTTCCGCCAATTCGGCAACCTGTCAAGCCCCGCTG : 160
CauHbB  : GGCCCTAGCCA*GGTGTCTGATCGTGTATCCCTGGACTCAGAGATATTTCCGCCA*CTTGGCAACCTGTCAAGCCCCGCTG : 160

*           180          *           200          *           220          *           240
DreHbBa : CGATCATGGGTAACCCCAA*AGTGGCAGCTCATGGGAGGACTGTGATGGGAGGCTT*GAGAGAGCCATCAAGAACATGGAC : 240
CauHbB  : CGATCATGGGTAACCCCAA*GTTGGCAGCTCACGGCAGGACTGTGATGGGAGGCT*GTGGAGAGCCATCAAGAACATGGAT : 240

*           260          *           280          *           300          *           320
DreHbBa : AAGCTCAAGAA*CACTATGCGCG*CCCTCAGTGTGATGCACCTCTGAGAAA*TCGATGTGGATCCCGACA*ACTTCAG*GCTCT : 320
CauHbB  : AACA*CAAGGC*CACTATGCGCG*CACTCAGTGTGATGCACCTCTGAGAAA*TTGCATGTGGATCCCGACA*ACTTCAG*GCTCT : 320

*           340          *           360          *           380          *           400
DreHbBa : CGCTGATTGCATCACCGT*TTGGCTGCCATGAAGTT*CGGCCAA*GCTGGT*TTCAATGCTGAT*GTCCAGGAGGC*TTGGCAGA : 400
CauHbB  : GCTGATTGCATCACCGT*TTGGCTGCCATGAAGTT*GGGCCA*CTTGGG*TTCAATGCTGAC*GTCCAGGAGGC*TTGGCAGA : 400

*           420          *           440
DreHbBa : AGTTTCTGCTCTGCTGCTCGTTTC*GCTCTGTGCAGACAGTACCACTAG : 447
CauHbB  : AGTTTCTGCTCTGCTCGTTTC*GCTCTGTGCAGACAGTACCACTAG : 447
    
```

6.1.3 Myoglobin

```

*           20           *           40           *           60           *           80
DreMb   : ATGGCTGATCATGAT*CTGGTTCTGAA*CTGCTGGGGA*GCGCTGGAGGCCGAT*TTGCGGCTAA*CGGAGGAGAAGTTCTCAA : 80
CauMb1  : ATGGCTGATCAGGA*CTGGTTCTGAA*TGCTGGGGGG*TGCTCGAGGCCGAT*TTGCGGCTAA*CGGAGGAGAAGTTCTGAC : 80
CauMb2  : ATGGCTGATTAAGAG*CTGGTTCTGAA*TGCTGGGGA*GAGTGGAGGCCGAT*TTGCGGCTAA*CGGAGGAGAAGTTCTGAC : 80

*           100          *           120          *           140          *           160
DreMb   : CCGTCTGTTCAAGGACTATCCAGA*CACTCTGAAGCTCTTCCCAAGTTTCTGGGAT*TTCTCAGGGT*GATCTGGCGGGAA : 160
CauMb1  : CCGTCTGTTTAA*GCAAGCATCCCGA*GACTCAGAAGCTCTTCCCAAGTTCTGGGAT*TTCTCAGGGT*GATCTGGCGGGAA : 160
CauMb2  : CCGTCTGTTTAA*GAGCA*CATCCGGAT*ACTCAGAAGCTCTTCCCAAGTTCAA*GGGAT*TTCTCAGTCTGAA*CTGGCGGGAA : 160

*           180          *           200          *           220          *           240
DreMb   : GCCCGGCGGTGGCGGCTCAT*GGAGCGACCTGTGCTCAAGAAGCTGGGCGAA*TGCTGAAGGCCA*AGGAGAC*CAAGCTGCC : 240
CauMb1  : ACCCGGCGGTGAACGCC*CAAGGAGCGACCTGTGCTGAAGAAGCTGGGCGAA*TGCTGCTGAAGGCCA*AGGAGAT*CAAGCTGCC : 240
CauMb2  : ATGCGTGGTGGCGGCGCA*CGGTGCGACTGTGCTGAAGAAGCTGGGCGAA*TGCTGCTGAAGGCCA*AGGAGAT*CAAGCTGCC : 240

*           260          *           280          *           300          *           320
DreMb   : CTGCTCAAA*CACTGGCCAA*ATAC*CAAGCCAACTTT*CAAAAGT*GGCCCTCAACA*ACTTCAG*GCTGATCAC*GAGGTGCT : 320
CauMb1  : ATCTCAAA*CCGCTGGCCAA*CACTCAAGCCAA*AGCACAAGAT*CGCCCTCAACA*ACTTCAG*GCTGATCAC*GAGGTGCT : 320
CauMb2  : ATCTCAAA*CCGCTGGCCAA*CACTCAAGCCAA*AGCACAAGAT*CA*CCCTCAACA*ACTTCAG*GCTGATCAC*GAGGTGCT : 320

*           340          *           360          *           380          *           400
DreMb   : GGTGAAAGT*GATGGCC*GAA*AGCGGGCTCTGGAC*CGCCGCTCAAGCCGCT*GAGCGCGCT*GAGCGCGCTCATGGAC*GCACTCATCG : 400
CauMb1  : GGTGAAAGT*GATGGCC*GAA*AGCGGGCTCTGGAC*CGCCGCTCAAGCCGCT*GAGCGCGCT*GAGCGCGCTCATGGAC*GCACTCATCG : 400
CauMb2  : GGTGAAAGT*GATGAA*AGGAGAA*AGCGGGCTCTGGACT*CAAGCGGCA*GAGCGCGCT*GAGCGCGCTCATGGAC*GCACTCATCG : 400

*           420          *           440
DreMb   : GGGACATCGAC*GATACTACAAGGAG*TCGGATTTCGGCGTTAA : 444
CauMb1  : GAGACATCGAC*GATACTACAAGGAG*TCGGATTTCGGCGTTAA : 444
CauMb2  : ATGACATCGAC*GATACTACAAGGAG*TCGGATTTCGGCGTTAA : 444
    
```

6.1.4 Cytoglobin

```

DreCygb1 : ATGGAG-----CGAGACCGACGAGTCCAGCTCACACAGAGTCCACTCTCTGACGGAGCAGCGTCTCTTGAT : 71
CauCygb1 : CCAGGACACTTGGACACCCTATGAGACCGAGAGAACCGCTGGAGTCCCTGTGCTCATCAGGTTCTTCTCCAACTTCC : 5
DreCygb2 : ATGGACAAGAGAGGCGAGGATCAACAGACCGAGGGGAGGGAGAGACCAAGCCTCTGACGGATCTGGAAGCGCCATTCAT : 80

DreCygb1 : CCAGGACACGTGGAAACGGGTGTACCCGAGCGAGATTAAGCTGGAGTCCCTGTGCTGTGCAAGTTTTCACAAAATTC : 151
CauCygb1 : CCAGGACACTTGGACACCCTATGAGACCGAGAGAACCGCTGGAGTCCCTGTGCTCATCAGGTTCTTCTCCAACTTCC : 85
DreCygb2 : TAAGGACACCTGGGCAAGTGTATAGCAAGTTGTACGAGTAGGCGTCACTATACTAATCAAGTTCTTTGTTAACTTCC : 160

DreCygb1 : CATCGGCCAAGCAGTACTTCGAGCATTTCCTGAGCTGCAGGACCCGGCGGAGATGCAGCAGAACCCGCAGCTGAAGAAA : 231
CauCygb1 : CGTCGGCCGAGCAGTACTTCGATCAATTCCCTGACATAAGGATCCCTGAGGAGCTGAAGCAAAAGCCTCCAGCTGAAGAAA : 165
DreCygb2 : CCTCAGCAAGCAGTACTTCAGTCACTTCCAGGATTCAGGATCCGGAGGAGATGCAGAAAGCCTCAGCTGAAGAAA : 240

DreCygb1 : CACGGACACCGAGTCTTGAACGCTCTCAACACACTGGTGGAAACCTGCCAGATGCTGACAAAACCAACCCATCTTCAA : 311
CauCygb1 : CACGCCCTGGCGGATATGACCGCCCTCAACAGGATGGGAGAACCTGCCGAGCGAGACAAAACCAACCCATCTTCAA : 245
DreCygb2 : CATGCCGACCTGTGATGACCGCATTAAACAGATGTGGAGAACCTACATGACCCAGAGAAAGATCATCTGTGCTGGT : 320

DreCygb1 : CCAGATGGGCAAAACACACGGCTGCGCCACAAGGTGGACCGTGTACTTCAAATTTCTGGCCGAGTGATCTGGAGG : 391
CauCygb1 : CCAGATGGGCAAAACACACGGCTCAACACAAAGGTGGACCGGCTTACTTCAAATTTCTGGCTGGATGATCTGGAGG : 325
DreCygb2 : ACTCGTGGGCAAAACACATGCCCTTAAATACAAAATGGAAACCAATATACTTCAAATCTTAAGTGGGTTATTTCTGGAG : 400

DreCygb1 : TCCTCTCGAGGCTTCCCAAAATCTTCAAGTCCAGCAAGATGAGAGCTCCTGGTGCAGGCTGATGCCGATCCGTGAC : 471
CauCygb1 : TCCTCTCGAGGCTTCCCAAAATCTTCAAGTCCAGCAAGATGAGAGCTCCTGGTGCAGGCTGATGCCGATCCGTGAC : 355
DreCygb2 : TACTCTCAGAGGCTTGGAGAGTCTTACACCA---GAGGTACAGACTTCTGGTGCAGGCTGATGCCGATCCGTGAC : 477

DreCygb1 : TGGCAGATGAAACCTGTCACGCTGAGCTCCGCTGGGAG-----AACAGCAAAAGTGA : 525
CauCygb1 : TGGCAGATGAAACCTGTCACGCTGAGCTCCGCTGGGAG-----AACAGCAAAAGTGA : -
DreCygb2 : TGGCATATCAAGGCGCCATACTGAAGTGGGTGGCTCAAACATATCCAGCTCAGCATGCTGA : 540
    
```

6.1.5 Neuroglobin

```

DreNgb : ATGGAGAAGCTGTCTGAAAAAGATAAGGGTCTCATCCGGACAGCTGGGAGAGTCTGGGGAAGAACAGGTGCCACATGG : 80
CauNgb : -----CTTATCCGGGTCAGCTGGGAGAGTCTGGGGAAGAACAGGTGCCACATGG : 50

DreNgb : AATCGTTTGTTCACGAGGTTATTTGAGCTGGATCCAGCACTACTCTCTTCACTACAGCACAATTTGTGGCCATG : 160
CauNgb : AATCGTTTGTTCACGAGGTTATTTGAGCTGGATCCAGCACTACTCTCTTCACTACAGCACAACGTGTGGCCATG : 130

DreNgb : CACCTGAATCTCTCTCCAGCCAGAGTTCCTCGAGCAGTCCACAAAGGTGATGTTAGTGATGATGCACTGTGAGCCAT : 240
CauNgb : CACCTGAATCTCTCTCCAGCCAGAGTTCCTCGAGCAGTCCACAAAGGTGATGTTAGTGATGATGCACTGTGAGCCAT : 210

DreNgb : CTTGATGACCTACACACTGGAGGACTTCTTGTGAACCTGGCAAGGAAGCACCAGCAGTTGGAGTGAATACGCAGTCC : 320
CauNgb : CTTGATGACCTACATTCATGGAGGACTTCTTGTGAACCTGGCCAAAGGAAGCACCAGCAGTTGGGTTGAACACTCAGTC : 290

DreNgb : CTTGCGTTTGGTTGGAGAGTCCCTGCTCTATATGCTACAGTCCAGTTTGGACCCAGCTACACACAATCTCTGGCCAGG : 400
CauNgb : CTTTACCTTGGTTGGAGAGTCCCTGCTTATATGCTACAGTCCAGCTTGGTCCAGCTACACACAACCTCTGGCCAGG : 370

DreNgb : CCTGGCTTACCATGTACAGCATTTGGTGTCCAGCATGACTCGAGGCTGGGCCAAAAATGGTGAACACAAGTCCAACTGA : 480
CauNgb : CTTGGCTTACCATGTACAGCATCTA----- : 396
    
```

6.1.6 Globin X

```

                *      20      *      40      *      60      *      80
DreGbX : ATGGGCTGCGCTATTTTCGGGCTCCGGACTGACAGCGGGAGCCCGGAGATCAGACCCGGGGAGGAAGAGACTCCGGCGGG : 80
CauGbX : ATGGGCTGCGCTATTTTCGGGCTCCGGACTGACAGCGGGAGCCCGGAGATCAGACCCGGGGAGGAAGAGACTCCGGCGGG : 80

                *      100     *      120     *      140     *      160
DreGbX : ACTCACCACATATCACATCCGCCTCATCAAAGAGTCTGGAGGCTCATT CAGGAGGACATCGCCAAGTGGGCATCATTA : 160
CauGbX : ACTCACCACATATCACATCCGCCTCATCAAAGAGTCTGGAGGCTCATT CAGGAGGACATCGCCAAGTGGGCATCATTA : 160

                *      180     *      200     *      220     *      240
DreGbX : TGTTCGTCAGGTTGTTTGA GACTCATC CA GAGTGA AAGATCTTTCTTCCTCTTTCCGGACGTGGAGGATCTGGAGAGG : 240
CauGbX : TGTTCGTCAGGTTGTTTGA GACTCATC CA GAGTGA AAGATCTTTCTTCCTCTTTCCGGACGTGGAGGATCTGGAGAGG : 240

                *      260     *      280     *      300     *      320
DreGbX : CTGCGCACAAAGCAGAGAGCTTCGAGCCACGGCCTGGCGGTGATGTCTTCATTGCAAGAGTGTGGCCAGACTGGATCA : 320
CauGbX : CTGCGCACAAAGCAGAGAGCTTCGAGCCACGGCCTGGCGGTGATGTCTTCATTGCAAGAGTGTGGCCAGACTGGATCA : 320

                *      340     *      360     *      380     *      400
DreGbX : GCTGGACGCTTTAGAGACTCTGGCGCTGGAAGTGGGCAAGAGCCACTACAGATAAAGCTCCACCCAAGTATTACGGGT : 400
CauGbX : GCTGGACGCTTTAGAGACTCTGGCGCTGGAAGTGGGCAAGAGCCACTACAGATAAAGCTCCACCCAAGTATTACGGGT : 400

                *      420     *      440     *      460     *      480
DreGbX : ATCTAGAGCTGAGTTTATCTGTGCGGTTCCGGCCGATCTTAAAGGACAGATGGACTCCTGAACTGGAAAGAGCCCTGGAA : 480
CauGbX : ATCTAGAGCTGAGTTTATCTGTGCGGTTCCGGCCGATCTTAAAGGACAGATGGACTCCTGAACTGGAAAGAGCCCTGGAA : 480

                *      500     *      520     *      540     *      560
DreGbX : ACTCTGTTCCAGTATGTGACGCTCCATCATGAGAGAGGGATTTCTGGAGGAAGAAAGAAACCAACGCAGCAACACACAGAC : 560
CauGbX : ACTCTGTTCCAGTATGTGACGCTCCATCATGAGAGAGGGATTTCTGGAGGAAGAAAGAAACCAACGCAGCAACACACAGAC : 560

                *      580     *      600
DreGbX : GTCCAGCAGAGAGCAACCAGACAAGAGGAGCACAGCCATCTCA : 603
CauGbX : GTCCAGCAGAGAGCGACCAGACAAGAGGAGCACAGCCATCTGA : 603
    
```

6.1.7 Genomische Globin X-Sequenz des Kugelfisches *T. nigroviridis*

Lage der Exons bzw. Introns: schwarz bzw. weiß

```

                *      20      *      40      *      60      *      80
TniGbX_Gen1 : CCGTGGAGCAAGATCTACCATTTTACGGACTGTACAGCATCCCACCGTCGGACTTTCCACCCCGTGTTCCTCCGTTCA : 80
TniGbX_Gen2 : CCGTGGAGCAAGATCTACCATTTTACGGACTGTACAGCATCCCACCGTCGGACTTTCCACCCCGTGTTCCTCCGTTCA : 80
TniGbX_cDNA : -----

                *      100     *      120     *      140     *      160
TniGbX_Gen1 : AATGGGCTCGCGATATCAAGTCTGGGCGCAAAGCGGAGTTTGGAGACAGAAGCGCAGAGGAGGAGGACGCAGCTGCTG : 160
TniGbX_Gen2 : AATGGGCTCGCGATATCAAGTCTGGGCGCAGAAGCGGAGTTTGGAGACAGAAGCGCAGAGGAGGAGGACGCAGCTGCTG : 160
TniGbX_cDNA : -AATGGGCTCGCGATATCAAGTCTGGGCGCAAAGCGGAGTTTGGAGACAGAAGCGCAGAGGAGGAGGACGCAGCTGCTG : 79

                *      180     *      200     *      220     *      240
TniGbX_Gen1 : CT--GCTGCGGTGGTGTATCCAGAGAAGATCAGATT CAGATGATCAAAGACTCGTGGAAAGTTATCCGGGATGACATC : 237
TniGbX_Gen2 : CT--GCTGCGGTGGTGTATCCAGAGAAGATCAGATT CAGATGATCAAAGACTCGTGGAAAGTTATCCGGGATGACATC : 237
TniGbX_cDNA : CTGCTGCTGCGGTGGTGTATCCAGAGAAGATCAGATT CAGATGATCAAAGACTCGTGGAAAGTTATCCGGGATGACATC : 159

                *      260     *      280     *      300     *      320
TniGbX_Gen1 : GCCAAAGTTGGGATTATTTATGTTTCGTTAGGTAAGATGGGGCATAAAAAGGGTAAAAACTTTGAAGTGTGGTACAGTGT : 317
TniGbX_Gen2 : GCCAAAGTTGGGATTATTTATGTTTCGTTAGGTAAGATGGGGCATAAAAAGGGTAAAAACTTTGAAGTGTGGTACAGTGT : 317
TniGbX_cDNA : GCCAAAGTTGGGATTATTTATGTTTCGTTAG-----

                *      340     *      360     *      380     *      400
TniGbX_Gen1 : AAGATACTTATTACCACACTCGGTTTTTTTTTTCTTACAGAAAAAACAAATAGTTATTTTCTTACAACAAATGGACCTG : 397
TniGbX_Gen2 : AAGATACTTATTACCACACTCGGTTTTTTTTTTCTTACAGAAAAAACAAATAGTTATTTTCTTACAACAAATGGACCTG : 397
TniGbX_cDNA : -----

                *      420     *      440     *      460     *      480
TniGbX_Gen1 : TAGGATAGAAAATAAAAATGTCATAAATGTTTAAAGCCACCATTGGTCTCACTGAAACTTTAACATTTAAAAGGGCCTCCA : 477
TniGbX_Gen2 : TAGGATAGAAAATAAAAATGTCATAAATGTTTAAAGCCACCATTGGTCTCACTGAAACTTTAACATTTAAAAGGGCCTCCA : 477
TniGbX_cDNA : -----

                *      500     *      520     *      540     *      560
TniGbX_Gen1 : GAGACCTGGTGGATCTCTAGTGATGATGACTCGACCTTTGTCATGCAAGCTGGAACGCCTGACATCCCTGTGCTGCCCTC : 557
TniGbX_Gen2 : GAGACCTGGTGGATCTCTAGTGATGATGACTCGACCTTTGTCATGCAAGCTGGAACGCCTGACATCCCTGTGCTGCCCTC : 557
TniGbX_cDNA : -----

                *      580     *      600     *      620     *      640
TniGbX_Gen1 : TGACCCACGCCCCAGCCCTCCCTCCACCCCTCTTATCGCTCCACATCGCATCTTCAGAAAGCATTATGCAGTAACGCA : 637
TniGbX_Gen2 : TGACCCACGCCCCAGCCCTCCCTCCACCCCTCTTATCGCTCCACATCGCATCTTCAGAAAGCATTATGCAGTAACGCA : 637
TniGbX_cDNA : -----
    
```

Anhang

```

TniGbX_Gen1 : CAGC--AGGTCTGCAGCACGGCCATGCAATTAAGCCATGGAGAAAATGGGTTTTATCAATTACAACGATGGCAGCCCG : 714
TniGbX_Gen2 : CAGCTGCAGGTCTGCAGCACGGCCATGCAATTAAGCCATGGAGAAAATGGGTTTTATCAATTACAACGATGGCAGCCCG : 717
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : TGCCTGGGACACACACACAGACGTGTTTGGCCTCTGGCTGAAAAACAAACGCTGGAATAAGAGACAACCTGGGCGGGTAGA : 794
TniGbX_Gen2 : TGCCTGGGACACACACACAGACGTGTTTGGCCTCTGGCTGAAAAACAAACGCTGGAATAAGAGACAACCTGGGCGGGTAGA : 797
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GTCCAAGTAAAGCCCTGGGAATATGGTGTCCGTGAGAGAGCCGACTCCCTCCCTGACGGACAGGAGCAGCGTCACATC : 874
TniGbX_Gen2 : GTCCAAGTAAAGCCCTGGGAATATGGTGTCCGTGAGAGAGCCGACTCCCTCCCTGACGGACAGGAGCAGCGTCACATC : 877
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GTTGGGAATCACCTACTGTGTGATTCAACGTGGGTTCTGTGACAGCAGGAAGGAGTCCACTCAGATGTCCCGCTGAGA : 954
TniGbX_Gen2 : GTTGGGAATCACCTACTGTGTGATTCAACGTGGGTTCTGTGACAGCAGGAAGGAGTCCACTCAGATGTCCCGCTGAGA : 957
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : CCATGTGACAGCTCTCAAAAAGCACCATCTAACTTCCACAGAGGGCTGCATGGGTGCCTGCGGATGTCTGCTCTCACAT : 1034
TniGbX_Gen2 : CCATGTGACAGCTCTCAAAAAGCACCATCTAACTTCCACAGAGGGCTGCATGGGTGCCTGCGGATGTCTGCTCTCACAT : 1037
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : CCTGCTGAAGTGTCTCACATAAACCGCCACCATTCCCTTTCATTCCATTCACTCGGCACACCAACTTCCCTCCCTCCAG : 1114
TniGbX_Gen2 : CCTGCTGAAGTGTCTCACATAAACCGCCACCATTCCCTTTCATTCCATTCACTCGGCACACCAACTTCCCTCCCTCCAG : 1117
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GAACAGAAGTTATAGCCCTCACATTTTGATTTCCCTCTTTTCCATCCCAGCTGGCAAGGGGAGGGTGGGGAGTGGGGG : 1194
TniGbX_Gen2 : GAACAGAAGTTATAGCCCTCACATTTTGATTTCCCTCTTTTCCATCCCAGCTGGCAAGGGGAGGGTGGGGAGTGGGGG : 1197
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GGGGGGGGGGACGACACTGACTTTGTGCTGTAAGAAAATGCATCCTGTGACATATTAGTATTACGATTTATGTTGC : 1274
TniGbX_Gen2 : GGGGGGGG--ACGACACTGACTTTGTGCTGTAAGAAAATGCATCCTGTGACATATTAGTATTACGATTTATGTTGC : 1274
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GACATCCTCTGGTGGCGCTCTGGCAGCCATCACAGAGCCGTCGGTGTCTCGACAGCTCCTCCATCCATCTGTCACTCAT : 1354
TniGbX_Gen2 : GACATCCTCTGGTGGCGCTCTGGCAGCCATCACAGAGCCGTCGGTGTCTCGACAGCTCCTCCATCCATCTGTCACTCAT : 1354
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GGGTGCCACATGTCACCAGCGTCTGATGCATTTATTATGCGTGTCTGTGTAACACTTTTATTTACACCGTCAATGAGA : 1434
TniGbX_Gen2 : GGGTGCCACATGTCACCAGCGTCTGATGCATTTATTATGCGTGTCTGTGTAACACTTTTATTTACACCGTCAATGAGA : 1434
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GATTAACAACAACAGCAGAGCCGTCACACGAGGAGCTCAGGCCAACTCCCTCCTCCTTCTTTCTCTTTTACACCG : 1514
TniGbX_Gen2 : GATTAACAACAACAGCAGAGCCGTCACACGAGGAGCTCAGGCCAACTCCCTCCTCCTTCTTTCTCTTTTACACTG : 1514
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : ACTTTAATGCAAAACAGACGGAGTTTGCAGCCGCTCAGCTGGAGGCAGGACTGCTCTGTGATTGGCTGGCAGCACACTCCA : 1594
TniGbX_Gen2 : ACTTTAATGCAAAACAGACGGAGTTTGCAGCCGCTCAGCTGGAGGCAGGACTGCTCCGTGATTGGCCGCGCAGCACACTGCA : 1594
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : AAGTTCGTCTTGGAGGGAAGTATTGGGGTTAAATCAGAGCCGAGATGCCATCTGACCACAATCCTGGTGGTTCTTGTCTG : 1674
TniGbX_Gen2 : AAGTTCGTCTTGGAGGGAAGTATTGGGGTTAAATCAGAGCCGAGATGCCATCTGACCACAATCCTGGTGGTTCTTGTCTG : 1674
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : GGGAGGCGCGCAAAAAAAGAGAAAAAACCACAGACTGATTGCAGATTACCAGAAAAAGAACAGGATAACGGGGGA : 1753
TniGbX_Gen2 : GGGAGGCGCGCAAAAAAAGAGAAAAAACCACAGACTGATTGCAGATTACCAGAAAAAGAACAGGATAACGGGGGA : 1754
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : CAATCAGATCTCTGCTCAGAAGACATGAGGAGGATAAACCGTCCCGCTTCCGTGTTGATGAGCTGCACACTCGGAGGTCA : 1833
TniGbX_Gen2 : CAATCAGATCTCTGCTCAGAAGACATGAGGAGGATAAACCGTCCCGCTTCCGTGTTGATGAGCTGCACACTCGGAGGTCA : 1834
TniGbX_cDNA : -----: -

TniGbX_Gen1 : TGTGACCGTCAGCCTGAACCGTTCGGTATCTCTGCGTGAACCTGTCTCCCTCCGTGTCTGATTACAGCTTCTTCGAGACT : 1913
TniGbX_Gen2 : TGTGACCGTCAGCCTGAACCGTTCGGTATCTCTGCGTGAACCTGTCTCCCTCCGTGTCTGATTACAGCTTCTTCGAGACT : 1914
TniGbX_cDNA : -----GTTGTTTCGAGACT: 201

TniGbX_Gen1 : CATCCTGAATGCAAAGACGCTCTTCTTCTGTTCCGAGATGTGGAGACCTGGAGAGGTTGCGGAGCAGCGCTGAGCTCAG : 1993
TniGbX_Gen2 : CATCCTGAATGCAAAGACGCTCTTCTTCTGTTCCGAGATGTGGAGACCTGGAGAGGTTGCGGAGCAGCGCTGAGCTCAG : 1994
TniGbX_cDNA : CATCCTGAATGCAAAGACGCTCTTCTTCTGTTCCGAGATGTGGAGACCTGGAGAGGTTGCGGAGCAGCGCTGAGCTCAG : 281

```

Anhang

```

*          2020          *          2040          *          2060          *          2080
TniGbX_Gen1 : GGGGCACGGCTGCGGTCAGTAAGCAAGGCTGAGAATGTCAGCCCTGGGCTCAAACCTGGGCACAACTGGCCGACTGCT : 2073
TniGbX_Gen2 : GGGGCACGGCTGCGGTCAGTAAGCAAGGCTGAGAATGTCAGCCCTGGGCTCAAACCTGGGCACAACTGGCCGACTGCT : 2074
TniGbX_cDNA : GGGGCACGGCTGCGG-----: 296

*          2100          *          2120          *          2140          *          2160
TniGbX_Gen1 : CCGCCCCCTTAGACGGGGGATGCTGAAACCCAGTCCCTCCAGGGCCACAATCCAATGGGGATCTGACCTGGCTCACCT : 2153
TniGbX_Gen2 : CCGCCCCCTTAGACGGGGGATGCTGAAACCCAGTCCCTCCAGGGCCACAATCCAATGGGGATCTGACCTGGTTCACCT : 2154
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2180          *          2200          *          2220          *          2240
TniGbX_Gen1 : GGGTTCACCTGCCCGGGGAGGACAGTCCGCTGTCTGCTTACAGTGGAAAAACAGCGAGCAGCATCAGGGAGCCTGATC : 2233
TniGbX_Gen2 : GGGTTCACCTGCCCGGGGAGGACAGTCCGCTGTCTGCTTACAGTGGAAAAACAGCGAGCAGCATCAGGGAGCCTGATC : 2234
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2260          *          2280          *          2300          *          2320
TniGbX_Gen1 : CTGACATTTTAAACTCTAATCTGCTGTATTTCAAAGCATGTTTAAAGTGTGACGATGT CATGGAAGGGTAATAACCG : 2313
TniGbX_Gen2 : CTGACATTTTAAACTCTAATCTGCTGTATTTCAAAGCATGTTTAAAGTGTGCGATGT CATGGAAGGGTAATAACAG : 2314
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2340          *          2360          *          2380          *          2400
TniGbX_Gen1 : GTAGGGTAATAA---CAGCTGCATCGGTGACGGCACCCTGAAAACCCCGTAACTCATCACAGGAGAAGGGCTGGAATG : 2390
TniGbX_Gen2 : GTAGCGTAATAATAACAGCTGCATCGGTGACAGCACCCTGAAAACCCCGTAACTCATCACAGGAGAAGGGCTGGAATG : 2394
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2420          *          2440          *          2460          *          2480
TniGbX_Gen1 : TACTGAAATGATTAAATAAACAGAACCATGAACTCCACCCCTCAGAGGGAGAGCAGACAAGTCTTCGGCTCACTCCCT : 2470
TniGbX_Gen2 : TACTGAAATGATTAAATAAACAGAACCATGAACTCCACCCCTCAGAGGGAGAGCAGACAAGTCTTCGGCTCACTCCCT : 2474
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2500          *          2520          *          2540          *          2560
TniGbX_Gen1 : TAACTGAAACATGAGTAAAATTAACCAAGCCAGAATTCTCAGTGCAGCTAAAGTGAACCAAATTTCCACATTGTATAA : 2550
TniGbX_Gen2 : TAACTGAAACATGAGTAAAATTAACCAAGCCAGAATTCTCAGTGCAGCTAAAGTGAACCAAATTTCCACATTGTATAG : 2554
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2580          *          2600          *          2620          *          2640
TniGbX_Gen1 : CTTTGGTTCAGAAAAGGCTGGTGTAAATGCCACGACTGACAACCGAGGCAGGAACTTGATACCAAAGATACAAACGATG : 2630
TniGbX_Gen2 : CTTTGGTTCAGAAAAGGCAAGTGTAAATGCCACGACTGACAACCGAGGCAGGAACTTGATACCAA-GATACAAACGATG : 2633
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2660          *          2680          *          2700          *          2720
TniGbX_Gen1 : CCCCATGAGGCAGCAGCCATGTTCCAGGACCTTGAACCTCAGCATCAGGTCTGGAGAACGCTGTGGCTCCTGCGCCT : 2710
TniGbX_Gen2 : CCCCATGAGGCAGCAGCCATGTTCCAGGACCTTGAACCTCAGCATCAGGTCTGGAGAGCCTGTGGCTCCTGCGCCT : 2713
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2740          *          2760          *          2780          *          2800
TniGbX_Gen1 : GCAGCTGGCCCTCGGCACAGTCGTAAGGTTGTTAAAGTTATTGATCTCCAGGTCACCGATCAGTGGCGCTCAACCATA : 2790
TniGbX_Gen2 : GCAGCTGGCCCTCGGCACAGTCGTAAGGTTGTTAAAGTTATTGATCTCCAGGTCACCGATCAATGCGCGCTCAACCATA : 2793
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2820          *          2840          *          2860          *          2880
TniGbX_Gen1 : ATGTCAGATTAGAAAAGACAAATCCAGCACATCCCTTCATTCTGTTGGGGGAAGACTCGGAGGAGCTATTTTTAGCTGTGA : 2870
TniGbX_Gen2 : ATGTCAGATTAGAAAAGACAAATCCAGCACATCCCTTCATTCTGTTGGGGGAAGACTCGGAGGAACTATTTTTAGCTGTGA : 2873
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2900          *          2920          *          2940          *          2960
TniGbX_Gen1 : ATTTTCAGTCTTTATATAGTAATATAACAAAATATTTAGTTGTGTGTATGAGCATGCACCAGAACAGCTTCTGGTGCATGC : 2950
TniGbX_Gen2 : ATTTTCAGTCTTTATATAGTAATATAACAAAATATTTAGTTGTGTGTGTGAGCATGCACCAGAACAGCTTCTGGCGCATGC : 2953
TniGbX_cDNA : -----: -

*          2980          *          3000          *          3020          *          3040
TniGbX_Gen1 : TCACACACAAAAAGGCAAAACGTATGCATTTCTCTAGTAAAGTGTGGATGTCAAAGGGCTGTTGGTGGTTCTCTCCTG : 3030
TniGbX_Gen2 : CCACACACAAAAAGGCAAAACGTATGCATTTCTCTAGTAAAGTGTGGATGTCAAAGGGCTGTTGGTGGTTCTCTCCTG : 3033
TniGbX_cDNA : -----: -

*          3060          *          3080          *          3100          *          3120
TniGbX_Gen1 : GTGTTTCAGCCTGATGTTAGGCCAGCGTCACTGATCAGGTCACGTGGTTCTGCAAAACACACATTAGTGCGAATGCAGAGGA : 3110
TniGbX_Gen2 : GTGTTTCAGCCTGATGTTAGGCCAGCGTCACTGATCAGGTCACGTGGTTCTGCAAAACACACATTAGTGCAAATGCAGAGGA : 3113
TniGbX_cDNA : -----: -

*          3140          *          3160          *          3180          *          3200
TniGbX_Gen1 : AATGAAACCGGTTCTAAATGTTACCCCTTATTAGCCTTCCCTCTCTTTTTTTCTTTTGTCCACCCCAACACACACAC : 3190
TniGbX_Gen2 : AATGAAACCGGTTCTAAATGTTACCCCTTATTAGCCTTCCCTCTCTTTTTTTCTTTTGTCCACCCCAACACACACAC : 3193
TniGbX_cDNA : -----: -

*          3220          *          3240          *          3260          *          3280
TniGbX_Gen1 : ACACGTTAAAGTGATGCCAGGGAACAACAAGAATATTGATCTGTGGTATTCTACAGAAGAAAAATATATATTTTGGGA : 3270
TniGbX_Gen2 : ACACGTTAAAGTGATGCCAGGGAACAACAAGAATATTGATCTGTGGTATTCTACAGAAGAAAAATATATATTTTGGGA : 3273
TniGbX_cDNA : -----: -

*          3300          *          3320          *          3340          *          3360
TniGbX_Gen1 : CACAAAAACAATTATGCAATCAGCTGTTCCGGCCATGAGCAACTGTGATGGACAGAGAATCAATTGTGTGTGTGTGTG : 3350
TniGbX_Gen2 : CACAAAAACAATTATGCAATCAGCTGTTCCGGCCATGAGCAACTGTGATGGACAGAGAATCAATTGTGTGTGTGTGTG : 3353
TniGbX_cDNA : -----: -

```

Anhang

```

*           3380           *           3400           *           3420           *           3440
TniGbX_Gen1 : TGTGTGTGTGTGTGTGTGTTCAGGCTGTTTCAGTGTAAATGTCACCACGCAACAAGAGCAGCACACAGATCCACAGT : 3430
TniGbX_Gen2 : TGTGTGTGTGTGTG--TTTTCAGCTGTTTCAGTGTAAATGTCACCACGCAACAAGAGCAGCACACAAATCCACAGT : 3431
TniGbX_cDNA : -----: -

*           3460           *           3480           *           3500           *           3520
TniGbX_Gen1 : GCTGCTCATTTCCACGAGCAGGCTGATCTCCTTCTATTGCGCTCCATCTCTTTCAGGGTGATGTCCTTTATTGAGAAAAG : 3510
TniGbX_Gen2 : GCTGCTCATTTCCACGAGCAGGCTGATTTCTTCTATTGCGCTCCATCTCTTTCAGGGTGATGTCCTTTATTGAGAAAAG : 3511
TniGbX_cDNA : -----GGTGATGTCCTTTATTGAGAAAAG : 320

*           3540           *           3560           *           3580           *           3600
TniGbX_Gen1 : CGTGCCGAGGCTGGACCAGCAGGACCGGCTGGAAGCTCTGGCTGTGGAGCTGGGGAAAAGCCATTATCACTACAACGCTC : 3590
TniGbX_Gen2 : CGTGCCGAGGCTGGACCAGCAGGACCGGCTGGAAGCTCTGGCTGTGGAGCTGGGGAAAAGCCATTATCACTACAACGCTC : 3591
TniGbX_cDNA : CGTGCCGAGGCTGGACCAGCAGGACCGGCTGGAAGCTCTGGCTGTGGAGCTGGGGAAAAGCCATTATCACTACAACGCTC : 400

*           3620           *           3640           *           3660           *           3680
TniGbX_Gen1 : CACCCAAGTATTACAGCTAAGGCCCAACGAGCCCGTGGACTCGCGCACACAGACTCCACCTGAAACATTTTTCATT : 3670
TniGbX_Gen2 : CACCCAAGTATTACAGCTAAGGCCCAACGAGCCCGTGGACTCGCGCACACAGACTCCACCTGAAACATTTTTCATT : 3671
TniGbX_cDNA : CACCCAAGTATTACAGC-----: 417

*           3700           *           3720           *           3740           *           3760
TniGbX_Gen1 : TCCCAGTATGTCGGAGCTGAATTCATCTGTGCCCTGCAGCCCATCTGAAGGAGAGGTTCCACATCCGAGCTGGAGGAGGC : 3750
TniGbX_Gen2 : TCCCAGTATGTCGGAGCTGAATTCATCTGTGCCCTGCAGCCCATCTGAAGGAGAGGTTCCACATCCGAGCTGGAGGAGGC : 3751
TniGbX_cDNA : -----TATGTCGGAGCTGAATTCATCTGTGCCCTGCAGCCCATCTGAAGGAGAGGTTCCACATCCGAGCTGGAGGAGGC : 491

*           3780           *           3800           *           3820           *           3840
TniGbX_Gen1 : CTGGAAGGTGAGAAGGCTCTGGTTGGATGCCAGTAAGACCGGTTTGATGTGCAACCAGTGAAGGAGGTTCCACATCCGAGCTGGAGGAGGC : 3830
TniGbX_Gen2 : CTGGAAGGTGAGAAGGCTCTGGTTGGATGCCAGTAAGACCGGTTTGATGTGCAACCAGTGAAGGAGGTTCCACATCCGAGCTGGAGGAGGC : 3831
TniGbX_cDNA : CTGGAAG-----: 498

*           3860           *           3880           *           3900           *           3920
TniGbX_Gen1 : GACAAGGGAACCTGGCCCTTCAAAGGTCATGGTATGAGTACAGAGAATGGTGAAAACAGAGCTGATCAAATGTAGT : 3910
TniGbX_Gen2 : GACAAGGGAACCTGGCCCTTCAAAGGTCATGGTATGAGTACAGAGAATGGTGAAAACAGAGCTGATCAAATGTAGT : 3911
TniGbX_cDNA : -----: -

*           3940           *           3960           *           3980           *           4000
TniGbX_Gen1 : GTGTGTAATGTGGATGGACTGAGACATTTTGTCTTATGGGTGAAAAAAAACCCCAAAGATAATAATTTTAAACAACC : 3990
TniGbX_Gen2 : GTGTGTAATGTGGATGGACTGAGACATTTTGTCTTATGGGTGAAAAAAAACCCCAAAGATAATAATTTTAAACAACC : 3991
TniGbX_cDNA : -----: -

*           4020           *           4040           *           4060           *           4080
TniGbX_Gen1 : ATAAGTGGGCTTAATGAAACTTGGAAAAAGCATTTCCAAAGCTGGACTGAATGATTTCTAACTGTCTGTGGCAAATGA : 4070
TniGbX_Gen2 : ATAAGTGGGCTTAATGAAACTTGGAAAAAGCATTTCCAAAGCTGGACTGAATGATTTCTAACTGTCTGTGGCAAATGA : 4071
TniGbX_cDNA : -----: -

*           4100           *           4120           *           4140           *           4160
TniGbX_Gen1 : ATGGTTTTATTGGAAGACAGAGGACAAACACGTTCAAATTAAGGGTGGGGCAGAGGGGTAAAAAAA-CACATTTCAACAG : 4149
TniGbX_Gen2 : ATGGTTTTATTGGAAGACAGAGGACAAACACGTTCAAATTAAGGGTGGGGCAGAGGGGTAAAAAAAACACATTTCAACGG : 4151
TniGbX_cDNA : -----: -

*           4180           *           4200           *           4220           *           4240
TniGbX_Gen1 : CTAATAAAAATAGCGATAATCGGCATTAATTTGTATTAATATTGGACTTTTTTTTTT-CTTTGGTAATTATTATCTTAGC : 4228
TniGbX_Gen2 : CTAATAAAAATAGCGATAATCGGCATTAATTTGTATTAATATTGGACTTTTTTTTTTCTTTGGTAATTATTATCTTAGC : 4231
TniGbX_cDNA : -----: -

*           4260           *           4280           *           4300           *           4320
TniGbX_Gen1 : TTGAGCCAGTTTTTTATTGCTGGGTTGACGCAGACCTTGTTCAGTACGTGACCGGGCTGATGAGGAAGGGCCACCAGG : 4308
TniGbX_Gen2 : TTGAGCCAGTTTTTTATTGCTGGGTTGACGCAGACCTTGTTCAGTACGTGACCGGGCTGATGAGGAAGGGCCACCAGG : 4311
TniGbX_cDNA : -----ACCTTGTTCAGTACGTGACCGGGCTGATGAGGAAGGGCCACCAGG : 544

*           4340           *           4360           *           4380           *           4400
TniGbX_Gen1 : AGGAGGGCAGCCGACAGCGCCACCTAGCGCTGCCCCGAAGGACGCGCCAGAGAAGAGGACCAGCGCCCTGTAGGAGGGC : 4388
TniGbX_Gen2 : AGGAGGGCAGCCGACAGCGCCACCTAGCGCTGCCCCGAAGGACGCGCCAGAGAAGAGGACCAGCGCCCTGTAGGAGGGC : 4391
TniGbX_cDNA : AGGAGGGCAGCCGACAGCGCCACCTAGCGCTGCCCCGAAGGACGCGCCAGAGAAGAGGACCAGCGCCCTGTAGGAGGA-- : 622

*           4420           *           4440           *           4460           *           4480
TniGbX_Gen1 : CCGCTGCACCGGGCCACCGCCAGTCTGTGTTTGTAAATACTGTACCGCTTCATTTTGTATATTGCTCATATTTATTAGCC : 4468
TniGbX_Gen2 : CCGCTGCACCGGGCCACCGCCAGTCTGTGTTTGTAAATACTGTACCGCTTCATTTTGTATATTGCTCATATTTATTAGCC : 4471
TniGbX_cDNA : -----: -

*           4500           *           4520           *           4540           *           4560
TniGbX_Gen1 : AATTTTACATATTTATCGCATAAAAACACACTCAAATAACCATGAGACTTTAAACAATGCACCTTATTCTGACACAGCAC : 4548
TniGbX_Gen2 : AATTTTACATATTTATCGCATAAAAACACACTCAAATAACCATGAGACTTTAAACAATGCACCTTATTCTGACACAGCAC : 4551
TniGbX_cDNA : -----: -

*           4580           *           4600           *           4620           *
TniGbX_Gen1 : GCTAGTGCAGGACTCAGGAACAGACAGATGTTCAAAAAAACTGAAAAACAGCTGTGAGAAGACCTGCTGCTTGAC : 4627
TniGbX_Gen2 : GCTAGTGCAGGACTCAGGAACAGACAGATGTTCAAAAAAACTGAAAAACAGCTGTGAGAAGACCTGCTGCTTGAC : 4630
TniGbX_cDNA : -----: -

```

6.1.8 Stammbaum der Globine im Tierreich

Die Aminosäuren sind entsprechend ihres Konservierungsgrades unterlegt, schwarz = 100%, dunkelgrau = 70%, hellgrau = 40%.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*		
TniGbX	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
DreGbX	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CauGbX	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
XtrGbX	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
HsaNGB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MmuNgb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
TniNgb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
DreNgb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
OmyNgb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
AacNgb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
GdiHbP3	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CinHb2	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CinHb3	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CinHb4	:	MKIICGLILFSTFAIIFVSGLNCWTCNVLGGNNVCCRSSGGLRTCFNNQVCYNEVRRRGNTINIRKGCKNSGVCENHIMQSMSTPNPNNQC	:							:	90
CinHb1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
LteGbB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
LteGbD	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
PsiHb1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
SspHb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
AmaMb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
LamHb2	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
DmeHb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
GinHb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CttHbIb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CttHbVIII	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CttHbVI	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CttHbE	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MglHb1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MglHb2	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MglHb3	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
LflHb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
HsaCYGB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MmuCygb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
DreCygb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
ManMb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
GauMb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
TthMb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
TniMb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
PcaMb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
HsaMB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MmuMb	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
HpoHbA	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
SacHbA	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
OmyHbA4	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
TthHbA2	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MmuHbA	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
HsaHBA	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
SacHbB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
HpoHbB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CcaHbB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
DreHbBa1	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
HsaHBB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
MmuHbB	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-

Anhang

	*	200	*	220	*	240	*	260	*																	
TniGbX	:	--FLFRDV----	EDLERLRSSRELRA	GLRVM	MSFIEKSVARLDQ	---	QDRLEALAVE	GKSHYHYN-A	PPKYYSVVGAEFICAVQPIL	: 153																
DreGbX	:	--FLFRDV----	EDLERLRSSRELRA	GLRVM	MSFIEKSVARLDQ	---	LERLETLALE	GKSHYRYN-A	PPKYGYVGAEFICAVRPIL	: 147																
CauGbX	:	--FLFRDV----	EDLERLRSSRELRA	GLRVM	MSFIEKSVARLDQ	---	LERLETLALE	GKSHYRYN-A	PPKYGYVGAEFICAVRPIL	: 147																
XtrGbX	:	--FLFRDV----	DDLQALRANKDLRA	GLRVL	SFVEKSVARIAD	---	CARLEELALE	GRSHYRYN-A	PPRYQVVGTEFISAVCPML	: 149																
HsaNGb	:	Q-YNCRQFS	---SPEDCL	-SSPEFLD	IRKVM	MLVIDAAVTNVED	---	LSSLEEYLAS	GRKRAVG-V	KLSSSTVVGESLMLLEKCL	: 121															
MmuNgb	:	Q-YNCRQFS	---SPEDCL	-SSPEFLD	IRKVM	MLVIDAAVTNVED	---	LSSLEEYLAS	GRKRAVG-V	KLSSSTVVGESLMLLEKCL	: 121															
TniNgb	:	H-YT-TNCG	---STQDCL	-SSPEFLE	VTKVM	MLVIDAAVSHLDD	---	LHSLDFLLN	GRKHQAVG-V	KPQSEAMVGESLMLYMLQCSL	: 123															
DreNgb	:	S-YT-TNCG	---DAPECL	-SSPEFLE	VTKVM	MLVIDAAVSHLDD	---	LHSLDFLLN	GRKHQAVG-V	NTQSEALVGESLMLYMLQCSL	: 123															
OmyNgb	:	H-YT-TNCG	---TIQDCL	-SSPEFLE	VTKVM	MLVIDAAVSHLDD	---	LHSLDFLLN	GRKHQAVG-V	NTQSEAVVGESLMLYMLQCSL	: 123															
AacNgb	:	P-CK-GES	---LAALKTNVLLGQ	GAKFMEYIT	TAVNGLDDY	---	AGKAHGPLET	GRSHKTRG-T	TPANR	GKAGEALLAILASVV	: 124															
GdiHbP3	:	G-YT-SRT	---SALKHNSKLQ	NKRIIV	HQIGQAVSELDD	---	GSKFEATLHK	GRKHQAVG-V	KPEY	PDIFLKHLLHVMKSKV	: 122															
CinHb2	:	--YN-LELPDDETL	TLEAMRSNQKMSR	TRIA	TISSTYLKLVQD	---	PEELKTFLENG	GELHAGHN-V	EPED	EYLAPVMLAVIGQQL	: 127															
CinHb3	:	--HS-VLSP	TQQT-ELEVLKSN	AKVVR	ASRV	GLSIDKIINLLDN	---	GEELVKYLLF	GKSHVYKRS-I	PRKY	SAMGFPVLLSVISAVL	: 126														
CinHb4	:	--SQ-LSLSSNES	FTLEQMRNNSRVVY	ANR	VARAVGR	LVLDLIEL	---	PTNFTDHLVW	GRSHAYHG-V	APVND	YMGFVLLLETIKVNL	: 260														
CinHb1	:	--YT-IDLP	DEEBELTIDVMRENK	VVA	TRIANA	ISKFIKFLDQ	---	PEELEKLLTS	GESHARRQ-V	DPESE	EYVAPVILSVIGGHL	: 127														
LteGbB	:	---KRV	---HGDDTS	-HPAFIA	AEER	LGGLDIAISTLDQ	---	PATLKEELDH	QVQHEGRK-I	PDNY	DAFKTALHVAQAQL	: 121														
LteGbD	:	---SRV	---RGDNLY	-SPEFGA	SQRV	LSGLDITISMLDT	---	PDMMLAAQLAH	KVQHEVERN-L	KPEP	PDIFLKHLLHVMKSKV	: 136														
PsiHb1	:	---KRV	---QGENIY	-SPEFGA	GIRV	LAGLDSVIGVLEDD	---	DDTFTVQLAH	KACHTERG-T	KPEY	PDIFLKHLLHVMKSKV	: 119														
SspHb	:	---F-KRV	---NGKDIS	-SPAFA	IQRI	PGGDMCTISMLDD	---	SDVLASQLAH	HACHVERG-I	SAEY	EDVFAESLMLAVESTI	: 135														
AmaMb	:	PNY	---KGK	---SVDLS	SSVGSFAS	TTKVV	AAVFDL	VAKAGD	---	AAGLAGAAKQV	VADVSRGGV	-SGAEYADL	FAALVPPFLASAL	: 121												
LamHb2	:	---KRV	---RGDNH	-TPAFRA	TRIV	LGGLDMLCIALDD	---	EGVLNTQLAH	ASQSSRG-V	SAAQV	DNVHESVMMVGEHEI	: 118														
DmeHb	:	P-F	---RDV	---PLEEL	SGNARFRA	AGRI	IRVDES	IQVLGGDGL	LEKLEI	WTKIAV	SHIPRT	-V-SKESY	QKLGVLDDVLEAAC	: 121												
GinHb	:	PWF	---KEI	---PPDDL	PENARFKT	TRIL	RQVDE	GVKAL	SVDFGDK	KFDDV	WKKIAQ	THHEKK	-V-ERRS	YNLEKDIIEVVCSCV	: 122											
CttHbIib	:	PQFAGKDL	---	ETL	KGTGQFAT	AGRI	VGFSE	IVALMGNS	ANMPAM	ETLLIK	DMAAN	HKARG-I	-PKAQ	NEFRASLVSVLQSKV	: 118											
CttHbVII	:	PQFAGKDL	---	DS	IKDSADFA	VESGR	IVGFP	SEVIGL	IGNPEN	PAKTL	IDGAS	SEKARG-I	-EKAQ	EEFRASLVSVLSHHL	: 118											
CttHbVI	:	PQFAGKDL	---	DS	IKDSAAFAT	TRIV	SFSE	VISLAGS	DANIPAI	QNLAK	ATSE	KPRG-V	-SKQ	TEFRALFTYLKHAH	: 118											
CttHbE	:	PQFVKGDL	---	DA	IKGGA	EFS	TRIV	SF	GGV	IDDL	---	PNIGKHVDA	VAT	HKPRG-V	-THAQ	NNFRAAFIAYLKGHV	: 127									
MglHb1	:	PKF	---SAT	---K	---CNLE	QDNEVKWQASRI	INAV	NHTIG	LMDK	---	EAAM	QYLKE	SAR	HSSEFQV	-DPK	YKELSAIFVSTIR	: 127									
MglHb2	:	TKM	---KDL	---HTLE	D	LASSADAR	VERI	IQA	VNF	AVINIED	---	REK	LSNKFVK	SQD	IEEFHV	TPQV	MLSQITLDEVEKRN	: 130								
MglHb3	:	PKF	---SAK	---K	---CHLE	QDNEVKWQASRI	INAV	NVGH	LDN	---	EVAM	QYLKE	SAR	HSSEFQV	-DPK	YKELSAIFVSTIR	: 127									
LflHb	:	PKF	---KGM	---TSAD	QLKKSAD	VRV	AE	RI	INA	VND	AVAS	MDD	---	TEK	MSMKLRD	SGK	HAKSFQV	-DPQ	YKELSAIFVSTIR	: 129						
HsaCYGB	:	SQF	---KHM	---ED	PLEMERS	PQLRK	ACR	VM	GALNT	VVENLHD	---	PKV	SSVLAL	VGKA	HALKHKV	-EPV	YKELSGVILEVVAEAF	: 139								
MmuCygb	:	SQF	---RHM	---ED	PLEMERS	PQLRK	ACR	VM	GALNT	VVENLHD	---	PKV	SSVLAL	VGKA	HALKHKV	-EPV	YKELSGVILEVVAEAF	: 139								
DreCygb	:	EHF	---REL	---QD	PAEQNA	QLKKE	GOR	V	LNAL	NTLVEN	LRD	---	ADK	LNTIF	NQMGK	SHALRHKV	-DPV	YKELLAGVILEVVAEAF	: 136							
ManMb	:	PKFKNKS	---	GEL	KDTAD	IKAQAD	T	LSAL	GNIV	KKKGS	---	HSQP	VKA	AA	THITTHKI	-PPHY	TKITTI	IAVGLSEMY	: 115							
GauMb	:	PKLKNKS	---	GEL	KDTAD	IKAQAD	T	LSAL	GNIV	KKKGN	---	HSQP	VKA	AA	THITTHKI	-PPHY	TKITTI	IAVGLSEMY	: 115							
TthMb	:	PKF	---AGI	---AQ	ADIAG	NAAVS	AGAT	V	LK	L	GELLK	AKGS	---	HA	ILKP	AN	SHATKHKI	-PINN	KLISEV	LKVVMHEKA	: 115					
TniMb	:	PKF	---VGI	---AQ	SEIAG	NAAVS	AGAT	V	LK	L	GELLK	AKGN	---	HA	ILQP	AN	SHATKHKI	-PIKN	KLISEV	LKVVMHEKA	: 115					
PcaMb	:	DRF	---KHL	---KTE	AEMK	ASEDLK	KRG	VT	L	TAL	GAIL	KKGH	---	HE	AELKP	AQ	SHATKHKI	-PIK	YLEFISE	AIHVLHSHR	: 119					
HsaMB	:	DKF	---KHL	---KSE	DEMKA	SEDLK	KRG	VT	L	TAL	GIL	KKKGG	---	HE	AELKP	AQ	SHATKHKI	-PVK	YLEFISE	IIQVLSQSKH	: 120					
MmuMb	:	DKF	---KNL	---KSE	EDMKA	SEDLK	KRG	VT	L	TAL	GIT	LLKKKGG	---	HA	EIQP	AQ	SHATKHKI	-PVK	YLEFISE	IIIEVLKVRH	: 120					
HpoHbA	:	KDY	---KDFT	---AA	PSI	KA	GAK	V	TAL	AKAC	DHLDD	---	LK	THLHK	AT	PHG	SELKV	-DPAN	QVLSY	CELEVALVHL	: 122					
SacHbA	:	SKF	---TDFS	---ANG	KRVKA	GGK	V	LN	VAD	ATD	HLDD	---	VAG	HLD	AV	LEG	TTL	CV	-DPHN	PL	LLTQCL	IVLVAHL	: 115			
OmyHbA4	:	SHW	---ADLS	---PG	S	GPVK	GGI	M	GA	L	GKAV	GLMDD	---	LV	GMSA	SD	L	H	PNLRV	-DPGN	KILSH	NLIVLVAH	: 115			
TthHbA2	:	SHW	---PDMS	---PG	S	GPVK	GGK	V	M	G	VAL	AVSKIDD	---	LT	TGLD	SEL	H	AFKMRV	-DPSN	KILSH	CILV	VIANMF	: 116			
MmuHbA	:	PHF	---DVS	---HG	SAQVK	GKK	V	AD	AL	ASA	AGHLDD	---	LP	GALSA	SD	L	H	AKLRV	-DPVN	KILSH	CLLIVLVAH	: 114				
HsaHBA	:	PHF	---DLS	---HG	SAQVK	GKK	V	AD	AL	TNA	VAVHDD	---	MP	NALSA	SD	L	H	AKLRV	-DPVN	KILSH	CLLIVLVAH	: 114				
SacHbB	:	VKF	---	PH	ASD	STVQT	AGK	V	S	AL	TVA	YNHIDD	---	VK	PHFVE	SKR	H	EELHV	-DPEN	KIL	LAN	CELEVALGHAL	: 114			
HpoHbB	:	G	---	EPT	AC	SYG	VKE	AKK	V	T	GAL	GVAV	THLGD	---	VK	SQ	TD	SKR	H	EELHV	-DVS	E	KLLAC	KCVVGLL	: 113	
CcaHbB	:	ASF	---GNLS	---SP	AA	IMGN	PKVAA	GRT	V	M	GGL	ERA	IKNMDN	---	IK	ATYAP	SVM	H	SEKLV	-DPDN	RLL	AD	CITVCA	AMKF	: 119	
DreHbBa1	:	ATF	---GNLS	---SP	AA	IMGN	PKVAA	GRT	V	M	GGL	ERA	IKNMDN	---	VK	NTYAP	SVM	H	SEKLV	-DPDN	RLL	AD	CITVCA	AMKF	: 119	
HsaHBB	:	ESF	---GDLS	---TP	D	AVMGN	PKVAA	GRT	V	L	GAF	S	DGLAHLDD	---	LK	GT	FAT	SEL	H	CDKLV	-DPEN	RLL	GN	LV	VGLVAH	: 119
MmuHbB	:	DSF	---GDLS	---SAS	A	IMGN	AKVAA	GRT	V	I	F	ND	GLNHLDS	---	LK	GT	FAS	SEL	H	CDKLV	-DPEN	RLL	GN	LV	VGLVAH	: 119

Anhang

	280	*	300	*	320		
TniGbX	: K-ERF-TSELEE	WKTLFQYVTGLMRKGHQB	E-GSRQRHLALPPKDGPEKRTSAL	:	205		
DreGbX	: K-DRW-TPELEE	WKTLFQYVTSIMREGFLEEBERNKRSNTQTSSRERPKRSTAI	:	200			
CauGbX	: K-DRW-TPELEE	WKTLFQYVTSIMREGFLEEBERNKRSNTQTSSRERPKRSTAI	:	200			
XtrGbX	: H-DKW-TAEVEE	WKGLFAYICTVMERGYQEE	--RRHSDGRSLIDGLQGNKGLI	:	200		
HsaNGb	: G-PAF-TPATRA	WSQLYGAVVQAMSRGWGDE	-----	:	151		
MmuNgb	: G-PDF-TPATRT	WSRLYGAVVQAMSRGWGDE	-----	:	151		
TniNgb	: G-QAY-TASLRQ	WLMYSVVVASMSRGWAKNGEDKAD	-----	:	159		
DreNgb	: G-PAY-TTSLRQ	WLTMSYIVVSAMTRGWAKNGEHKSN	-----	:	159		
OmyNgb	: G-QGY-TAPLRQ	WLMNYTIIVVAAMSRGWAKNGEHKTD	-----	:	159		
AacNgb	: G-GDF-TPAAKD	WTKVYNTISSTMQAAL	-----	:	151		
GdiHbP3	: H-GLD-----	RTLWAAGYRVISDALIAGLES	-----	:	147		
CinHb2	: N-LNS-NSAILQ	WVKAYGVLNRNGIVRGMYA	-----	:	156		
CinHb3	: E-KDL-DAPVMO	WATAYGVIEKGIIDGM	-----	:	153		
CinHb4	: E-LPS-DSPTLS	WAKAYGVKNGIKDAIIATYAEG	-----	:	294		
CinHb1	: K-LPS-NSPTLQ	WVKAYGVLNRNGIVSAMEA	-----	:	156		
LteGbB	: G-RCY-D---	REWDACIDHIEDGKGGH	-----	:	145		
LteGbD	: G-THF-D---	FGWHDQVDQIIDGK	-----	:	157		
PsiHb1	: G-THF-D---	QAWRDCYAVIAAGIKP	-----	:	141		
SspHb	: E-SCF-D---	KDWSQCTKVISSGIGSGV	-----	:	159		
AmaMb	: G-GAC-D---	QAWTAATGAVVAALKAAA	-----	:	145		
LamHb2	: GQNVF-D---	KDHWQACLVDVITGGIQGN	-----	:	142		
DmeHb	: S---L-DESQAAT	WAKLVDPVYGIIFKAIIDDDGNK	-----	:	153		
GinHb	: K---L-NEQVH	YHKFPDRAYDIAFAEMAKMG	-----	:	151		
CttHbIib	: S---W-NDSLGA	WTQGLDNVFNMMFSYL	-----	:	143		
CttHbVII	: D---W-NDTMKS	TWDLALNMMFYILHALE	-----	:	144		
CttHbVI	: N---F-DGPTET	WTLALDITYAMLFSA	-----	:	144		
CttHbE	: D---Y-TAAVEA	WGATFDFFGAVFAKM	-----	:	152		
MglHb1	: -----	GKAYEKLFSIICLLRSSYDE	-----	:	149		
MglHb2	: G--GL-SGEGKS	GWVKVMTIICMLKSKY	-----	:	156		
MglHb3	: -----	GKAYEKLFSIICLLRSSYDE	-----	:	149		
LflHb	: -----	GDAGFEKLSMCIILRSAY	-----	:	149		
HsaCYGB	: A-SDF-PPETQR	WAKLRGLIYSHVTAAYKEVGWVQVPNATTPPATLPSSGP	--	:	190		
MmuCygb	: A-NDF-PVETQR	WAKLRGLIYSHVTAAYKEVGWVQVPNTTTPPATLPSSGP	--	:	190		
DreCygb	: P-QCFSPA	EVQSSWSKLMGLYQWNRVYAEVGE	---NSKK	-----	:	174	
ManMb	: P-SEM-NAQVQA	WFSGAFKICSDIEKEYKAANFQG	-----	:	149		
GauMb	: P-SEM-NAQVQA	WFSGAFKICSDIEKEYKAANFQG	-----	:	149		
TthMb	: G-LD---AGGQT	LRNVMGIIADLEANYKELGFSG	-----	:	147		
TniMb	: G-LD---TAGQT	LRNIMATIIADIDATYKELGFS	-----	:	146		
PcaMb	: P-GDF-GADAQG	MNKALELFRKDIAAKYKELGYQG	-----	:	153		
HsaMB	: P-GDF-GADAQG	MNKALELFRKDMASNYKELGFQG	-----	:	154		
MmuMb	: S-GDF-GADAQG	MSKALELFRNDIAAKYKELGFQG	-----	:	154		
HpoHbA	: T--EF-SPETHC	LDKFLTNVCHELSSRYR	-----	:	149		
SacHbA	: T--EL-KPETHC	LDKFLCEVATALGSHYR	-----	:	142		
OmyHbA4	: P-SDF-TPEVHI	LVDKFLAASALADKYR	-----	:	143		
TthHbA2	: P-KEF-TPDAHVS	LDKFLASVALAERYR	-----	:	144		
MmuHbA	: P-ADF-TPAVHAS	LDKFLASVSTVLTSKYR	-----	:	142		
HsaHbA	: P-AEF-TPAVHAS	LDKFLASVSTVLTSKYR	-----	:	142		
SacHbB	: H-KEF-TPEVQA	WSKFSNVVDALSKGYH	-----	:	142		
HpoHbB	: K-DKF-APQQA	IWEKYFGVVVAISKEYH	-----	:	141		
CcaHbB	: GPSGF-NPDVQE	WQKFLCVVVSALCRQYH	-----	:	148		
DreHbBa1	: GQAGF-NADVQE	WQKFLAVVVSALCRQYH	-----	:	148		
HsaHbB	: G-KEF-TPPVQA	IYQKVVAGVANALAHKYH	-----	:	147		
MmuHbB	: G-KDF-TPAQA	WQKVVAGVAALAHKYH	-----	:	147		

6.1.9 Stammbaum der Fisch-Myoglobine

Die Aminosäuren sind entsprechend ihres Konservierungsgrades unterlegt, schwarz = 100%, dunkelgrau = 70%, hellgrau = 40%.

```

                *           20           *           40           *           60           *           80
DreMb : MADHDLVLCWGAWEADYAANGGEVLNRLRLEKEYEDTLKLFPPKFSGTISQGDLAGSPAVAAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
CcaMb1 : MADHELVLKCGWGVWEADFEPTGGEVLTRLRKQHPETQKLFPPKFGVTAQSDLAGNAVKAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
CcaMb2 : MADYERFLKCGWAWEADYAGHGGGEVLTRLRKQHPETQKLFPPKFGVTAQSDLAGNLVAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
CauMb1 : MADHELVLKCGWGVWEADFEPTGGEVLTRLRKQHPETQKLFPPKFGVTAQSDLAGNAVKAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
CauMb2 : MADYERFLKCGWAWEADYAGHGGGEVLTRLRKQHPETQKLFPPKFGVTAQSDLAGNLVAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
PprMb : MSHDELVLKCGWAWEADYAGHGGGEVLTRLRKQHPETQKLFPPKFGVTAQSDLAGNAVKAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
NcoMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
CanMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
CrhMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
CraMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
TorMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
TthMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
TobMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
SchMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
TalMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
TalaMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
FruMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
TniMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
EpeMb : MADLDAVLKCGWAWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 79
SjaMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
MniMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
PgeMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
GgiMb : MADFDMVLKCGWPMWEADYATHGGLVLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
ManMb : MVDWEKNSVMSAVESDLTAIQNIIILRLRLEFTEHPESQNHFFPKKKNKSLGELKDTADIKAQADTVLRALENIVKPKKGSQ : 80
HpoMb : MTEWEHVNQWAVVEPDIIPAVCLAILRLRLEFTEHPETLKLFPKFGVTAQADLAGDAVSAHGATVLLKLGELLKAKGDHAA : 80
HjaMb : MABWDKNSVMSAVESDLTAIQNIIILRLRLEFTEHPESQNHFFPKKKNKSLGELKDTADIKAQADTVLRALENIVKPKKGSQ : 80
GgaMb : MADWDKNSVMSAVESDLTAIQNIIILRLRLEFTEHPESQNHFFPKKKNKSLGELKDTADIKAQADTVLRALENIVKPKKGSQ : 80
    
```

```

                *           100           *           120           *           140
DreMb : LLKPLANTHANTHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDGYKKEIGFAG : 147
CcaMb1 : LLKPLATTHANTHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
CcaMb2 : LLQPLATTHANTHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--TAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
CauMb1 : LLKPLATTHANTHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
CauMb2 : LLHPMATTHANTHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--SAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
PprMb : LLKPLANTHANTHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--PAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
NcoMb : LLKPLSSSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
CanMb : LLKPLSSSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
CrhMb : LLKPLSSSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
CraMb : LLKPLSSSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
TorMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
TthMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
TobMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
SchMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
TalMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
TalaMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
FruMb : LLQPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--TAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 146
TniMb : LLQPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--TAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 146
EpeMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 146
SjaMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
MniMb : LLKPLANSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
PgeMb : LLKPLSSSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
GgiMb : LLKPLSSSHATKHKIPIINFKLISEVLVVMHEKAGLD--AAGQALRRVMDVIGDIDTYKKEIGFAG : 147
ManMb : PVKALAAATHTTHKIPPHYFTKITTIAVGLSEMYPSMNAQAQAFSGAFKNICSDIEKEYKAANSQG : 149
HpoMb : NVKELADTHTINKHKIPPKNFVLTNIAVKVLTMYPSMTGPMOESFSKFTVICSDLETLYKKAANSQG : 149
HjaMb : PVKALAAATHTTHKIPPHYFTKITTIAVGLSEMYPSMNAQAQAFSGAFKNICSDIEKEYKAANSQG : 149
GgaMb : PVKALAAATHTTHKIPPHYFTKITTIAVGLSEMYPSMNAQAQAFSGAFKNICSDIEKEYKAANSQG : 149
    
```

6.2 Alignments der Kontroll- und Referenzgene

6.2.1 β -Actin

Zugangsnummer: AB039726

```

Cau_bActin : ATGGATGAGGAAATCGCTGCCCTGGTCGTTGATAACGGCTCCGGTATGTGCAAAGCCGGTTTGGCTGGAGATGATGCCCC : 80
                *      20          *      40          *      60          *      80
Cau_bActin : TCGTGTCTGTTTCCCTCCATTGTTGGCAGACCCAGGCATCAGGGAGTGTGGTTGGCATGGGACAGAAGGACTCCTATG : 160
                *      100         *      120         *      140         *      160
Cau_bActin : TGGGAGATGAGGCTCAAAGCAAGAGAGGTATCCTGACCCCTTAAGTATCCTATTGAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGAT : 240
                *      180         *      200         *      220         *      240
Cau_bActin : CATATGGAGAAGATCTGGCACCACTTTCTACACAGGCTGCGTGTGCCCTGAGGAGCACCTGTCTCTGCTGACAGA : 320
                *      260         *      280         *      300         *      320
Cau_bActin : GGCCTCCCCTCAATCCCAAAGCCAAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTATG : 400
                *      340         *      360         *      380         *      400
Cau_bActin : TGGCCATCCAGGTGTGCTCTCCCTGTATGCTTCAGGTGCTACTACTGGTATTGTGATGGACTCCGGTGTGGTGTGACC : 480
                *      420         *      440         *      460         *      480
Cau_bActin : CACACTGTACCCATCTACGAGGTTATGCTCTTCCCATGCAATCCTGCGTCTGGAATCTGGCTGGTGTGCTGACAGA : 560
                *      500         *      520         *      540         *      560
Cau_bActin : CTACCTGATGAAGATCCTGACCGAGCGTGGCTACAGCTTCACCACCAGGCCGAGAGAAATTGTCGGTGACATCAAGG : 640
                *      580         *      600         *      620         *      640
Cau_bActin : AGAAGCTGTGCTATGTGGCCCTGGACTTTGAGCAGGAGATGGGAACCGCCCTCCTCTTCTCTCTGGAGAAGAGCTAT : 720
                *      660         *      680         *      700         *      720
Cau_bActin : GAGCTCCCTGACGGGCAGGTCAACCAATTGGCAATGAGCGTTCCGTTGCCCTGAGGCTCTTTTCCAGCCATCCTTCC : 800
                *      740         *      760         *      780         *      800
Cau_bActin : AGGTATGGAAATCTTGGCGTATCCATGAGACCCTTCAACTCAATCATGAAGTGTGATGTGGACATTCGTAAGGACCTG : 880
                *      820         *      840         *      860         *      880
Cau_bActin : ATGCCAACACTGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCTGGCATTGCTGACCGTATGCAGAAAGAGATCACTTCCCTT : 960
                *      900         *      920         *      940         *      960
Cau_bActin : GCTCCTTCCACCATGAAGATCAAGATCATGTGCCCTGAGCGCAAATACTCTGTCTGGATTGGTGGCTCCATCCTGGC : 1040
                *      980         *      1000        *      1020        *      1040
Cau_bActin : CTCCCIGTCTATCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCTGGCCCTTCCATTGTCCACAGAAAG : 1120
                *      1060        *      1080        *      1100        *      1120
Cau_bActin : GCTTCTAA : 1128
    
```

6.2.2 Acidic ribosomal protein (ARP)

```

DreArp : ATGCCAGGGAAGACAGGGCCACGTGGAAGTCCAACACTTTCTGAAATCATCCAAGTCTGGATGACTACCCCAAGTG : 80
CauArp : ATGCCAGGGAAGACAGGGCCACGTGGAAGTCCAACACTTTCTGAAATCATCCAAGTCTGGATGACTACCCCAAGTG : 80
                *      20          *      40          *      60          *      80
DreArp : TTTTCATCGTGGGCGCAGACAATGTCCGCTCCAAGCAGATGCAGACCATCCGTCTGTCCCTGCGGGGCAAGGCCGTCGTGC : 160
CauArp : TTTTCATCGTGGGCGCAGACAATGTCCGCTCCAAGCAGATGCAGACCATCCGTCTGTCCCTGCGGGGCAAGGCCGTCGTGC : 160
                *      100         *      120         *      140         *      160
DreArp : TCATGGGCAAAAAACCCATGATGAGGAAGGCCATCCCTGGCCACCTGGAAACAACCCAGCTCTGGAGAGGCTGCTTCC : 240
CauArp : TCATGGGCAAAAAACCCATGATGAGGAAGGCCATCCCTGGCCACCTGGAAACAACCCAGCTCTGGAGAGGCTGCTTCC : 240
                *      180         *      200         *      220         *      240
DreArp : CACATCCCGGGGAACGTGGGCTTCTGCTTCCACCAAGGAGGATCTGACTGAGGTCGAGACCTGCTGCTGGCAAAACAAGT : 320
CauArp : CACATCCCGGGGAACGTGGGCTTCTGCTTCCACCAAGGAGGATCTGACTGAGGTCGAGACCTGCTGCTGGCAAAACAAGT : 320
                *      260         *      280         *      300         *      320
DreArp : GCGCCGCTGCTGCCCGTCTGGTGCCATCGCCCGCTGTGAGGTGACCTGCGCGGCAGAACACCGGGCTCGGTCTTGAGA : 400
CauArp : GCGCCGCTGCTGCCCGTCTGGTGCCATCGCCCGCTGTGAGGTGACCTGCGCGGCAGAACACCGGGCTCGGTCTTGAGA : 400
                *      340         *      360         *      380         *      400
DreArp : AGACCTCTTCTTCCAGGCTTTGGGAATCACCAACCAAGATCTCCAGAGGAACCATTTGAATCTTGACGACGTTTCCAGCTG : 480
CauArp : AGACCTCTTCTTCCAGGCTTTGGGAATCACCAACCAAGATCTCCAGAGGAACCATTTGAATCTTGACGACGTTTCCAGCTG : 480
                *      420         *      440         *      460         *      480
    
```

```

*           500           *           520           *           540           *           560
DreArp : ATCAAACCTGGAGACAAGGTGGGCGCCAGCGAGGCCACGCTGCTGAACATGCTGAACATCTCGCCCTTCTCTA CGGGCTT : 560
CauArp : ATCAAACCTGGAGACAAGGTGGGCGCCAGCGAGGCCACGCTGCTCAACATGCTGAACATCTCGCCCTTCTCTT CGGGCTT : 560

*           580           *           600           *           620           *           640
DreArp : GATCATCCAGCAGGTGTATGATAACGGCAGTGTCTACAGCCCCGAGGTGCTGGACATCACTGAGGATGCCCTGCACAAGA : 640
CauArp : GATCATCCAGCAGGTGTATGATAACGGCAGTGTCTACAGCCCCGAGGTGCTGGACATCACTGAGGATGCCCTGCACAAGA : 640

*           660           *           680           *           700           *           720
DreArp : GATTCTCGAGCGTGTGAGGAACATCGCCAGTGTGTCTGTCAGATCGCCCTACCCAGTCTTGGTTGCATCCCTCACACT : 720
CauArp : GATTCTCGAGCGTGTGAGGAACATCGCCAGTGTGTGTCTGTCAGATCGCCCTACCCAGTCTTGGTTGC----- : 707

*           740           *           760           *           780           *           800
DreArp : ATCATCAATGGATACAAGAGGGTCCCTGGCTGTCACTGTCGAAACAGACTACACATTCGCCCTGGCTGAGAAAGTTGAAGGC : 800
CauArp : ----- : -

*           820           *           840           *           860           *           880
DreArp : CTACCTGGCTGATCCCACCCTTTTCGCTGTTGACGCCCTTGTTCGGCAGCTACAGAGCAGAAATCCGCTGCTCCTGCGG : 880
CauArp : ----- : -

*           900           *           920           *           940           *
DreArp : CCAAAGAGGAGGCCCAAGGAGGAATCTGAGGAGTCTGATGAAGACATGGGCTTCGGCCTGTTTGATTAA : 951
CauArp : ----- : -

```

6.2.3 Cyclophilin (CP)

```

*           20           *           40           *           60           *           80
DreCP : ATGGCAAACCCCAAGTGTMTTTTGGACATCACCATCGATGGGAAGGAGCGGGGAGGATCGTGATGGA GCTGAGAGCTGA : 80

*           100          *           120          *           140          *           160
DreCP : TGTTCGTGCCAAGACCGCTGAGAACTTCCGTGCACTCTGCACCCGAGAGAGAAGGGTTTCGGCTACAAGGGCTCCGGTTC : 160

*           180          *           200          *           220          *           240
DreCP : ACCGCGTCACTCCCCCAATTCATGTGTCAAGGCGGTGATTTACCAATCACAAACGGAACCGGAGGAAAATCCATCTACGGC : 240

*           260          *           280          *           300          *           320
DreCP : AACAAAGTTTGGAGATGAAAACCTTCACACTGAAACACGGAGGCCAAAGGCACCCTGTCTATGGCCAACCGCGGCCCAACAC : 320

*           340          *           360          *           380          *           400
DreCP : CAACGGCTCGAGATCTTCACTCTGCACCGCCGACACCAACTGCGCTGGACGGTAAGCACGTGTTGTTCCGGAAAGGTTGTTGG : 400

*           420          *           440          *           460          *           480
DreCP : ATGGTTTAGATGTTGTGGATGCCATCGAGAAAAAGGAAGTAGCAGCGGGAATGCTCCGCCAAGGTCGTGATCGCCAAC : 480

*
DreCP : TCGGCCAGCTCTAA : 495

```

6.2.4 Lactatdehydrogenase A (LDH-A)

```

*           20           *           40           *           60           *           80
DreLDHa : ATGGCCTCAACAAAGGAGAAACTCAATTGCTCACGTCAGCAAGGAGCAGCCTGCTGGGCCCAAAAACAAGGTGACAGTGGT : 80

*           100          *           120          *           140          *           160
DreLDHa : TGGTGTGGAATGGTTGGAATGGCTGCCGCCCTCAGCATCCTTCTCAAAGATCTGACCGATGAACTCGCCCTGGTGGACC : 160

*           180          *           200          *           220          *           240
DreLDHa : TGATGGAAGATAAGCTGAAAGGAGAGGCTATGGACTTGGACGATGGAAGCCTGTTTCTCAAGACGCACAAGATTTGTAGCC : 240

*           260          *           280          *           300          *           320
DreLDHa : GATAAA GATTACAGTGTGACCCGAAACTCAAAAAGTGGTTGTTGTGACCCGTGGAGCTCGTCAGCAGGAGGGTGAAGCC : 320

*           340          *           360          *           380          *           400
DreLDHa : CCTGAACCTTGTCCAGAGGAATGTTAACATTTTCAAGTTCATTTATCCCAACATCATCAAGTACAGCCCAACTGCATCC : 400

*           420          *           440          *           460          *           480
DreLDHa : TTTTGGTGGTTTCAAATCCTGTTCACATTTTGACCTATGTGGCCTGGAAGCTGAGCGGTTTGCCAGGAACCGTGTGATT : 480

*           500          *           520          *           540          *           560
DreLDHa : GGCAGTGGCACAACCTGGATTCTGCTCGTTCCGCTACTTGTATGGGAGAGAAGTTGGGAATTCATCCATCTAGCTGCCA : 560

*           580          *           600          *           620          *           640
DreLDHa : TGGTTGGGTCGTTGGAGAACATGGAGACTCCAGCGTCTCTGTGTGGAGTGGTGTGAATGTGGCTGGGGTGTCCCTCCAAC : 640

*           660          *           680          *           700          *           720
DreLDHa : CTCTAAACCTGACTTGGGTACAGATAAAGACAAGGAGGACTGGAAGAGCGTCCACAAGATGGTGGTTGACAGTGCATAT : 720

```

```

DreLDHa : GAAGTTATTAAGCTGAAGGGTTACACTTCTTGGGCTATTTGGAATGCTCTAGCTGACCTGTGTGAAAGTATCTTTGAAGAA : 800
          *      740      *      760      *      780      *      800
DreLDHa : CATGCACAAATGTCACCCAGTTTCTACTTTGGTCAAGGGAATGCATGGTGTAAATGAAGAGGTTTTCCTAAGTGTGCCTT : 880
          *      820      *      840      *      860      *      880
DreLDHa : GCATTTCTGGGTAAATAATGGCCTGACAGATGTCGTCCACATGACCCCTCAAACCAGAAAGGAAAAACAGTTGGTGAAGAGC : 960
          *      900      *      920      *      940      *      960
DreLDHa : GCCGAGACCTTGTGGGGTGTTCAGAAGGAGCTGACCCCTGTCA : 1002
          *      980      *      1000

```

6.2.5 Phosphoglyceratkinase 1 (PGK-1)

```

DrePGK1 : ATGCTCTCTTTTCGAACAACCTTCATTTGGACAAGGTGGACGTGAAAGGAAAGCGGGTGATCATGAGGGTGGACTTCAATGT : 80
          *      20      *      40      *      60      *      80
DrePGK1 : CCCTATCAAGAACAATGTGATCACAAATAACCAGAGATCAAGGCTGCAGTCCCATCTATCCAGACTGTTTAGATAATT : 160
          *      100     *      120     *      140     *      160
DrePGK1 : GTGCCAAAGCTGTGGCCCTGATGAGCCACTTGGGCCCGCCTGATGGAGTCCCTATGCCAGACAAATACTCTCTGGAGCC : 240
          *      180     *      200     *      220     *      240
DrePGK1 : GTGGCTGCAGAACTCAAGAACCTGCTGGGAAAAGACGTTTCAGTTTCCTGAAAGACTGTGTGGTCCAGATGTGGAGAAGC : 320
          *      260     *      280     *      300     *      320
DrePGK1 : CTGTGCAGACCCCTCCTGCAGGATCTGTCTATTCTGCTGGAGAACTGCGCTTTTCATGTGGCTGAGGAGGGCAAGGGCAAAG : 400
          *      340     *      360     *      380     *      400
DrePGK1 : ATGCATCGGGTAAACAAGCCAAAGCAAGTCAGGCAGAGATCGATGCTTTCCGAGCCTCCCTGTCCAATTTGGTTCAGTA : 480
          *      420     *      440     *      460     *      480
DrePGK1 : TACGTCAACGATGCTTTTCGGAACTGCACATAGAGCTCACAGTCTATGGTTGGAGTGAATCTCCCTCAGAAGGCTGTCTG : 560
          *      500     *      520     *      540     *      560
DrePGK1 : TTTTCTGATGAAGAAAGACTAGACTACTTTGCCATGGCCCTTGAGAAACCACAGAGGCCTTTCTTGGCCATCCTCGGAG : 640
          *      580     *      600     *      620     *      640
DrePGK1 : GGCCCAAGTCAAAGATAAGATTTCAGCTGATCAACAACATGTTGGACAAGGTGAATGAGATGATCATTTGGTGGGGAATC : 720
          *      660     *      680     *      700     *      720
DrePGK1 : GCCTTTACCTTCTCTCAAGAACATGGAGATCGGCACTTCCCTGTTTGATGAAGAGGGTTCCACAATTTGTA : 800
          *      740     *      760     *      780     *      800
DrePGK1 : AGACCTCATGGCCAAAGCAGAAAAGAACGGTGTAAAGATCACACTTCCAGTTCGACTTTATCACTGCAGACAAATTTGATC : 880
          *      820     *      840     *      860     *      880
DrePGK1 : AGAAGGCAACAACAGGGACCGCAACGGTAGCAGAAGGTATTCCTGCTGGCTGGATGGGTCTAGACTGTGGTCTCAGAGC : 960
          *      900     *      920     *      940     *      960
DrePGK1 : TCAAAGCTCTATGCAGAGGCTGTGGCCAGGCCAAGCAGATTGTGTGGAACGGACCCGTTGGCGTGTTCGAGTGGGACAA : 1040
          *      980     *      1000    *      1020    *      1040
DrePGK1 : CTTTGCTCATGGAAACCAAGAACATGATGGACAAAGTTGTAGAAGCGACCAAAAATGGCTGCATCACCATTATCGCTGGGG : 1120
          *      1060    *      1080    *      1100    *      1120
DrePGK1 : GAGACACAGCTACCTGCTGTGCCAAGTGGGACACTGAGGACAAGGTCAGCCATGTGAGCACAGGGGGCGGAGCCAGTCTC : 1200
          *      1140    *      1160    *      1180    *      1200
DrePGK1 : GAGCTGCTGGAGGGTAAAGTGTGCTGCCCGGTGTCGATGCCCTCAGTAACGTATAA : 1254
          *      1220    *      1240

```

6.2.6 Superoxiddismutase 1 (SOD-1)

```

DreSOD1 : ATGGTGAACAAGGCCGTTTGTGTGCTTAAAGGCACCGGTGAAGTGACCGGCACCGTCTATTTCATCAAGAGGGTGAAAA : 80
          *      20      *      40      *      60      *      80
DreSOD1 : GAAGCCAGTGAAGGTGACTGGTGAATTACTGGCCTTACTCCAGGAAAACATGGTTTCCACGTCATGCTTTTGGTGACA : 160
          *      100     *      120     *      140     *      160
DreSOD1 : ACACAACGGTGCATCAGTGCAGGTCCGCACTTCAACCTCATGACAAAACTATGGTGGGCCAACCGATAGTGTGAGA : 240
          *      180     *      200     *      220     *      240
DreSOD1 : CACGTCGGAGACCTGGGTAAATGTGACCGCTGATGCCAGGTGTTGCAAAAATGAAATCGAGGATGCAATGCTAACTTT : 320
          *      260     *      280     *      300     *      320

```

DreSOD1 : **GTCAGGCCAACATTCTATTATTGGGAGGACCATGGT**³⁴⁰**GATTCATGAGAAGGAGGATGACTTGGGGAAGGGTGGCAATGAGC**⁴⁰⁰ : 400
 DreSOD1 : **AAAGTCTTAAACTGGCAACGCTGGCGGTCGCTGGCCCTGTGGAGTGTATCGGCATCACTCACTGA**⁴²⁰⁴⁴⁰⁴⁶⁰ : 465

7 Abkürzungen und deutsche Namen der Tiere

7.1 Stammbaum der Globine im Tierreich

Abkürzung	Lateinischer Name Deutscher Name	Stamm (lat.) Stamm (deut.)	Klasse (lat.) Klasse (deut.)	Ordnung (lat.) Ordnung (deut.)
Aac	<i>Aphrodita aculeata</i> Seemaus	Annelida Ringelwürmer	Polychaeta Vielborster	Phyllodocida ---
Ama	<i>Arenicola marina</i> Wattwurm	Annelida Ringelwürmer	Polychaeta Vielborster	Capitellida ---
Cau	<i>Carassius auratus</i> Goldfisch	Chordata Chordatiere	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige
Cca	<i>Cyprinus carpio</i> Karpfen	Chordata Chordatiere	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige
Cin	<i>Ciona intestinalis</i> Schlauchseescheide	Chordata Chordatiere	Ascidiacea Tunikaten	Enterogona ---
Ctt	<i>Chironomus thummi thummi</i> Rote Mückenlarve	Arthropoda Gliederfüßler	Insecta Insekten	Diptera Zweiflügler
Dme	<i>Drosophila melanogaster</i> Taufliege	Arthropoda Gliederfüßler	Insecta Insekten	Diptera Zweiflügler
Dre	<i>Danio rerio</i> Zebraäbrbling	Chordata Chordatiere	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige
Gau	<i>Galeorhinus australis</i> Hundshai	Chordata Chordatiere	Chondrichthyes Strahlenflosser	Carcharhiniformes Grundhaie
Gdi	<i>Glycera dibranchiata</i> Blutwurm	Annelida Ringelwürmer	Polychaeta Vielborster	Phyllodocida ---
Gin	<i>Gasterophilus intestinalis</i> Pferdemagenbremse	Arthropoda Gliederfüßler	Insecta Insekten	Diptera Zweiflügler
Hpo	<i>Heterodontus portusjacksoni</i> Port Jackson-Stierkopfhai	Chordata Chordatiere	Chondrichthyes Strahlenflosser	Heterodontiformes Stierkopfhäie
Hsa	<i>Homo sapiens</i> Mensch	Chordata Chordatiere	Mammalia Säugetiere	Primates Primaten
Lam	<i>Lamellibrachia</i> sp. Röhrenwurm	Pogonophora Bartwürmer	Vestimentifera ---	Lamellibrachiida ---
Lfl	<i>Lampetra fluviatilis</i> Flussneunauge	Chordata Chordatiere	---	Petromyzontiformes Rundmäuler

Lte	<i>Lumbricus terrestris</i> Regenwurm	Annelida Ringelwürmer	Oligochaeta Wenigborster	Haplotaxida ---
Man	<i>Mustelus antarcticus</i> Australischer Glatthai	Chordata Chordatiere	Chondrichthyes Strahlenflosser	Carcharhiniiformes Grundhaie
Mgl	<i>Myxine glutinosa</i> Schleimaal	Chordata Chordatiere	---	Myxiniiformes Inger
Mmu	<i>Mus musculus</i> Maus	Chordata Chordatiere	Mammalia Säugetiere	Rodentia Nagetiere
Omy	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenbogenforelle	Chordata Chordatiere	Actinopterygii Strahlenflosser	Salmoniformes Lachsartige
Pca	<i>Physeter catodon</i> Pottwal	Chordata Chordatiere	Mammalia Säugetiere	Cetacea Wale
Psi	<i>Pheretima sieboldi</i> Regenwurm	Annelida Ringelwürmer	Oligochaeta Wenigborster	Haplotaxida ---
Sac	<i>Squalus acanthias</i> Dornhai	Chordata Chordatiere	Chondrichthyes Strahlenflosser	Squaliformes Stachelhaiartige
Ssp	<i>Sabella spallanzanii</i> Röhrenwurm	Annelida Ringelwürmer	Polychaeta Vielborster	Sabellida Federwürmer
Tni	<i>Tetraodon nigroviridis</i> Grüner Kugelfisch	Chordata Chordatiere	Actinopterygii Strahlenflosser	Tetraodontiformes Kugelfischartige
Tth	<i>Thunnus thynnus</i> Großer Thunfisch	Chordata Chordatiere	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartigen
Xtr	<i>Xenopus tropicalis</i> Krallenfrosch	Chordata Chordatiere	Amphibia Amphibien	Anura Froschlurche

7.2 Stammbaum der Fisch-Myoglobine

Abkürzung	Lateinischer Name Deutscher Name	Klasse (lat.) Klasse (deut.)	Ordnung (lat.) Ordnung (deut.)	Familie (lat.) Familie (deut.)
Can	<i>Cryodraco antarcticus</i> Langfingriger Eisfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Channichthyidae Krokodileisfische
Cau	<i>Carassius auratus</i> Goldfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige	Cyprinidae Karpfenfische
Cca	<i>Cyprinus carpio</i> Karpfen	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige	Cyprinidae Karpfenfische
Cca	<i>Cyprinus carpio</i> Karpfen	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige	Cyprinidae Karpfenfische
Cgu	<i>Champsocephalus gunnari</i> Gebänderter Eisfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Channichthyidae Krokodileisfische
Cid	<i>Ctenopharyngodon idella</i> Graskarpfen	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige	Cyprinidae Karpfenfische
Cra	<i>Chionodraco rastrospinosus</i> Stacheliger Eisfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Channichthyidae Krokodileisfische

Crh	<i>Channichthys rhinoceros</i> Langschnauzen-Eisfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Channichthyidae Krokodileisfische
Dre	<i>Danio rerio</i> Zebrabärbling	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige	Cyprinidae Karpfenfische
Epe	<i>Euthynnus pelamis</i> Echter Bonito	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische
Fru	<i>Fugu rubripes</i> Kugelfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Tetraodontiformes Kugelfischartige	Tetraodontidae Kugelfische
Gga	<i>Galeorhinus galeus</i> Hundshai	Chondrichthyes Knorpelfische	Carcharhiniformes Grundhaie	Triakidae Hundshaie
Ggi	<i>Gobionotothen gibberifrons</i> Gelbe Notothenia	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Nototheniidae Antarktisdorsche
Hja	<i>Hemirhamphys japonica</i> Japanischer Engelhai	Chondrichthyes Knorpelfische	Carcharhiniformes Grundhaie	Triakidae Hundshaie
Hpo	<i>Heterodontus portusjacksoni</i> Port Jackson-Stierkopfhai	Chondrichthyes Knorpelfische	Heterodontiformes Stierkopfhaiartige	Heterodontidae Stierkopphaie
Man	<i>Mustelus antarcticus</i> Australischer Glatthai	Chondrichthyes Knorpelfische	Carcharhiniformes Grundhaie	Triakidae Hundshaie
Mni	<i>Makaira nigricans</i> Blauer Marlin	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Xiphiidae Schwertfische
Nco	<i>Notothenia coriiceps</i> Gelbbauchnotothenia	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Nototheniidae Antarktisdorsche
Pge	<i>Pseudochaenichthys georgianus</i> South-Georgia-Eisfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Channichthyidae Krokodileisfische
Ppr	<i>Pimephales promelas</i> Goldelritze	Actinopterygii Strahlenflosser	Cypriniformes Karpfenartige	Cyprinidae Karpfenfische
Sch	<i>Sarda chiliensis</i> Ostpazifischer Bonito	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische
Sja	<i>Scomber japonicus</i> Mittelmeermakrele	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische
Tala	<i>Thunnus alalunga</i> Weißer Thunfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische
Tal	<i>Thunnus albacares</i> Gelbflossen-Thunfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische
Tni	<i>Tetraodon nigroviridis</i> Grüner Kugelfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Tetraodontiformes Kugelfischartige	Tetraodontidae Kugelfische
Tob	<i>Thunnus obesus</i> Atlantischer Großaugenthun	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische
Tor	<i>Thunnus orientalis</i> Nordpazifischer Blauflossen-Thunfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische
Tth	<i>Thunnus thynnus</i> Großer Thunfisch	Actinopterygii Strahlenflosser	Perciformes Barschartige	Scombridae Makrelenfische

8 Zugangsnummern der Sequenzen

8.1 Stammbaum der Globine im Tierreich

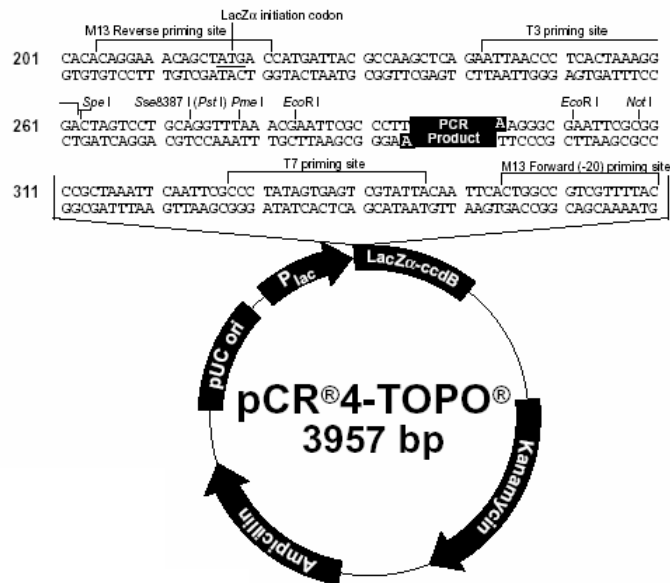
Bezeichnung	Zugangsnummer	Bezeichnung	Zugangsnummer
AacNgb	U46754	HsaNGB	AJ245946
AmaMb1	Kleinschmidt & Weber 1998	LamHb2	P15469
CauGbX	AJ635195	LflHb	P02207
CcaHbB	D88117	LteGbB	P02218
CinHb1	AJ548500	LteGbD	U55073
CinHb2	AJ548501	ManMb	P14399
CinHb3	AJ548502	MglHb1	AF156936
CinHb4	AJ548503	MglHb2	AF157494
CttHbIb	AF001292	MglHb3	AF184239
CttHbVI	P02224	MmuCygb	AJ315163
CttHbVIII	P02227	MmuHbA	V00714
CttHbE	P11582	MmuHbB	AK028067
DmeHb	AJ132818	MmuMb	P04247
DreCygb	AJ320232	MmuNgb	AJ245945
DreGbX	AJ635194	OmyHbA4	D88114
DreCygb	AJ320232	OmyNgb	AJ547800
DreHbBa1	NM_131020	PcaMb	P02185
DreNgb	AJ315610	PsiHb1	S06483
GauMb	P14397	SacHbA	A24653
GdiHbP3	M55444	SacHbB	B24653
GinHb	AF063938	SspHb	AJ131285
HpoHbA	P02021	TniGbX	AJ635193
HpoHbB	P02143	TniMb	CAAE01011832
HsaCYGB	AJ315162	TniNgb	AJ315609
HsaHBA	J00153	TthHbA2	AB093570
HsaHBB	M36640	TthMb	Q9DD47
HsaMB	M14603	XtrGbX	AJ634915

8.2 Stammbaum der Fisch-Myoglobine

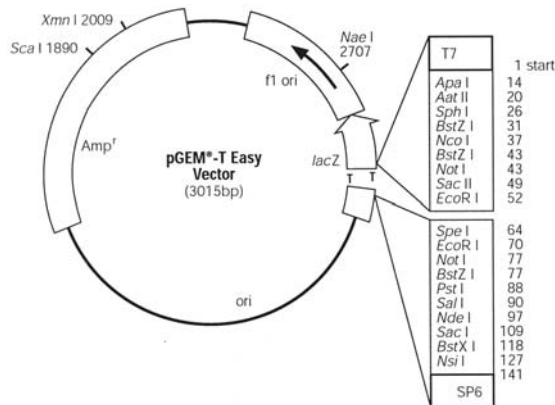
Bezeichnung	Zugangsnummer	Bezeichnung	Zugangsnummer
CanMb	Q9DEP0	ManMb	P14399
CauMb	Rösner, 2003	MniMb	AF291833
CcaMb	CF663027	NcoMb	AAC69245
CguMb	U71054	PgeMb	U71055
CraMb	P87497	PprMb	DT260395
CrhMb	AY341058	SchMb	AAG02108
DreMb	NM_200586	SjaMb	AF291835
EpeMb	AF291837	TalaMb	AF291832
FruMb	AL835228	TalMb	AAG02112
GgaMb	P14397	TniMb	FS_CONTIG_40589_1
GgiMb	U71057	TobMb	AB104433
HjaMb	P14398	TorMb	AF291836
HpoMb	P02206	TthMb	Q9DD47

9 Vektoren

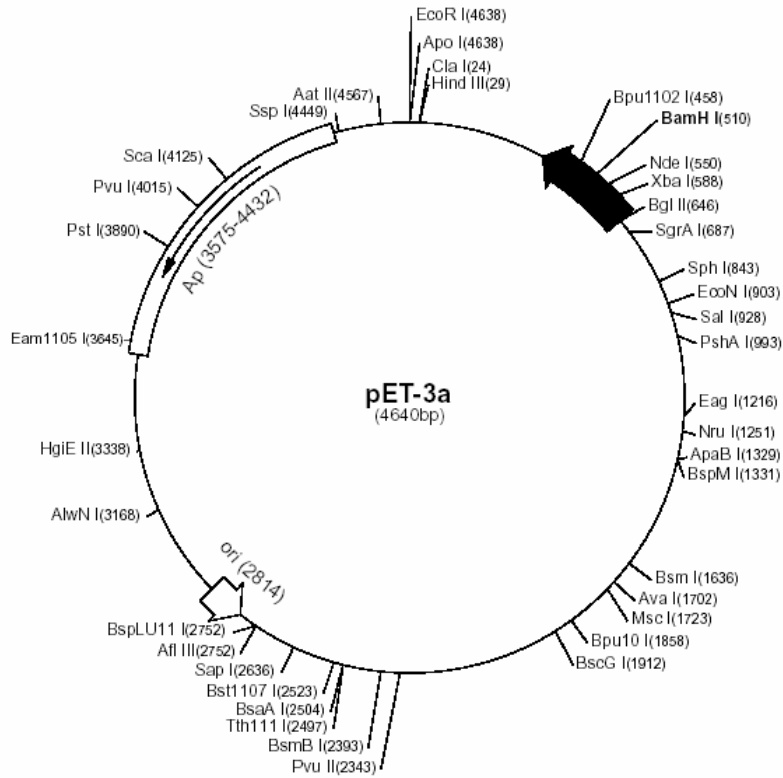
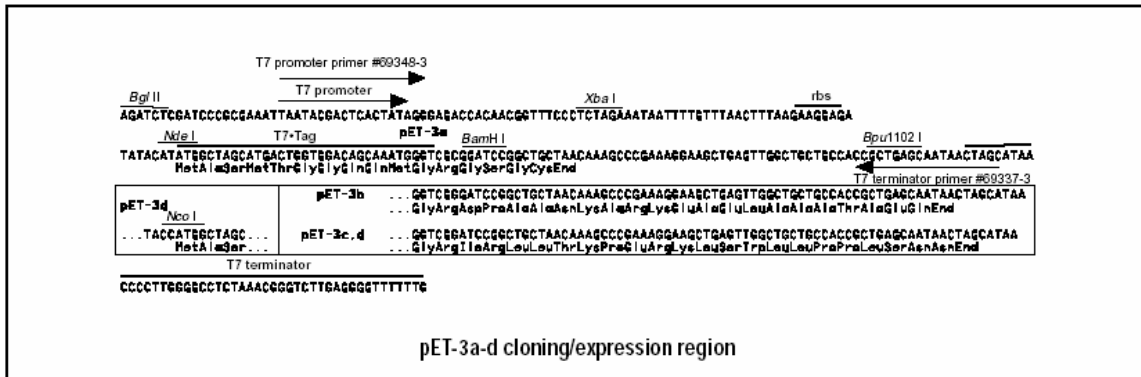
9.1 Vektorkarte des pCR[®]4-TOPO[®]-Vektors



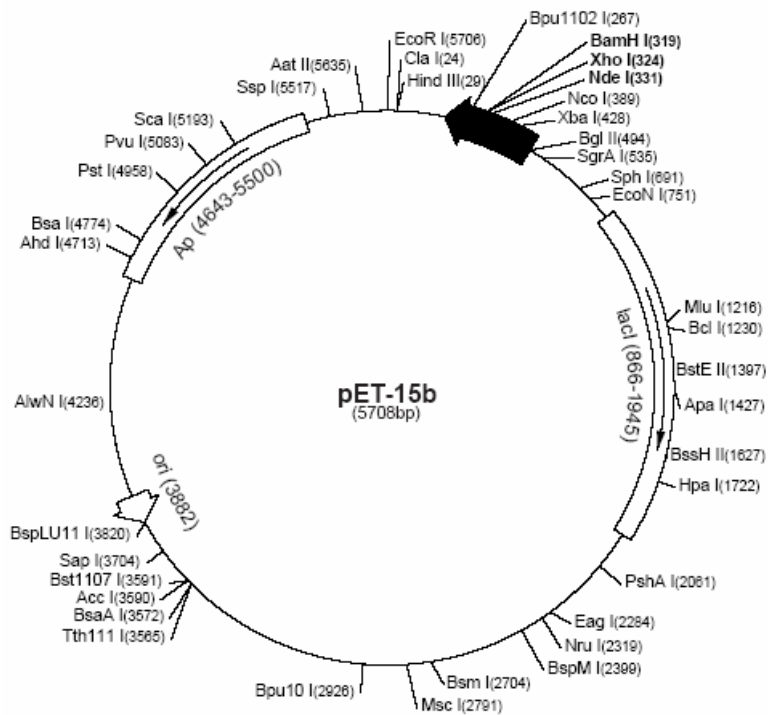
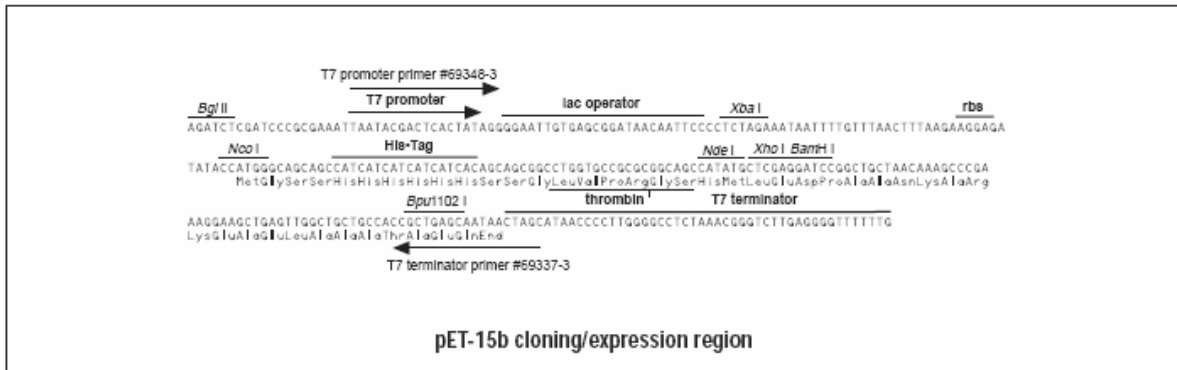
9.2 Vektorkarte des pGEM[®]-T Easy-Vektors



9.3 Vektorkarte des pET-3a-Vektors



9.4 Vektorkarte des pET-15b-Vektors



H Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht (siehe Anlagen):

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

Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., **Roesner, A.**, Schmidt, M., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., and Hankeln, T. (2004) Neuroglobin and cytoglobin: Genes, proteins and evolution. *IUBMB Life* **56**, 671-679

Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2005) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: Evidence for two distinct globin families in animals. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 12-20

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

Roesner, A., Hankeln, T., and Burmester, T. (2006) Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Biol.* **209**, 2129-2137

Zebrafish Reveals Different and Conserved Features of Vertebrate Neuroglobin Gene Structure, Expression Pattern, and Ligand Binding*[§]

Received for publication, February 24, 2004, and in revised form, March 22, 2004
Published, JBC Papers in Press, March 31, 2004, DOI 10.1074/jbc.M402011200

Christine Fuchs[‡]§, Valeska Heib[§]¶, Laurent Kiger^{||}, Mark Haberkamp[¶], Anja Roesner[¶],
Marc Schmidt[¶], Djemel Hamdane^{||}, Michael C. Marden^{||}, Thomas Hankeln[‡],
and Thorsten Burmester[¶]**

From the [‡]Institute of Molecular Genetics, Johannes Gutenberg University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany, [¶]Institute of Zoology, Johannes Gutenberg University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany, and ^{||}INSERM U473, 84 rue du General Leclerc, F-94276 Le Kremlin-Bicetre, France

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

Transport and storage of oxygen in vertebrate animals are typically mediated by globins, small proteins that bind O₂ by the means of a porphyrin-coordinated Fe²⁺ ion (1–3). The heterotetrameric hemoglobin is present in red blood cells of nearly all vertebrates and transports O₂ in the circulatory system from the respiratory surfaces to the inner organs. The monomeric myoglobin, typically found in the myocytes of cardiac and striated muscles, facilitates intracellular O₂ diffusion to the mitochondria and stores O₂ (3, 4) but also functions as an nitric-oxide dioxygenase (5). Neuroglobin (Ngb)¹ and cytoglobin

are two recently discovered vertebrate globins (6–9). Whereas cytoglobin might play a role in collagen synthesis (10, 11), the leading hypotheses suggest Ngb to be involved in neuronal oxygen homeostasis (6, 12–16).

Ngb shares only a few amino acids with vertebrate hemoglobin and myoglobin (<25% identity) but rather resembles the nerve-specific globins known in some invertebrates (6, 13). In fact, phylogenetic analyses suggest an ancient origin of Ngb, probably diverging from the other globins before the Protostomia-Deuterostomia split (6, 8). Mouse and human deoxy-Ngb display hexacoordinated heme-binding schemes at the Fe²⁺ (17, 18). The proximal histidine can be replaced by an external ligand such as O₂, resulting in an oxygen affinity (P₅₀) of ~1–2 torr, similar to that of myoglobin (6, 17).

Initially, Ngb was found to be predominantly expressed in the brains of man and mouse (6), but recent analyses show Ngb to be also present in the peripheral nervous system and some non-neuronal endocrine tissues (19–21). Particularly high amounts of Ngb were observed in the mammalian retina where it could reach a concentration similar to that of myoglobin in muscle cells (14). This study also suggests that, at the subcellular level, Ngb is localized adjacent to the mitochondria. In cultured neuronal cells from the mouse brain, synthesis of Ngb is enhanced under low oxygen conditions (12), although these results could not be confirmed by *in vivo* studies (22). The presence of Ngb promotes the survival of cultured neuronal cells at low oxygen levels, and overexpression of Ngb may protect neurons from hypoxic-ischemic injury *in vitro* and *in vivo* (12, 15).

The available data suggest that Ngb expression levels correlate with high oxygen consumption rates, implying an important role of Ngb in neuronal O₂ supply, although other functions of Ngb are still conceivable (13, 23). Whereas Ngb was originally identified in mammalian species (6), it is also present in fishes (24), suggesting a widespread occurrence in vertebrates. The investigation of Ngb function in non-mammalian species is an essential prerequisite for the understanding of its role in the vertebrate metabolism. Here, we have carried out a detailed genetic, biochemical, and expressional analysis of Ngb from the zebrafish *Danio rerio*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning and Sequencing of D. rerio Ngb cDNA and Gene—*D. rerio* were kept at 28 °C in a freshwater aquarium. Genomic DNA of *D. rerio*

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha2103/3, Bu956/5), INSERM, the Délégation Générale pour l'Armement, and European Union (QLRT-2001-01548). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains Figs. S1–S5 and Tables S1–S2.

[¶] Both authors contributed equally to this work.

** To whom correspondence should be addressed: Institute of Zoology, University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany. Tel.: 49-6131-39-24477; Fax: 49-6131-39-24652; E-mail: burmeste@uni-mainz.de.

¹ The abbreviations used are: Ngb, neuroglobin; RACE, rapid ampli-

fication of cDNA ends; HRE, hypoxia-responsive sequence elements; ISH, *in situ* hybridization; NRSE, neuron-restrictive silencer element; PBS, phosphate-buffered saline; TBST, Tris-buffered saline with Tween 20.

was extracted using the Qiagen DNeasy kit. Several oligonucleotide primers were designed according to the *Ngb* cDNA sequence (24) and partial data base entries of the zebrafish *Ngb* gene. Overlapping fragments were amplified using the SAWADY "Mid Range" PCR system (PeqLab). The sequences were obtained after the cloning of the PCR products into the pCR4-TOPO vector (Invitrogen). 5'-RACE experiments were carried out with the Invitrogen kit according to the manufacturer's instructions using $\sim 1 \mu\text{g}$ of *D. rerio* total RNA and three nested oligonucleotide primers. Sequences were obtained either directly from the PCR products or after cloning into the pCR4-TOPO vector (Invitrogen). Sequences were analyzed by applying the GeneDoc 2.6 (25), MatInspector V2.2 (26), and BLAST searches (27) using Eukaryotic Promoter Data base, release 76 (28).

Expression and Purification of Recombinant Ngb—The complete *D. rerio* Ngb cDNA was cloned into the pET3a expression vector (Novagen) using PCR-generated NdeI and BglIII restriction sites. The plasmid was transformed into the *Escherichia coli* BL21(DE3)pLys strain and grown at 25 °C in TB medium (0.5% NaCl, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, pH 7.4) containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloramphenicol, and 1 mM δ -aminolevulinic acid. The culture was induced at $A_{600} = 0.8$ by isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside at a final concentration of 0.4 mM and grown overnight. The bacteria were harvested by a 20-min centrifugation at $4,322 \times g$ and resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase, and 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase supplemented with CompleteTM protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and Pefabloc (Roche Applied Science). The cells were broken by three freeze-thaw cycles in fluid nitrogen followed by ultrasonication (10×30 s). The sample was incubated for 2 h at 37 °C to digest the DNA and RNA. The cell debris was removed by a centrifugation for 1 h at 4 °C at $10,000 \times g$. The supernatant was fractionated by ammonium sulfate precipitation. The reddish 60–70% ammonium sulfate pellet was dissolved in 5 mM Tris-HCl, pH 8.5, and desalted using an Amicon Ultra filter (Millipore). Further purification of Ngb was achieved by a DEAE ion-exchange column with a gradient of 0–1 M NaCl in 5 mM Tris-HCl, pH 8.5. Size exclusion chromatography was carried out using a High LoadTM 26/60 SuperdexTM 75 prep grade (Amersham Biosciences). The final Ngb fractions were analyzed by gel electrophoresis, pooled, concentrated, and stored frozen at -20 °C. Protein concentrations were determined using the Bradford (29) method.

Absorption Spectra and Ligand-binding Kinetics—The spectral forms were determined on a Cary400 or HP8453 spectrometer. The main characteristic differing from human hemoglobin is the deoxy form, which has the enhanced α and Soret band characteristic of the hexacoordinated species. The CO-bound form can be photodissociated to follow the subsequent competitive rebinding of CO and the distal histidine. A 10-ns yttrium aluminium garnet laser at 532 nm was used for photodissociation. A monochromatic detection beam was used consisting of a 50-watt quartz halogen lamp with an interference filter.

Antibody Preparation and Western Blotting—Purified recombinant *D. rerio* Ngb was used to raise a polyclonal antibody in rabbits. Specific antibodies were affinity-purified from the crude rabbit serum using recombinant *D. rerio* Ngb coupled to a SulfoLink column (Pierce) according to the manufacturer's instructions. The antibody was stored at 4 °C in 50 mM Tris, 100 mM glycine, \sim pH 7.4, supplemented with 0.1% NaN_3 . For Western blotting, selected tissues were homogenized in 1% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol, and 65 mM Tris, pH 6.8. The samples were heat-denatured at 95 °C for 5 min and loaded to a 14% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Antibody detection was carried out on protein samples transferred to nitrocellulose membrane for 2 h at 0.8 mA/cm². Nonspecific binding sites were blocked by incubation for 2 h with 2% nonfat dry milk in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.3% Tween 20). The membranes were incubated with anti-Ngb antibodies diluted 1:2,000 in 2% milk/TBST. The membranes were washed four times for 10 min in TBST and incubated with the goat anti-rabbit antibody coupled with alkaline phosphatase (Dianova). The filters were washed in TBST as above, and detection was carried out with either nitro blue tetrazolium chloride or 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate as substrates.

In Situ Hybridization—The DNA template for generating an Ngb antisense RNA probe was produced by PCR, attaching the T7 RNA polymerase promoter sequence to the 3' end of the *Ngb* cDNA. Digoxigenin-labeled antisense RNA was then generated by *in vitro* transcription using T7 RNA polymerase (Roche Applied Science). Control sense RNA probe was created using a cDNA carrying the T7 promoter sequence at the 5' end. Two specimens of *D. rerio* were prepared by freezing the animals on dry ice and decapitating them. Frontal cryo-

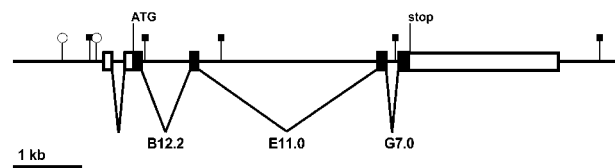


FIG. 1. Structure of the *D. rerio* Ngb gene. The sequences were compiled from the data of Awenius *et al.* (24), the published *Danio* genomic sequences (clone CH211-233N24), and our own sequencing results. The bar indicates the mRNA. The open reading frame is black. The positions of the start and stop codons and the four introns are indicated. The distribution of potentially relevant HREs in the gene region is shown by closed squares, and the possible NRSEs are indicated by open circles.

sections (15 μm) were mounted onto slides coated with aminosilane and stored at -80 °C. Prior to hybridization, the sections were postfixed for 15 min in 4% formaldehyde/PBS and washed 2×5 min in PBS, 0.1% Tween 20 and 5 min in PBS. Hybridization with labeled RNA probes was carried out at 42 °C overnight in 50% formamide, $2 \times \text{SSC}$. Sense probes and hybridization mixtures completely lacking probe RNA were used as negative controls. Slides were washed for 3×5 min at room temperature in $2 \times \text{SSC}$, 20 min in $0.1 \times \text{SSC}$ at 60 °C and subsequently treated for 15 min at 37 °C with RNase A in $2 \times \text{SSC}$. After washing 3×5 min with $2 \times \text{SSC}$ and 5 min in $1 \times \text{PBS}$, 0.1% Tween 20, and 0.2% bovine serum albumin, nonspecific antibody binding sites were blocked with 1% blocking reagent (Roche Applied Science), 150 mM NaCl, and 100 mM Tris-HCl, pH 7.4. Specimens were incubated for 30 min at room temperature with an anti-digoxigenin antibody (Roche Applied Science) coupled with alkaline phosphatase (diluted 1:100 in PBS) and washed 2×5 min in PBS, 0.1% Tween 20, and 0.2% bovine serum albumin and 5 min in 100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, and 50 mM MgCl_2 . Detection was carried out using nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate. The reaction was stopped by washing in PBS, and preparations were mounted in 50% glycerol/PBS and examined with a Zeiss Axiophot microscope. Neuroanatomical regions were identified by the aid of the brain atlas by Wullmann *et al.* (30).

Immunofluorescence Studies—Tissues were fixed for 8 h or overnight in 4% paraformaldehyde in PBS (8 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl). Cryosections (12 μm) were prepared and placed onto glass slides coated with chromalau gelatin. Nonspecific binding sites were blocked for 15 min in 2% bovine serum albumin, 0.1% TritonX-100 in PBS. The sections were incubated with anti-Ngb antibodies (1:20–1:50) in the blocking solution overnight at 4 °C. The sections were washed 3×8 min in PBS. Incubation with the secondary antibody coupled with Cy3 (Dianova), diluted 1:500 in blocking solution, was carried out for 2 h at room temperature in the dark. The sections were washed 3×8 min in PBS, mounted in Elvanol polyvinyl alcohol (Mowiol, Calbiochem), and examined with a Leitz DM RD microscope.

RESULTS

The *D. rerio* Neuroglobin Gene—The nucleotide sequence of zebrafish *Ngb* cDNA has been determined previously (24). We designed multiple primers that allowed the amplification of overlapping fragments from the *D. rerio* *Ngb* gene. The sequences of the PCR fragments are essentially identical ($>99\%$) with the sequence of clone CH211-233N24 from the zebrafish genome project (Sanger Institute). Within the *Ngb* coding region, only at the third nucleotide of codon 153, a silent C \rightarrow T transition was observed (Supplemental Fig. S1). Putative mRNA transcription start sites were determined by 5'-RACE experiments and deduced from the longest expressed sequence tags (fr71g03.y1, fr74a03.y1, and fr73f03.y1). Counting from the 5' most transcription start site to the poly(A) tail, the zebrafish *Ngb* gene covers a total of 6286 bp (Fig. 1 and Supplemental Fig. S1). A comparison of the genomic sequences with the cDNA reveals the presence of four introns. The second, third, and fourth introns are positioned within the coding region at exactly the same positions as in the human and mouse neuroglobin genes (6) as follows: B12.2 (*i.e.* between codon positions 2 and 3 of the 12th amino acid of the globin helix B); E11.0; and G7.0. An additional intron of 184 bp is located at bp 119 in the 5'-non-coding region, whereas the start ATG was

found at position 446. Thus, the *D. rerio* Ngb mRNA covers 2640 bp, including a 5'-untranslated region of 261 bp and a 3'-untranslated region of 1899 bp.

The expressed sequence tags in the sequence databases show the presence of another transcribed region of unknown function 1.5 kb upstream to the *Danio* Ngb gene (data not shown), thus delimiting the 5'-regulatory sequences of the Ngb gene. This upstream region, putatively encompassing the Ngb promoter, was compared with the Eukaryotic Promoter Data base, which is an annotated collection of eukaryotic PolII promoters with experimentally determined transcription start sites (28). In this analysis, the upstream region revealed significant similarities with various PolII promoter regions. In particular, the promoters of mouse myoglobin and rabbit β -hemoglobin gave significant scores ($E = 2 \times 10^{-13}$ and $E = 2 \times 10^{-7}$), indicating the integrity of the predicted transcription start site. Further inspections of the 5'-upstream sequences of the zebrafish Ngb gene show that the putative promoter lacks a TATA box, whereas multiple other regulatory sequences such as GATA-binding sites, CCAAT/enhancer-binding protein, and CAAT box are present (Supplemental Table S1). Two putative neuron-restrictive silencer elements (NRSEs) were also identified in the Ngb promoter region (Fig. 1).

The Ngb gene plus the upstream and downstream genomic regions were scanned for the presence of putative hypoxia-responsive sequence elements (HREs). HREs in hypoxia-regulated genes are defined by the binding motif of the hypoxia-inducible transcription factor HIF-1 (5'-RCGTG-3') (31). Typically, an HRE includes two HIF-1 motifs (in direct or inverted orientation) or one HIF-1 motif combined with an erythropoietin (EPO) box (32) or a HIF ancillary sequence (33). Five such closely spaced motif combinations are present in the zebrafish Ngb gene region (Fig. 1).

Ligand-binding Kinetics of Zebrafish Neuroglobin—The *Danio* Ngb was expressed using the pET3a vector system. The recombinant protein was purified by ammonium sulfate precipitation followed by ion-exchange and size exclusion chromatography (Supplemental Fig. S2). The ferrous deoxy form of Ngb shows a typical hexacoordinated absorption spectrum (Fig. 2A) as characterized by large amplitudes for the α band (560 nm) and the Soret band (426 nm) (17). The kinetics after CO photodissociation revealed a biphasic form. The rapid phase is competitive binding of CO or the distal histidine residue. For higher CO levels, the rate and relative amplitude of this phase increases. At low CO levels, the histidine binding becomes more competitive and the slow phase becomes more prominent. The slow phase involves the replacement of the histidine by CO and requires several seconds for a complete return to the initial CO-bound state. From the kinetics at various CO levels, one can extract the CO on-rate and the histidine both on-rate and off-rate (Table I). Similarly, competition of oxygen and CO can be used to obtain the rate coefficients for oxygen. Note that two ligand affinities are given in the table. The intrinsic affinity is the ratio of the binding rates for a given ligand. This would be the affinity in the absence of competing ligand. The overall oxygen affinity, taking into account the competing histidine ligand, is calculated to be ~ 1 torr, similar to human NGB without dithiothreitol (34). With dithiothreitol, the disulfide bond is broken and human NGB shows a lower oxygen affinity. This effect was not observed for *Danio* Ngb.

Detection of Ngb Protein in Zebrafish Tissues—Specific antibodies against recombinant zebrafish Ngb were raised in rabbits and further purified by affinity chromatography. In Western blotting, these antibodies detect the recombinant Ngb at ~ 16 kDa (Fig. 3A). Ngb was also stained by the antibody in extracts from the brain, the total eye, and the gills but not in

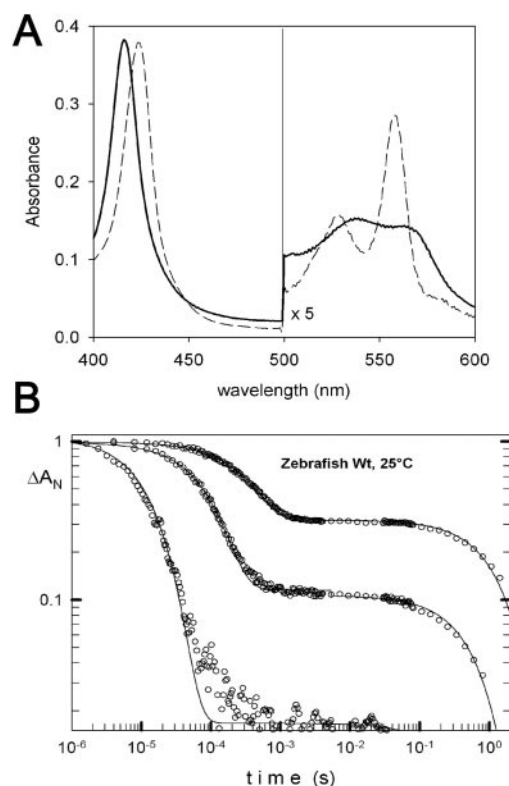


FIG. 2. **Ligand binding of recombinant *D. rerio* Ngb.** A, absorption spectra equilibrated under CO (solid line) or nitrogen (deoxy, dashed line). B, recombination of CO to zebrafish Ngb at three CO concentrations: 10, 100, and 1000 μM . The biphasic kinetics show the competition between CO and His binding. As the CO concentration is increased, less His binds and the amplitude of the slow phase decreases.

TABLE I
Ligand binding parameters to Ngb

pH 7.0, 100 mM phosphate buffer based on flash photolysis results.

	CO		Oxygen			Histidine			O_2 P ₅₀
	k_{on}	k_{off}	k_{on}	k_{off}	K_d	k_{on}	k_{off}	K_d	
	$\mu\text{M/s}$	s	s	s	nM	s	s	torr	
<i>Danio</i>	70	250	0.3	1.3	2500	2	1250	0.9	
Human Ngb ^a	40	140	0.8	5.7	2000	7	280	0.9	
NGB + DTT ^a	50	170	0.8	4.7	2000	0.6	3300	8.4	

^a Hamdane *et al.* (32).

the muscle or the blood. As already observed in mouse (14), the apparent molecular mass of the native Ngb is slightly higher than that of the recombinant protein. The reason for this discrepancy is still unknown but may be explained by posttranslational modifications. After preadsorption of the antibodies with the antigen, the Ngb band disappeared in Western blots of retinal and brain tissues, demonstrating the specificity of the anti-Ngb antibodies. To investigate whether Ngb may be released from the cells, the total brain was incubated for 2 h in PBS. However, no Ngb could be detected in the supernatant while there was a signal in the brain extracts (Fig. 3B).

Expression Pattern of *Danio* Ngb by mRNA in Situ Hybridization—To localize the sites of Ngb mRNA expression in zebrafish, frontal cryosections of head regions were analyzed by *in situ* hybridization (ISH) using an *in vitro* transcribed antisense RNA probe. Cross-sections from several layers were inspected (Supplemental Fig. S3). A perinuclear signal typical for mRNA hybridization of Ngb was found in the neuronal somata of essentially all of the regions of the *Danio* brain (Fig. 4) (see also Supplemental Fig. S4 and Supplemental Table S2). Control experiments that included nonspecific RNA (mouse intes-

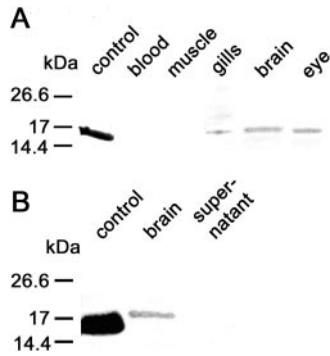


FIG. 3. Western blot analysis of NgB protein in selected zebrafish tissues. *A*, ~20 μ g of total protein form of selected tissue extracts were applied/lane. NgB was detected in the brain, the gills, and the total eye but not in the muscle or blood. ~0.5 μ g of recombinant NgB was applied as a positive control. *B*, detection of NgB after incubation of the brain in PBS. No NgB was detected in the supernatant while it was present in the brain tissue. Control, 2 μ g of purified NgB.

tine total RNA) as competitor showed identical staining (data not shown). Sections hybridized with an *in vitro* transcribed sense RNA probe showed no staining (Supplemental Fig. S5), thus demonstrating the specificity of the NgB labeling. For example, in a section of the posterior mesencephalon (Fig. 4), we found a particularly strong NgB signal in the periventricular zone of the *tectum opticum*. Additional staining was observed in putative neurons scattered in the white matter of the brain and in neuronal populations such as the preglomerular nucleus, posterior tubular nucleus, the *torus longitudinalis*, the hypothalamus, and the pituitary gland. An examination of further frontal sections showed the presence of NgB mRNA in various brain regions (Supplemental Fig. S4 and Supplemental Table S2), e.g. NgB mRNA was also detected in brain regions of the visual system, predominantly in parts of the *tectum opticum* and the *torus semicircularis*, which are both part of the mesencephalon. ISH signal was also present in two other regions involved in visual signal processing, the *area dorsalis telencephali* of the telencephalon and the *medulla oblongata*, a part of the rhombencephalon. The other parts of the *Danio* brain in which strong ISH signals were observed included parts of the telencephalic *area dorsalis telencephali*, the diencephalic posterior *tuberculum*, the hypothalamus, and the synencephalon. In the rhombencephalon, which includes the metencephalon and the myelencephalon, signals could be seen in the *formatio reticularis*.

NgB ISH staining was also noticed in the telencephalon, containing the *bulbus olfactorius* (Fig. 5A). Intense NgB ISH signal could be detected in the sensory epithelium of the peripheral olfactory organ. Strong NgB mRNA labeling was also observed in distinct layers of the zebrafish retina (Fig. 5B). The outer and inner nuclear layers, which contain the nuclei, and the ganglion cell layer were heavily stained with the NgB probe, whereas the outer plexiform layer and the outer segments of the photoreceptor cells appeared to be unstained. The head cross-sections revealed that NgB is also present in the gills (Fig. 5C). The ISH signal appeared to be limited to the chloride cells that were located mainly at the base and the lateral regions of the secondary lamella.

Immunodetection of *Danio* NgB Protein—The presence of the NgB protein in zebrafish tissues was monitored by indirect immunofluorescence experiments. An affinity purified α -*Danio* NgB antibody was applied on cryosections from both fixed and unfixed tissues. In agreement with the mRNA ISH data, we observed scattered NgB immune reactivity of the brain neurons. Particularly strong staining of neurons was observed in the diencephalic lateral hypothalamus (Fig. 6A). In control

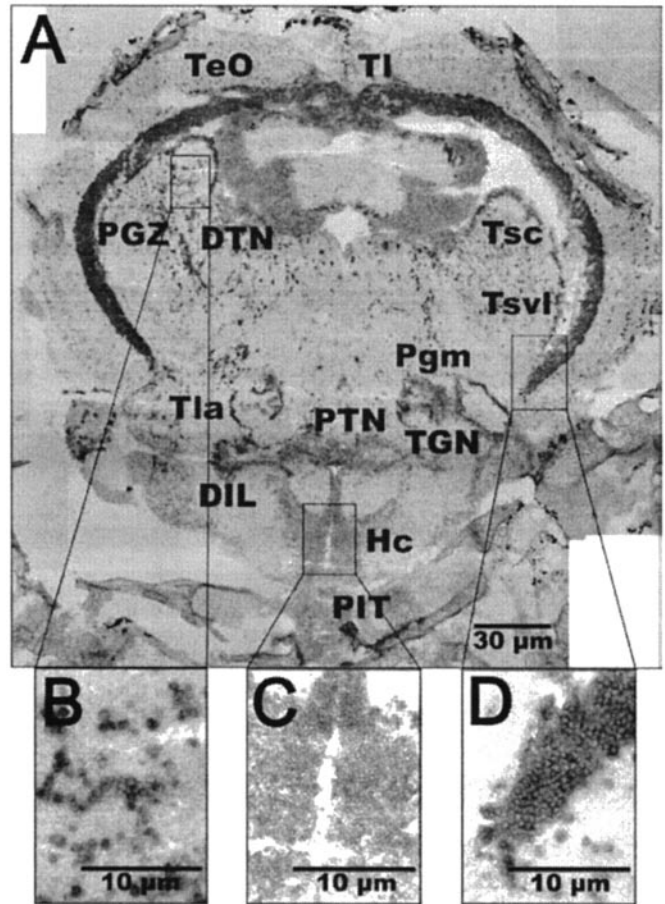


FIG. 4. Localization of NgB mRNA in the zebrafish midbrain. *A* frontal section of the zebrafish mesencephalon (cf. Supplemental Fig. S3) was hybridized with an NgB antisense probe. ISH signals were observed in the neurons in various brain regions. The insets show enlarged neuronal somata in the dorsal tectum (*B*), the caudal zone of periventricular hypothalamus (*C*), and the ventral region of the periventricular gray zone of tectum opticum (*D*). Abbreviations: DIL, diffuse nucleus of the inferior lobe; DTN, dorsal tectum; Hc, caudal zone of periventricular hypothalamus; Pgm, medial preglomerular nucleus; PGZ, periventricular gray zone of tectum opticum; PIT, pituitary gland; PTN, posterior tubular nucleus; TeO, tectum opticum; TGN, tertiary gustatory nucleus; TL, longitudinal torus; Tla, lateral torus; Tsvl, ventrolateral nucleus of torus semicircularis.

experiments without first antibody, no staining of the neurons was observed (Fig. 6B). In the retina, no anti-NgB immune staining was found either in the cells of the retinal pigment epithelium or in the outer segments of the photoreceptors. Bright immune staining was observed in the photoreceptor layer, whereas there was little but detectable immune reaction in the outer and inner plexiform layers and at the ganglion cells (Fig. 6C). No signal was present in the appropriate control experiments (not shown). In the gills, we observed scattered staining of cells that most probably corresponded to the chloride cells of the secondary lamella (Fig. 6D).

DISCUSSION

NgB is a recently identified member of the vertebrate globin superfamily (6) that is probably present in all of the vertebrate taxa including fish (24), amphibians, and birds.² Although most experiments support the idea of an important role of NgB in oxygen homeostasis of nerve tissues (6, 12–16), other functions or additional functions of NgB are still conceivable (13, 16)

² C. Fuchs, P. Kugel Stadt, T. Hankeln, and T. Burmester, unpublished data.

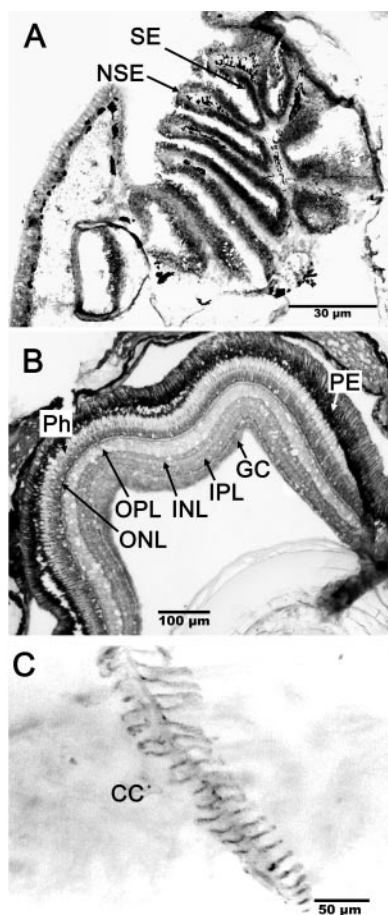


FIG. 5. Localization of *Ngb* mRNA in zebrafish tissues. The sections were incubated with an *Ngb* antisense RNA probe. *Ngb* was strongly expressed in the sensory epithelium (*SE*) of the olfactory bulb, whereas there was less *Ngb* mRNA in the non-sensory epithelium (*NSE*) (*A*). In the retina (*B*), there was *Ngb* mRNA present in the ganglion cell layer (*GC*), the inner plexiform layer (*IPL*), the inner nuclear layer (*INL*), and the outer nuclear layer (*ONL*). No signal was detected in the outer plexiform layer (*IPL*) and the outer segments of the photoreceptor cells (*Ph*). *PE*, pigment epithelium. In the gill (*C*), the chloride cells (*CC*) at the secondary lamella are labeled.

and many open questions remain to be solved. So far, biochemical and molecular studies on *Ngb* have been carried out exclusively with mammalian species. However, a comparative approach involving non-mammalian species offers a promising tool for the identification of conserved *Ngb* features and thus for the further understanding of *Ngb* function.

Conservation and Differences between Fish and Mammalian *Ngb* Genes—*Ngb* is a highly conserved protein with substitution rates that are ~3-fold lower than those in hemoglobin and myoglobin (6, 24, 35). This is also true for the gene structure, which contains three conserved introns in the coding regions of fish and mammalian *Ngb* genes. While the introns in B12.2 and G7.0 are present in all vertebrate and many invertebrate globin genes (13, 36), the intron in E11.0 is unique to *Ngb*. The additional short intron in the 5'-untranslated region is most likely homologous to an intron at a similar position in the *Tetraodon nigroviridis* and *Takifugu rubripes* genes (data not shown). Such an intron is absent from the mammalian neuroglobins and may have been acquired early in fish evolution before the Ostariophysi (*D. rerio*) and the Acanthopterygii (*T. nigroviridis*, *T. rubripes*) separated ~120 million years ago (37, 38).

Similar to mammalian *Ngb* (6, 35), the zebrafish gene lacks a TATA box, although several other transcription factor bind-

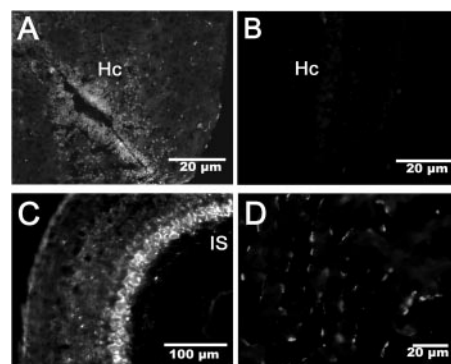


FIG. 6. Indirect anti-*Ngb* immunofluorescence of cryosections from the brain (*A*), the retina (*C*), and the gills (*D*). In the caudal zone of periventricular hypothalamus (*Hc*), neuronal cells were stained with the anti-*Ngb* antibody (*A*), whereas in a control without first antibody no staining was observed (*B*). In the retina, bright immunofluorescence was visible in the inner segments (*IS*) of the photoreceptor cells (*C*). The plexiform layers and ganglion cells were weakly stained. In the gills (*D*), single cells at the secondary lamella were stained that most probably represent chloride cells.

ing sites were present (Supplemental Table S1 and Supplemental Fig. S1). In contrast to the mammalian genes, the putative *Danio Ngb* promoter region was not associated with a CpG island. The *Danio Ngb* promoter rather shared significant similarities with experimentally derived promoters from mouse myoglobin (39) and rabbit hemoglobin (40). However, it must remain uncertain whether this is a conserved feature retained from the common globin gene ancestor or has been acquired by convergent evolution. The hypoxia response of *Ngb* is of particular interest because it may shed light on neuroglobin function and its role in hypoxia-related diseases such as stroke. However, the available data are conflicting. Whereas Sun *et al.* (12) suggest an up-regulation of *Ngb* in cultured neuronal cells under oxygen deprivation, Mammen *et al.* (22) did not find any reaction of *Ngb* to hypoxia in mouse *in vivo*. In fact, five putative HREs (31–33) were present in the *Danio Ngb* gene region (Fig. 1). However, a comparison of the zebrafish *Ngb* gene with that of *T. nigroviridis* and *T. rubripes* does not reveal any positional conservation of these regulatory elements (35). The actual function of the putative HREs in hypoxia regulation of the zebrafish *Ngb* genes requires experimental confirmation in future studies. In several mammalian genes, neuron-specific gene expression was mediated by a 21-bp sequence motif, the NRSE that binds to the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) (41, 42). Putative NRSE motifs have been identified in mouse and human *Ngb* genes (43), and two such elements were present in the 5'-promoter region of the *Danio Ngb* gene (Supplemental Table S1 and Supplemental Fig. S1). Although the regulatory function of these NRSEs remains to be established in both fish and mammalian *Ngb*, they possibly explain the largely neuron-specific expression of *Ngb*.

Fish and Mammalian *Ngb* Are Hexacoordinated Globins with Similar Ligand-binding Kinetics—Similar to the mammalian *Ngb*s (17, 18) and various other animal and plant hemoglobins (44), deoxygenated zebrafish *Ngb* displayed a hexacoordinated heme-chrome-binding scheme at the Fe^{2+} of the porphyrin ring. The ligand-binding kinetics of zebrafish *Ngb* are similar to those of human *Ngb*, displaying the biphasic form for competitive binding of the internal His with the external ligand. The rate coefficients for *Danio* are approximately twice the rates of human *Ngb*, indicating a faster passage in the heme pocket. Because all of the rates are increased by the same factor, the overall observed affinity does not change significantly. As for mammalian *Ngb*, the *Danio Ngb* oxygen affinity is ~1 torr, suggesting that this parameter has been maintained

throughout the evolutionary process. There is a major difference in the dependence on the kinetics on the possible disulfide bond. Although human NGB oxygen affinity decreased to ~ 10 torr (34), *Danio* Ngb showed little effect. Note that the first Cys in *Danio* was shifted by two positions relative to the human NGB sequence.

Neuronal Expression of Ngb in the Vertebrate Brain—As in the central nervous system of mammals (6, 19, 21), Ngb was expressed in brain neurons (Figs. 3–6). Because of the instability of the purified anti-Ngb antibody, we did not carry out a thorough immunohistochemical analysis of the fish brain. Nevertheless, in regions inspected by both methods, ISH and immunofluorescence, the observed patterns matched and demonstrated the presence of Ngb mRNA and protein in the somata of most if not all of the nerve cells. No evidence was found for glial expression of Ngb in fish, which corresponds to the data obtained in mammals (19–21). Thus, the neuronal expression of Ngb was conserved in gnathostomian vertebrates for ~ 420 million years (37). A novel finding of this study was the observation of strong Ngb expression in the sensory part of the receptor cells of the zebrafish olfactory system (Fig. 5A). Significant Ngb was also present in the following parts of the olfactory tract in the telencephalon and the olfactory cortex. Because of the strong calcification of the rodent olfactory system, similar staining experiments have not been carried out in these species. Thus, it remains to be established whether high Ngb expression also occurs in the olfactory region of the mammals or whether this is a unique feature of the teleost fish.

Because the immunofluorescence signal in the brain was only clearly visible at high magnifications, its total concentration in the brain appeared to be low. Nevertheless, the fish retina and the gills showed bright fluorescence and thus may contain higher amounts of Ngb.

High Concentrations of Ngb in the Photoreceptor Inner Segments—The mouse retina has been observed so far to be the highest Ngb-expressing tissue in mouse with the Ngb protein reaching a concentration similar to that of myoglobin in the striated muscle ($\sim 100 \mu\text{M}$) (14). The ISH pattern of Ngb mRNA in the fish retina was similar to that in mouse with the exception that we observed some ISH signals in the fish inner plexiform layer (Fig. 5B). Although there was, as in mouse, detectable amounts of Ngb protein present in the ganglion cell and the plexiform layers, most Ngb in the zebrafish retina actually appeared to be located in the inner segments of the photoreceptor cells (Fig. 6B). If the idea of an oxygen transport function of Ngb (6, 14, 16) was correct, it may be explained by the high energy requirements of the fish cones and rods. Whereas upon light adaptation, the pupil diameter of the mammalian retina decreased, most fish did not show a similar response (45). Rather, the cone cells of the fish retina displayed light-induced shortening of the myoid, the neck-region located between the ellipsoid and the perinuclear region of the inner segments (46). Consequently, a high concentration of mitochondria in the ellipsoid region has been observed. Thus, the observation of the presence of apparently high Ngb concentrations in the inner segments agrees with previous observation in the mouse retina that suggests an association of Ngb with mitochondria (14).

Wittenberg and Wittenberg (47) observe an extracellular hemeprotein in the choroid blood from perfused retina of two basal teleost fish species (bowfin and bluefish). The hemo-chrome absorption spectra of these globins were similar to those of mammalian and fish Ngb. Thus, we had speculated that this heme protein may correspond to Ngb (14, 24). However, neither the Western blotting experiments (Fig. 3) nor the immunofluorescence data (Fig. 6) provided any evidence that Ngb may be found in the blood or the extracellular space.

Therefore, it remains uncertain whether the retinal heme protein identified in the bowfin and the bluefish (47) corresponds to Ngb and, even if it does, whether it represents as proposed by those authors an intracellular globin that has been artificially released into the blood during the preparation procedure.

Ngb in the Chloride Cells Suggests Another Association of Ngb with Mitochondria—With the exception of the expression in some endocrine tissues (19, 20), Ngb has been assumed to be an exclusively neuronal protein. Here we show by immunofluorescence studies, ISH, and Western blotting that Ngb was also present in the chloride cells of zebrafish gills. Fish gills perform a variety of physiological functions including respiratory gas exchange, ion exchange, and excretion (48, 49) and are considered as high energy-demanding tissues (50, 51). In freshwater fish, the chloride cells are the principal site of Ca^{2+} , Cl^- , and possibly also Na^+ uptake (52) and are known to be rich in mitochondria (52, 53). Again, this observation suggests an association of Ngb with the mitochondria (14) and is in line with the hypothesis that Ngb is involved in cellular oxygen consumption.

Implications for Vertebrate Ngb Function—The phylogenetic origin of Ngb dates back to before the time when the Protostomia and Deuterostomia diverged, suggesting a conserved function of this protein in the metabolism of the animal (6, 13, 14, 24). The Ngb gene structure, oxygen-binding kinetics, and expression patterns are globally similar in mammals and fish. Differences in the retinal expression pattern as well as the presence of Ngb in the fish gills may be easily explained by different oxygen requirements within these tissues. It should be stressed that, similar to mammals, fish Ngb concentration appears to be correlated with an abundant presence of mitochondria in the cells, although there is no evidence that Ngb is located within these organelles. Therefore, our results support the hypothesis of an important role of Ngb in oxygen-linked metabolism (14, 16). Whether Ngb has a myoglobin-like function in supplying oxygen to the respiratory chain by facilitated diffusion from the cell membrane to the mitochondria (3, 4) or whether it actually sustains the energy metabolism of the cell via another, a still unknown mechanism (13, 16), remains to be established.

Acknowledgments—We thank S. Reuss and G. Technau for help with the microphotography, M. Schaffeld and U. Wolfrum for discussions, and J. Markl for excellent working facilities.

REFERENCES

- Dickerson, R. E., and Geis, I. (1983) *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology*, Benjamin/Cummings Publications Co., Menlo Park, CA
- Wittenberg, J. B. (1992) *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **13**, 60–85
- Wittenberg, J. B., and Wittenberg, B. A. (2003) *J. Exp. Biol.* **206**, 2011–2020
- Merx, M. W., Flögel, U., Stumpe, T., Gödecke, A., Decking, U. K., and Schrader, J. (2002) *FASEB J.* **15**, 1077–1079
- Flögel, U., Merx, M. W., Gödecke, A., Decking, U. K., and Schrader, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 735–740
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., and Hankeln, T. (2000) *Nature* **407**, 520–523
- Kawada, N., Kristensen, D. B., Asahina, K., Nakatani, K., Minamiyama, Y., Seki, S., and Yoshizato, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 25318–25323
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., and Hankeln, T. (2002) *Mol. Biol. Evol.* **19**, 416–421
- Trent, J. T., III, Watts, R. A., and Hargrove, M. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 30106–30110
- Nakatani, K., Okuyama, H., Shimahara, Y., Saeki, S., Kim, D. H., Nakajima, Y., Seki, S., Kawada, N., and Yoshizato, K. (2004) *Lab. Invest.* **84**, 91–101
- Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J. C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 8063–8069
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y., and Greenberg, D. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15306–15311
- Pesce, A., Bolognesi, M., Ascenzi, P., Bocedi, A., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., and Burmester, T. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 1146–1151
- Schmidt, M., Gießl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., and Burmester, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 1932–1935
- Sun, Y., Jin, K., Peel, A., Mao, X. O., Xie, L., and Greenberg, D. A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3497–3500

16. Burmester, T., and Hankeln, T. (2004) *News Physiol. Sci.*, in press
17. Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzat, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R., and Moens, L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38949–38955
18. Trent, J. T., III, and Hargrove, M. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19538–19545
19. Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M., Burmester, T., and Hankeln, T. (2002) *Neuroscience* **115**, 645–656
20. Geuens, E., Brouns, I., Flamez, D., Dewilde, S., Timmermans, J. P., and Moens, L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30417–30420
21. Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T., and Reuss, S. (2003) *Neurosci. Lett.* **346**, 114–116
22. Mammen, P. P. A., Shelton, J. M., Goetsch, S. C., Williams, S. C., Richardson, J. A., Garry, M. G., and Garry, D. J. (2002) *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 1591–1598
23. Wakasugi, K., Nakano, T., and Morishima, I. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 36505–36512
24. Awenius, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 418–421
25. Nicholas, K. B., Nicholas, H. B., Jr., and Deerfield, D. W. (1997) *The European Molecular Biology Network Newsletter* **4**, 14
26. Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 4878–4884
27. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402
28. Périer, R. C., Praz, V., Junier, T., Bonnard, C., and Bucher, P. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**, 302–303
29. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
30. Wullimann, M. F., Rupp, B., and Reichert, H. (1996) *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas*, Birkhäuser, Basel, Switzerland
31. Wenger, R. H., and Gassmann, M. (1997) *Biol. Chem.* **378**, 609–616
32. Semenza, G. L., Jiang, B.-H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J.-P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32529–32537
33. Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashina, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M., and Esumi, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **273**, 2292–2298
34. Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L., and Marden, M. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 51713–51721
35. Wystub, S., Ebner, B., Fuchs, C., Weich, B., Burmester, T., and Hankeln, T. (2004) *Cytogenet. Genome Res.*, in press
36. Hardison, R. C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5675–5679
37. Benton, M. J. (1990) *Vertebrate Paleontology*, Unwin Hyman Ltd., London
38. Wittbrodt, J., Shima, A., and Schartl, M. (2002) *Nat. Rev. Genet.* **3**, 53–64
39. Blanchetot, A., Price, M., and Jeffreys, A. J. (1986) *Eur. J. Biochem.* **159**, 469–474
40. Dierks, P., van Ooyen, A. J. J., Cochran, M. D., Dobkin, C., Reiser, J., and Weissmann, C. (1983) *Cell* **32**, 695–706
41. Schoenherr, C. J., and Anderson, D. J. (1995) *Science* **267**, 1360–1363
42. Schoenherr, C. J., Paquette, A. J., and Anderson, D. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9881–9886
43. Laufs, T., Wystub, S., Reuss, S., Burmester, T., Saaler-Reinhardt, S., and Hankeln, T. (2004) *Neurosci. Lett.*, in press
44. Kundu, S., Trent, J. T., III, and Hargrove, M. S. (2003) *Trends Plant Sci.* **8**, 387–393
45. Douglas, R. H., Harper, R. D., and Case, J. F. (1998) *Vision Res.* **38**, 2697–2710
46. Burnside, B. (1978) *J. Cell Biol.* **78**, 227–246
47. Wittenberg, J. B., and Wittenberg, B. A. (1975) *Comp. Biochem. Physiol. A* **51**, 425–429
48. Claiborne, J. B., Edwards, S. L., and Morrison-Shetlar, A. I. (2002) *J. Exp. Zool.* **293**, 302–319
49. Marshall, W. S. (2002) *J. Exp. Zool.* **293**, 264–283
50. Lyndon, A. R. (1994) *J. Fish Biol.* **44**, 707–715
51. Johansen, K., and Pettersson, K. (1981) *Respir. Physiol.* **44**, 277–284
52. Perry, S. F. (1997) *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 325–347
53. Rombough, P. (2002) *J. Exp. Biol.* **205**, 1787–1794

Research Communication

Neuroglobin and Cytoglobin: Genes, Proteins and Evolution

Thorsten Burmester¹, Mark Haberkamp¹, Stephanie Mitz¹, Anja Roesner¹, Marc Schmidt¹, Bettina Ebner², Frank Gerlach², Christine Fuchs² and Thomas Hankeln²

¹Institute of Zoology, University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

²Institute of Molecular Genetics, University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

Summary

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

IUBMB *Life*, 56: 703–707, 2004

Keywords Hemoglobin; myoglobin; neuroglobin; Cytoglobin; oxygen transport.

INTRODUCTION

Globins are small respiratory proteins that bind an oxygen molecule by the virtue of an iron-ion that is coordinated by a porphyrin-ring and a histidine of the polypeptide chain (1, 2). Globin genes have been identified in all domains of life, including bacteria, archaea, protists, fungi, plants and animals (3–5). There is little doubt that all globins derived from a

globin gene that had already been present in the last universal common ancestor more than 1.8 billion years ago (3, 5).

In vertebrates, five globin types have been identified so far. Most famous are hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb). Hb, consisting of two α - and two β -chains, transports molecular oxygen from the respiratory surfaces to the inner organs, thus fuelling the respiratory chain of the mitochondria (1). Mb, on the other hand, either stores or transports oxygen in the myomers of the striated and cardiac muscle, but also detoxifies NO (6). Neuroglobin (Ngb) and cytoglobin (Cygb) are two recently discovered vertebrate globins, with their physiological functions only just beginning to emerge (7–13). Ngb represents an ancient globin related to invertebrate nerve-globins. It is mainly expressed in the nervous system and is thought to be involved in neuronal oxygen homeostasis (7, 12–15). Cygb might play a role in collagen synthesis (16). Most recently, a fifth type of vertebrate globin – referred to as 'globin X' (GbX) – was discovered in fish and amphibians, which appears to be absent in higher vertebrates (17). Understanding the evolution of these proteins helps in unravelling their physiological functions. Here we compare sequences of vertebrate Ngb and Cygb from all available resources, and discuss their possible origin in light of putative functions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sequence Data

The BLASTN and TBLASTN algorithms (18) were employed to search the sequence databases and trace archives of genomic DNA and expressed sequence tags available at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The nucleotide sequences of the genes were extracted from the databases and assembled by hand. The following sequences were used:

Neuroglobin. HsaNGB, human (*Homo sapiens*), accession number AJ245946; PtrNgb, chimpanzee (*Pan troglodytes*), XM_522915; MmulNgb, Rhesus monkey (*Macaca mulatta*);

Received 15 October 2004; accepted 30 October 2004

Address correspondence to: Thorsten Burmester, Institute of Zoology, University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany. Tel: + 49 6131 39 24477. Fax: + 49 6131 39 24652.

E-mail: burmeste@uni-mainz.de

CpoNgb, Guinea pig (*Cavia porcellus*), AJ781213; OcuNgb, rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), AJ781214; MmusNgb, mouse (*Mus musculus*), AJ245945; RnoNgb, rat (*Rattus norvegicus*), AY066001; SscNgb, pig (*Sus scrofa*), AJ635235; CfaNgb, dog (*Canis familiaris*), AAEX01040503; BtaNgb, cow (*Bos taurus*), AJ635234; MdoNgb, opossum (*Monodelphis domestica*), AAFR01016568; GgaNgb, chicken (*Gallus gallus*), AJ635192; DreNgb, zebrafish (*Danio rerio*), AJ315610; TniNgb, pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*), AJ315609; TruNgb, pufferfish (*Takifugu rubripes*), CAAB01000170; OmyNgb1 and 2, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), AJ547800 and AJ547801.

Cytoglobin. HsaCYGB, human (*H. sapiens*), AJ315162; PtrCygb, chimpanzee (*P. troglodytes*), XM_523726; MmulCygb, Rhesus monkey (*M. mulatta*); MmusCygb, mouse (*M. musculus*), AJ315163; RnoCygb, rat (*R. norvegicus*), AJ245663; CfaCygb, dog (*C. familiaris*), AAEX01049981; BtaCygb, cow (*B. taurus*), AAFC01078662; MdoCygb, opossum (*M. domestica*), AAFR01073414; GgaCygb, chicken (*G. gallus*), AJ812227; DreCygb1, zebrafish (*D. rerio*), AJ320232; DreCygb2, zebrafish (*D. rerio*); CcaCygb, carp (*Cyprinus carpio*), CA967584; OmyCygb2, rainbow trout (*O. mykiss*), AJ547802.

Sequence Analyses and Molecular Phylogenetic Inference

DNA sequence translation and analyses of primary structures were performed with the programs of the ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.org>). The Ngb and Cygb cDNA and amino acid sequences were aligned by hand, employing the known crystal structures (19, 20) and previously published alignments as guidelines (8, 17, 21). The program package PHYLIP 3.6b (22) was used for the phylogenetic tree reconstructions. Distance matrices were calculated with PROTDIST using the PAM models. Neighbor-joining trees were inferred with the program NEIGHBOR, the reliability of the branching pattern was tested by bootstrap analysis (23) with 100 replications. MrBayes was employed for Bayesian phylogenetic analyses (24), using the WAG model with gamma distribution of rates. The analyses were run for 100,000 to 200,000 generations with random starting trees. Trees were sampled every 10th generation and posterior probabilities were estimated on the final 5,000 trees.

RESULTS AND DISCUSSION

Neuroglobin Genes and Proteins

Until today, only a limited number of Ngb genomic and cDNA sequences have been published (7, 25–27). Sequences from a few other species are available from the databases (see materials and methods). However, some of these are suspicious because of unreasonably high identity with human or rat Ngb (AY264260–AY264264; AY625274). These sequences are most likely PCR artefacts and have been ignored. To obtain additional Ngb sequences, we searched various genome projects. This resulted in the Ngb coding

sequences from the chimpanzee (*P. troglodytes*), the rhesus monkey (*M. mulatta*), the dog (*C. familiaris*) and the opossum (*M. domestica*). Partial sequences are also available from a few other species (data not shown). Only unambiguous sequences were considered, while single read positions were ignored. Therefore, Ngb sequences are currently available from 11 mammals, a bird and four teleost fish species. Ngb appears to be a single-copy gene in all species except of the trout, in which two distinct Ngb sequences have been obtained that differ by 6 amino acids. While most vertebrate and invertebrate globin genes contain only two introns at the distinct positions B12.2 (i.e., helix B, 12th amino acid, between codon positions 2 and 3) and G7.0 (3), Ngb harbours an additional intron in E11.0. It has been speculated that such central intron was present in the globin ancestor (3, 28). In fact, an intron at the adjacent position E10.2 has been observed in GbX and in the tunicate globins, both of which are assumed to be distantly related to Ngb (17, 21). It has also been speculated that the E11.0 intron emerged from an E10.2 intron by a rare ‘intron sliding’ event (17).

The Ngb proteins match the ‘classical’ globin fold and measure between 151 and 160 amino acids (Fig. 1). Insertion/deletion events have been rare in Ngb evolution and are restricted to the N- and C-termini and the flexible CD corner. The heme- and ligand-associated residues (proximal and distal histidines, PheB10, PheCD1, TyrCD3, ValE11, LeuF4, ValFG1, ValFG3, and PheG5; cf. ref. 19) are invariant in all Ngb proteins. Seventy amino acids are strictly conserved among the known Ngbs, which corresponds to 46.4% of the positions (ignoring gaps). Amino acid substitution rates are low in Ngb ($\sim 0.4 \times 10^{-9}$ amino acid replacements per site per year in mammals), being about a third of that in hemoglobin (17, 29). This is largely due to a reduction of non-synonymous mutations in Ngb evolution, which is an indicator for strong purifying selection. We found no evidence for conspicuous positive selection events at any position. In summary, all data show that Ngb has remained largely unchanged during evolution. This view is also supported by the essentially identical ligand binding characteristics of human, mouse and zebrafish Ngb (30, 31). These observations strongly suggest that Ngb function does not allow for much variation in protein sequence and structure.

Cytoglobin Genes and Proteins

Six Cygb cDNA sequences are available from the literature (8, 9, 27). Additional Cygb sequences were obtained from the chimpanzee (*P. troglodytes*), rhesus monkey (*M. mulatta*), dog (*C. familiaris*), cow (*B. taurus*), opossum (*M. domestica*), trout (*O. mykiss*) and carp (*C. carpio*) (Fig. 2). Cygb is a single copy gene in mammals (8), whereas two distinct Cygb gene lineages have been observed in teleost fishes (C. Fuchs, T. Burmester, and T. Hankeln, unpublished data). At present, it must remain uncertain whether these two Cygbs carry out different functions. In addition, a globin distantly related to Cygb has

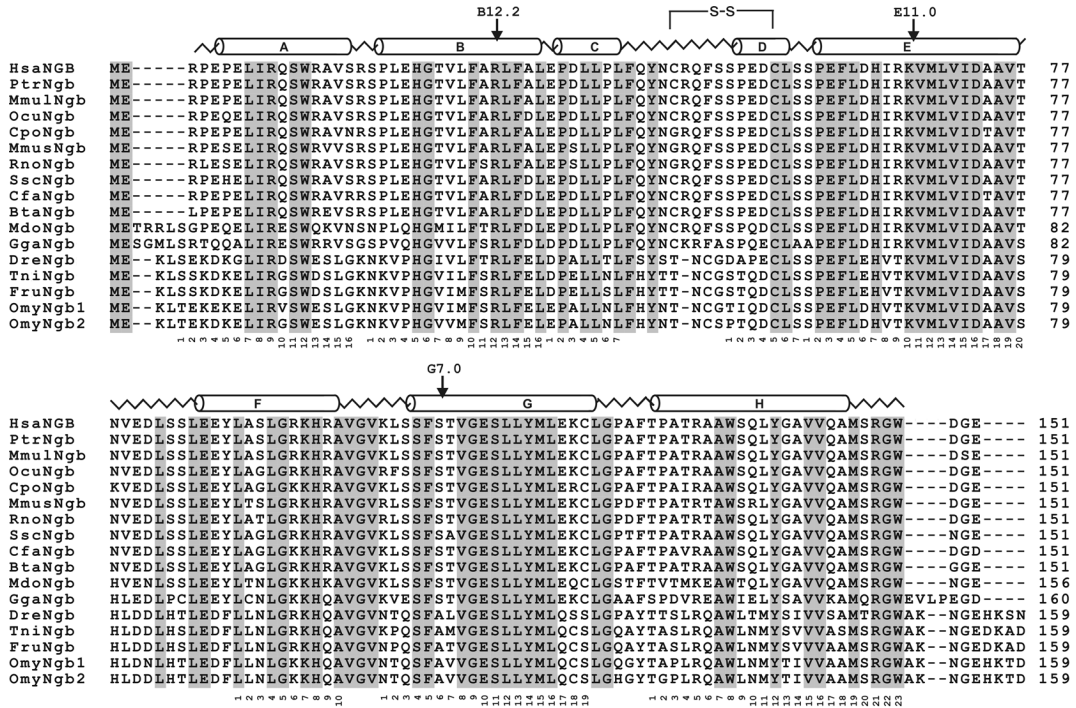


Figure 1. Alignment of Ngb amino acid sequences. The globin consensus numbering is given in the lower row and the secondary structure of human Ngb (19) is superimposed in the upper row. α -helices are designated A through H; conserved amino acids are shaded. The intron positions are given. See Materials and Methods for abbreviations.

been observed in chicken, which appears to be exclusively expressed in the eye (27). Thus, *Cygb* gene evolution is more complex than that of *Ngb*, suggesting several subfunctionalization events, which certainly requires attention in future studies. Introns are present in the conserved positions B12.2 and G7.0. Due to an additional exon at the 3' end, mammalian *Cygb* genes are ten amino acids longer than those of chicken and fish. The function of these sequences is uncertain because they do not display any discernible similarity to any other sequence in the databases. The identification of opossum *Cygb* shows that this exon has been acquired by the mammalian *Cygb* after the separation from bird some 310 million years ago (MYA), but before the divergence of Placentalia and Marsupialia (~170 MYA).

Although it carries extensions at its N- and C-termini, the *Cygb* protein displays the typical globin core (20). Besides the iron-coordinating proximal and distal histidines at E7 and F8, the other heme-coordinating and stabilizing residues LeuB10, PheCD1, ValE11, ValF4 and HisFG2 are strikingly conserved, with the exception that in *D. rerio* *Cygb*2 HisFG2 is replaced by a Tyr. Human *Cygb* forms a stable dimer *in vitro* (20, 32). The hydrophobic dimer interface is surrounded by residues providing stabilizing hydrogen bonds and electrostatic interactions (ArgB12, AsnBC1, SerC3, TyrG4, LysG6, GluG14 and ArgH12). Both, the hydrophobic core and the stabilizing residues are highly conserved in the mammalian *Cygb*

proteins, suggesting dimer formation in these species, too. Non-mammalian *Cygb* proteins are more variable, and their quaternary structure is currently uncertain. Sequence comparisons have shown that (mammalian) *Cygb* is even less variable than *Ngb*, with low substitution rates ($\sim 0.3 \times 10^{-9}$ amino acid replacements per site per year) and a reduction of non-synonymous mutations (8, 29). Thus, mammalian *Cygb* function seems to require a highly conserved protein. Probably due to the duplication, the two fish *Cygb* genes display higher substitution rates (C. Fuchs, T. Burmester, and T. Hankeln, unpublished data). Presently, it is uncertain whether this is the result of a relaxation of selective pressure or positive selection.

The Evolution of Vertebrate Globins and Functional Implications

Due to the large number of available sequences, the globins are a popular model for the investigation of gene and species evolution (33). Vertebrate globin types are associated with two distinct branches of metazoan globins (ref. 17; Fig. 3). *Ngb* and *GbX* belong to an ancient branch of globins that diverged from the other globin types before the Protostomia and Deuterostomia split more than 600 MYA (7, 17). The recently identified Hbs from the tunicate *Ciona intestinalis* also belong to this branch (21), likewise at least some invertebrate nerve globins and intracellular hemoglobins (7, 25). The other branch includes the gnathostomian and agnathan Hbs,

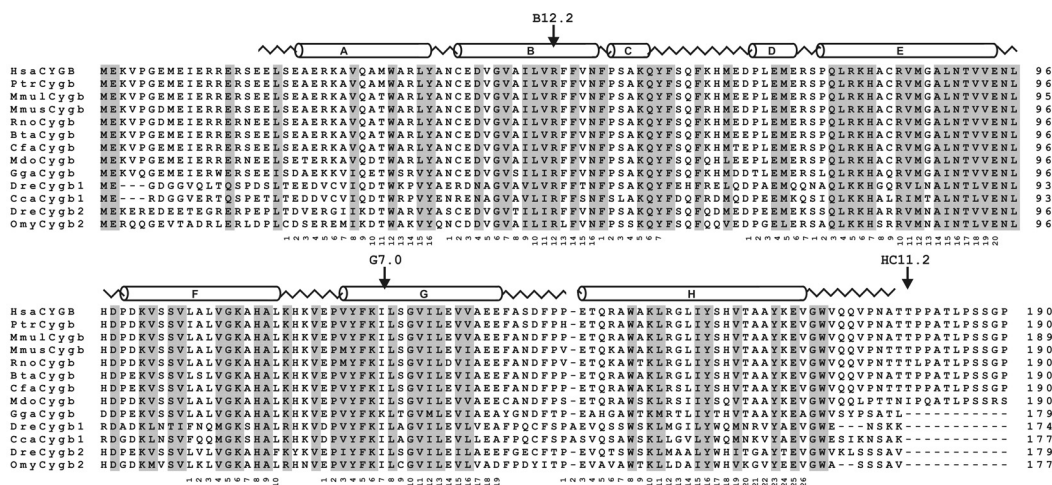


Figure 2. Alignment of Cygb sequences. The secondary structure of human Cygb (20) is shown in the upper row and conserved residues are shaded. α -helices are designated A through H; conserved amino acids are shaded. See Materials and Methods for abbreviations.

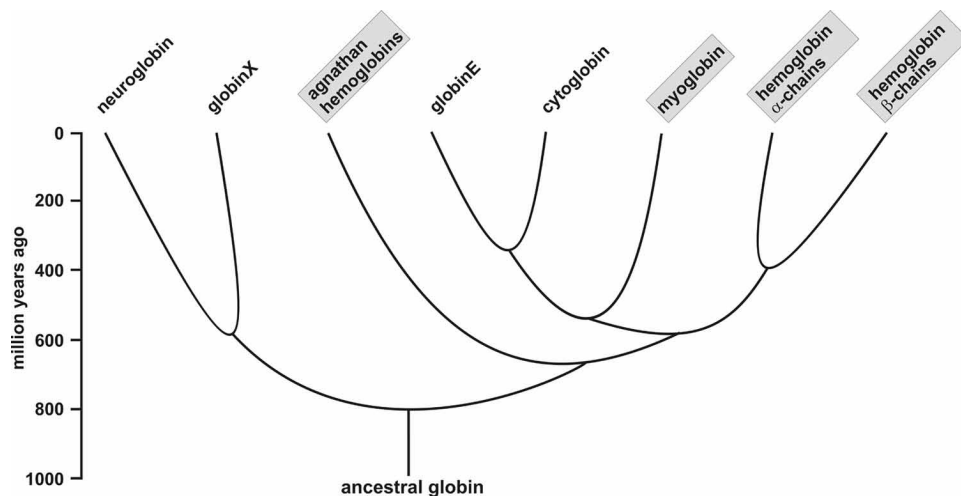


Figure 3. Simplified phylogenetic tree of vertebrate globins. Proteins with clear respiratory functions are shaded in grey. See text for discussions.

gnathostomian Mbs, Cygb and the eye-specific globin (GbE) from chicken (27). Currently, the exact topology of this clade is difficult to resolve. Based on the absence of Mb in the Agnatha, we have argued that Cygb forms a common branch with Mb (8). However, it is also conceivable that Cygb is in fact more closely related to the Hbs of Agnatha, with Mb being a distinct branch. GbE associates with Cygb in all analyses, although it must be uncertain whether it represents an ancient Cygb-related gene lineage or has evolved only in the Archosauria (27).

Tree topology clearly shows that highly expressed globins with either oxygen storage (Mb) or transport (Hb) functions

(Fig. 3) emerged several times independently from tissue globins with uncertain roles in the animal’s metabolism. This may be interpreted as three independent ‘gain of respiratory function’ events in vertebrate globin evolution. Alternatively, the last common globin ancestor may have already had a role in oxygen supply, which has possibly been retained in all other globins (Ngb, Cygb, GbX, and GbE). The generally lower expression levels of these proteins might be explained by their restricted expression in particular cell types or cellular compartments, or the involvement in a yet undefined O₂ supply mechanism specific to some enzymatic reactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank A. Bentmann and D. Kugelstadt for their help with sequencing. Our work is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bu956/5 and Ha2103/3) and the European Union (QLG3-CT-2002-01548).

REFERENCES

- Dickerson, R. E., and Geis, I. (1983) *Hemoglobin: Structure, function, evolution, and pathology*, Benjamin/Cummings Publ. Co., California.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, W.H. Freeman & Co, New York.
- Hardison, R. C. (1996) A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5675–5679.
- Weber, R. and Vinogradov, S. N. (2001) Nonvertebrate hemoglobins: Functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.* **81**, 569–628.
- Freitas, T. A., Hou, S., Dioum, E. M., Saito, J. A., Newhouse, J., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. A. and Alam, M. (2004) Ancestral hemoglobins in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6675–6680.
- Wittenberg, J. B., and Wittenberg, B. A. (2003) Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* **206**, 2011–2020.
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., and Hankeln, T. (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**, 520–523.
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., and Hankeln, T. (2002) Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 416–421.
- Kawada, N., Kristensen, D.B., Asahina, K., Nakatani, K., Minamiyama, Y., Seki, S. and Yoshizato, K. (2001) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 25318–25323.
- Trent, J. T. 3rd, and Hargrove, M. S. (2002) A ubiquitously expressed human hexacoordinate haemoglobin. *J. Biol. Chem.* **277**, 19538–19545.
- Burmester, T., and Hankeln, T. (2004) Neuroglobin: A respiratory protein of the nervous system. *News Phys. Sci.* **19**, 110–113.
- Pesce, A., Bolognesi, M., Ascenzi, P., Bocedi, A., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., and Burmester, T. (2002) Neuroglobin and cytoglobin: Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep.* **3**, 1146–1151.
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M.C., Kiger, L., Dewilde, S., Moens, L., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A., and Burmester, T. (2005) Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 110–119.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y., and Greenberg, D.A. (2001) Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15306–15311.
- Schmidt, M., Giebl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., and Burmester, T. (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply of the mammalian retina. *J. Biol. Chem.* **278**, 1932–1935.
- Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J. C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Cytoglobin is a respiratory protein expressed in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **279**, 8063–8069.
- Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2005) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: Evidence for two distinct globin families in animals. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 12–20.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., and Bolognesi, M. (2003) Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure* **11**, 1087–1095.
- de Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., and Bolognesi, M. (2004) Crystal structure of cytoglobin: The fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination. *J. Mol. Biol.* **336**, 917–927.
- Ebner, B., Burmester, T., and Hankeln, T. (2003) Globin genes are present in *Ciona intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1526–1536.
- Felsenstein, J. (2004) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6b. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Huelsenbeck, J.P., and Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- Awenius, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2001) Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 418–421.
- Zhang, C., Wang, C., Deng, M., Li, L., Wang, H., Fan, M., Xu, W., Meng, F., Qian, L. and He, F. (2002) Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1411–1419.
- Kugelstadt, D., Haberkamp, M., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Neuroglobin, cytoglobin and a novel eye-specific globin from chicken. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 719–725.
- Go, M. (1981) Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature* **291**, 90–92.
- Wystub, S., Ebner, B., Fuchs, C., Weich, B., Burmester, T., and Hankeln, T. (2004) Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet. Genome Res.* **105**, 65–78.
- Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuz, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R., and Moens, L. (2001) Biochemical characterization and ligand-binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J. Biol. Chem.* **276**, 38949–38955.
- Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, M., Hamdane, D., Marden, M. C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 24116–24122.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L., and Marden, M. C. (2003) The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. *J. Biol. Chem.* **278**, 51713–51721.
- Graur, D., and Li, W.-H. (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd edition. Sinauer Sunderland, Massachusetts.

A Globin Gene of Ancient Evolutionary Origin in Lower Vertebrates: Evidence for Two Distinct Globin Families in Animals

Anja Roesner,* Christine Fuchs,† Thomas Hankeln,† and Thorsten Burmester*

*Institute of Zoology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany; and †Institute of Molecular Genetics, Johannes-Gutenberg-University, Mainz, Germany

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

Introduction

Globins are small heme-proteins with a characteristic three-on-three α -helical sandwich structure. They have the ability to bind oxygen and other gaseous ligands between the iron ion of the porphyrin ring and—typically—a histidine of the polypeptide chain (Dickerson and Geis 1983). Globin-type proteins are widespread and occur in archaea, bacteria, plants, fungi, and animals and exhibit an enormous structural and functional diversity (Hardison 1996; Weber and Vinogradov 2001; Freitas et al. 2004). Although globins are famous for their capability to transport and store oxygen (Dickerson and Geis 1983; Wittenberg and Wittenberg 2003), thus, sustaining oxidative metabolism in the cell, in recent years, other functions have been discovered (Gardner et al. 1998; Sowa et al. 1998; Minning et al. 1999; Flögel et al. 2001).

In the vertebrates, four types of globin have been identified so far. Here, we refer to all globins as “globin superfamily.” For functionally derived classifications we use the term “type”, the term “family” refers to the distinct globin branches defined here by phylogenetic studies. Hemoglobin (Hb) consists of four globin chains, is located in erythrocytes, and serves for the transport of oxygen from the respiratory surfaces to the inner organs (Dickerson and Geis 1983). Hb is present in all vertebrates investigated so far (Dickerson and Geis 1983), with the exception of some icefish species (Ruud 1954; Sidell et al. 1997). Myoglobin (Mb), mainly localized in the striated and cardiac muscle, is a monomer that acts as temporal oxygen store and facilitates intracellular oxygen diffusion (Wittenberg 1992; Wittenberg and Wittenberg 2003) but also detoxifies NO (Flögel et al. 2001). Neuroglobin (Ngb) and cytoglobin

(Cygb) are two recently discovered vertebrate globin types with poorly defined functions (Burmester et al. 2000, 2002; Kawada et al. 2001; Trent and Hargrove 2002; Pesce et al. 2002; Burmester and Hankeln 2004). Here, we present the identification and molecular analyses of a fifth vertebrate globin type, adding further diversity to the globin superfamily.

Materials and Methods

Animals

All animals were obtained from a local pet shop. Zebrafishes (*Danio rerio*: Actinopterygii; Ostariophysii; Cypriniformes) and spotted green pufferfishes (*Tetraodon nigroviridis*: Actinopterygii; Acanthopterygii; Tetraodontiformes) were kept at 28°C in a freshwater aquarium; goldfishes (*Carassius auratus*: Actinopterygii; Ostariophysii; Cypriniformes) were kept at 16°C. The western clawed frog *Silurana (Xenopus) tropicalis* (Amphibia; Anura) was dissected immediately after purchase. Animals were killed by decapitation, the tissues were removed and kept frozen at -80°C or immediately used for the experiments.

Cloning and Sequencing of Globin X cDNAs and Gene

RNA was extracted from tissues of *D. rerio*, *T. nigroviridis*, and *C. auratus* according to the guanidine hydrochloride method (Chirgwin et al. 1979) and from *S. tropicalis* by the Qiagen RNeasy kit. Specific oligonucleotide primers were designed according to the aligned sequences and used to amplify the corresponding cDNAs by reverse-transcription PCR experiments applying the OneStep kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen) or employing the SuperScript™ reverse transcriptase (Invitrogen). The primer sequences are available from the authors upon request. The PCR products were cloned into the pCR4-TOPO (Invitrogen) or the pGEM-Teasy

Key words: globin, hemoglobin, neuroglobin, gene duplication, intron sliding.

E-mail: burmeste@uni-mainz.de.

Mol. Biol. Evol. 22(1):12–20, 2005

doi:10.1093/molbev/msh258

Advance Access publication September 8, 2004

vectors (Promega), sequenced on both strands using Dye-TerminatorTM chemistry (Applied Biosystems), and loaded on an ABI3730 capillary sequencer (GENEnterprise). The missing 3' region of *S. tropicalis* GbX cDNA was obtained using the RACE system by Invitrogen. Sequences were deposited at the GenBank/EMBL database under the accession numbers AJ635194 (*D. rerio*), AJ635193 (*T. nigroviridis*), AJ635195 (*C. auratus*), and AJ634915 (*S. tropicalis*). Genomic DNA of *T. nigroviridis* was obtained using the Stratagene DNA extraction kit. Two sets of nested primer pairs were designed according to the complete *T. nigroviridis* cDNA and the partial database entries available at GenBank and Genoscope (see above). Overlapping genomic fragments were amplified and their sequences were obtained after the cloning of the PCR products as described above. The PCR clones represent two slightly different *GbX* genes (accession numbers AJ635196 and AJ635197).

mRNA Expression Analyses

Total RNA was isolated from various *C. auratus* tissues. 1.6 µg of total RNA per tissues from *C. auratus* were reverse transcribed with an oligo-dT primer followed by PCR reactions on 10% of the total synthesis. Primers used for *C. auratus* GbX are 5'-CAGGGCTGGTTTCAGGATGGGC-3' and 5'-TACATGTCTGAGATGGTCTTCA-3', with 5' GGATGGGCTGCGCTATTTCCGG-3' and 5'-TGAGATGGTCTTCAGATGGCTGTGC-3' as nested primers. The oligonucleotides 5'-GTCCGTGACATCAAGGAGAAGC-3' and 5'-CAGACTCATCGTACTCCTCCTTG-3' were applied for the β-actin standard.

Database Analyses

The BlastN and TblastN search algorithms (Altschul et al. 1990) were employed to evaluate the sequence databases and trace archives at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the pufferfish genome projects of *Takifugu rubripes* (<http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk>) and *Tetraodon nigroviridis* (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetraodon/>). The nucleotide sequences were extracted from the databases and assembled with Genedoc 2.6 (Nicholas and Nicholas 1997), using the BlastT results as guidelines. The Web-based tools provided at the ExpASY Molecular Biology Server at the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.expasy.org>) were used for the translation of the DNA and further analyses of the protein sequences.

Sequence Analyses and Phylogenetic Inference

The GbX protein sequences were manually added to an alignment of selected globin sequences (Burmester et al. 2000, 2002). The sequences used are Ngb from human (*Homo sapiens*: Chordata; Vertebrata; Mammalia) (HsaNGB, accession number AJ245946), mouse (*Mus musculus*: Chordata; Vertebrata; Mammalia) (MmuNgb, AJ245945), *T. nigroviridis* (Chordata; Vertebrata; Actinopterygii) (TniNgb, AJ315609), *D. rerio* (Chordata; Vertebrata; Actinopterygii) (DreNgb, AJ315610), and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*: Chordata; Vertebrata; Actinopterygii) (OmyNgb, AJ547800), nerve Mb of the sea mouse

(*Aphrodita aculeata*: Annelida; Polychaeta) (AacNgb, U46754), sea squirt (*Ciona intestinalis*: Chordata; Tunicata) Hbs 1 to 4 (CinHb1-4, AJ548500 to AJ548503), bloodworm (*Glycera dibranchiata*: Annelida; Polychaeta) Hb P3 (GdiHbP3, M55444), earthworm (*Lumbricus terrestris*: Annelida; Oligochaeta) Hbs B (LteGbB, P02218*) and Hbs D (LteGbD, U55073*), earthworm (*Pheretima sieboldi*: Annelida; Oligochaeta) Hb I (PsiHb1; S06483*), fanworm (*Sabella spallanzanii*: Annelida; Polychaeta) Hb (SspHb, AJ131285), lugworm (*Arenicola marina*: Annelida; Polychaeta) Mb (AmaMb1 [Kleinschmidt and Weber 1998]), beard worm (*Lamelligibrachia* sp.: Pogonophora; Vestimentifera) Hb 2 (LamHb2, P15469*), fruitfly (*Drosophila melanogaster*: Arthropoda; Insecta) Hb (DmeHb, AJ132818), horse botfly (*Gasterophilus intestinalis*: Arthropoda; Insecta) Hb (GinHb, AF063938), midge (*Chironomus thummi thummi*: Arthropoda; Insecta) Hbs (CttHbIb, AF001292, CttHbVI, P02224*, CttHbVIII, P02227*, CttHbE, P11582*), Atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*: Chordata; Vertebrata; Myxiniiformes) Hbs 1 to Hbs 3 (MgIHb1, AF156936, MgIHb2, AF157494, MgIHb3, AF184239), European river lamprey *Lampetra fluviatilis* Hb (Chordata; Vertebrata; Petromyzontiformes) (LflHb, P02207*), Cygb from human (HsaCYGB, AJ315162), mouse (MmuCygb, AJ315163), and zebrafish (DreCygb, AJ320232), Mb from the gummy shark (*Mustelus antarcticus*: Chordata; Vertebrata; Chondrichthyes) (ManMb, P14399*), tope shark (*Galeorhinus australis*: Chordata; Vertebrata; Chondrichthyes) (GauMb, P14397*), *T. nigroviridis* (TniMb, CAAE01011832), bluefin tuna (*Thunnus thynnus*: Chordata; Vertebrata; Actinopterygii) (TthMb, Q9DD47*), sperm whale (*Physeter catodon*: Chordata; Vertebrata; Mammalia) (PcaMb, P02185*), mouse (MmuMb, P04247*), and human (HsaMB, M14603); Hbs a from the Port Jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*: Chordata; Vertebrata; Chondrichthyes) (HpoHbA, P02021*), spiny dogfish (*Squalus acanthias*: Chordata; Vertebrata; Chondrichthyes) (SacHbA, A24653), rainbow trout (OmyHbA4, D88114), bluefin tuna (TthHbA2, AB093570), the mouse (MmuHbA, V00714) and human (HsaHbA, J00153), Hbs b from *H. portusjacksoni* (HpoHbB, P02143*), *S. acanthias* (SacHbB, B24653), carp (*Cyprinus carpio*: Chordata; Vertebrata; Actinopterygii) (CcaHbB, D88117), zebrafish (DreHbBa1, NM_131020), human (HsaHBB, M36640), and mouse (MmuHbB, AK028067). Asterisks indicate sequences from the protein database. The final alignment is available from the authors upon request.

The program packages PHYLIP version 3.6b (Felsenstein 2004), Tree-Puzzle version 5.2 (Strimmer and von Haeseler 1996) and MrBayes version 3.0beta4 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) were used for the phylogenetic tree reconstructions. Distance matrices were calculated with Tree-Puzzle using the PAM (Dayhoff, Schwartz, and Orcutt 1978) and the WAG (Whelan and Goldman 2001) models of amino acid evolution, each with assuming gamma distributions of substitution rates with eight categories. Neighbor-joining trees were inferred with the program NEIGHBOR from the PHYLIP package. The reliability of the branching pattern was tested by bootstrap analysis (Felsenstein 1985) with 100 replications,

employing PUZZLEBOOT (shell script by M. Holder and A. Roger). Bayesian phylogenetic analyses (cf. Huelsenbeck et al. 2001) were performed by MrBayes, using the PAM and WAG models of amino acid evolution and assuming a gamma distribution of substitution rates. Prior probabilities for all trees were equal. Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMCMC) sampling was performed with one cold and three heated chains that were run for 300,000 generations. Starting trees were random, trees were sampled every 10th generation, and posterior probabilities were estimated on the final 5,000 trees (burn-in = 25,000).

Substitution rates were calculated based on a PAM matrix under the assumptions that the Tetrapoda and Teleostei diverged about 420 MYA and that the cyprinid fishes (*D. rerio* and *C. auratus*) and percomorph pufferfishes (*T. nigroviridis*) diverged about 120 MYA (Benton 1990; Wittbrodt, Shima, and Schartl 2002). The number of nonsynonymous (dn) and synonymous (ds) nucleotide substitutions per site were obtained by the SNAP program (Ota and Nei 1994), which implements the method of Nei and Gojobori (1986) for the correction of multiple substitutions.

Results

Identification of a Novel Globin Gene from Fishes and Amphibians

Systematic Blast searches were carried out on the databases of genomic sequences from three fish species (*D. rerio*, *T. nigroviridis*, and *Takifugu [Fugu] rubripes*) and the amphibian *S. tropicalis*. Initially, the TBlastN algorithm under the assumption of a BLOSUM 45 substitution matrix was employed, using the human Ngb amino acid sequence (Burmester et al. 2000) as query. For each species, we obtained sequences that correspond to a single novel globin gene. Because the function of the gene product is presently unknown, this novel gene has been termed “globin X” or *GbX*. Employing the BlastN algorithm, the *D. rerio*, *T. nigroviridis*, *T. rubripes*, and *S. tropicalis GbX* sequences were compiled from the NCBI trace archives and other resources (see *Materials and Methods*), and the tentative genomic sequences of the genes were deduced. In addition, an expressed sequence tag (EST) from the catfish *Ictalurus punctatus* (accession number CK416201) was found that is most likely homologous to *GbX*. No corresponding sequences were found by TBlastN searches in any of the complete genomes of mouse, human, or chicken, in EST sequences of mammals or birds, or in the trace archives of mammalian genomic sequences.

The putative coding regions were inferred by comparison with the published Ngb genes and the *I. punctatus* EST sequence. These data show that the coding region of the *T. rubripes GbX* gene is not completely covered by the genome sequences in the databases. The actual cDNA sequences of *D. rerio*, *T. nigroviridis*, and *S. tropicalis GbX* were then obtained from total RNA by RT-PCR experiments, also demonstrating that these novel globin genes are in fact expressed in the animals. In addition, we used oligonucleotide primers deduced from

the *D. rerio* sequence to obtain the cDNA of *GbX* from the goldfish *C. auratus*.

Genomic DNA was extracted from *T. nigroviridis* and the *GbX* gene was amplified by PCR and sequenced. Two slightly different sequences were obtained from a single animal. Because the available genomic sequences of *T. nigroviridis* and *T. rubripes* suggest that *GbX* is a single-copy gene, the two obtained sequences most likely represent distinct alleles of this gene. The *GbX* gene of *T. nigroviridis* comprises 4,301 bp or 4,302 bp (counting from the start ATG to the stop codon). As deduced from the trace files and partial database entries, the *GbX* genes of *T. rubripes* and *D. rerio* are more than 4,390 bp and more than 47,200 bp, respectively (fig. 1). Because both genes are not complete in their intronic regions, these values are lower estimates. The coding regions of *S. tropicalis GbX* are scattered on different trace files that indicate a gene of less than 7,600 bp. The coding region of *T. nigroviridis GbX* covers 615 bp, and those of the other *GbX* genes cover 600 bp. Comparison of the *GbX* genes with the cDNA sequences shows that the coding regions of fish and amphibian *GbX* are distributed on five exons (fig. 1). Two of the introns are located at positions B12.2 (i.e., between the second and third base of the 12th codon in globin helix B) and G7.0, which are typical for vertebrate globins (fig. 2). Two other introns are present in positions E10.2 and H10.0.

The cDNAs translate into proteins of 200 (*S. tropicalis*) and 205 (*T. nigroviridis*) amino acids, with predicted molecular masses in the range of 23 kDa. Comparison of the deduced *GbX* protein sequences with other globins show that the globin fold, which covers about 140 to 150 amino acids of the standard α -helices A through H, is conserved (fig. 3). Because of extensions of about 25 to 30 amino acids at both the N-terminal and the C-terminal, the lengths of fish and amphibian *GbX* exceed that of the typical globins. Nevertheless, the key residues important for oxygen binding, such as the proximal and distal histidines in the position E7 and F8, as well as the phenylalanine at CD1, are strictly conserved. Computer predictions using the PSORT II program (Nakai and Horton 1999) indicate that the *GbX* proteins do not contain any signal peptide and are most likely localized in the cytoplasm.

Sequence Comparison and Phylogenetic Analyses of Vertebrate Globins

The *GbX* amino acid sequences of the pufferfish *T. nigroviridis* and the Cypriniformes (*D. rerio* and *C. auratus*) share about 69% of the amino acids and are about 89% similar considering isofunctional replacements (based on a PAM 250 matrix). Fish and amphibian globins are 54.5% to 59.4% identical. Ninety-eight residues are strictly conserved among all four *GbX* proteins. Within the 140-amino acid globin core, 90 amino acids are unchanged. The substitution rates within the fish *GbX* are 1.65×10^{-9} amino acid substitutions per site per year (table 1) and 0.63×10^{-9} if fish and amphibian *GbX* are compared (data not shown). When only the globin core regions are considered, the substitution rates are estimated

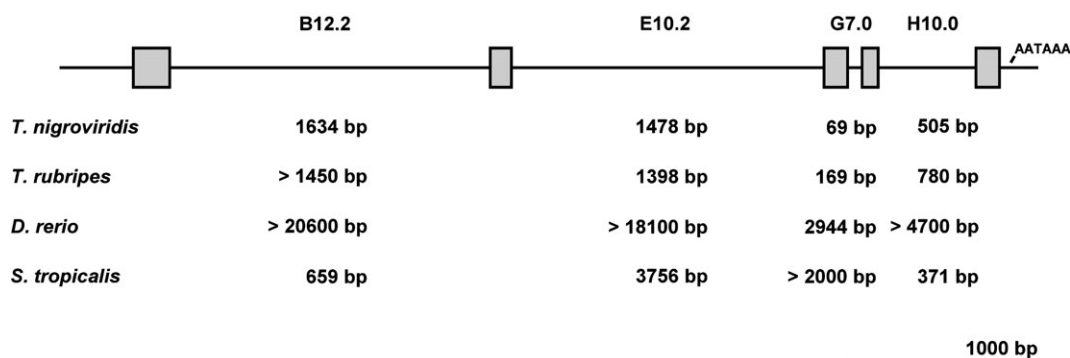


FIG. 1.—Genome structure of *GbX* genes. The intron positions and sizes are indicated. Introns are designated according to the positions in the globin structure (e.g., “B12.2” means codon position 2 within codon 12 of globin helix B). The size bar refers to the *T. nigroviridis* *GbX* gene.

to be about the half. Levels of selective constraints were measured by calculating the ds/dn ratios. These vary between 5.2 and 10.5 in the coding region of fish GbX and between 8.4 and 34.9 in the DNA sequences coding for the globin domain.

The GbX amino acid sequences were then included in an alignment of selected vertebrate and invertebrate globins (see *Materials and Methods*). Pairwise comparisons showed that GbX displays the highest degree of sequence similarity with the vertebrate Ngbs, with identity values ranging from 26.0% to 34.6%. Other globins have generally lower similarity scores. For example, the GbX proteins share 18% to 26% amino acids with vertebrate Mbs, 15% to 25% with vertebrate Hbs, and 22% to 26% with the cytoglobins. Various phylogenetic trees were constructed employing the neighbor-joining method and Bayesian inference. Because of the high divergence of the plant, fungal, and bacterial globins, these proteins cannot be used as out-group for rooting of the metazoan globin tree. In a radial phylogram, the GbX proteins consistently group with the vertebrate Ngbs, annelid intracellular globins (*Glycera* Hbs and the *Aphrodite* nerve Mb) and the *Ciona intestinalis* Hbs (fig. 4).

The monophyly of this branch (fig. 4, node “A”) received modest bootstrap support (43% and 48%) and reasonable Bayesian probability scores (0.83 and 0.78) and was recovered in all additional analyses employing other substitution matrices or additional metazoan globin sequences (data not shown). Together, they are strictly separated from the other metazoan globins, represented here by the protostomian globins from annelids and arthropods (node “C”) and by the other vertebrate globins, which include the Hb chains α and β , the Mbs and the Cygbs of the gnathostomian vertebrates, and the agnathan (hagfish and lamprey) Hbs (node “B”). Whereas the branch that comprises the protostomian globins is poorly supported, the monophyly of the vertebrate globins (excluding Ngb and GbX) was recovered with high probability scores in all analyses.

Expression of Globin X mRNA

Total RNA was extracted from nine selected goldfish tissues. Using RT-PCR with two pairs of specific GbX primers, weak GbX cDNA signals were detected in the

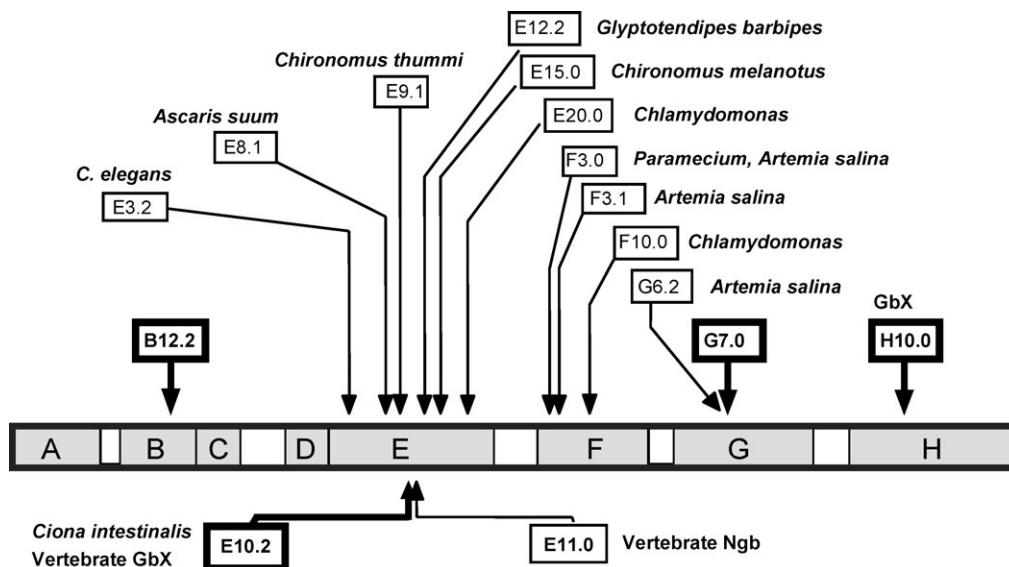


FIG. 2.—Distribution of introns in various metazoan globin genes, shown relative to the globin α -helices A to H. The bold boxes indicate the introns in the *GbX* genes.

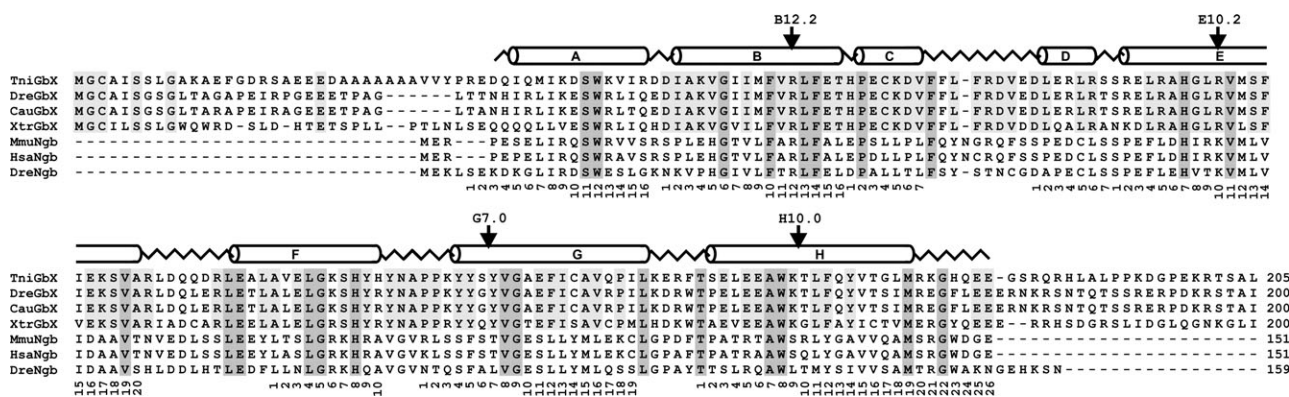


FIG. 3.—Comparison of GbX amino acid sequences from pufferfish (TniGbX), zebrafish (DreGbX), goldfish (CauGbX), and frog (XtrGbX) with Ngb from zebrafish (DreNgb), mouse (MmuNgb), and human (HsaNgb). The secondary structure of human neuroglobin is superimposed in the upper row, with α -helices designated A through H, the globin consensus numbering is given below the sequences. Strictly conserved amino acids are shaded in dark gray; residues conserved among GbX are shaded in light gray. The four intron positions in the *GbX* genes (i.e., B12.2, E10.2, G7.0 and H10.0) are indicated by arrows at the upper row.

gills, muscle, heart, gut, kidney, spleen, and liver (fig. 5). No detectable amplification products were observed in the eye and the brain RNA. Although these data do not allow a valid quantitative assessment of expression levels, the abundance of the GbX message appears to be generally low. This observation is corroborated by the available EST data from zebrafish. A single sequence (AL921870) was obtained from the EST database of 450,652 entries (as of February 2004) by Blast searches, whereas 11 entries are derived from Ngb, 31 from Cygb, 87 from Mb, and several hundred from the various Hb genes.

Discussion

For many years, globins have served as an important model for investigating protein and gene evolution, as well as species phylogeny (Graur and Li 2000). So far, four types of globins have been identified in vertebrates, with Ngb and Cygb being the most recent additions to the well-known Hbs and Mbs (Burmester et al. 2000, 2002; Burmester and Hankeln 2004). Ngb represents an ancient globin type related to invertebrate nerve globins and is thought to be involved in neuronal oxygen homeostasis (Burmester et al. 2000; Sun et al. 2001; Schmidt et al.

2003; Fuchs et al. 2004). Cygb shares a more recent common ancestry with Mb and might play a role in collagen synthesis (Nakatani et al. 2004; Schmidt et al. 2004). As we have shown here, a fifth globin type is present in fish and amphibians. This protein, named GbX, is not particularly related to the α and β Hb chains, the Mbs, or the Cygbs from fishes, amphibians, or any other vertebrate, as reflected by the low sequence similarities and the phylogenetic analyses (fig. 4). GbX is widely expressed in many but not all tissues, although its cellular distribution remains to be investigated. It should be emphasized that, despite its distant similarity to Ngb, GbX is not a primary neuronal protein, and, at least in goldfish, it is not expressed in neural tissues at all (fig. 5). At present, the function(s) of GbX remain uncertain. Nevertheless, GbX provides valuable clues for the evolution of globin proteins and genes.

Possible Loss of GbX in Amniota

In the present study, *GbX* sequences have been identified in fish and amphibians, suggesting that the emergence of this gene dates back to the time before the Tetrapoda diverged from the teleost fishes some 420 MYA (Benton 1990). Extensive database searches did not provide any evidence for the presence of GbX homologs in the available sequences of mammals and birds. Thus, the GbX gene has most likely been lost during the evolution of the Amniota.

Conserved and Divergent Features of GbX Protein and Genome Structures

Similar to Cygb (Burmester et al. 2002) and some invertebrate globins (Neuwald et al. 1997), the GbX proteins contain extensions at their N-terminals and C-terminals. No discernible similarity of these extensions to any known sequence in the databases has been found. The N-terminal parts are largely characterized by simple sequences, and in some *T. nigroviridis* GbX sequences, an indel of one amino acid was observed in the alanine-rich region (fig. 3). Short sequence duplications, possibly generated by replication

Table 1
Mean Substitution Rates in Selected Fish Globins

	Substitution rates ($\times 10^{-9}$)			
	Amino acids	dn	ds	ds/dn
Globin X	1.65	0.88	8.21	9.6
Globin X core	0.72	0.38	11.00	28.6
Neuroglobin	0.95	0.46	9.69	21.3
Cytoglobin	3.09	1.67	5.61	3.4
Hemoglobin α	4.02	2.13	6.00	2.8
Hemoglobin β	2.12	1.29	4.95	3.9
Myoglobin	1.55	0.75	5.25	7.0

NOTE.—Amino acid evolution rates were estimated according to the PAM model (Dayhoff, Schwartz, and Orcutt 1978), assuming that the lineages leading to the Ostariophysii (*D. rerio*; *C. auratus*) and Acanthopterygii (*T. nigroviridis*; *T. rubripes*) separated 120 MYA. Cytoglobin paralogs in fish (C. Fuchs, T. Burmester, and T. Hankeln, unpublished data) were treated separately. Corrected nonsynonymous (dn) and synonymous (ds) nucleotide substitutions per site were calculated by the method of Ota and Nei (1994). All rates are given as changes per site per year.

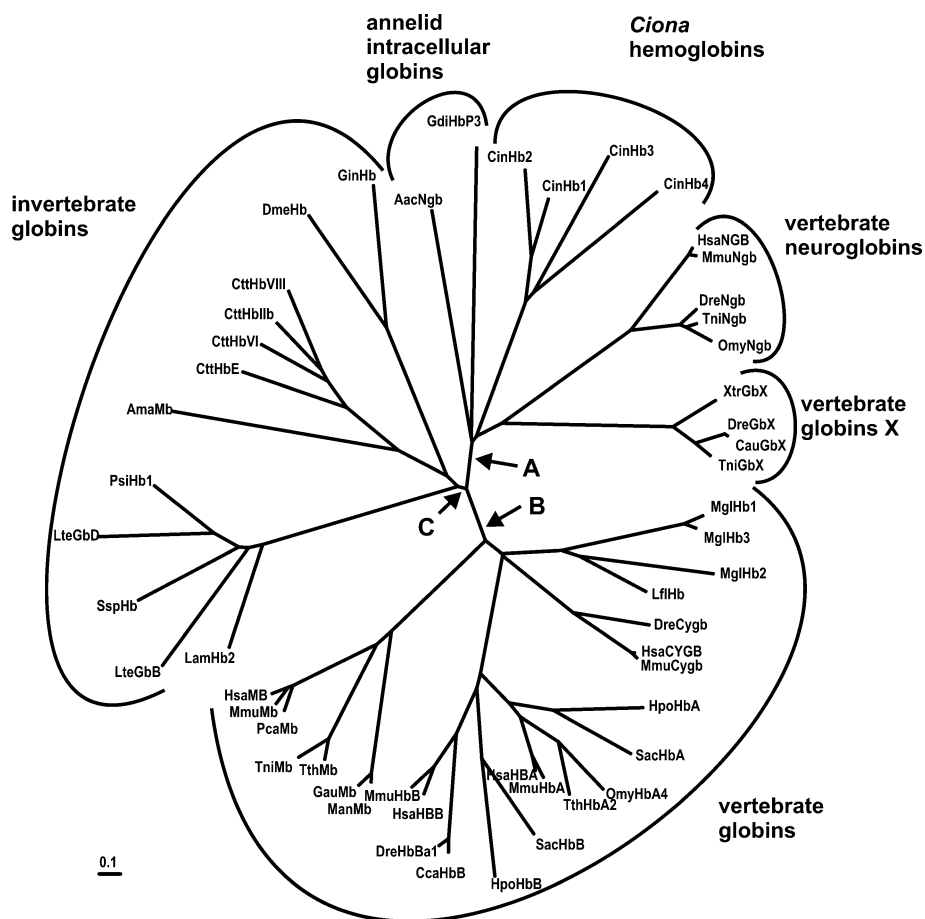


FIG. 4.—Neighbor-joining tree of selected animal globins, based on a WAG substitution matrix with gamma corrections of rates. See *Materials and Methods* for proteins and abbreviations. The numbers at the trees represent bootstrap support values; the bar equals 0.1 PAM distance. Neighbor-joining bootstrap support values of node “A” are 43% (PAM model) and 48% (WAG model), 68%/73% for node “B,” and 37%/33% for node “C.” Bayesian posterior probabilities for nodes “A” are 0.83 (PAM model) and 0.73 (WAG model), 1.00/1.00 for node “B,” and 0.58/0.48 for node “C.”

slippage, have also been noted in the N-terminal extension of mammalian Cygb genes (Burmester et al. 2002).

Patterns and rates of amino acid and nucleotide substitutions provide evidence of the levels of selective constraints that have shaped the GbX sequences. The overall amino acid substitution rates of GbX are in the range of 10^{-9} amino acid substitutions per site per year, similar to those of other vertebrate globins (Graur and Li 2000; Wystub et al. 2004). The globin core of GbX is highly conserved, with rates similarly low as those in Ngb and Cygb (cf. Wystub et al. 2004). Thus, the low similarity of GbX to other globins probably reflects an ancient divergence of GbX (see below) rather than enhanced evolutionary rates. Selective constraints may also be measured by the ds/dn ratios (Nei and Gojoberi 1986), which have been found to be highly variable among vertebrate globin genes (Wystub et al. 2004). Strong selective pressure on a coding region will favor synonymous nucleotide substitutions (ds) over nonsynonymous substitutions that lead to an amino acid replacement (dn) (table 1). While overall GbX ds/dn ratios are in the range of those of vertebrate hemoglobins and myoglobins (Wystub et al. 2004), the ratios in the globin core are par-

ticularly high. In summary, these observations indicate that strong purifying selection has been imposed on the globin core and, thus, has shaped GbX structure and most likely also its function.

As already noted for the other vertebrate globins (Wystub et al. 2004), a comparison of pufferfish (*T. nigroviridis*) and cyprinid (*D. rerio*; *C. auratus*) GbX sequences resulted in higher evolution rates than expected (e.g., from a comparison of fish and amphibian globins). Whereas on the one hand, replacement rates may be enhanced in the fish lineage, it is on the other hand conceivable that the divergence time of the Cypriniformes and pufferfishes assumed in this study (approximately 120 MYA [cf. Benton 1990; Wittbrodt, Shima and Schartl 2002]) is in fact an underestimate (Thomas and Touchman 2002). An earlier divergence of these taxa within the teleost fishes would of course explain the apparent higher substitution rates.

The GbX gene of the pufferfish *T. rubripes* is not complete, with parts of the first intron and the second exon missing in the databases. Nevertheless, the available genomic sequences of *T. rubripes* (Aparicio et al. 2002) allow the identification of the neighboring genes. The *T. rubripes* GbX gene is located on scaffold M000153,

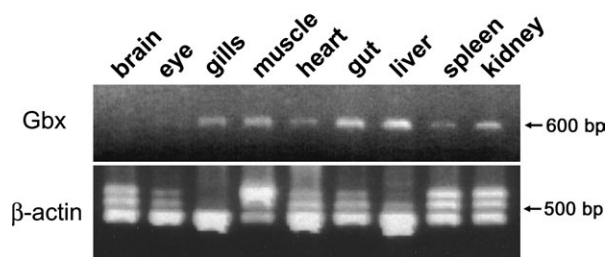


FIG. 5.—Analysis of Gbx expression. RNA was isolated from the indicated goldfish tissues. The expression of Gbx mRNA was determined by RT-PCR (upper row). β -actin mRNA was used as standard control of RNA concentration and integrity (lower row). Note that the multiple bands for β -actin mRNA derive from tissue-specific isoforms.

between the putative genes coding for hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 and phospholipase D3. The human orthologs of these genes are located on chromosomes 15q5 and 19q13.2, respectively, and neither these nor putative paralogous genes are associated with any globin locus in the human genome. Thus, the chromosomal position of *Gbx* is unlikely to be informative with respect to its chromosomal origin in an ancestral taxon.

Possible Evidence for Intron Sliding in Globins

Intron positions are considered as valuable clues for gene evolution, but the antiquity of introns within globin genes and their positional stability have been a matter of debate (e.g., Hankeln et al. 1997; Logsdon, Stoltzfus, and Doolittle 1998). The *Gbx* genes contain the “classical” globin introns at positions B12.2 and G7.0 (figs. 1–3). These two introns have been found in most vertebrate and invertebrate globins, including all known vertebrate hemoglobin, myoglobin, neuroglobin, and cytoglobin genes (Hardison 1996; Hankeln et al. 1997; Burmester et al. 2000, 2002) and are considered as phylogenetically ancient (Dixon and Pohajdak 1992; Hardison 1996). *Gbx* contains two additional introns. Whereas the intron in the H-helix (H10.0) is unique and, thus, has most likely been acquired after the divergence of Gbx from the other globins, the central intron in E10.2 of the *Gbx* gene requires attention. Introns in the E-helix have been found in various globin genes, although they are differentially positioned within this region (fig. 2). All four *C. intestinalis* Hb genes, which are distantly related to Gbx (fig. 4), also contain introns in position E10.2 (Ebner, Burmester, and Hankeln 2003). It is noteworthy that the vertebrate *Ngb* genes, which are the closest relatives of Gbx, have an intron in E11.0, which is, thus, shifted by 1 bp compared with the E10.2 position. Although it is possible that these introns arose from two independent insertion events, we must also consider the possibility of intron sliding (Rogers 1986; Stoltzfus et al. 1997). At present, a shift of intron-exon boundaries by 1 bp is not easy to explain, and no known mechanism—except for two coinciding independent mutation events (Stoltzfus et al. 1997)—exists that can readily bring about such an intron sliding event. However, given the close phylogenetic relationship of *Ngb*, Gbx and the *Ciona* Hbs (fig. 4), it is possible that the central intron in these genes actually

inserted early in evolution (likely in position E10.2), and that *Ngb* is in fact one of the few anecdotal examples of intron sliding (Rogozin, Lyons-Weiler, and Koonin 2000).

Two Families of Animal Globins?

The globin superfamily is widespread within the animal kingdom, and tracing of globin phylogeny would help to understand their functional evolution. At present, no out-group is available that would allow a reliable rooting of the phylogenetic tree of the metazoan globins. Moreover, regardless of the reconstruction method used, the resolution of the trees remains poor, as reflected by the low bootstrap support values and Bayesian posterior probabilities (fig. 4). This drawback is largely caused by the poor conservation of the globins over long evolutionary distances and the rather short sequences. Nevertheless, three major branches of animal globins were recovered (fig. 4). The first branch, at node “C,” comprises protostomian globins and the second branch (node “B”) comprises the vertebrate Hbs, Mbs, and Cygb proteins but not the *Ngb* and Gbx proteins. It is reasonable to assume that these two branches separated at the time of protostomian-deuterostomian divergence. By contrast, *Ngb* and Gbx are members of a third and more ancient globin branch that comprises proteins from both Protostomia and Deuterostomia (fig. 4, node “A”). Thus, the phylogenetic tree provides evidence that the last common bilaterian ancestor possessed at least two distinct globin genes: the ancestor at node “A” eventually gave rise to the vertebrate *Ngb* and Gbx proteins, the *C. intestinalis* Hbs, and the annelid intracellular globins, whereas the other ancestral gene was the predecessor of the metazoan globins of the clades “B” and “C.” However, at present there are no functional or structural features that clearly delineate these globin families. For example, pentacoordinated (e.g., vertebrate and *Glycera* Hbs) and hexacoordinated (e.g., neuroglobin and cytoglobin) globins occur in both families (Pesce et al. 2002; Burmester and Hankeln 2004), as well as Mb-type oxygen-storage proteins and Hb-type oxygen-transport proteins. This demonstrates the structural and functional flexibility of globins that is only beginning to be fully appreciated as genomic data of a broad variety of taxa becomes available.

Acknowledgments

A.R. and T.B. wish to thank J. Markl for excellent working facilities. This work is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bu 956/5 and Ha2103/3) and in part by the EU (QLG3-CT-2002-01548).

Literature Cited

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
- Aparicio, S., J. Chapman, E. Stupka et al. (41 co-authors). 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*. **297**:1301–1310.
- Benton, M. J. 1990. Vertebrate paleontology. Unwin Hyman Ltd., London.

- Burmester, T. and T. Hankeln. 2004. Neuroglobin: A respiratory protein of the nervous system. *News Physiol. Sci.* **19**:110–113.
- Burmester, T., B. Ebner, B. Weich, and T. Hankeln. 2002. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* **19**:416–421.
- Burmester, T., B. Weich, S. Reinhardt, and T. Hankeln. 2000. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**:520–523.
- Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**:5294–5299.
- Dayhoff, M. O., R. M. Schwartz, and B. C. Orcutt. 1978. A model of evolutionary change in proteins. Pp. 345–352 in Dayhoff, M. O., ed. *Atlas of protein sequence structure*, Vol. 5, Supplement 3. National Biomedical Research Foundation, Washington, DC.
- Dickerson, R. E., and I. Geis. 1983. Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology. Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, Calif.
- Dixon, B., and B. Pohajdak. 1992. Did the ancestral globin gene of plants and animals contain only two introns? *TIBS* **17**:486–488.
- Ebner, B., T. Burmester, and T. Hankeln. 2003. Globin genes are present in *Ciona intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* **20**:1521–1525.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
- . 2004. PHYLIP (phylogeny inference package). Version 3.6b. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Flögel, U., M. W. Merx, A. Goedecke, U. Decking, and J. Schrader. 2001. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:735–740.
- Freitas, T. A., S. Hou, E. M. Dioum, J. A. Saito, J. Newhouse, G. Gonzalez, M. A. Gilles-Gonzalez, and M. Alam. 2004. Ancestral hemoglobins in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:6675–6680.
- Fuchs, C., V. Heib, L. Kiger, M. Haberkamp, A. Roesner, M. Schmidt, D. Hamdane, M. C. Marden, T. Hankeln, and T. Burmester. 2004. Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **279**:24116–24122.
- Gardner, P. R., A. M. Gardner, L. A. Martin, and A. L. Salzman. 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10378–10383.
- Graur, D., and W.-H. Li. 2000. *Fundamentals of molecular evolution*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Hankeln, T., H. Friedl, I. Ebersberger, J. Martin, and E. R. Schmidt. 1997. A variable intron distribution in globin genes of *Chironomus*: evidence for recent intron gain. *Gene* **205**:151–160.
- Hardison, R. C. 1996. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5675–5679.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**:754–755.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist, R. Nielsen, and J. P. Bollback. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* **294**:2310–2314.
- Kawada, N., D. B. Kristensen, K. Asahina, K. Nakatani, Y. Minamiyama, S. Seki, and K. Yoshizato. 2001. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* **276**:25318–25323.
- Kleinschmidt, T., and R. E. Weber. 1998. Primary structures of *Arenicola marina* isomyoglobins: molecular basis for functional heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**:55–62.
- Logsdon, J. M., A. Stoltzfus, and W. F. Doolittle. 1998. Molecular evolution: recent cases of spliceosomal intron gain? *Curr. Biol.* **8**:R560–563.
- Minning, D. M., A. J. Gow, J. Bonaventura, R. Braun, M. Dewhirst, D. E. Goldberg, and J. S. Stamler. 1999. Ascaris haemoglobin is a nitric oxide-activated ‘deoxygenase’. *Nature* **401**:497–502.
- Nakai, K., and P. Horton. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**:34–36.
- Nakatani, K., H. Okuyama, Y. Shimahara, S. Saeki, D. H. Kim, Y. Nakajima, S. Seki, N. Kawada, and K. Yoshizato. 2004. Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab. Invest.* **84**:91–101.
- Nei, M., and T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**:418–426.
- Neuwald, A. F., J. S. Liu, D. J. Lipman, and C. E. Lawrence. 1997. Extracting protein alignment models from the sequence database. *Nucleic Acids Res.* **25**:1665–1677.
- Nicholas, K. B., and H. B. Nicholas Jr. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>.
- Ota, T., and M. Nei. 1994. Variance and covariances of the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions per site. *Mol. Biol. Evol.* **11**:613–619.
- Pesce, A., M. Bolognesi, P. Ascenzi, A. Bocedi, S. Dewilde, L. Moens, T. Hankeln, and T. Burmester. 2002. Neuroglobin and cytoglobin: fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep.* **3**:1146–1151.
- Rogers, J. H. 1986. Introns between protein domains: selective insertion or frameshifting? *Trends Genet.* **2**:223.
- Rogozin, I. B., J. Lyons-Weiler, and E. V. Koonin. 2000. Intron sliding in conserved gene families. *Trends Genet.* **16**:430–432.
- Ruud, J. T. 1954. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. *Nature* **173**:848–850.
- Schmidt, M., A. Giessler, T. Laufs, T. Hankeln, U. Wolfgram, and T. Burmester. 2003. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J. Biol. Chem.* **278**:1932–1935.
- Schmidt, M., F. Gerlach, A. Avivi et al. (11 co-authors). 2004. Cytoglobin is a respiratory protein expressed in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **279**:8063–8069.
- Sidell, B. D., M. E. Vayda, D. J. Small, T. J. Moylan, R. L. Londraville, M. L. Yuan, K. J. Rodnick, Z. A. Eppley, and L. Costello. 1997. Variable expression of myoglobin among the hemoglobinless Antarctic icefishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3420–3424.
- Sowa, A. W., S. M. G. Duff, P. A. Guy, and R. D. Hill. 1998. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10317–10321.
- Stoltzfus, A., J. M. Logsdon Jr, J. D. Palmer, and W. F. Doolittle. 1997. Intron “sliding” and the diversity of intron positions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10739–10744.
- Strimmer, K., and A. von Haeseler. 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**:964–969.
- Sun, Y., K. Jin, X. O. Mao, Y. Zhu, and D. A. Greenberg. 2001. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:15306–15311.

- Thomas, J. W., and J. W. Touchman. 2002. Vertebrate genome sequencing: building a backbone for comparative genomics. *Trends. Genet.* **18**:104–108.
- Trent, J. T. 3rd, and M. S. Hargrove. 2002. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **277**:19538–19545.
- Weber, R. E., and S. N. Vinogradov. 2001. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol. Rev.* **81**:569–628.
- Whelan, S., and Goldman, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**:691–699.
- Wittbrodt, J., A. Shima, and M. Schartl. 2002. Medaka—a model organism from the far east. *Nat. Rev. Genet.* **3**:53–64.
- Wittenberg, J. B. 1992. Functions of cytoplasmatic hemoglobins and myohemerythrin. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **13**:60–85.
- Wittenberg, J. B., and B. A. Wittenberg. 2003. Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* **206**:2011–2020.
- Wystub, S., B. Ebner, C. Fuchs, B. Weich, T. Burmester, and T. Hankeln. 2004. Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet. Genome Res.* **105**: 65–78.

Dan Graur, Associate Editor

Accepted April 6, 2004

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

Thomas Hankeln^{a,*}, Bettina Ebner^a, Christine Fuchs^a, Frank Gerlach^a,
Mark Haberkamp^b, Tilmann L. Laufs^a, Anja Roesner^b, Marc Schmidt^b,
Bettina Weich^a, Sylvia Wystub^a, Sigrid Saaler-Reinhardt^c, Stefan Reuss^d,
Martino Bolognesi^e, Daniele De Sanctis^e, Michael C. Marden^f, Laurent Kiger^f,
Luc Moens^g, Sylvia Dewilde^g, Eviatar Nevo^h, Aaron Avivi^h, Roy E. Weberⁱ,
Angela Fagoⁱ, Thorsten Burmester^b

^a Institute of Molecular Genetics, Johannes Gutenberg University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

^b Institute of Zoology, Johannes Gutenberg University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

^c Institute of Genetics, Johannes Gutenberg University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

^d Department of Anatomy, Johannes Gutenberg University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

^e Department of Physics-INFM and Center for Excellence in Biomedical Research, University of Genova, I-16146 Genova, Italy

^f INSERM U473, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France

^g Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, B-2610 Antwerp, Belgium

^h Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel

ⁱ Department of Zoophysiology, Aarhus University, DK-8000 Aarhus C, Denmark

Received 4 April 2004; received in revised form 1 October 2004; accepted 24 October 2004

Available online 30 November 2004

Abstract

Neuroglobin and cytoglobin are two recent additions to the family of heme-containing respiratory proteins of man and other vertebrates. Here, we review the present state of knowledge of the structures, ligand binding kinetics, evolution and expression patterns of these two proteins. These data provide a first glimpse into the possible physiological roles of these globins in the animal's metabolism. Both, neuroglobin and cytoglobin are structurally similar to myoglobin, although they contain distinct cavities that may be instrumental in ligand binding. Kinetic and structural studies show that neuroglobin and cytoglobin belong to the class of hexa-coordinated globins with a biphasic ligand-binding kinetics. Nevertheless, their oxygen affinities resemble that of myoglobin. While neuroglobin is evolutionarily related to the invertebrate nerve-globins, cytoglobin shares a more recent common ancestry with myoglobin. Neuroglobin expression is confined mainly to brain and a few other tissues, with the highest expression observed in the retina. Present evidence points to an important role of neuroglobin in neuronal oxygen homeostasis and hypoxia protection, though other functions are still conceivable. Cytoglobin is predominantly expressed in fibroblasts and related cell types, but also in distinct nerve cell populations. Much less is known about its function, although in fibroblasts it might be involved in collagen synthesis. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Neuroglobin; Cytoglobin

1. Globins: vertebrate novices add complexity to the family

Globins are small globular metalloproteins typically consisting of about 150 amino acids and comprising

* Corresponding author. Tel.: +49 6131 39 23277; fax: +49 6131 39 24585.

E-mail address: hankeln@uni-mainz.de (T. Hankeln).

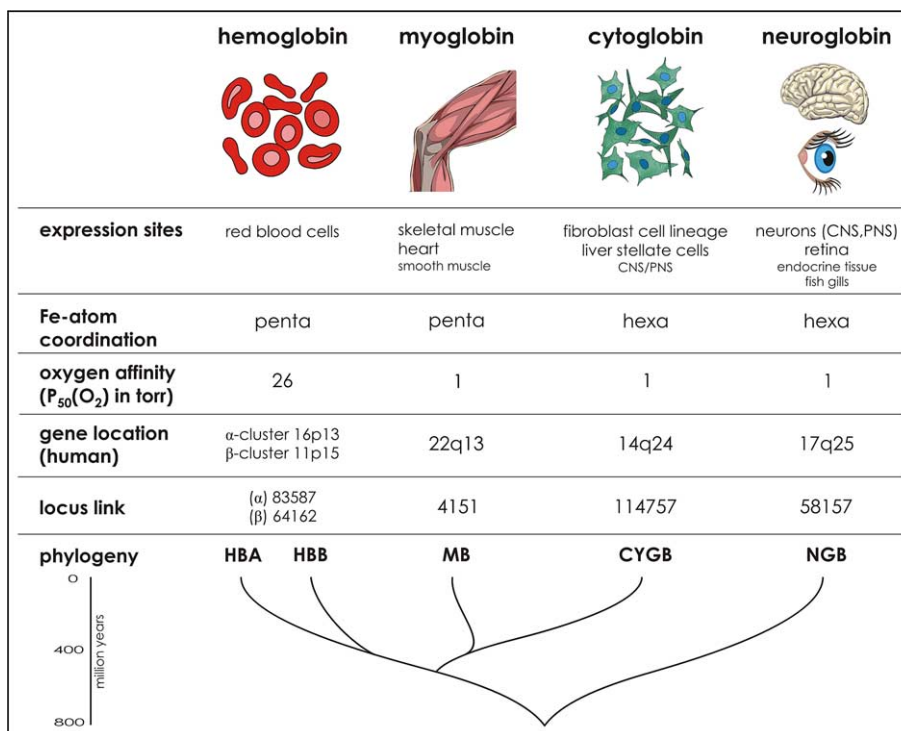


Fig. 1. Characteristics of vertebrate globins. The graphic summarizes selected expressional, biochemical and phylogenetic features of vertebrate globin types. More information can be retrieved under the ‘locus link’ numbers at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>.

eight α -helical segments (named A–H) that display a characteristic 3-over-3 α -helical sandwich structure. This conserved ‘globin fold’ identifies them as members of the globin protein superfamily [1–3], which also comprises truncated versions whose globin fold consists of only four α -helices [4]. Globins contain a heme prosthetic group (Fe-protoporphyrin IX), by which they can reversibly bind gaseous ligands like O₂, CO and NO. Most known globins fulfil respiratory functions, supplying the cell with adequate amounts of O₂ for aerobic energy production via the respiratory chain [5–7]. They are phylogenetically ancient molecules whose intricate adaptive evolution is demonstrated by their widespread occurrence in bacteria, fungi, plants, invertebrate and vertebrate animals [8]. In man and other vertebrates, the heterotetrameric hemoglobin (Hb) is located in red blood cells and transports O₂ from the respiratory organs to the tissues via the circulatory system, and CO₂ (at the N-terminal amino groups of the protein chains) in the reverse direction [5]. The monomeric vertebrate myoglobin (Mb) is present in cardiac and striated muscle, where it acts as a local O₂ store and probably facilitates intracellular diffusion of O₂ to the mitochondria [7,9]. In addition, Mb has an important function as a dioxygenase, converting potentially harmful NO radicals into innocuous nitrate [10]. With exciting data like these, globins continue to be amongst the best-studied cases in terms of structure, function and evolution in the world of protein families.

A few years ago, intrigued by the discovery of unexpected globins in the insect model organism *Drosophila* [11,12], we set out to systematically search human and mouse genome project sequence databases for the presence of novel, additional globins in vertebrates. First found was neuroglobin (Ngb), a globin predominantly expressed in nervous tissue [13]. Shortly after that, a fourth vertebrate globin type was described independently by three groups [14–16] and is now officially named cytoglobin (Cygb), based on its widespread expression in mammalian tissues. These findings add considerable complexity to our view on O₂ metabolism in the vertebrate cell and may have substantial biomedical implications. The review is intended to summarize the structural, gene expressional and functional data on Ngb and Cygb available until November 2004 (Fig. 1), thereby providing perspectives for future research on these molecules.

2. Neuroglobin: the distantly related cousin on our nerves

2.1. Protein structure and ligand binding

Ngb is a substantially divergent member of the globin family, displaying only 20–25% amino acid sequence identity to Mbs and Hbs [13, Fig. 2]. Ngb represents a typical Mb-type monomeric globin, which

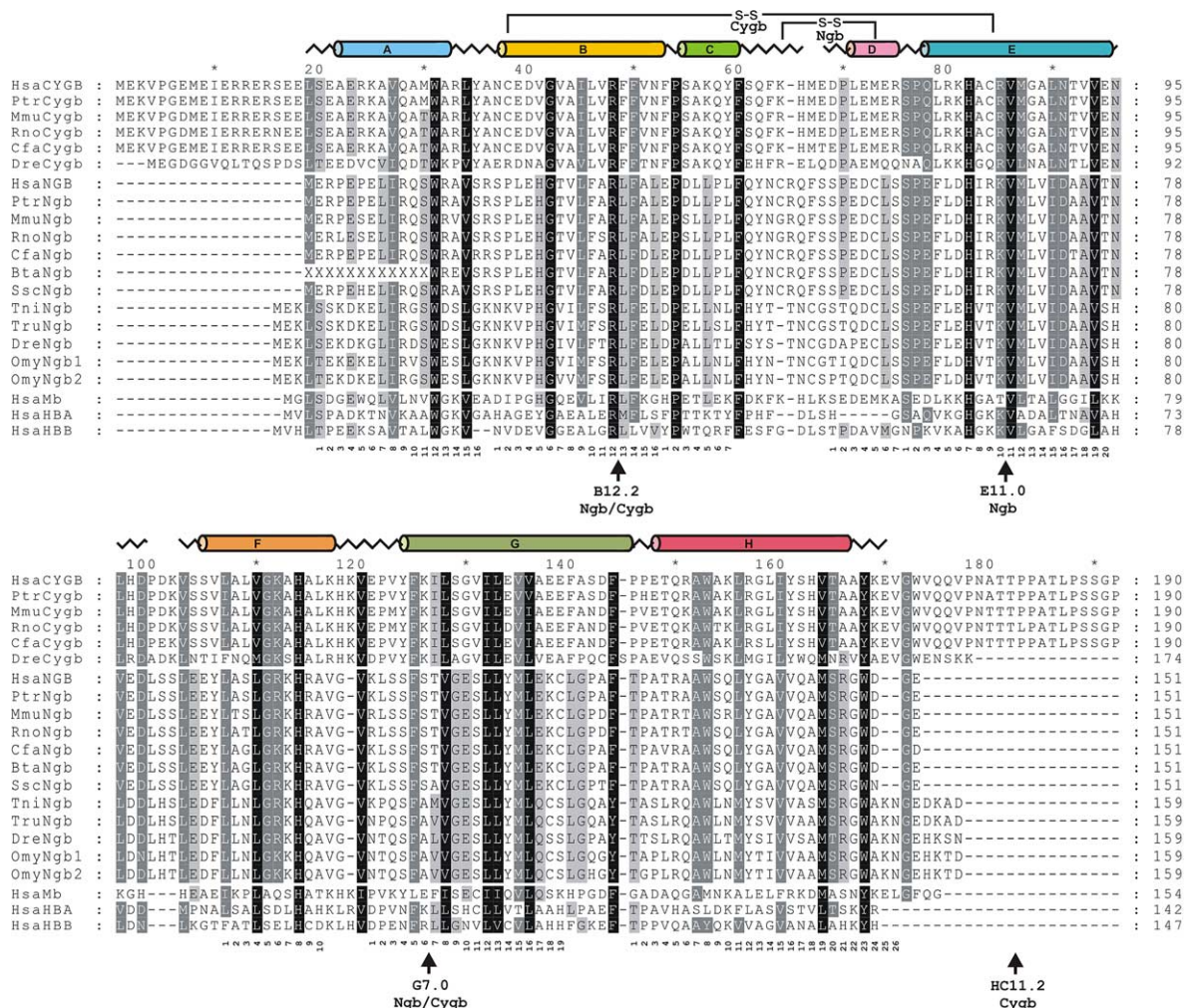


Fig. 2. Amino acid sequence alignment of Ngb and Cygb sequences from various vertebrate species, compared with human hemoglobin alpha and beta chains and human myoglobin. Amino acid positions are shaded to indicate conserved residues. Cysteine residues in Ngb and Cygb, possibly engaging in disulfide bond formation (see text), are linked by brackets. The intron positions found in Ngb and Cygb genes are indicated by arrows (B12.2, e.g., means that the intron is found between positions 2 and 3 in the 12th codon of helix B). The species abbreviations are: Hsa, *Homo sapiens*; Ptr, *Pan troglodytes*; Mmu, *Mus musculus*; Rno, *Rattus norvegicus*; Cfa, *Canis familiaris*; Bta, *Bos taurus*; Ssc, *Sus scrofa*; Tni, *Tetraodon nigroviridis*; Tru, *Takifugu rubripes*; Dre, *Danio rerio* and Omy, *Onchorhynchus mykiss*.

can bind O_2 reversibly [13,17,18]. In spite of its sequence differences, Ngb features the conserved globin fold consisting of the eight α -helices A–H, albeit with some peculiarities which reflect a pronounced adaptive potential of this basic globin structure (Fig. 3). The crystal structure of human NGB [19] has recently been solved, revealing the presence of unusual protein cavities which are not found as such in Hb and Mb and which may influence ligand storage and diffusion paths inside the molecule. The most peculiar structural characteristic of Ngb is the so-called ‘hexa-coordinated’ binding scheme of the heme Fe atom in the ferrous (Fe^{2+}) deoxy and in the ferric (Fe^{3+}) states (Fig. 3). The crystallographic data have ultimately confirmed several types of spectroscopic analyses [13,17,20–24], showing that in the absence of external ligands, the histidine at position 7 of the E helix (HisE7) binds the

heme iron at its sixth, distal position. Thereby, any external gaseous ligand such as O_2 or CO has to compete with the internal His(E7) ligand for Fe binding. This produces a biphasic ligand-binding kinetics for Ngb: the displacement of the His(E7) is the rate-limiting, slow step, while the inherent affinity of the Fe atom after His(E7) displacement is high and makes the gaseous ligand-binding step fast [17,25]. Heme hexa-coordination has previously been reported in plant, bacteria and invertebrate globins [26], and although this widespread occurrence may suggest a conserved function, its physiological significance is not yet understood. Recent kinetic studies show that even slight variations in pH may cause pronounced changes in the association rates of exogenous ligands in Ngb [27]. On the other hand, hexa-coordination in Ngb and other globins may render the process of exter-

nal ligand binding relatively independent of temperature variations [unpublished data], which might be physiologically relevant under conditions of fluctuating body temperatures, e.g., in poikilothermic animals. Another effect of hexa-coordination may be a protection of the Fe^{3+} iron atom against various oxidizing molecules, which seems to suppress the formation of cytotoxic ferryl (Fe^{4+})-heme [28].

Despite the complex ligand-binding scheme, the overall O_2 -affinity of mammalian and of fish Ngb is in the range of 1 Torr [13,17,25,29], which is similar to the O_2 affinity of Mb. Recently, it was found that human NGB is able to form an internal disulfide bridge at cysteines CD7 and D5 in vitro (see Fig. 2) [18], which may break up under reducing conditions in the cell, e.g., when NADH^+ reduction equivalents accumulate under hypoxia. Reduction of the disulfide bond in turn lowers the O_2 affinity of Ngb by a factor of 10, which would lead to a release of O_2 and thus, possibly, an attenuation of hypoxic stress. It is not yet clear if this mechanism is acting in vivo: while fish Ngbs possess two cysteines at roughly equivalent positions, rodent Ngbs lack the CD7 cysteine (cf. Fig. 2).

With regard to globin function (see below), it is essential to investigate the possibility of Ngb binding to ligands other than O_2 , namely the noxious reactive oxygen and nitrogen species, which accumulate in the

cell, e.g., after ischemic insult and subsequent reperfusion of the tissue [30]. EPR (electron paramagnetic resonance) and kinetic studies revealed that the binding affinity of the reactive nitric oxide (NO) to Ngb- Fe^{2+} is relatively low compared to penta-coordinate Hbs and Mbs, which is due to protection of the Fe^{2+} by the internal His(E7) ligand [31]. Under an excess of NO, however, Ngb- Fe^{2+} -NO may readily form and scavenge peroxynitrite, a harmful oxidizing molecule generated under ischemic conditions [28].

2.2. Phylogeny

Ngb sequences are now known for a broad variety of mammalian and fish species (Fig. 2 and unpublished data) [13,29,32,33]. Our recent finding of putative Ngb orthologs in frogs and chicken strongly indicates its conserved presence in all vertebrate taxa (unpublished data). Phylogenetic reconstructions show that Ngb resembles nerve globins that have been found in some invertebrate species [13]. Recent results have shown the existence of a fifth globin type in lower vertebrates (unpublished data). Together with Ngb, invertebrate nerve and other intracellular globins, and the *Ciona intestinalis* globins [34], this novel globin of presently unknown function defines a distinct branch of the globin phylogenetic tree. Thus, Ngb is representative of an

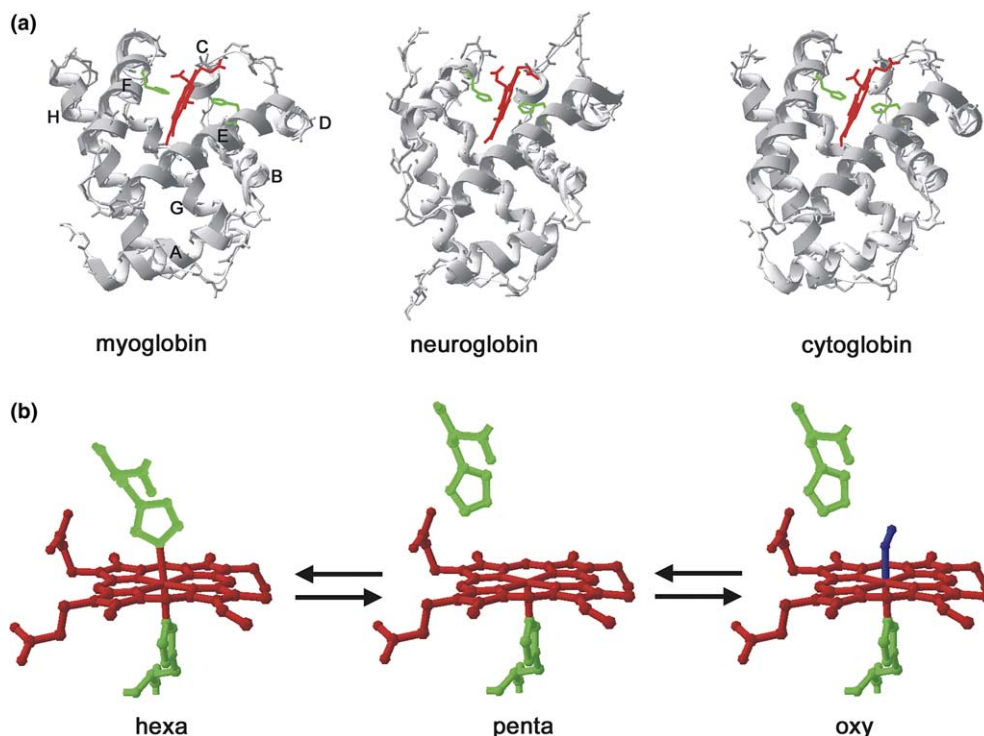


Fig. 3. (a) 3-D protein structure of human MB (PDB accession number: 2MM1), NGB (1OJ6) and Cygb (1UMO). In MB, the eight alpha-helices are designated A through H. Note that the globin fold is conserved in all three proteins. (b) Schematic scheme of globin hexa-coordination. The equilibrium of the hexa- and penta-coordinated form is the rate limiting step in ligand binding for Ngb and Cygb. Colors: red, heme group; green, interacting histidines; blue, oxygen ligand.

old globin lineage, which already existed before the separation of Protostomia and Deuterostomia more than 600 million years ago (Fig. 1). Ngb sequence conservation during mammalian evolution has been especially high, pointing to a strongly selected, important function. Evolutionary rate calculations show that mammalian Ngb evolves approximately 3-fold slower than Mb and Hb [35].

2.3. Gene expression patterns

Since the initial discovery of Ngb mRNA in the mammalian brain [13], several studies have confirmed the widespread expression of both, Ngb mRNA and protein, in nerve cells of the central and peripheral nervous system in mammals [32,36–39]. Ngb is exclusively expressed in the cytoplasm of neurons, but not in glia, which may be explained by the presence of candidate neuron-restrictive silencer elements in the Ngb gene region [38,40]. In some studies [36,39], virtually all neurons appear to be Ngb-positive, albeit at regionally substantially different expression intensities. These varying expression levels reconcile these data with other studies that have reported a more focal expression pattern of Ngb [37,38]. Recent mRNA in situ hybridization studies in the zebrafish (*Danio rerio*) revealed a global pattern of Ngb expression in the fish brain [29].

In addition to the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system (PNS), mammalian Ngb is expressed in endocrine tissues such as the adenohypophysis, adrenal gland, testes [36] and the pancreatic islets of Langerhans [38]. Like neurons, these cell-types are known to be metabolically highly active, which appears to be a general feature of Ngb expression sites.

While the average Ngb protein content in total mouse brain has been estimated to be rather low (ca. 1 μM ; [13]), we found that the retina of the mammalian eye is a major site of Ngb expression [41]. Local retinal Ngb concentrations in mouse amount to an estimated 100 μM , which is almost equivalent to Mb content in muscle cells. Ngb is found in the plexiform cell layers and in the inner segments of the photoreceptors, which again coincides with regions of high metabolism and O_2 demand. Retinal Ngb expression has recently been confirmed in the zebrafish [29]. In *Danio*, we noticed an additional Ngb expression site, namely the chloride cells of the gills, which are known to sustain high metabolic rates during regulation of osmolarity.

2.4. Gene regulation and medical implications

Given that Ngb may be instrumental in sustaining cellular O_2 levels, it is mandatory to study its regulation under conditions of hypoxic and ischemic stress.

In cultured rat cortical neurons, Ngb mRNA and protein were shown to be upregulated maximally 2.5-fold after 16 h of anoxia [42]. Admittedly, cell culture hypoxia experiments should be interpreted critically, since the ‘hypoxic’ conditions achieved in the cell incubator may in reality merely reflect physiological O_2 tensions normally present in tissues like the brain [43]. Other authors [37] did not find any upregulation of Ngb mRNA in brains in vivo after prolonged (up to 14 days) exposure of mice to moderate hypoxia (10% O_2). Our preliminary hypoxia experiments appear to confirm a lack of pronounced upregulation [unpublished data]. Clearly, the results on Ngb regulation by hypoxic stress need to be further substantiated. At this moment, the data can at best be taken to indicate a mild short-term response of Ngb to hypoxic stress. Interestingly, bioinformatical sequence evaluations [35] reveal that the Ngb genes in mammals lack conserved hypoxia-responsive sequence elements, which also argues against a strong transcriptional hypoxia response of Ngb mediated by the hypoxia-inducible ‘master’ transcription factor HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1). However, the moderate hypoxia response of Ngb in cell culture was reported to be dependent on the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway [44], which is known to interact with the HIF-pathway via the recruitment of p300/CREB transcriptional co-activator. In addition to hypoxia, Ngb seems to be moderately upregulated in cell cultures by the addition of hemin, the ferric chloride salt of heme, which is already known to transcriptionally activate Mb and Hb [44]. This response of Ngb seems to proceed via the soluble guanylate cyclase-protein kinase G (sGC-PKG) signal transduction pathway.

In the mouse immortalized hippocampal cell line HN33, antisense-mediated downregulation of Ngb leads to decreased levels of cell survival under hypoxia, while overexpression of Ngb in the same cells improves cell survival. This finding suggests that Ngb may exert some protective effect under hypoxic stress in the nervous system [42]. It is not clear, however, if neuroprotection is due to an O_2 supply function of Ngb or some other function, like the binding of noxious reactive oxygen species (see below). Recently, it was reported that Ngb is also able to promote neurogenic survival in vivo [45]: in rat, intracerebral administration of an Ngb antisense oligodeoxynucleotide increases infarct size by 2-fold and worsens neurological outcome after an induced focal ischemia. In turn, an adeno-associated-virus (AAV)-mediated Ngb overexpression ameliorates ischemic pathology [45]. These studies indicate that Ngb is a candidate target for diagnosis and, possibly, therapy of stroke and of neurodegenerative disorders, which are known to be associated with hypoxia or increased levels of reactive oxygen species.

3. Cytoglobin: myoglobin's elusive brother

3.1. Protein structure and ligand binding

Cygb shares about 30% amino acid sequence identity with Mb, pointing at a shared evolutionary ancestry [14–16]. Compared to Mb, mammalian Cygb is unusually long, containing 190 amino acids owing to extensions of about 20 amino acids at both, the N- and the C-terminus (Fig. 2). Part of the N-terminal extension may be explained by sequence motif duplication, while the C-terminal extension partly derives from a small additional exon, which has been recruited during mammalian evolution and is lacking in fish Cygb sequences (Fig. 2). Irrespective of these functionally elusive terminal extensions, which are also observed in some invertebrate globins, Cygb features the sequence hallmarks of a standard globin, e.g., the key residues Phe(CD1), His(E7) and His(F8). The crystal structure [46] ultimately proves that the Cygb core folds as a classic globin. Unfortunately, however, no interpretable electron density data were obtained for the extended Cygb termini. In agreement with spectroscopic data [16,47], the crystal structure proves that Cygb is also a hexa-coordinated globin (Fig. 3). Moreover, Cygb displays an unprecedented large apolar protein matrix cavity next to the heme, which is connected to the exterior and may provide a special 'ligand tunnelling' pathway [46,48].

Ligand-binding kinetics of Cygb are – as in the case of Ngb – determined by the comparatively slow phase of displacing the internal His(E7) ligand, before an external gaseous ligand can then rapidly bind to the iron atom [25,26]. The resultant O₂ affinity of Cygb is also in the range of 1 Torr [16,18]. As shown for Ngb, Cygb is able to form an internal disulfide bridge (albeit at different positions, between Cys(B2) and Cys(E9); cf. Fig. 2). Reduction of this bond lowers O₂ affinity of Cygb only moderately, by about 2-fold [18]. While there is no evidence for intermolecular disulfide bonds, biochemical and crystallographic data suggest that full-length Cygb might act as a homodimeric protein, while the truncated form is monomeric [18,46].

3.2. Phylogeny

Reconstructions of globin phylogeny confirmed that Cygb is distantly related to vertebrate Mbs (Fig. 1), with which it may have shared a common ancestor before the split of jawless and jawed vertebrates about 450 million years ago [15]. Independent evidence for this proposed 'relationship by gene duplication' comes from human genome data, showing that Cygb on chromosome 17q25 and Mb on chromosome 22q12 are both parts of paralogous gene groups which have been formed by an ancient large-scale duplication event [49]. Cygb se-

quences are known from various vertebrates including man, mouse, rat and zebrafish [14–16,50]. We have recently identified Cygb homologues in chicken, in several fish species like Medaka and pufferfishes and in amphibians [unpublished data], which substantiates our evolutionary scenario. In some taxa, we have obtained evidence for independently duplicated Cygb genes, making the evolution of this globin type rather complex. Cygb is very slowly evolving in mammals, and is even slightly more conservative than Ngb [35], which indirectly points towards a strongly selected function.

3.3. Gene expression patterns

Cytoglobin mRNA was originally detected by Northern blot hybridization in essentially all tissues of the mammalian body, indicating a very widespread expression pattern [15,16]. At the same time, the rat ortholog of Cygb was independently isolated by a proteomics approach from the fibroblast-related stellate cells of the liver (and it was therefore dubbed 'stellate cell activation-associated protein' STAP) [14,50]. Subsequently, it was reported that Cygb protein is localized exclusively within the cell nuclei in a wide variety of tissues [38]. Two recent studies have re-investigated the expression pattern of Cygb [51,52]. Using independently derived antibodies, both report that Cygb is cytoplasmatically expressed in fibroblasts and fibroblast-related cell types in a broad variety of splanchnic organs like liver, heart, muscle, gut, kidney, lung and pancreas. The earlier publications on the presence of Cygb (synonym STAP) in the fibroblast-like hepatic stellate cells were therefore confirmed. In addition, Cygb expression was also detected in bone osteoblasts and in tracheal chondroblasts, but not in mature osteocytes and chondrocytes [51]. In summary, the data by the majority support the specific expression of Cygb in the cytoplasm of cells that are actively engaged in the production of extracellular matrix components in visceral organs. Adding complexity to the Cygb expression pattern, our results suggest that Cygb is also expressed in specific, but ill-defined neuronal cell populations in the brain, as well as in peripheral nerve cells [51]. Here, Cygb immunostaining yielded signals in both, the cytoplasm and the nucleus, possibly pointing at a specific role of Cygb in nervous tissues.

3.4. Gene regulation and medical implications

Cygb was originally described as a protein that is upregulated in activated, fibroblast-like hepatic stellate cells during liver fibrosis, and recent data demonstrate Cygb expression in stellate cells of fibrotic pancreas tissue during pancreatitis and in fibroblast-like cells from necrotic regions in the kidney after diet-induced chronic nephropathy in rats [14,52]. In primary cultures of rat hepatic stellate cells, Cygb expression is slightly aug-

mented by addition of recombinant transforming growth factor β (TGF β) and platelet-derived growth factor-B (PDGF-B), serum factors, which accelerate stellate cell activation [52]. Addition of protein kinase inhibitors suggests that Cygb may be regulated via a protein kinase C (PKC)-dependent signal transduction pathway.

When NIH 3T3 fibroblast cells were transfected with a Cygb expression construct and, subsequently, collagen $\alpha 1$ (I) synthesis was induced by TGF β , a substantial enhancement of collagen production was observed in the Cygb-transfected cells as compared to non-Cygb-expressing wild-type 3T3 cells [52]. This result suggests a stimulatory, yet undefined role of Cygb in collagen expression, a finding that is corroborated by the shut-down of Cygb expression during osteoblast and chondroblast maturation [51]. By exposing mice to hypoxic conditions, we have shown that Cygb is upregulated 2- to 3-fold in heart and liver [51], which is in good agreement with the presence of conserved hypoxia-responsive sequence elements in the Cygb gene region [35]. Acute tissue hypoxia is a stimulatory signal in processes like osteogenesis, chondrogenesis and wound healing [53,54], in which collagens are massively produced, thereby possibly creating a link between the above observations on Cygb regulation. In summary, Cygb may have substantial biomedical impact due to its involvement in organ fibrosis and in the production of extracellular matrix collagens during normal tissue development and fibrotic pathogenesis.

4. Two globins in search of their role in the family (and in the cell)

Theoretically, and partly in analogy to other globins, we can consider several possible cellular functions for Ngb and Cygb (Fig. 4) and discuss them in light of the currently available data:

- (a) As with Mb and many other Mb-type molecules, both novel globins could either *store* O_2 or *assist in the diffusion of* O_2 within the cell towards the mitochondria [7].
- (b) Both globins could function as *oxygen sensor* proteins, which have been well-studied in bacteria [55]. Alternatively, they could be involved in other intracellular signalling pathways.
- (c) Ngb and Cygb might act as *terminal oxidases*, regenerating NAD^+ to support glycolysis and sustain ATP production under hypoxic conditions, as proposed for maize hemoglobin [56].
- (d) Both globins could be instrumental as *scavengers of reactive oxygen or nitrogen species*, which are produced, e.g., after reperfusion/re-oxygenation following ischemia.
- (e) As proven for Mb in mammalian muscle cells [10], they could possess *dioxygenase activity*, converting harmful excess NO into innocuous nitrate.
- (f) Several cytoplasmatic enzymes use molecular O_2 for chemical reactions, and globins like Ngb or Cygb could *supply* these other *enzymes* with adequate amounts of O_2 .

In the case of Ngb, much indirect evidence favours scenario (a). As initially pointed out [13], it certainly makes sense for highly O_2 -demanding and metabolically active cells like neurons to possess a specialized respiratory protein, which helps to sustain aerobic metabolism, possibly by acting as a 'salvage' O_2 store on the encounter of acute hypoxia. The correlation between Ngb expression rates and metabolic activity is intriguing, most notably in the case of the vertebrate retina, where Ngb localization perfectly matches the zones of strongest O_2 consumption and is even found strictly associated with mitochondria-rich segments of the photoreceptors [41]. Adding to this argument, the nerve globin present in the bivalve mollusc *Tellina* has been proven to sustain neuronal activity under hypoxic stress [57]. While the overall amount of Ngb protein in the mammalian brain may be low, there are pronounced differences in expression levels. For certain highly active brain regions, and of course the most strongly Ngb-expressing retina, Ngb levels appear to be sufficient for an Mb-like O_2 supply function. Moreover, some structural and physiological features of Ngb are essentially Mb-style. It must be clearly pointed out, however, that Ngb rapidly autoxidizes to metNgb(Fe^{3+}) [17]. To function as an O_2 supply, we therefore have to postulate a yet unidentified Ngb-reducing enzymatic activity, in analogy to Mb reductase in muscle. The neuroprotective effects of Ngb (over)expression [42,45] are certainly in line with an O_2 supply function. Also, a short-term storage role will not necessarily require a pronounced upregulation of globins under hypoxia, as shown for Mb in hypoxic muscle during athletic training [58]. One may even ask whether any gross physiological hypoxia response on the globin level can be expected in those mammalian species which are usually not adapted to hypoxic conditions.

We regard the current evidence for Ngb as a signalling protein (scenario b) as rather weak. Globin-coupled O_2 sensors [55] have until now only been found in Archaea and bacteria and usually require signal-transducing protein domains in addition to the globin part. It has been proposed based on in vitro studies using surface plasmon resonance that oxidized Ngb(Fe^{3+}) is involved in intracellular signalling under oxidative stress by inhibiting release of GDP from $G\alpha$ proteins and triggering release of the $G\beta\gamma$ complex, thereby enhancing cell survival [59]. The interaction of Ngb with G proteins was postulated on the basis of a proposed sequence similarity be-

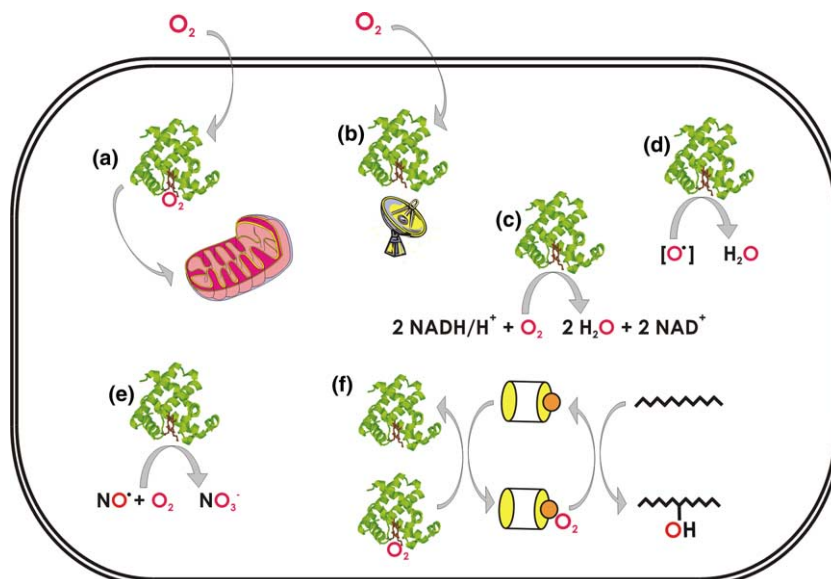


Fig. 4. Hypothetical functions of intracellular globins. See text for further explanations. Colors: green, globin molecule; brown, heme group; red, oxygen ligand; pink, mitochondrion; yellow, oxygen-need enzyme.

tween Ngb and regulators of G protein signalling (RGS) and RGS domains of G protein-coupled receptor kinases. The evidence given for this similarity, however, is very weak and it will require further studies to substantiate this proposed Ngb involvement in signal transduction *in vivo*. Recently, the $\beta 2$ subunit of the Na,K-ATPase ion pump was also reported to interact with Ngb in a yeast two-hybrid assay and in immunoprecipitation experiments [60]. This protein, however, is membrane-bound with a pronounced expression in astroglial cells [61], while Ngb is clearly cytoplasmatically expressed only in neurons. These methods of identifying potential Ngb partner molecules should therefore be used with caution. Finally, it should be noted that a role of both Ngb and Cygb in O_2 sensing appears unlikely, because at least *in vitro* their observed ligand affinities [13,17] are much higher than those of functional sensors like the HIF prolyl-4-hydroxylases that are known to work under natural cellular O_2 concentrations [62].

The role of Ngb as a terminal oxidase for sustaining glycolysis under hypoxia (scenario c) has not yet been investigated. According to the 'lactate shuttle' hypothesis, it is currently believed that in normoxia and even under functional activation of a brain region, glycolysis occurs predominantly in the astroglia, which produces substantial amounts of lactate [63]. This lactate is taken up by neurons, which appear to have a preference to oxidize imported lactate instead of producing lactate/pyruvate by their own glycolysis. Under this scenario, Ngb as a purely neuronal protein should not play a substantial role in glycolytic energy production. Energy depletion under hypoxia, however, may stimulate enhanced glucose oxidation in neurons, compensating for a reduction in lactate supply by astroglia.

A function of Ngb as a scavenger of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (scenario d) would be consistent with the neuroprotective effect of Ngb after ischemia and reperfusion of brain tissue [42,45], when such harmful molecules are known to form. A possible chemistry showing how $\text{Ngb}(\text{Fe}^{2+})$ might react first with NO and then with peroxynitrite has recently been published [28]. It remains to be shown whether this chemistry works *in vivo* at physiological NO concentrations. At present, a classic MbO_2 -like NO dioxygenase activity (scenario e) may be regarded improbable for Ngb. To our knowledge, this issue has been studied, without any publication of positive results so far. Ngb and NO synthase do not seem to strictly co-localize in neurons [36]. The NO donor sodium nitroprusside did not increase Ngb expression in cultured cells [42], although an upregulation might not strictly be required for the dioxygenase reaction.

Less data are currently available for Cygb and several possible cellular roles can still be hypothesized for this protein. On the one hand, Cygb shows a globin fold and an O_2 affinity reminiscent of Mb, to which it is phylogenetically related. On the other hand, Cygb features peculiarities like its N- and C-terminal extensions, which might be mediating special protein-protein interactions, plus the heme hexa-coordination, a redox-dependent O_2 affinity and special cavities for ligand diffusion. Based on the expression pattern, which is not as global as suggested by its name, we envisage that Cygb will perform distinct functions in the cytoplasm of fibroblast-like cells, and in the nuclear and cytoplasmic compartments of yet to be defined nerve cell populations [51]. Cygb certainly has its most prominent role in cells of the fibroblast lineage. Any proposed function here must take

into account the following: (i) fibroblast-like cells are not known to be metabolically active in general, but engage in the massive production of extracellular matrix proteins like collagen; (ii) collagen synthesis consumes molecular O₂ during hydroxylation at proline residues, performed by dedicated prolyl-hydroxylases; (iii) Cygb (like collagen production) is upregulated by hypoxia [51] and (iv) Cygb overexpression is able to somehow enhance collagen expression [52]. We therefore hypothesize that Cygb could be involved in collagen production. One formal possibility is that Cygb provides O₂ directly to the collagen prolyl-hydroxylases (scenario f in Fig. 4), although the lower O₂ affinity of the collagen prolyl-hydroxylase [62] appears to be at odds with this mechanism. Alternatively, Cygb might participate in some unknown signalling pathway, ultimately augmenting collagen synthesis.

Although vertebrate Ngb and Cygb were discovered only recently, many labs have since contributed significantly to our knowledge on the biochemistry, structure, comparative physiology and molecular genetics of these proteins. Future studies should focus on ultimately understanding the function(s) of intracellular globins in the metabolism of eukaryotic cells and on their biomedical impact.

Note added in proof

Recent papers describe the structures of mouse bis-histidyl ferric and CO-bound ferrous mouse Ngb (Vallone et al. (2004) *Proteins* 56, 85–92; Vallone et al. (2004) *PNAS*, e-publication), and of human wildtype CYGB (Sugimoto et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 339, 873–885). Ligand binding characteristics of NGB and CYGB have been further analyzed (Fago et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 44417–26). Chicken Ngb and Cygb and the fifth vertebrate globin (GbX) are published (Kugelstadt et al. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 719–725; Roesner et al. (2004) *Mol. Biol. Evol.*, e-publication).

Acknowledgements

We are very grateful to Jonathan and Beatrice Wittenberg (New York), Rainald Schmidt-Kastner (Miami), Nigel Woolf (San Diego) and Joachim Fandrey (Essen) for discussions. This work was supported by grants from DFG (Ha2103/3 and Bu956/5 to T.H. and T.B.), the Danish Natural Science Research Council (A.F. and R.E.W.), the European Union FP5 project (QLG3-CT2002-01548) to M.B., and the EU project 'Neuroglobin and the survival of the brain' (QLRT-2001-01548). S.D. is a postdoctoral fellow of the Fund for Scientific Research-Flanders.

References

- [1] J.C. Kendrew, *Science* 139 (1963) 1259–1266.
- [2] M.F. Perutz, *Ann. Rev. Biochem.* 48 (1979) 327–386.
- [3] M. Bolognesi, D. Bordo, M. Rizzi, C. Tarricone, P. Ascenzi, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68 (1997) 29–68.
- [4] M. Milani, A. Pesce, M. Nardini, H. Ouellet, Y. Oullet, S. Dewilde, A. Bocedi, P. Ascenzi, M. Guertin, L. Moens, J.M. Friedman, J.B. Wittenberg, M. Bolognesi, *J. Inorg. Biochem.* (2004) this issue, doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.10.035.
- [5] R.E. Dickerson, I. Geis, *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, 1983.
- [6] R.E. Weber, S.N. Vinogradov, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 569–628.
- [7] J.B. Wittenberg, B.A. Wittenberg, *J. Exp. Biol.* 206 (2003) 2011–2020.
- [8] R.C. Hardison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5675–5679.
- [9] M.W. Merx, U. Flögel, T. Stumpe, A. Gödecke, U.K. Decking, J. Schrader, *FASEB J.* 15 (2001) 1077–1079.
- [10] U. Flögel, M.W. Merx, A. Gödecke, U.K. Decking, J. Schrader, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 735–740.
- [11] T. Burmester, T. Hankeln, *Mol. Biol. Evol.* 16 (1999) 1809–1811.
- [12] T. Hankeln, V. Jaenicke, L. Kiger, S. Dewilde, G. Ungerechts, M. Schmidt, J. Urban, M.C. Marden, L. Moens, T. Burmester, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29012–29017.
- [13] T. Burmester, B. Weich, S. Reinhardt, T. Hankeln, *Nature* 407 (2000) 520–523.
- [14] N. Kawada, D.B. Kristensen, K. Asahina, K. Nakatani, Y. Minamiyama, S. Seki, K. Yoshizato, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 25318–25323.
- [15] T. Burmester, B. Ebner, B. Weich, T. Hankeln, *Mol. Biol. Evol.* 19 (2002) 416–421.
- [16] J.T. Trent 3rd, M.S. Hargrove, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19538–19545.
- [17] S. Dewilde, L. Kiger, T. Burmester, T. Hankeln, V. Baudin-Creuz, T. Aerts, M.C. Marden, R. Caubergs, L. Moens, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38949–38955.
- [18] D. Hamdane, L. Kiger, S. Dewilde, B.N. Green, A. Pesce, J. Uzan, T. Burmester, T. Hankeln, M. Bolognesi, L. Moens, M.C. Marden, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 51713–51721.
- [19] A. Pesce, S. Dewilde, M. Nardini, L. Moens, P. Ascenzi, T. Hankeln, T. Burmester, M. Bolognesi, *Structure (Camb)* 11 (2003) 1087–1095.
- [20] M. Couture, T. Burmester, T. Hankeln, D.L. Rousseau, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36377–36382.
- [21] J.T. Trent 3rd, R.A. Watts, M.S. Hargrove, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30106–30110.
- [22] J.M. Kriegl, A.J. Bhattacharyya, K. Nienhaus, P. Deng, O. Minkow, G.U. Nienhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 7992–7997.
- [23] W. Du, R. Syvitski, S. Dewilde, L. Moens, G.N. La Mar, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 8080–8081.
- [24] T. Uno, D. Ryu, H. Tsutsumi, Y. Tomisugi, Y. Ishikawa, A.J. Wilkinson, H. Sato, T. Hayashi, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5886–5893.
- [25] A. Pesce, M. Bolognesi, A. Bocedi, P. Ascenzi, S. Dewilde, L. Moens, T. Hankeln, T. Burmester, *EMBO Rep.* 3 (2002) 1146–1151.
- [26] S. Kundu, J.T. Trent 3rd, M.S. Hargrove, *Trends Plant Sci.* 8 (2003) 387–393.
- [27] K. Nienhaus, J.M. Kriegl, G.U. Nienhaus, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22944–22952.
- [28] S. Herold, A. Fago, R.E. Weber, S. Dewilde, L. Moens, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 22841–22847.

- [29] C. Fuchs, V. Heib, L. Kiger, M. Haberkamp, A. Roesner, M. Schmidt, D. Hamdane, M.C. Marden, T. Hankeln, T. Burmester, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24116–24122.
- [30] L.B. Becker, *Cardiovasc. Res.* 61 (2004) 461–470.
- [31] S. Van Doorslaer, S. Dewilde, L. Kiger, S.V. Nistor, E. Goovaerts, M.C. Marden, L. Moens, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 4919–4925.
- [32] C. Zhang, C. Wang, M. Deng, L. Li, H. Wang, M. Fan, W. Xu, F. Meng, L. Qian, F. He, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 1411–1419.
- [33] C. Awenius, T. Hankeln, T. Burmester, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 418–421.
- [34] B. Ebner, T. Burmester, T. Hankeln, *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003) 1521–1523.
- [35] S. Wystub, B. Ebner, C. Fuchs, B. Weich, T. Burmester, T. Hankeln, *Cytogenet. Genome Res.* 105 (2004) 65–78.
- [36] S. Reuss, S. Saaler-Reinhardt, B. Weich, S. Wystub, M.H. Reuss, T. Burmester, T. Hankeln, *Neuroscience* 115 (2002) 645–656.
- [37] P.P. Mammen, J.M. Shelton, S.C. Goetsch, S.C. Williams, J.A. Richardson, M.G. Garry, D.J. Garry, *J. Histochem. Cytochem.* 50 (2002) 1591–1598.
- [38] E. Geuens, I. Brouns, D. Flamez, S. Dewilde, J.P. Timmermans, L. Moens, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 30417–30420.
- [39] S. Wystub, T. Laufs, M. Schmidt, T. Burmester, U. Maas, S. Saaler-Reinhardt, T. Hankeln, S. Reuss, *Neurosci. Lett.* 346 (2003) 114–116.
- [40] T.L. Laufs, S. Wystub, S. Reuss, T. Burmester, S. Saaler-Reinhardt, T. Hankeln, *Neurosci. Lett.* 362 (2004) 83–86.
- [41] M. Schmidt, A. Giessl, T. Laufs, T. Hankeln, U. Wolftrum, T. Burmester, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1932–1935.
- [42] Y. Sun, K. Jin, X.O. Mao, Y. Zhu, D.A. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 15306–15311.
- [43] M. Erecinska, I.A. Silver, *Resp. Physiol.* 128 (2001) 263–276.
- [44] Y. Zhu, Y. Sun, K. Jin, D.A. Greenberg, *Blood* 100 (2002) 2494–2498.
- [45] Y. Sun, K. Jin, A. Peel, X.O. Mao, L. Xie, D.A. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 3497–3500.
- [46] D. de Sanctis, S. Dewilde, A. Pesce, L. Moens, P. Ascenzi, T. Hankeln, T. Burmester, M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.* 336 (2004) 917–927.
- [47] H. Sawai, N. Kawada, K. Yoshizato, H. Nakajima, S. Aono, Y. Shiro, *Biochemistry* 42 (2003) 5133–5142.
- [48] D. De Sanctis, S. Dewilde, A. Pesce, L. Moens, P. Ascenzi, T. Hankeln, T. Burmester, M. Bolognesi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 1217–1221.
- [49] A. McLysaght, K. Hokamp K, K.H. Wolfe, *Nat. Genet.* 31 (2002) 200–204.
- [50] K. Asahina, N. Kawada, D.B. Kristensen, K. Nakatani, S. Seki, M. Shiokawa, C. Tatenno, M. Obara, K. Yoshizato, *Biochim. Biophys. Acta* 1577 (2002) 471–475.
- [51] M. Schmidt, F. Gerlach, A. Avivi, T. Laufs, S. Wystub, J.C. Simpson, E. Nevo, S. Saaler-Reinhardt, S. Reuss, T. Hankeln, T. Burmester, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 8063–8069.
- [52] K. Nakatani, H. Okuyama, Y. Shimahara, S. Saeki, D.H. Kim, Y. Nakajima, S. Seki, N. Kawada, K. Yoshizato, *Lab. Invest.* 84 (2004) 91–101.
- [53] E. Schipani, H.E. Ryan, S. Didrickson, T. Kobayashi, M. Knight, R.S. Johnson, *Genes Dev.* 15 (2001) 2865–2876.
- [54] A.A. Tandara, T.A. Mustoe, *World J. Surg.* (2004), online publication.
- [55] T.A.K. Freitas, J.A. Saito, S. Hou, M. Alam, J. Inorg. Biochem. (2004) this issue, doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.10.024.
- [56] A.W. Sowa, S.M.G. Duff, P.A. Guy, R.D. Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 17 (1998) 10317–10321.
- [57] D.M. Kraus, J.M. Colacino, *Science* 232 (1986) 90–92.
- [58] H. Hoppeler, M. Vogt, *J. Exp. Biol.* 204 (2001) 3133–3139.
- [59] K. Wakasugi, T. Nakano, I. Morishima, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 36505–36512.
- [60] W.L. Xu, C.L. Wang, Z.Y. Liao, Y.L. Zhang, L.H. Yu, F.W. Meng, X.X. Wang, F.W. Meng, Z.Y. Yin, L.J. Qian, C.G. Zhang, *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35 (2003) 823–828.
- [61] L. Peng, E. Arystarkhova, K.J. Swadner, *Glia* 24 (1998) 257–271.
- [62] M. Hirsilä, P. Koivunen, V. Günzler, K.I. Kivirikko, J. Myllyharju, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 30772–30780.
- [63] Y. Itoh, T. Esaki, K. Shimoji, M. Cook, M.J. Law, E. Kaufman, L. Sokoloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 4879–4884.

Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*)

Anja Roesner¹, Thomas Hankeln² and Thorsten Burmester^{1,*}

¹Institute of Zoology, University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany and ²Institute of Molecular Genetics, University of Mainz, D-55099 Mainz, Germany

*Author for correspondence (e-mail: burmeste@uni-mainz.de)

Accepted 29 March 2006

Summary

Unlike most mammals, many fish species live and survive in environments with low or changing levels of oxygen. Respiratory proteins like hemoglobin or myoglobin bind or store oxygen, thus enhancing its availability to the respiratory chain in the mitochondria. Here we investigate by means of quantitative real-time PCR the changes of hemoglobin, myoglobin, neuroglobin, cytoglobin and globin X mRNA in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to mild ($P_{O_2} \approx 8.6$ kPa) or severe ($P_{O_2} \approx 4.1$ kPa) hypoxia. Neuroglobin and myoglobin protein levels were investigated by western blotting. Whereas mild hypoxia caused only minor changes of mRNA levels, strong hypoxia enhanced mRNA levels of the control genes (lactate dehydrogenase A and phosphoglycerate kinase 1). Surprisingly, levels of hemoglobin α and β mRNA were significantly reduced under severe hypoxia. Myoglobin mRNA and protein in heart mildly increased, in line with

its proposed oxygen supply function. Likewise, neuroglobin mRNA and protein significantly increased in brain (up to 5.7-fold at the protein level), but not in eye. This observation, firstly, suggests physiological differences of zebrafish eye and brain under hypoxia, and secondly, indicates an important role of neuroglobin in oxidative metabolism, probably oxygen supply within neurons. There was little change in the expression of the two cytoglobin genes. Globin X mRNA significantly decreased under hypoxia, pointing to a functional linkage to oxygen-dependent metabolism.

Supplementary material available online at
<http://jeb.biologists.org/cgi/content/full/209/11/2129/DC1>

Key words: cytoglobin, hemoglobin, myoglobin, neuroglobin, oxygen, zebrafish, *Danio rerio*.

Introduction

The aerobic lifestyle of most animals requires a constant supply of sufficient oxygen, and low oxygen levels (hypoxia) constitute a major environmental threat. Fish live in water, which has a low oxygen capacitance (1/30th compared to air) and poor oxygen diffusibility. Aqueous environments are also prone to temporal and seasonal changes of oxygen partial pressures. Therefore, many fish species have evolved various behavioral, anatomical, physiological, biochemical and molecular adaptations that enable them to cope with periods of hypoxia (for reviews, see Nikinmaa, 2002; Nilsson and Renshaw, 2004; Cossins and Crawford, 2005; Nikinmaa and Rees, 2005). Low oxygen levels cause a decrease of activity, enhanced ventilation and reduction of the metabolic rate (Jensen et al., 1993; Dalla Via et al., 1994; van den Thillart and van Waarde, 1985; Smith et al., 1996; Ton et al., 2003; van der Meer et al., 2005). Prolonged hypoxia, which extends more than a few days, may also induce anatomical changes such as expansion of the gill surface (Sollid et al., 2005; van der Meer et al., 2005).

It is not surprising that hypoxia causes major changes of gene expression in fish (Gracey et al., 2001; Ton et al., 2003; Nikinmaa and Rees, 2005; van der Meer et al., 2005), which allow the animals to save oxygen and to better cope with periods of oxygen shortage. For example, genes encoding enzymes for glycolysis and fermentation were found to be more strongly expressed after long term hypoxia in adult goby fish, *Gillichthys mirabilis* (Gracey et al., 2001), adult zebrafish, *Danio rerio* (van der Meer et al., 2005), and after 24 h of anoxia (0% O_2) in zebrafish embryos (Ton et al., 2003). By contrast, among others, genes required for oxygen-dependent energy production (e.g. the TCA cycle or the mitochondrial respiratory chain) and protein translation were repressed. Hypoxia also causes developmental arrest, as reflected by the repression of cell cycle-related genes (Padilla and Roth, 2001; Ton et al., 2003).

Respiratory proteins enhance the availability of oxygen to the electron transport chain in the mitochondria. All respiratory proteins of vertebrates belong to the superfamily of globins, which harbor a porphyrin-ring with a Fe^{2+} ion. Five globin

classes are known to be present in fish (Fig. 1). Hemoglobin (Hb) consists of two α and two β chains, is located in the erythrocytes and greatly increases the oxygen capacitance of the blood. It enables the efficient transport of oxygen from the respiratory surfaces (lungs, gills, skin) to the inner organs. The monomeric myoglobin (Mb) is mainly situated in striated muscle and heart. It is supposed to store oxygen and to facilitate intracellular oxygen diffusion (Wittenberg and Wittenberg, 2003). Neuroglobin (Ngb) is located in the central and peripheral nervous system (Burmester et al., 2000), the retina (Schmidt et al., 2003) and some endocrine tissues (Reuss et al., 2002). Ngb may have a Mb-like role in enhancing the availability of oxygen to the metabolically active neurons, although other functions such as the detoxification of reactive oxygen or nitrogen species (ROS, RNS) or oxygen signaling have been proposed (for reviews, see Burmester and Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005). Cytoglobin (Cygb) is expressed in fibroblast-related cells and some neurons (Burmester et al., 2002; Schmidt et al., 2004). Its function may be related to ROS detoxification or oxygen supply to particular enzymatic reactions (Schmidt et al., 2004; Hankeln et al., 2005). Globin X (GbX) is restricted to fish and amphibia (Roesner et al., 2005). Its function is currently unknown.

It may be expected that altered oxygen levels have a significant impact on the expression of globins. For example, Hb levels were shown to have increased in mammals under high altitude conditions (e.g. Samaja et al., 2003), whereas data on Mb expression under hypoxia are variable (Hoppeler and Vogt, 2001; Levine and Stray-Gundersen, 2001). Results on hypoxia regulation of Ngb in mammalian systems are also not consistent. Whereas Ngb was found to be more highly expressed in hypoxic cell and tissue culture systems (Sun et al., 2001; Fordel et al., 2004), no changes in Ngb mRNA levels were found in whole animal experiments (Mammen et al., 2002). Cygb mRNA levels increase in hypoxic liver and heart of rat and mice (Schmidt et al., 2004), whereas the observed changes of Cygb mRNA levels in the brain were not significant (Fordel et al., 2004) (A. Avivi, F. Gerlach, S. Reuss, T. Burmester, E. Novo and T. Hankeln, unpublished data).

Most mammals are not adapted to environments with low or changing oxygen partial pressures. Therefore, at least some of the data on globin expression, particularly those on Ngb and Cygb, have been obtained from animals that will never be subject to any hypoxic conditions during their adult live. Here, we investigate the response of globin mRNA and protein (for Mb and Ngb) levels to hypoxia in the zebrafish *Danio rerio*. The zebrafish may actually experience low oxygen levels in its warm and tropical environment and it has an astonishing ability to withstand hypoxia (Padilla and Roth, 2001; Rees et al., 2001; Pelster, 2002; Ton et al., 2003; van der Meer et al., 2005). Moreover, *D. rerio* has become a prime model for investigation of physiological adaptations at the molecular level.

Materials and methods

Animal maintenance

Danio rerio Hamilton (Cypriniformes) were obtained from a local pet shop and kept in activated carbon filtered water at a density of approximately 1 fish per 2 l, with a 14 h:10 h light:dark cycle and a temperature of 25°C. Fish were fed TetraMin flakes (Tetra, Melle, Germany) once per day. Water was filtered with a thermofilter (Ekip 350, Hydor, Bassano del Grappa, Italy). Water quality (total and carbonate hardness, pH and nitrite and nitrate content) was checked periodically and partial water changes were carried out when necessary. Temperature acclimation was performed by cooling 1°C per day. Zebrafish were acclimated to 22°C for at least 10 days before hypoxia treatment. Animal handling and experiments were conducted according to a protocol that had been approved by the county-government office (Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz, AZ 1.5 177-07/021-30).

Hypoxic treatment

Groups of four fish were randomly assigned to hypoxia treatment or control groups. Hypoxia treatment was performed in a 10 l glass aquarium, covered with loosely fitting acrylic covers. Gas mixtures (2% O₂ in N₂ or 5% O₂ in N₂, Air liquide,

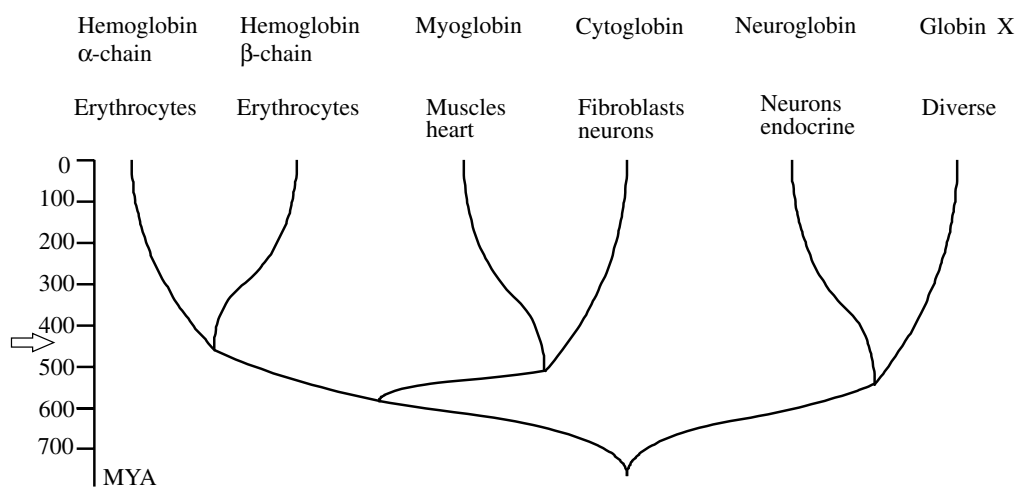


Fig. 1. Fish respiratory proteins. The scheme provides an overview on the expression and evolution of fish globins. MYA, million years ago. The arrow indicates the approximate time of divergence of teleost fish and tetrapods.

Dusseldorf, Germany) were bubbled through water. A thermopump (Ekip 200, Hydor, Bassano Del Grappa, Italy) was used to circulate the water and to keep the temperature constant at 22°C. Oxygen partial pressure and temperature were measured every 5 min by an oxygen sensor (Oxi 340i, WTW, Weilheim, Germany). Fish were not fed for 24 h before the start of, or during, the experiment. Experiments started at an oxygen partial pressure of 18.4 kPa (138 Torr). The water was aerated to achieve 4.1 kPa (~31 Torr, bubbled with 2% O₂) or ~8.6 kPa (65 Torr, bubbled with 5% O₂), respectively, after 1 h. Oxygen partial pressure remained constant (±0.6–0.8 kPa) throughout the experiment. Control zebrafish were kept under the same conditions, but the water was gassed with room air (P_{O₂}~18.4 kPa). After 24 h or 48 h, fish were directly frozen in liquid nitrogen. For the experiments employing total eyes, brain or heart, the specimens were cooled on ice and killed by decapitation. For each fish, organs were removed within less than 2 min, shock-frozen in liquid N₂ and kept at –80°C until use.

RNA extraction

RNA samples from total animals or single organs were extracted using the RNeasy Mini Kit by Qiagen (Hilden, Germany). Fish were weighed and homogenized in the required volume of RLT buffer (Qiagen) with a rotor stator. To avoid contamination with genomic DNA, a DNase digestion was performed on the column (Qiagen). Quality and amount of RNA were checked photometrically and with RNA gel electrophoresis.

cDNA cloning and sequencing

The complete cDNA sequences of the genes used in this study [acidic ribosomal protein [ARP (also known as *rplp0*), EMBL/GenBank acc. no. BC049058], cyclophilin (AY391451), Hbα [*hba* (*hbaa1*), NM_131257], Hbβ [*hbb*(*ba1*), NM_131020], Mb (AY337025), Ngb (NM_131853), Cygb1 (AJ320232), Cygb2 (AJ635229) and GbX (NM_001012261)] were obtained by amplification from total RNA with the OneStep RT-PCR kit (Qiagen) using specific primers (see Table S1 in supplementary material). After cloning into standard vectors (pCR4-TOPO, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, or pGEM Teasy, Promega, Mannheim, Germany) the sequences were determined by a commercial service (Genterprise, Mainz, Germany). The cDNA plasmids were used for generating standard curves for use in real-time PCR (see below). The cDNAs of the genes used as positive controls [lactate dehydrogenase A (*ldha*, NM_131246) and phosphoglycerate kinase 1 (*pgk1*, NM_213387)] were not cloned.

Quantitative real-time PCR

RNA extractions and cDNA synthesis were carried out from single specimens, except for the control group for which the RNA samples were combined before cDNA synthesis. In the experiments with brains or total eyes, both the hypoxia and control group animals were treated individually. Quantitative

real-time RT-PCR was performed with a two-step protocol. First, total RNA was converted into cDNA employing Superscript II RNase H⁻ reverse transcriptase (Invitrogen) and an oligo(dT₁₆) primer according to manufacturer's instruction. The cDNA samples were diluted with the same volume of DNase-free water. Real-time RT-PCR experiments were carried out on an ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) using the ABsolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix (Abgene, Hamburg, Germany). Levels of mRNA of ARP, cyclophilin, LDHA, PGK1, Hba, Hbb, Mb, Ngb, Cygb1, Cygb2 and GbX were evaluated. ARP and cyclophilin were employed as putatively non-regulated reference genes (Simpson et al., 2000). To avoid amplification of genomic DNA, all primer pairs included one intron-spanning oligonucleotide. The oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys (Hamburg, Germany) (see Supplemental Table S1 in supplementary material). Reactions were run in triplicate with one or two repetitions, using 1 µl of diluted cDNA as template in a reaction volume of 30 µl. Primer concentrations were 0.13 µmol l⁻¹ for each oligonucleotide. The Taq-polymerase was activated for 15 min at 95°C, followed by 40 cycles of a standard PCR protocol (94°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s). Efficiency of reaction was measured by the slope of a standard curve. For standard curves, only duplicates were run, using fivefold cDNA dilutions (positive controls *ldha* and *pgk1*) or tenfold dilutions of plasmids (all other genes). Specificity of the amplification reaction was analyzed using dissociation curves with a temperature range from 60°C to 95°C. First evaluation of results was performed in the ABI Prism 7000 SDS program; for normalization and calibration, data were exported to qBase (<http://www.medgen.ugent.be/qbase/>). Final data analyses were carried out with the Microsoft Excel XP spreadsheet program. The significance of the data was evaluated using Student's *t*-test.

Protein extraction and western blotting

After the hypoxia treatment, zebrafish used for protein analyses were cooled down on ice and immediately dissected. Total eyes, brains and hearts were removed and stored at –20°C. Tissues were homogenized in 1× phosphate-buffered saline (PBS; 140 mmol l⁻¹ NaCl, 2.7 mmol l⁻¹ KCl, 8.1 mmol l⁻¹ Na₂HPO₄, 1.5 mmol l⁻¹ KH₂PO₄) with ultrasonication and precipitated for 10 min at 13,000 *g* at 4°C. Protein concentrations of the supernatant were determined with the Bradford method (Bradford, 1976).

Protein extracts (100 µg per lane) were heat-denatured in sample buffer (31.25 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 2.5% β-mercaptoethanol, 5% glycerol) for 5 min at 95°C and loaded onto a 15% SDS polyacrylamide gel. Antibody detection was carried out on protein samples transferred to nitrocellulose membrane for 2 h at 0.8 mA cm⁻². Non-specific binding sites were blocked by incubating for 45 min with 2% bovine serum albumin (BSA) in TBS (10 mmol l⁻¹ Tris, pH 7.4, 140 mmol l⁻¹ NaCl). Membranes were then incubated for 2 h with anti-Ngb antibodies (Fuchs et al., 2004) or anti-

zebrafish-Mb serum (raised against recombinantly expressed *D. rerio* Mb; unpublished), both diluted 1:500 in 2% BSA/TBS, and washed four times for 5 min with TBS. Membranes were incubated with the goat anti-rabbit antibody coupled with alkaline phosphatase (Dianova, Hamburg, Germany) for 1 h, diluted 1:10 000 in 2% BSA/TBS, and washed as described above. Detection was carried out with nitroblue-tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate salt as substrates. The filters were scanned at 1,200 d.p.i. and the images were imported into the Scion Image program (version Beta 4.02) and an analysis of grey values was performed to obtain an estimate of the protein levels. The mean grey values of the background of empty gel lanes were subtracted from the measurements of the Ngb or Mb protein levels. Data were imported into Microsoft Excel XP and Student's *t*-test was used to assess significance.

Results

We first followed the survival rate of adult *D. rerio* after exposure to hypoxia. We found that $P_{O_2} \sim 2.4$ kPa (~ 18 Torr) was lethal for more than 80% of the animals after 24 h ($N=8$). At ~ 4.1 kPa O_2 partial pressure and at 22°C , the survival rate was $>80\%$ after 48 h hypoxia exposure ($N=43$). Therefore, the latter regime was applied as maximum (severe) hypoxic conditions.

Changes of gene expression in the hypoxic zebrafish

Evaluation of real-time RT-PCR results showed that ARP expression does not change under hypoxia ($P_{O_2} \sim 4.1$ kPa or ~ 8.6 kPa), whereas we observed a mild but significant upregulation of cyclophilin (Figs 2 and 3). Therefore, all expression levels were subsequently normalized according to ARP. Microarray data had demonstrated that expression levels of LDH-A and PGK1 mRNA were highly enhanced in

zebrafish under hypoxia (Ton et al., 2003). These mRNAs were used in our experiments as positive controls to verify hypoxia exposure and response. In fact, at $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa for 48 h, we saw significant upregulation of the expression of both LDHA and PGK1 mRNA by a factor of 2.5 and 3.8, respectively (Figs 2 and 3). PGK-1 levels increase even under mild hypoxia (48 h, $P_{O_2} \sim 8.6$ kPa; 1.9-fold compared with the normoxic control) or after a shorter time-period (24 h, $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa) (2.1-fold compared with the normoxia). The large standard deviations reflect differences of mRNA levels among individuals. However, the results were significant according to a Student's *t*-test, as indicated in Figs 2 and 3.

Globin-mRNA levels in zebrafish under different hypoxia regimes

We found only minor changes in globin mRNA levels in animals exposed to $P_{O_2} \sim 8.6$ kPa for 48 h (Fig. 2). There was an approximate 50% decrease in Hb α and Hb β mRNA levels, which was, however, not significant. Under severe hypoxia ($P_{O_2} \sim 4.1$ kPa), the changes in globin mRNA were much more pronounced (Fig. 3). Hb mRNAs decreased after 24 h by 20%, to 30% compared to the normoxia control, and after 48 h at $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa they were reduced by between 65% and 75% ($P < 0.005$ and $P < 0.001$). Mb mRNA levels increased about 2.5-fold under short- and long-term severe hypoxia, although this change was not significant because of the large standard deviation. Ngb mRNA increased after 24 h strong hypoxia by about fourfold, but the standard deviation results in a borderline significance ($P = 0.065$). After 48 h at 4.1 kPa P_{O_2} , the Ngb mRNA levels were nearly back to normoxia levels, with only about a 1.3-fold increase. Zebrafish possess two paralogous Cygb genes (Fuchs et al., 2005). For Cygb1 mRNA, we see a mild upregulation under hypoxia, which was, however, not significant. Cygb2 mRNA levels remained almost unaltered. GbX mRNA expression was unchanged at

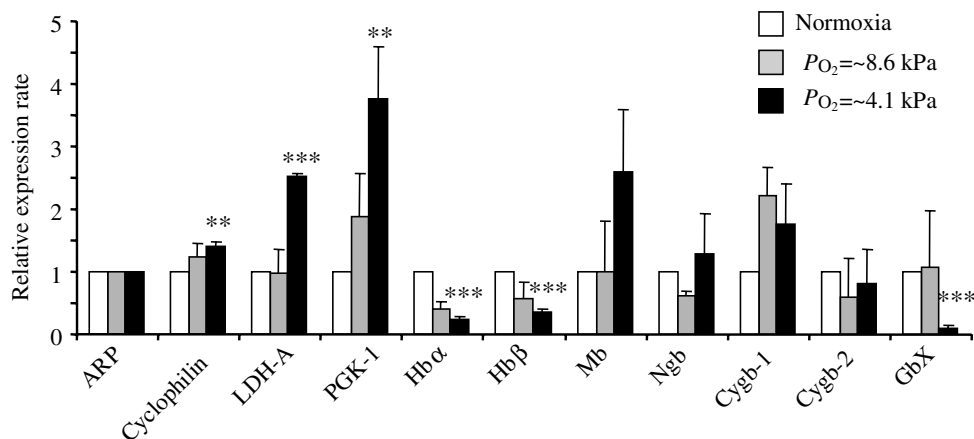


Fig. 2. Expression of *D. rerio* globins at different oxygen levels. mRNA quantities were determined by quantitative real-time PCR. The white columns represent mRNA levels from zebrafish kept for 48 h at normoxia ($P_{O_2} \sim 18.4$ kPa), grey columns are mRNA levels from zebrafish kept for 48 h at $P_{O_2} \sim 8.6$ kPa, black columns are mRNA levels from zebrafish kept for 48 h at $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa. Values are means \pm s.d. The significance of the data was estimated with a Student's *t*-test, with $N=3$ or 4 individuals for each data point. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$. ARP, acidic ribosomal protein; Cygb, cytoglobin; GbX, globin X; Hb, hemoglobin; LDHA, lactate dehydrogenase A; Mb, myoglobin; Ngb, neuroglobin; PGK1, phosphoglycerate kinase 1.

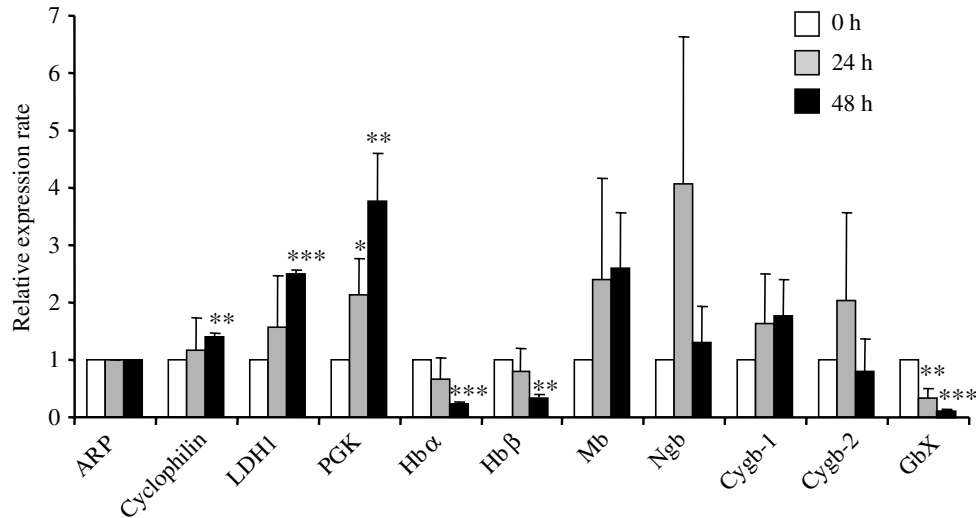


Fig. 3. Rate of expression of *D. rerio* globin expression under hypoxia. Zebrafish were kept at $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa for 24 h (grey columns) and 48 h (black columns). The white columns represent the normoxia control. mRNA quantities were determined by quantitative real-time PCR. Values are means \pm s.d. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ (*t*-test). For abbreviations, see Fig. 2.

$P_{O_2} \sim 8.6$ kPa, but significantly decreased at $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa to a level of about 10% of the normoxia control after 48 h ($P < 0.001$).

Expression of *Ngb* mRNA in brain and eye

We further analyzed the expression of *Ngb* mRNA separately in brain and eye of zebrafish that had been kept for 24 h at $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa. Total brains and eyes were immediately removed from zebrafish and shock-frozen in liquid N_2 . Expression of selected genes was analyzed in individuals by quantitative real-time PCR. Again, we found a strong variation in gene expression levels between individuals of the same

group (Fig. 4). The positive-control genes *ldha* and *pgk1* were found to be significantly upregulated in both tissues (data not shown). *Ngb* mRNA levels were essentially the same in the normoxic and hypoxic eyes (Fig. 4). However, in brain we saw about threefold higher mRNA level in tissues from hypoxic animals compared to the control ($P < 0.01$).

Quantitative western blotting

Proteins were extracted from brains, total eyes and hearts of individual zebrafish that had been kept for 48 h at severe hypoxia ($P_{O_2} \sim 4.1$ kPa). To analyze changes in protein levels, we performed quantitative western blots, applying a constant amount of total protein extracts (100 μ g per lane; Fig. 5). We observed a mildly (20%) but significantly ($P < 0.05$) higher level of myoglobin in the hearts from hypoxic zebrafish compared to control animals that had been kept for the same time under normoxia ($P_{O_2} \sim 18.4$ kPa). *Ngb* protein levels were somewhat higher in the protein extracts from the hypoxic eye than in those of the normoxia control (1.6-fold), but this increase was not significant ($P = 0.11$). In the brain, however, we consistently observed 5.7-fold more *Ngb* protein in the hypoxic than in the normoxic animals. This increase was highly significant, as estimated by a Student's *t*-test ($P < 0.001$).

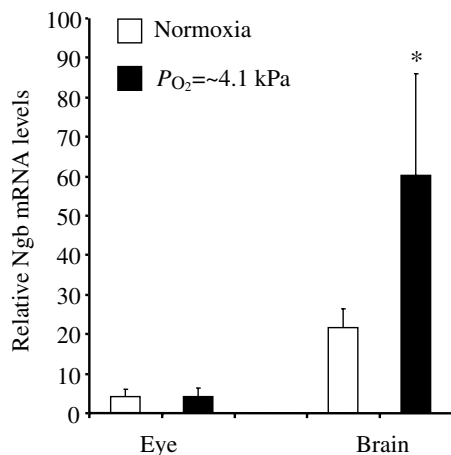


Fig. 4. Expression of neuroglobin (*Ngb*) mRNA in zebrafish eye and brain. Zebrafish were kept for 24 h at normoxia (white columns) or $P_{O_2} \sim 4.1$ kPa (black columns). *Ngb* mRNA levels from eye and brain were quantified separately by real-time PCR ($N = 4$). The units of the y-axis are arbitrary. * $P < 0.05$ (*t*-test).

Discussion

Zebrafish at low oxygen concentrations

Fish have many different adaptations that allow them to cope with the oscillations in P_{O_2} that may occur in the aquatic environment (Nikinmaa, 2002; Nilsson and Renshaw, 2004; Cossins and Crawford, 2005). A previous study reported that adult zebrafish survive a P_{O_2} of 2 kPa at 22°C for 48 h (Rees et al., 2001), whereas in our hands $P_{O_2} \sim 2.4$ kPa at 22°C caused >80% mortality after less than 24 h. This discrepancy

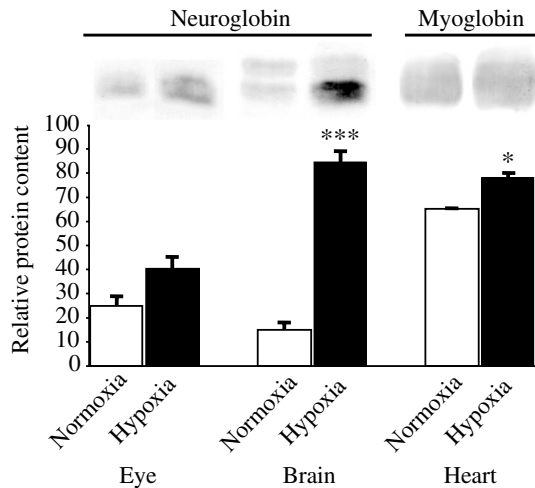


Fig. 5. Expression of neuroglobin (Ngb) in zebrafish eye and brain, and myoglobin (Mb) in heart. Zebrafish were kept for 48 h at normoxia (white columns) or $P_{O_2} = -4.1$ kPa (black columns). Ngb protein levels from eye and brain, and Mb levels from heart, were quantified separately (100 μ g protein per lane; $N=3$). The units of the y-axis are arbitrary. *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$ (t -test).

may be explained by differences in zebrafish strains. We have chosen an oxygen partial pressure of ~ 4.1 kPa (4.15 kPa) as the severe hypoxic condition for our experiments. The strong upregulation of the typical hypoxia-responsive genes *ldha* and *pgk1*, which is in line with a recent microarray study (Ton et al., 2003), demonstrates that under these conditions zebrafish were actually experiencing serious hypoxic stress.

We observed a large standard deviation in all our quantitative real-time PCR experiments employing zebrafish. A similarly large variability has been noted for various fish species in a number of microarray studies (Oleksiak et al., 2002; Cossins and Crawford, 2005). These variations in mRNA levels certainly reflect genetic, physiological or behavioral differences between individuals. Nevertheless, most changes in globin mRNA levels were significant, and, in the case of Mb and Ngb, agreed with parallel western blot experiments. Moreover, we observed very similar values for the expression levels of Hb α and Hb β , as expected for the products of such tightly co-regulated genes (Hardison, 1998). It should also be noted that variability in Mb and Ngb protein content was much smaller than the variation in mRNA levels, suggesting additional regulation at the translational level.

Understanding the role of respiratory proteins in hypoxia response

Maintaining a constant flow of oxygen from the water to the respiratory chain of the mitochondria is a major challenge for fish living under hypoxia. Respiratory proteins already enhance oxygen availability under normoxia, and changes in their concentration or physiological properties are expected under hypoxia. It is well established that Hb transports oxygen in the circulatory system and that Mb enhances oxygen supply to striated muscle cells, which is, in the case of fish, mainly the

heart. Much less is known about the recently discovered novel members of the globin family, Ngb, Cygb and GbX (Burmester and Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005), which are present in fish (Awenius et al., 2001; Burmester et al., 2002; Fuchs et al., 2004; Fuchs et al., 2005; Roesner et al., 2005). Their expression response in an animal system that is evolutionarily adapted to at least temporarily low oxygen partial pressures provides hints to their general physiological functions in vertebrates and their particular roles in hypoxic response.

Hemoglobin mRNA is downregulated under hypoxia

A surprising finding of our study is that Hb α and β mRNA levels were significantly lower after 2 days of hypoxia compared to the normoxia controls. The response of Hb to hypoxia exposure in fish is not clear (Nikinmaa and Rees, 2005). Whereas some studies reported an increase of Hb under hypoxia (e.g. Timmerman and Chapman, 2004), others did not see any change in Hb concentration (e.g. Person-Le Ruyet et al., 1998), or a differential responses depending on exposure times (e.g. Affonso et al., 2002). Thus hypoxia response of Hb in fish may be species specific. Down-regulation of Hb mRNA in zebrafish has previously been reported in a microarray study employing embryos (Ton et al., 2003). The authors explained this observation by stating that zebrafish embryos, 24 h post-fertilization, did not require blood flow, but oxygen uptake was achieved by diffusion. However, there is no doubt that adult zebrafish, which display the same decrease of Hb mRNA (Figs 2 and 3), rely on blood circulation. Therefore, an alternative hypothesis to explain Hb regulation in hypoxic zebrafish is required.

First, we have to emphasize that we only monitored Hb mRNA. Protein levels may actually behave quite differently. Another explanation could be the induction of distinct Hb chains. Database searches revealed six copies of the Hb α gene and five of the Hb β gene. According to the annotation, two α and three β hemoglobins are embryonic hemoglobins, leaving multiple copies of each gene that are potentially expressed in the adult zebrafish. The oligonucleotide primers we used for quantitative PCR were designed to amplify all adult Hb α and β chains. Even a differential behavior of adult Hb genes would not alter the observed overall down-regulation of Hb. We cannot exclude that hypoxia, for example, induces the expression of embryonic Hbs. In fact, it has been observed by gel electrophoresis that hypoxia changes the pattern of Hb chains in trout (Marinsky et al., 1990). However, based on the observation of Ton et al. (Ton et al., 2003) of a down-regulation of embryonic Hbs in embryos, we consider this explanation less likely.

Another possible explanation is that under hypoxia the amount of Hb exceeds the available oxygen. Therefore, a rise in Hb concentration and thus oxygen carrying capacity would have only minor effect on oxygen delivery, but would be very energy costly. Numerous studies have demonstrated that hypoxia induces in fish a change in oxygen binding properties of Hb (Weber and Jensen, 1988; Nikinmaa, 2001; Jensen, 2004). Under hypoxia, the concentrations of the modulators

adenosine triphosphate (ATP) and guanosine triphosphate (GTP) fall in red blood cells, leading to an increased O₂ affinity of Hb. This is a more efficient mechanism that improves oxygen uptake by the blood. The decrease of Hb mRNA could be explained by an energy-saving mechanism that ceases Hb synthesis. However, we should note that we only investigated short-term changes, up to 2 days hypoxia. It is possible that other regimes will reveal a distinct pattern of Hb expression. Clearly, additional studies are required to fully understand the peculiar behavior of Hb mRNA under hypoxia.

Hypoxia induces myoglobin expression in zebrafish heart

The function of Mb is to facilitate diffusion of oxygen from the capillaries to mitochondria and to store oxygen, but it may also detoxify NO (Wittenberg and Wittenberg, 2003). In mammals, the pattern of Mb regulation under hypoxia is not conclusive. It is held that low-oxygen conditions, as they occur e.g. during high altitude training, increase Mb levels (Hoppeler and Vogt, 2001), but not all agree (e.g. Levine and Stray-Gundersen, 2001). In zebrafish, we observe that severe hypoxia induces Mb mRNA and protein (Figs 2, 3 and 5). This observation is in line with a major oxygen supply role of Mb for the heart. Because Mb is a monomeric protein, it does not display an Hb-like cooperativity that would enhance its oxygen affinity. The only possible mechanism to increase oxygen flow into the cardiac muscle is therefore to raise Mb concentrations.

Hypoxia regulation of neuroglobin and implication for its function

In this study, we have investigated for the first time the changes of Ngb expression in fish. Although this respiratory protein has been intensively studied in recent years, its exact role in vertebrate neurons is far from understood (Burmester and Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005). The phylogenetic relationship of Ngb to invertebrate nerve Hbs (Burmester et al., 2000), positive correlation with the intensity of cellular metabolism (Schmidt et al., 2003), co-localization with mitochondria (Bentmann et al., 2005) and ability to promote neuronal survival under hypoxia or ischemia (Sun et al., 2001) point to an Mb-like O₂ supply function of Ngb. However, other functions for Ngb, such as the detoxification of RNS and NO or signaling have been proposed (for reviews, see Burmester and Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005).

The published data disagree on the regulation of expression of Ngb under low oxygen conditions in mammalian systems. Sun et al. reported a 2.5-fold upregulation of Ngb mRNA and protein under nominal anoxia in a primary neuronal cell culture from mouse (Sun et al., 2001). An upregulation of Ngb mRNA was also obtained in a mouse neuronal cell line (Fordel et al., 2004), although the changes were not significant. By contrast, mice kept under sustained hypoxia (10% O₂) for up to 2 weeks showed no change in Ngb mRNA in the brain (Mammen et al., 2002). However, in rat, we observed a down-regulation of Ngb mRNA by about 40–60% after 5 h at 6% O₂, or after up to 44 h at 10% O₂ (A. Avivi, F. Gerlach, S. Reuss, T. Burmester, E. Nevo and T. Hankeln, unpublished data).

We show here that Ngb behaves differentially in the zebrafish brain and eye. Whereas in brain, Ngb mRNA levels showed a short-term upregulation after 24 h at $P_{O_2} \approx 4.1$ kPa (Fig. 4), no effect was observed in the whole eye. This pattern perfectly matches the western blot data (Fig. 5), which show a 5.7-fold increase of Ngb protein after 48 h severe hypoxia in brain but not in eye. In the eye, the protein levels only slightly increased. The differences might be explained by distinct behavior of these organs under hypoxia. The crucian carp *Carassius carassius*, which also belongs to the Cypriniformes, becomes blind under anoxia (Johansson et al., 1997), whereas the brain still functions (Nilsson, 2001). By inference, we assume that hypoxia causes a major decrease of metabolic activity of the zebrafish eye, whereas the brain is more or less active. We have previously demonstrated that the expression levels of Ngb in mammals are closely linked to metabolic activity and oxygen consumption (Schmidt et al., 2003; Bentmann et al., 2005). Therefore, high levels of Ngb are obviously required to preserve the oxidative metabolism in the zebrafish brain.

Our data show for the first time that Ngb is actually a hypoxia-inducible gene *in vivo* under naturally occurring conditions. This observation perfectly agrees with the hypothesis of Ngb being an O₂ supply protein of the neurons, similar to the function of Mb in the muscle cells (Burmester et al., 2000; Sun et al., 2001; Schmidt et al., 2003; Bentmann et al., 2005). In fact, Ngb behaves in the brain in a largely similar way to Mb in the heart. Nevertheless, it should also be considered that several studies reported that under low oxygen conditions (hypoxia or ischemia) the concentrations of ROS and NO may increase (Jezek and Hlavata, 2005; Wenger, 2006). Therefore, it is still conceivable that Ngb breaks down these deleterious compounds (Herold et al., 2004; Brunori et al., 2005). Regardless of its actual function at the molecular level, Ngb is presumably neuroprotective for both fish and mammals.

The other globins: cytoglobin and globin X

Fish possess two paralogous Cygb genes, which duplicated early in teleost evolution (Fuchs et al., 2005). In mammals, which have only a single gene copy (Burmester et al., 2002), Cygb expression increases under hypoxia in a variety of tissues (Schmidt et al., 2004; Fordel et al., 2004). We did not observe significant changes of Cygb1 or Cygb2 mRNA levels (Figs 2 and 3), indicating that Cygb is not involved in acute hypoxia response of zebrafish. GbX has only recently been discovered in fish and amphibians (Roesner et al., 2005). It is expressed at a low level in a variety of tissues, but its function is uncertain. The severe down-regulation of GbX mRNA in hypoxic zebrafish points to a close relationship of the gene to oxygen-dependent metabolism, but it is unlikely to be involved in oxygen supply.

Conclusions

We have presented the first comprehensive study on the regulation of globins under hypoxia in a single organism.

Because zebrafish may actually experience hypoxic periods in its environment, it is probable that the changes in mRNA and protein levels we observed here reflect physiological responses. This is in contrast to many mammalian studies, which have investigated species that are unlikely to experience any hypoxic situation during adult life or have used cell culture systems. The down-regulation of Hb mRNA in zebrafish under hypoxia certainly requires additional studies. The increased expression of Mb and Ngb under hypoxia is consistent with a proposed function of these proteins in oxygen supply to the heart and brain, respectively. This finding is remarkable in the case of Ngb, the function of which is still a topic of hot debate. GbX gene expression is markedly reduced under oxygenated conditions, providing a first hint to its physiological role.

We thank B. Pelster for discussions, J. Markl for the working facilities, and F. Gerlach for his advice on the real-time PCR experiments. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Bu956/5 and Ha2103/3) and the Fonds der Chemischen Industrie.

References

- Affonso, E. G., Polez, V. L., Correa, C. F., Mazon, A. F., Araujo, M. R., Moraes, G. and Rantin, F. T. (2002). Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* **133C**, 375-382.
- Avenius, C., Hankeln, T. and Burmester, T. (2001). Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 418-421.
- Bentmann, A., Schmidt, M., Reuss, S., Wolfrum, U., Hankeln, T. and Burmester, T. (2005). Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration. *J. Biol. Chem.* **280**, 20660-20665.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brunori, M., Giuffrè, A., Nienhaus, K., Nienhaus, G. U., Scandurra, F. M. and Vallone, B. (2005). Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8483-8488.
- Burmester, T. and Hankeln, T. (2004). Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News Physiol. Sci.* **19**, 110-113.
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S. and Hankeln, T. (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**, 520-523.
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B. and Hankeln, T. (2002). Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 416-421.
- Cossins, A. R. and Crawford, D. L. (2005). Fish as models for environmental genomics. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 324-333.
- Dalla Via, J., van den Thillart, G., Cattani, O. and de Zwaan, A. (1994). Influence of longterm hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. II. Intermediary metabolism in blood, liver, and muscle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **111**, 17-27.
- Fordel, E., Geuens, E., Dewilde, S., Rottiers, P., Carmeliet, P., Grooten, J. and Moens, L. (2004). Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 342-348.
- Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, A., Hamdane, D., Marden, M. C., Hankeln, T. and Burmester, T. (2004). Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 24116-24122.
- Fuchs, C., Luckhardt, A., Gerlach, F., Burmester, T. and Hankeln, T. (2005). Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 216-223.
- Gracey, A. Y., Troll, J. V. and Somero, G. N. (2001). Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1993-1998.
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S. et al. (2005). Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 110-119.
- Hardison, R. (1998). Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* **201**, 1099-1117.
- Herold, S., Fago, A., Weber, R. E., Dewilde, S. and Moens, L. (2004). Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 22841-22847.
- Hoppeler, H. and Vogt, M. (2001). Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J. Exp. Biol.* **204**, 3133-3139.
- Jensen, F. B. (2004). Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol. Scand.* **182**, 215-227.
- Jensen, F. B., Nikinmaa, M. and Weber, R. E. (1993). Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In *Fish Ecophysiology* (ed. J. C. Rankin and F. B. Jensen), pp. 161-179. London: Chapman & Hall.
- Ježek, P. and Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2478-2503.
- Johansson, D., Nilsson, G. E. and Døving, K. B. (1997). Anoxic depression of light-evoked potentials in retina and optic tectum of crucian carp. *Neurosci. Lett.* **237**, 73-76.
- Levine, B. D. and Stray-Gundersen, J. (2001). The effects of altitude training are mediated primarily by acclimatization, rather than by hypoxic exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.* **502**, 75-88.
- Mammen, P. P. A., Shelton, J. M., Goetsch, S. C., Williams, S. C., Richardson, J. A., Garry, M. G. and Garry, D. J. (2002). Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 1591-1598.
- Marinsky, C. A., Houston, A. H. and Murad, A. (1990). Effect of hypoxia on hemoglobin isomorph abundances in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.* **68**, 884-888.
- Nikinmaa, M. (2001). Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respir. Physiol.* **128**, 317-329.
- Nikinmaa, M. (2002). Oxygen-dependent cellular functions – why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comp. Biochem. Physiol.* **133A**, 1-16.
- Nikinmaa, M. and Rees, R. B. (2005). Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am. J. Physiol.* **288**, R1079-R1090.
- Nilsson, G. E. (2001). Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol. Sci.* **16**, 217-221.
- Nilsson, G. E. and Renshaw, G. M. C. (2004). Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J. Exp. Biol.* **207**, 3131-3139.
- Oleksiak, M. F., Churchill, G. A. and Crawford, D. L. (2002). Variation in gene expression within and among natural populations. *Nat. Genet.* **32**, 261-266.
- Padilla, P. A. and Roth, M. B. (2001). Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7331-7335.
- Pelster, B. (2002). Developmental plasticity in the cardiovascular system of fish, with special reference to the zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol.* **133A**, 547-553.
- Person-Le Ruyet, J., Boeuf, G., Zambonino-Infante, J., Helgason, S. and Le Roux, A. (1998). Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* **119A**, 511-518.
- Rees, B. B., Sudradjat, F. A. and Love, J. W. (2001). Acclimation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. *J. Exp. Zool.* **289**, 266-272.
- Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M., Burmester, T. and Hankeln, T. (2002). Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience* **115**, 645-656.
- Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T. and Burmester, T. (2005). A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 12-22.
- Samaja, M., Crespi, T., Guazzi, M. and Vandegriff, K. D. (2003). Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity

- and impact of the phenomena related to hemoglobin allostereism and red cell function. *Eur. J. Appl. Physiol.* **90**, 351-359.
- Schmidt, M., Gießl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U. and Burmester, T.** (2003). How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply of the mammalian retina. *J. Biol. Chem.* **278**, 1932-1935.
- Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J. C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T. et al.** (2004). Cytoglobin is a respiratory protein expressed in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **279**, 8063-8069.
- Simpson, D. A. C., Feeney, S., Boyle, C. and Stütt, A. W.** (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Mol. Vis.* **6**, 178-183.
- Smith, R. W., Houlihan, D. F., Nilsson, G. E. and Brechin, J. G.** (1996). Tissue-specific changes in protein synthesis rates in vivo during anoxia in crucian carp. *Am. J. Physiol.* **271**, R897-R904.
- Sollid, J., Kjærnsli, A., De Angelis, P. M., Røhr, A. K. and Nilsson, G. E.** (2005). Cell proliferation and gill morphology in anoxic crucian carp. *Am. J. Physiol.* **289**, R1196-R1201.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y. and Greenberg, D. A.** (2001). Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15306-15311.
- Timmerman, C. M. and Chapman, L. J.** (2004). Behavioral and physiological compensation for chronic hypoxia in the sailfin molly (*Poecilia latipinna*). *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 601-610.
- Ton, C., Stamatiou, D. and Liew, C. C.** (2003). Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiol. Genomics* **13**, 97-106.
- van den Thillart, G. and van Waarde, A.** (1985). Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.* **8**, 393-409.
- van der Meer, D. L., van den Thillart, G. E., Witte, F., de Bakker, M. A., Besser, J., Richardson, M. K., Spink, H. P., Leito, J. T. and Bagowski, C. P.** (2005). Gene expression profiling of the long-term adaptive response to hypoxia in the gills of adult zebrafish. *Am. J. Physiol.* **289**, R1512-R1519.
- Weber, R. E. and Jensen, F. B.** (1988). Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* **50**, 161-179.
- Wenger, R. H.** (2006). Mitochondria: oxygen sinks rather than sensors? *Med. Hypotheses* **66**, 380-383.
- Wittenberg, J. B. and Wittenberg, B. A.** (2003). Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* **206**, 2011-2020.

Eidesstattliche Erklärung

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

Mainz, den 06.05.2007

Anja Rösner