

Expressions- und Funktionsanalysen von Neuroglobin und Cytoglobin

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
(*doctor rerum naturalium*; Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie der
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
in Mainz

vorgelegt von
Dipl.-Biologin Sylvia Wystub
geb. in Opole, Polen

Mainz, 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.07

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Globine - Evolution, Struktur und Funktion.....	1
1.1.1	Molekulare Struktur der Globine.....	3
1.1.2	Vielfalt der Globine und ihre Funktionen.....	5
1.1.3	Globine der Vertebraten	7
1.1.3.1	Organisation und Sequenzevolution	7
1.1.3.2	Hämoglobin.....	10
1.1.3.3	Myoglobin	13
1.1.3.4	Neuroglobin	14
1.1.3.5	Cytoglobin	16
1.1.3.6	Mögliche Funktionen von Neuro- und Cytoglobin	18
1.2	„reactive oxygen species“ (ROS)	19
1.2.1	Entstehung von ROS	19
1.2.2	ROS im Alterungsprozess	22
1.2.3	Reaktionen von Globinen mit ROS.....	23
1.3	Tiermodelle zur funktionellen Genanalyse in Säugern.....	25
1.3.1	Gezieltes Ausschalten von Zielgenen in knock out-Mäusen	25
1.3.2	Überexpression von Genprodukten in transgenen Mäusen	29
1.4	Zielsetzung der Arbeit	31
2	Material und Methoden	33
2.1	Versuchsmaterial und Tiere	33
2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	34
2.2.1	Standard-Gelelektrophorese	34
2.2.2	DNA-Fällung	34
2.2.3	DNA-Restriktion	34
2.2.4	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-DNA-Extraktion	35
2.2.5	Standard-PCR	35
2.2.6	„Long Template“ und „Proofreading“ PCR.....	35
2.2.7	Kolonie PCR-Screening-Methode.....	36
2.2.8	Aufreinigung der PCR-Produkte	37
2.2.9	Klonierung in Plasmidvektoren	37
2.2.9.1	dA-tailing von PCR-Fragmenten	38
2.2.9.2	Dephosphorylierung von Plasmidvektoren	38
2.2.10	Elektrokompetente Bakterien und Elektroporation	38

2.3	DNA Präparation	39
2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Mus musculus</i>	39
2.3.2	Plasmidisolierung nach der „TELT-Schnellmethode“	39
2.3.3	Minipräparation von Plasmid-DNA	40
2.3.4	Maxipräparation von Plasmid-DNA	40
2.3.5	Präparation der knock out-Plasmide	40
2.4	RNA-Präparation	41
2.4.1	DNase-Verdau nach der Präparation der RNA	42
2.5	Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA	42
2.6	Reverse Transkription und RACE	43
2.7	Konzentrationsbestimmung der cDNA mit Hilfe von „PicoGreen“	43
2.8	Quantitative Realtime RT-PCR	44
2.8.1	Durchführung der Realtime Q-PCR mit SYBR-Green	44
2.8.2	Durchführung der Realtime Q-PCR mit einer „TaqMan“-Sonde	45
2.8.3	Auswertung der Q-PCR anhand von Standardplasmiden	46
	2.8.3.1 Relative Quantifizierung - $\Delta\Delta C_t$ -Methode	47
	2.8.3.2 Relative Quantifizierung - Standardkurvenmethode	47
2.9	DNA-Sequenzierung	48
2.10	Computerunterstützte Analyse der Sequenzdaten	49
2.11	Präparation muriner Gewebe und Herstellung von Gewebeschnitten für mRNA- <i>in situ</i> -Hybridisierungen und Immunohistochemie	50
2.11.1	Zuckerreihe für perfundierte Gewebe	50
2.12	Markierung der Sonden für Hybridisierungsversuche	51
2.12.1	Radioaktive DNA-Markierung	51
2.12.2	RNA-Markierung durch Einbau von Digoxigenin-UTP	51
	2.12.2.1 Überprüfen der Markierungseffizienz	51
	2.12.2.2 Northern Blot-Test der DIG-markierten Sonden	52
2.12.3	Markierung von Oligosonden mit Digoxigenin-ddUTP	52
2.13	Hybridisierungstechniken	53
2.13.1	DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern	53
2.13.2	Koloniefilterhybridisierung	53
2.13.3	Northern Hybridisierung	54
2.13.4	mRNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit DIG-markierter RNA-Sonden	54
2.13.5	mRNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotiden	55
2.14	Immunohistochemie	55
2.14.1	Kompetitionstest	56
2.15	Mikroskopie und Photodokumentation	56

2.16	Proteinbiochemische Standardmethoden	57
2.16.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
2.16.2	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	57
2.16.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	58
2.17	Proteinextraktionsmethoden.....	58
2.17.1	Isolierung von Proteinen aus Zellplasma und Zellkern	58
2.18	Western Blot.....	59
2.18.1	Immundetektion von Proteinen	59
2.18.2	Nachweisreaktion mit dem NBT/BCIP-System.....	60
2.18.3	Nachweisreaktion mit dem ECL-System	60
2.19	Lösungen und Materialien	61
2.20	Bezugsquellen.....	65
3	Ergebnisse.....	67
3.1	Komparative Sequenzanalyse des Neuroglobins.....	67
3.1.1	Genomische Struktur und Organisation des Neuroglobins im Interspeziesvergleich	68
3.1.2	Mögliche regulatorische Elemente in nicht-kodierenden Sequenzbereichen des <i>Ngb</i> -Gens	71
3.2	Expressionsanalyse von Neuroglobin	76
3.2.1	Lokalisation von Neuroglobin im zentralen Nervensystem	77
3.2.2	Neuroglobin im peripheren Nervensystem und endokrinen Geweben	84
3.2.3	Co-Lokalisation von <i>Ngb</i> und nNOS.....	89
3.3	Expressionsanalyse von Cytoglobin.....	90
3.3.1	Lokalisation von Cytoglobin im zentralen Nervensystem (ZNS).....	90
3.3.2	Subzelluläre Lokalisation von Cytoglobin in Neuronen.....	100
3.3.3	Co-Lokalisation von <i>Cygb</i> und nNOS	102
3.4	Neuroglobin- und Cytoglobin-Expression in seneszenten Hamstern	104
3.4.1	Klonierung und Sequenzierung der cDNAs für <i>Ngb</i> und <i>Cygb</i> aus <i>Phodopus sungorus</i>	105
3.4.2	Q-PCR-Analyse der <i>Ngb</i> - und <i>Cygb</i> -Expression in jung adulten und seneszenten <i>Phodopus sungorus</i>	109
3.4.3	Q-PCR-Analyse der Expression von Kontrollgenen während der <i>Phodopus</i> -Alterung	113
3.5	Experimente zur Herstellung einer Neuroglobin knock out-Maus	116
3.5.1	Konstruktion des Targeting-Vektors „ <i>Ngb</i> -ko1“	116
3.5.2	Konstruktion des Targeting-Vektors „ <i>Ngb</i> -ko2“	119
3.5.3	Konstruktion der Targeting-Vektoren „ <i>Ngb</i> -ko3.1“ und „ <i>Ngb</i> -ko3.2“	119
3.5.4	Etablierung von PCR-Genotypisierungsmethoden zum Nachweis von Targeting-Ereignissen.....	122

3.5.5	Etablierung von Southern Blot-Nachweisen zur Detektion von Targeting-Ereignissen.....	125
3.5.6	Genotypisierung von rekombinanten ES-Zell-Klonen	130
3.6	Experimente zur Herstellung einer Cytoglobin knock out-Maus	136
3.6.1	Der Cygb knock out-Vektor.....	136
3.6.2	Analyse von rekombinanten ES-Zell-Klonen mittels PCR-Schnelltest....	138
3.6.3	Analyse der möglichen positiven ES-Zell-Klone mittels Southern Blot ...	140
3.6.4	Expression von Neuroglobin und Cytoglobin in embryonalen Stammzellen	142
3.7	Herstellung von induzierbaren Transgen-Konstrukten für Ngb und Cygb	143
3.7.1	Vorbereitung des Vektors pINS-pBI.....	143
3.7.2	Vorbereitung der proteinkodierenden Sequenzen von Ngb und Cygb ...	145
4	Diskussion	151
4.1	Analyse der Ngb-mRNA- und Proteinverteilung in murinen Geweben	152
4.2	Funktionelle Bedeutung des Ngb-Expressionsmusters	155
4.3	Analyse der Cygb-Proteinverteilung in murinen Geweben	165
4.3.1	Welche Nervenzellpopulationen im Gehirn exprimieren Cygb?.....	167
4.3.2	Cygb-Protein im Cytoplasma und Zellkern von Neuronen.....	168
4.3.3	Funktionelle Bedeutung des Expressionsmusters von Cygb.....	170
4.3.4	Cygb und NO-Stoffwechsel im Maus-Gehirn: eine funktionelle Beziehung?	171
4.4	Analyse der Sequenzevolution von Neuroglobin	173
4.4.1	Konservierte regulatorische Elemente im Ngb-Gen und deren mögliche funktionelle Bedeutung	175
4.4.2	Mögliches Signal für eine neuronenspezifische Expression von Ngb.....	176
4.4.3	Wird Neuroglobin durch HIF-1 reguliert?	179
4.5	Ngb- und Cygb-Expression im alternden Säugergehirn	187
4.6	Bedeutung von transgenen und knock out-Mäusen für die Funktionsanalyse unbekannter Gene	192
4.7	Ausblick	196
5	Zusammenfassung	199
6	Literaturverzeichnis	201
6.1	Veröffentlichungen.....	226
7	Anhang	229
7.1	Verwendete Oligonukleotide.....	230
7.2	Verwendete Antikörper	233
7.3	Verwendete Plasmidvektoren	234
7.4	<i>Phodopus sungorus</i> RNA und cDNA-Präparationen	238
7.5	<i>Phodopus sungorus</i> Gensequenzen für die Q-PCR.....	239

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Dreidimensionale Darstellung der Globinfaltung	3
Abbildung 1-2 Die Häm-Gruppe in penta- und hexakoordinierten Globinen.....	4
Abbildung 1-3 Vertebratenglobine.....	7
Abbildung 1-4 Die α - und β -Subfamilien des Hämoglobins	8
Abbildung 1-5 Phylogenetischer Stammbaum der Vertebratenglobine	9
Abbildung 1-6 Aminosäurenvergleich der humanen Globine.....	17
Abbildung 1-7 Hypothetische Funktionen intrazellulärer Globine	19
Abbildung 1-8 ROS- und NO-Metabolismus in der mitochondrialen Matrix.....	20
Abbildung 1-9 Pro- und Antioxidantien.....	21
Abbildung 1-10 Generierung einer knock out-Maus.....	27
Abbildung 1-11 Das Cre- <i>loxP</i> -Rekombinationssystem	28
Abbildung 1-12 Das Tetracyclin-Transaktivator-System	30
Abbildung 2-1 Die Realtime Q-PCR Standardkurve	46
Abbildung 3-1 Der <i>NGB/Ngb</i> -„Percent Identity Plot“ (PIP).....	70
Abbildung 3-2 Graphische Darstellung der rVISTA Suchergebnisse.....	74
Abbildung 3-3 <i>Ngb</i> -ISH und IF-Signale im Maus-Vorderhirn	78
Abbildung 3-4 <i>Ngb</i> -mRNA und Protein im Hippocampus	79
Abbildung 3-5 <i>Ngb</i> -Signale im Hirnstamm	81
Abbildung 3-6 <i>Ngb</i> -Nachweis im Kleinhirn.....	82
Abbildung 3-7 <i>Ngb</i> -Detektion im Rückenmark	83
Abbildung 3-8 <i>Ngb</i> -IF-Signale in der Nähe von Blutgefäßen.....	84
Abbildung 3-9 <i>Ngb</i> -Signale in sensorischen Ganglien.....	85
Abbildung 3-10 Neuroglobin im PNS.....	86
Abbildung 3-11 <i>Ngb</i> -Signale im Maus-Testis.....	87
Abbildung 3-12 <i>Ngb</i> -Expression in endokrinen Geweben	88
Abbildung 3-13 Co-Lokalisation von <i>Ngb</i> mit nNOS	89
Abbildung 3-14 <i>Cygb</i> -Immunfärbung im Maus-Gehirn mit Kernfärbung.....	91
Abbildung 3-15 <i>Cygb</i> -IF im cerebralen Cortex und Striatum	93
Abbildung 3-16 <i>Cygb</i> -IF in Hippocampus, Hypothalamus und den Habenulae.....	94
Abbildung 3-17 <i>Cygb</i> -IF im Hypothalamus.....	95
Abbildung 3-18 <i>Cygb</i> -Signale im Mesencephalon	96
Abbildung 3-19 <i>Cygb</i> -Färbung im Tegmentum	97
Abbildung 3-20 <i>Cygb</i> -Immunfärbung im Hirnstamm	98
Abbildung 3-21 <i>Cygb</i> -IF im Hirnstamm	99
Abbildung 3-22 <i>Cygb</i> -IF im Cerebellum	99
Abbildung 3-23 <i>Cygb</i> -Western Blot.....	100
Abbildung 3-24 LSM-Aufnahmen <i>Cygb</i> -immunoreaktiver Zellen.....	101

Abbildung 3-25 Co-Lokalisation von NPY und Cygb im Striatum.....	102
Abbildung 3-26 Co-Lokalisation von nNOS und Cygb im Maus-Gehirn.....	103
Abbildung 3-27 Sagittalschnitt eines Rattengehirns.....	104
Abbildung 3-28 mRNA-Sequenz des Neuroglobins aus <i>Phodopus sungorus</i>	106
Abbildung 3-29 Ein Vergleich der Ngb-Proteinsequenzen aus Mensch, Maus und Hamster.	106
Abbildung 3-30 Partielle mRNA Sequenz des Cytoglobins aus <i>Phodopus sungorus</i>	107
Abbildung 3-31 Ein Vergleich der Cygb-Proteinsequenzen aus Mensch, Maus und Hamster	108
Abbildung 3-32 Ngb-mRNA-Expression in jungen und alten <i>Phodopus sungorus</i>	109
Abbildung 3-33 Ngb-mRNA-Expression in jungen und alten <i>Phodopus sungorus</i>	111
Abbildung 3-34 Cygb-mRNA-Expression in jungen und alten <i>Phodopus sungorus</i>	111
Abbildung 3-35 Cygb-mRNA-Expression in jungen und alten <i>Phodopus sungorus</i>	112
Abbildung 3-36 C4-mRNA-Expression in jungen und alten <i>Phodopus sungorus</i>	113
Abbildung 3-37 C4-mRNA-Expression in jung adulten und seneszenten Phodopus.....	114
Abbildung 3-38 C4-mRNA-Expression in weiblichen und männlichen Phodopus	115
Abbildung 3-39 Calmodulin1-mRNA-Expression in jungen und seneszenten Phodopus.....	115
Abbildung 3-40 Skizze des Ngb-ko1-Targeting-Vektors	118
Abbildung 3-41 Übersichtsskizze der Vektorkonstrukte Ngb-ko3.1-ko3.3	121
Abbildung 3-42 Kontrollkonstrukt zur Etablierung des PCR-Schnelltests für den Ngb-ko1-Targeting-Vektor.....	122
Abbildung 3-43 Kontroll-Konstrukt zur Etablierung des PCR-Schnelltests für die Ngb-ko3.1 und 3.2-Targeting-Vektoren.....	123
Abbildung 3-44 Etablierung des PCR-Assays für das Konstrukt Ngb-ko1	124
Abbildung 3-45 Etablierung des PCR-Assays für die Konstrukte Ngb-ko3.1 und 3.2.....	124
Abbildung 3-46 Strategie zur genomischen Southern Blot-Analyse von rekombinanten ES-Zellen des Ngb-ko1-Vektor-Konstruktes	126
Abbildung 3-47 Genomischer Southern Blot-Vorversuch für das Ngb-ko1-Konstrukt	127
Abbildung 3-48 Strategie zur genomischen Southern Blot-Analyse von rekombinanten ES-Zellen der Ngb-ko3.1 und Ngb-ko3.2-Targeting-Konstrukte	128
Abbildung 3-49 Southern Blot-Versuch zur Genotypisierung rekombinanter ES-Zellen.....	129
Abbildung 3-50 Ngb-ko1-Targeting-Vektor Plasmidpräparationen.....	130
Abbildung 3-51 Linearisierte Ngb-ko3.1 und 3.2-Targeting-Plasmide	132
Abbildung 3-52 Test einer 96well Platte mit ES-Zell-Lysaten bezüglich der DNA-Qualität....	134
Abbildung 3-53 Test-PCRs und PCR-Schnelltest der gereinigten ES-Zell-DNA	135
Abbildung 3-54 Übersichtsskizze des Cygb-Vektors.....	136
Abbildung 3-55 Cygb- und Ngb-knock out-Plasmide	137
Abbildung 3-56 Cygb-ko PCR-Schnelltest und anschließende Southern Blot-Analyse	139
Abbildung 3-57 Southern Blot-Analyse.....	141
Abbildung 3-58 Expression von Neuroglobin, Cytoglobin und β -Aktin in Maus Leber, Gehirn und in embryonalen Stammzellen	142
Abbildung 3-59 Verdau des pINS-pBI-Vektors	144
Abbildung 3-60 Die Herstellung der Ngb- bzw. Cygb.CDS	145
Abbildung 3-61 „Proofreading“-PCR-Amplifikation der Ngb- und Cygb-CDS	145

Abbildung 3-62 PCR-Analyse der <i>E.coli</i> -Klone	146
Abbildung 3-63 Plasmid-Prep der transgenen Ngb-pINS-pBI und Cygb-pINS-pBI Plasmide	147
Abbildung 3-64 Skizze zur Linearisierung des pINS-pBI-Vektors	148
Abbildung 3-65 Ngb- bzw- Cygb-Transgen-Vektoren	149
Abbildung 4-1 Quantitative Darstellung des NRSE Sequenz-Motivs	178
Abbildung 4-2 Lokale Sequenzalignments der 5'- und 3'-UTR des Ngb-Gens in Mensch und Maus	182
Abbildung 7-1 pGEM®-T Easy-Plasmidvektor	234
Abbildung 7-2 pPNT-Plasmidvektor	235
Abbildung 7-3 pBI-EGFP-Plasmidvektor	235
Abbildung 7-4 Sequenz des modifizierten pBI-EGFP-Ins-Vektors	237
Abbildung 7-5 ARP-CDS-Ausschnitt	239
Abbildung 7-6 β -Aktin-CDS-Ausschnitt	239
Abbildung 7-7 Calmodulin 1-CDS-Ausschnitt	239
Abbildung 7-8 Complement 4-CDS-Ausschnitt	239
Abbildung 7-9 NSE Q-PCR-Fragment	239
Abbildung 7-10 GAPDH-CDS-Ausschnitt	240

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Hämoglobine in Pflanzen, Pilzen und Bakterien und ihre möglichen Funktionen	6
Tabelle 3-1 Zusammenstellung der Ngb-Datenbankeinträge	68
Tabelle 3-2 Auswahl einiger Sequenzmotive, die an der Hypoxie-induzierten Regulation bekannter Gene beteiligt sind	72
Tabelle 3-3 Aus der Literatur bekannte funktionelle NRSE-Motive	75
Tabelle 3-4 Präparation der Gehirne aus jungen und alten <i>Phodopus sungorus</i>	104
Tabelle 3-5 Repetitive Elemente in den homologen Abschnitten des Ngb-ko1-Vektors	117
Tabelle 3-6 Verwendete Primer und Fragmentlängen der Integrate im Ngb-ko1-Vektor	118
Tabelle 3-7 Repetitive Elemente in den homologen Abschnitten der Ngb-ko3.1 und -ko3.2-Targeting-Vektoren	120
Tabelle 3-8 Verwendete Primer und Fragmentlängen der Integrate in den Targeting-Konstrukten Ngb-ko3.1, -ko3.2	121
Tabelle 3-9 Primer und Fragmentlänge zum Nachweis von Targeting-Ereignissen	123
Tabelle 3-10 Optimierte PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der ES-Zell-Lysate	125
Tabelle 3-11 Primerkombination und Länge der Sonden zur Southern Blot-Genotypisierung von Ngb-ko1 rekombinanten ES-Zellen	127
Tabelle 3-12 Primerkombination und Länge der Sonden zur Southern Blot-Genotypisierung von Ngb-ko3.1 und 3.2 rekombinanten ES-Zellen	128
Tabelle 3-13 Transformationen des Ngb-ko1-Targeting-Vektors	131
Tabelle 3-14 Linearisierte Ngb-ko3.1 und -ko3.2 Plasmide	133
Tabelle 3-15 Transformationen des Ngb-ko3.2-Targeting-Vektors	133
Tabelle 3-16 Linearisierte Cygb-ko-Plasmide	137
Tabelle 3-17 Untersuchte ES-Zell-Klone, nach der Transformation mit dem Cygb-ko-Vektor	137
Tabelle 3-18 Primerkombination und PCR-Fragmentgrößen zur Analyse der Ngb-, Cygb- und β -Aktin-Expression in ES-Zellen	142
Tabelle 4-1 Vergleich der Ngb-mRNA und Proteinexpression im ZNS der Säuger	154
Tabelle 4-2 Mögliche Interaktionen von Neuroglobin mit NO und Peroxynitrit	162
Tabelle 4-3 AS- und Nukleotidsubstitutionen in Vertebratenglobinen	174
Tabelle 4-4 Ngb-Regulation bei Hypoxie und I/R	185
Tabelle 7-1 Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierungen	230
Tabelle 7-2 RT-PCT Primer	230
Tabelle 7-3 <i>Phodopus sungorus</i> RACE Primer	231
Tabelle 7-4 Realtime Q-PCR Primer	231
Tabelle 7-5 Standard Primer	231
Tabelle 7-6 Primer für Neuroglobin und Cytoglobin transgen-Konstrukte	231
Tabelle 7-7 Primer für Neuroglobin-knock out-Konstrukte	232
Tabelle 7-8 Verwendete primäre Antikörper	233
Tabelle 7-9 Verwendete sekundäre Antikörper	233
Tabelle 7-10 Gesamt-RNA- und cDNA-Konzentrationen der <i>Phodopus sungorus</i> -Proben	238

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
A. bidest	Aqua bidestillata
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
bq	Bequerell
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	„complementary deoxyribonucleic acid“
CDS	„coding sequence“
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
Cygb	Cytoglobin
Da	Dalton
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (Deoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
d.h.	das heißt
EST	„expressed sequence tag“
evtl.	eventuell
Hb	Hämoglobin
inkl.	inklusive
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
mA	Milliampère
Mb/Myo	Myoglobin
min	Minuten
Mio.	Million /-en
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer

mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “
Ngb	Neuroglobin
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₃ ⁻	Nitration
NO ₂ ⁻	Nitrition
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase)
O ₂	molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
ORF	„ <i>open reading frame</i> “
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “
PNS	perifäres Nervensystem
Q-PCR	quantitative PCR
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “ (Ribonukleinsäure)
ROS	„ <i>reactive oxygen species</i> “
rpm	„ <i>rotations per minute</i> “
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription; Raumtemperatur
S.	Seite
sec	Sekunden
s.o.	siehe oben
Std.	Stunden
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
U	„ <i>unit</i> “
u. U.	unter Umständen
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
v/v	„ <i>volume per volume</i> “ (Volumen pro Volumen)
w/v	„ <i>weight per volume</i> “ (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Globine - Evolution, Struktur und Funktion

Die ursprünglich nahezu sauerstofffreie und stark reduzierend wirkende Erdatmosphäre bot zweifelsohne eine der wichtigsten Voraussetzungen für die effiziente Synthese erster Biomoleküle auf der Erdoberfläche (Miller, 1953). Molekularer Sauerstoff (O_2) wirkt insbesondere in Form seiner atomaren Radikale stark oxidierend auf organische Verbindungen und hätte somit eine spontane Entstehung von Leben verhindert. Erst das Aufkommen der ersten photosynthetisch aktiven Organismen vor ca. 3,5 Milliarden Jahren führte zum Anstieg des atmosphärischen O_2 -Gehaltes. Diese primitiven CO_2 -fixierenden Cyanobakterien (blaugrüne Algen) entzogen das Kohlendioxid aus der Erdatmosphäre unter Bildung von molekularem Sauerstoff aus Wasser. Der produzierte Sauerstoff reicherte sich zunächst in Form von Metalloxiden im Meerwasser an. Nachdem vor ca. 2 Milliarden Jahren fast das gesamte Eisen im Meer als Oxid ausgefällt war, begann der Sauerstoff in die Atmosphäre auszugasen, was anfangs einen leichten Anstieg der O_2 -Konzentration auf ca. 2% zur Folge hatte. Erst die Entstehung der Ozonschicht ermöglichte die Eroberung der Erdoberfläche durch die grünen photoautotrophen Pflanzen vor ca. 600 Millionen Jahren, wonach sich sehr schnell der gegenwärtige O_2 -Gehalt von 21% einstellte (Kerr, 2005; Schlegel, 1992).

Diese drastische Umweltveränderung erforderte zum einen die Entwicklung spezieller Schutzmechanismen in lebenden Organismen und begünstigte vermutlich die Evolution von O_2 -reaktiven Proteinen mit hohen Sauerstoffaffinitäten, deren primäre Funktion in der Bindung und Entsorgung von O_2 lag (Keilin, 1966; Riggs, 1991). Andererseits bot der verfügbare molekulare Sauerstoff den Lebewesen eine Chance,

ihren Metabolismus effizient zu steigern. Mit O_2 als finalem Elektronenakzeptor in der Atmungskette lässt sich im Vergleich zur anaeroben Atmung das 15fache Energiepotential aus einem Glucosemolekül schöpfen (Stryer, 1995). Die ältesten fossilen Eukaryoten, die Sauerstoff für den oxidativen Abbau von organischen Substanzen nutzten, lassen sich ca. 2 Milliarden Jahre zurückdatieren (Kerr, 2005).

Die aerobe Atmungskette an den Mitochondrien der Zellen erfordert einen ständigen Gasaustausch (O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe) zwischen der Zelle und der Umgebung. Während in Einzellern (Protozoen) und anderen niederen Lebensformen wie Coelenteraten oder Plathelminthen dieser durch einfache Diffusion über die Körperoberfläche gewährleistet werden kann, mussten höher organisierte Vielzeller mit geringerem Oberflächen/Volumen-Verhältnis im Laufe der Evolution Mechanismen einer adäquaten O_2 -Versorgung aller Körperzellen entwickeln. Zunächst sorgt die Atembewegung für die ständige Zufuhr der Luft bzw. des Wassers zur respiratorischen Oberfläche (Lunge oder Kiemen), die bei höheren Metazoen die nichtrespiratorische Körperoberfläche um ein Vielfaches übersteigen kann. Die aktive Beförderung des O_2 in speziell entwickelten Kreislaufsystemen ermöglicht währenddessen die Bewältigung größerer Distanzen und sorgt für eine verbesserte Ventilation der Körperflüssigkeiten. Durch den Einsatz spezieller Atmungsproteine, die in der Lage sind O_2 reversibel zu binden, konnte schließlich die schlechte physikalische Löslichkeit des Sauerstoffs in Flüssigkeiten überwunden werden. Dadurch kann O_2 nicht nur über größere Strecken, sondern auch in wesentlich größeren Mengen zu den Orten des Verbrauchs gelangen.

Im Laufe der Evolution sind drei Klassen von solchen O_2 -bindenden respiratorischen Proteinen entstanden: die Hämocyane in Mollusken und Arthropoden (Burmester, 2001; van Holde and Miller, 1995), die Hämerythrin in Anneliden, Brachiopoden, Sipunculiden und Priapuliden (Mangum, 1992) sowie die Globine. Während das Vorkommen der ersten beiden auf lediglich wenige Tiergruppen beschränkt ist, stellen die Globine die phylogenetisch am weitesten verbreitete Klasse der Atmungsproteine dar. Bislang wurden Ihre zahlreichen Vertreter sowohl in Tieren als auch in Pflanzen, Pilzen, Protozoen und Bakterien beschrieben (Hardison, 1998; Hardison, 1996).

1.1.1 Molekulare Struktur der Globine

Das kennzeichnende Merkmal aller Mitglieder der Familie der Globine ist die charakteristische Tertiärstruktur, die Globinfaltung. Die Polypeptidketten der monomeren Globine mit einer durchschnittlichen Länge von 140-150 Aminosäuren (AS) bilden trotz stark variierender Primärstrukturen meist acht rechtsgewundene α -Helices (A bis H), die sich unter physiologischen Bedingungen zu einer sog. „3 über 3 α -helikalen Sandwichstruktur“ zusammenlagern (Abb.1-1A). Im inneren hydrophoben Teil des Moleküls ist die prosthetische Häm-Gruppe der Globine verankert. Sie besteht aus vier ringförmigen Pyrrolen, die über Methinbrücken ($-\text{CH}=\text{}$) miteinander verbunden sind. An die vier Stickstoffatome im Zentrum dieses planaren Porphyrinringsystems ist ein Eisenatom gebunden (Richter, 1988). Neben den vier Verknüpfungen mit den Stickstoffatomen des Tetrapyrrolrings kann das Eisen zwei weitere Bindungen eingehen, die senkrecht auf der Häm-Ebene liegen. Dabei handelt es sich um die so genannte fünfte und sechste Koordinationsstelle. Die fünfte Koordinationsstelle des Eisenatoms nimmt das proximale Histidin F8 ein (Abb. 1-1B). Der Sauerstoff wird an die sechste Koordinationsstelle des Eisen(II)atoms reversibel gebunden. Diese liegt in der unmittelbaren Nähe des distalen Histidins E7, das dabei eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Sauerstoff eingeht. Dadurch wird die Bindung von O_2 an das aktive Zentrum stabilisiert, während beispielsweise die Bindung des toxischen CO durch die räumlichen Begebenheiten erschwert wird (Stryer, 1995).

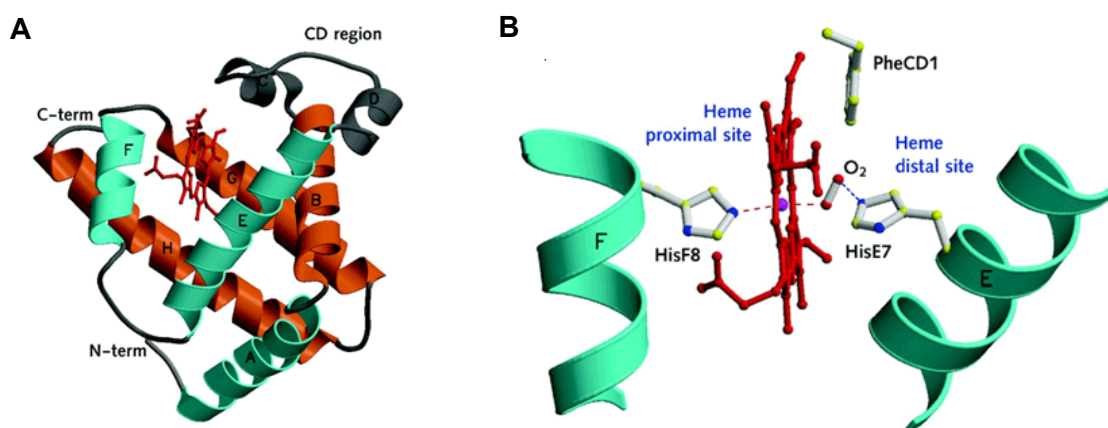


Abbildung 1-1 Dreidimensionale Darstellung der Globinfaltung. A: Die Färbung der Helices spiegelt die 3-über-3- α -helikale Sandwichstruktur wieder. B: Umgebung der Häm-Gruppe im aktiven Zentrum von Globinen. Die einzigen zwei polaren Aminosäuren im Inneren des Moleküls sind das proximale und das distale Histidin (HisF8 und HisE7), die eine elementare Funktion für die Bindung des Sauerstoffs an die sechste Koordinationsstelle des Fe(II)atoms aufweisen. Das Phenylalanin im interhelikalen Abschnitt CD1 (PheCD1) ist in allen bekannten Gobinen konserviert (Bildquelle: Pesce et al., 2002).

Im oxygenierten Zustand wird die sechste Koordinationsstelle des Eisenatoms stets von einem O_2 -Molekül belegt. Im deoxygenierten Zustand gibt es hingegen zwei Möglichkeiten. Während in pentakoordinierten Globinen, wie dem Hämoglobin und Myoglobin der Vertebraten, die sechste Koordinationsstelle im deoxygenierten Fe(II)-Zustand leer bleibt, wird sie in hexakoordinierten Globinen vom distalen Histidin E7 besetzt. Entsprechend komplexer verläuft die Sauerstoffbindung in hexakoordinierten Globinen. Aufgrund der Konkurrenz des endogenen (HisE7) und exogenen (O_2 , NO) Liganden um die Bindung an das Eisen sind zwei Schritte erforderlich. Zunächst muss die Bindung zwischen dem internen Liganden an der sechsten Koordinationsstelle des Eisenatoms gespalten werden, wobei übergangsweise eine pentakoordinierte Formation entsteht. Erst dann kann die Bindung des externen Liganden, beispielsweise O_2 , an die nun freie sechste Koordinationsstelle erfolgen. Dabei gehen die Proteine eine strukturelle Veränderung ein, die es ihnen ermöglicht, einen regulatorischen Effekt auf die Ligandenaffinität auszuüben (de Sanctis et al., 2004).

Neben den bekannten hexakoordinierten Globinen in Pflanzen (Arredondo-Peter et al., 1998; Hunt et al., 2001), Protisten (Couture et al., 1999a), Cyanobakterien (Couture et al., 2000; Hvitved et al., 2001; Scott and Lecomte, 2000) und Insekten (Burmester and Hankeln, 1999; de Sanctis et al., 2005; Hankeln et al., 2002), wurden durch die Entdeckung von Neuroglobin und Cytoglobin auch in Vertebraten hexakoordinierte Globine nachgewiesen (Couture et al., 2001; de Sanctis et al., 2004; Dewilde et al., 2001; Pesce et al., 2003b; Trent and Hargrove, 2002). Die physiologische Bedeutung dieser strukturellen Besonderheit konnte bislang jedoch nicht hinreichend geklärt werden.

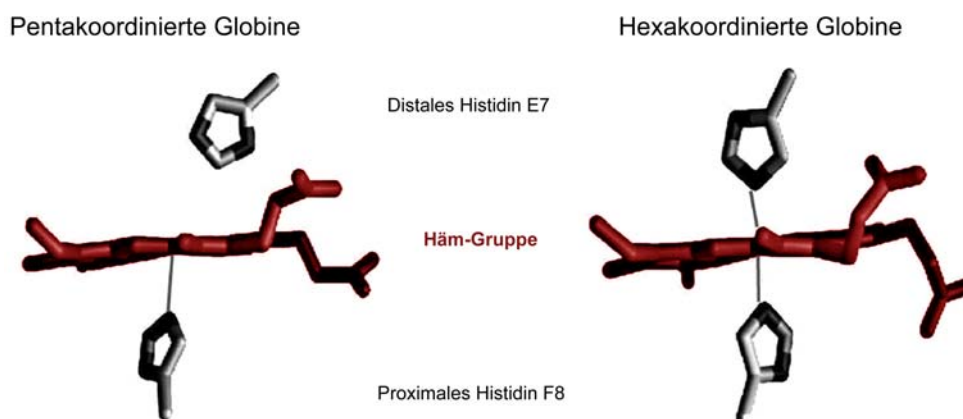


Abbildung 1-2 Die Häm-Gruppe in penta- und hexakoordinierten Globinen. In pentakoordinierten Globinen liegt die sechste Koordinationsstelle des Eisenatoms frei, während sie in hexakoordinierten Molekülen eine stabile Bindung mit dem distalen Histidin E7 eingeht. (Bildquelle: Trent and Hargrove, 2002)

1.1.2 Vielfalt der Globine und ihre Funktionen

Die Aufklärung der Struktur und Funktion der zeitlich als erstes entdeckten Globine der Vertebraten führte zu der Annahme, dass die Funktion der Globine im Allgemeinen mit Sauerstofftransport und Speicherung verknüpft ist. Die Entdeckung von Hämoglobinen in Organismen, in denen auf den ersten Blick kein Sauerstofftransport erforderlich ist, war deshalb zunächst überraschend. Als erstes wurden die sog. Leghämoglobine in den Wurzelknöllchen von Leguminosen entdeckt (Appleby et al., 1975), die mit hoher Affinität molekularen Sauerstoff binden. Später stellte sich heraus, dass sie die dort symbiotisch lebenden Bakterien mit Sauerstoff versorgen und zugleich Ihre O₂-empfindlichen Enzyme zur Stickstofffixierung vor toxischen O₂-Konzentrationen schützen (Ott et al., 2005). Anschließend wurden symbiotische Globine auch in nicht leguminosen Pflanzen, beispielsweise in der Sojabohne (Anderson et al., 1996) und nicht-symbiotische Globine mit bisher ungeklärter Funktion in zahlreichen Pflanzen- und Getreidearten (Arredondo-Peter et al., 1998; Taylor et al., 1994) entdeckt. Zudem wurden Globine mit verkürzten Sequenzen (<130 AS), die sog. trunkierten („truncated“) Globine in Protozoen (Takagi et al., 1993), Cyanobakterien (Potts et al., 1992; Scott et al., 2002) und Bakterien (Couture et al., 1999b; Wittenberg et al., 2002) beschrieben, deren Bedeutung ebenfalls unklar ist. Auch Globine mit Sequenzen, die länger als die üblichen 140-150 AS sind (>160 AS) und dennoch strukturelle Ähnlichkeiten zu den trunkierten Globinen aufzeigen, wurden in grünen Algen und Pflanzen identifiziert (Couture et al., 1994; Couture et al., 1999a). Die Kristallstruktur dieser Hämoglobine zeigt eine abgewandelte 2 über 2 (2/2)- α -helikale Sandwichfaltung (Milani et al., 2001; Milani et al., 2003; Pesce et al., 2000). Des Weiteren wurden chimäre Proteine, die sog. Flavohämoglobine mit einer N-terminalen Globindomäne und einer C-terminalen FAD- und NAD-bindenden Redox-Domäne in zahlreichen Bakterien entdeckt, die Ähnlichkeiten zu den Ferredoxin-NADP⁺-Reduktasen aufweisen und wahrscheinlich eine Rolle im Redoxhaushalt der Zellen spielen (Frey and Kallio, 2003; Poole and Hughes, 2000; Wu et al., 2003; Zhu and Riggs, 1992). Daneben wurden Globin-gekoppelte O₂-Sensorproteine in Archaeen und Bakterien entdeckt (Freitas et al., 2003; Hou et al., 2001; Hou et al., 2000; Yu et al., 2002). Die kürzliche Entdeckung der sog. Protoglobine in Archaeobakterien zeigt, dass ein sehr frühes Vorläuferprotein bereits vor der Auftrennung der Prokaryoten in Eubakterien und Archaeobakterien vor ca. 2,5-2,7 Milliarden Jahren existierte, aus dem sich vermutlich alle heute bekannten Globine ableiten (Freitas et al., 2004).

Klasse	Gattung	Hämoglobin	Funktion
Pflanzen	<i>Rhizobium</i> <i>Glycine</i>	LegHb	- O ₂ -Transport zur Atmungskette der Wurzelknöllchenbakterien - Schutz der Nitrogenase vor Sauerstoff (1)
Pflanzen	<i>Glycine</i>	nicht-symb. Hb	- Erleichterte Sauerstoffdiffusion zu Zellen mit hoher Respirationsaktivität - Induktion bei Hypoxie? (1)
Algen	<i>Chlamydomonas</i>	LI637 Hb	- Reduktion von gebundenem Sauerstoff - Elektronenakzeptor - Entsorgung von O ₂ - Anlieferung von O ₂ zu den Organellen, - lichtinduzierbare Expression (1)
Pilze	<i>Saccharomyces</i>	YHb (FlavoHb)	- Übertragung von Elektronen vom NADPH auf das Eisenatom - Schutz vor oxidativem Stress - Induktion der Expression bei hohen O ₂ - und ROS- Konzentrationen - Repression bei Hypoxie (1)
Bakterien	<i>Alcaligenes</i>	FlavoHb	- vermutlich Elektronentransfer - eine Rolle beim anaeroben Stoffwechsel - Induktion unter anaeroben Bedingungen - NO-Entgiftung als NO-Oxygenase (aerob) und NO-Reduktase (anaerob) (1)
Bakterien	<i>Vitreoscilla</i>	Hb	- O ₂ -Scavenger - terminaler Elektronenakzeptor in der Atmung, - induzierbar durch Hypoxie (1)
Archaeobakterien	<i>Aeropyrum</i> und <i>Methanosarcina</i>	Pgb (Protoglobin)	- O ₂ -Detoxifikation, - Elektronentransport (2)

Tabelle 1-1 Hämoglobine in Pflanzen, Pilzen und Bakterien und ihre möglichen Funktionen. Aus: (1) Hardison, 1998 und (2) Freitas et al., 2004

Auch in zahlreichen Vertretern der Invertebraten wurden Globine beschrieben, die neben ihren Aufgaben im O₂-Metabolismus eine Vielzahl anderer Funktionen bewerkstelligen können (Weber and Vinogradov, 2001). Ihre Struktur unterliegt großer Variabilität: man findet sowohl monomere Moleküle, die aus Einzelketten bestehen, als auch große Multi-Domänen-Komplexe bis hin zu „Multi-Subunit“-Komplexen aus mehreren Globin-Untereinheiten in Anneliden, Mollusken und Crustaceen. Sie gewährleisten zum einen die Sauerstoffversorgung der Organismen, verfügen aber auch über enzymatische Aktivitäten und können als Oxidasen, Peroxidasen und Superoxiddismutasen fungieren (Vinogradov et al., 2006; Vinogradov et al., 2005).

Darüber hinaus wurden zahlreiche weitere Hämoglobine mit bislang unbekannten Funktionen in diversen Taxa entdeckt, in denen zunächst keine Globine vermutet wurden, so z.B. in Nematoden (Hoogewijs et al., 2004), Insekten (Burmester and Hankeln, 1999), Urochordaten (Ebner et al., 2003) und Gastropoden (Lieb et al., 2006).

1.1.3 Globine der Vertebraten

In höheren Vertebraten sind derzeit vier verschiedene Hämoglobine bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Struktur, Funktion und Expressionsmuster unterscheiden. Sie binden den Sauerstoff reversibel und gehören aufgrund ihrer typischen Faltung zur Globin-Superfamilie. Bis dato am besten charakterisiert sind das Hämoglobin (Hb) im Blut und das Myoglobin (Mb) im Muskel der Vertebraten (Dickerson and Geis, 1983). Über das Neuroglobin (Ngb) im neuronalen und endokrinen Gewebe (Burmester et al., 2000) sowie das in vielen Organen und Geweben exprimierte Cytoglobin (Cygb) (Burmester et al., 2002; Kawada et al., 2001; Trent and Hargrove, 2002) ist bislang weniger bekannt.

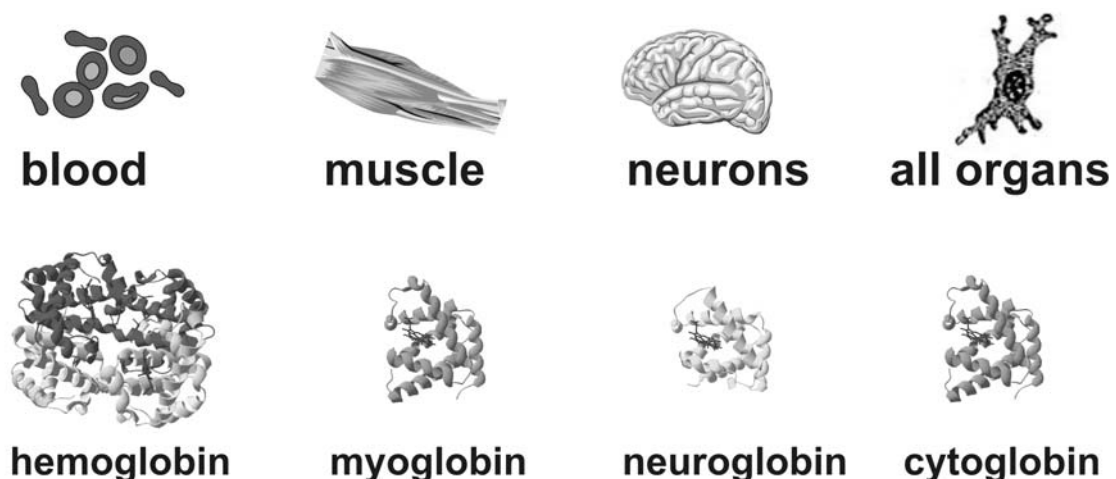


Abbildung 1-3 Vertebratenglobine (Bildquelle: Burmester und Hankeln, 2004)

1.1.3.1 Organisation und Sequenzevolution

Die Globingene der Vertebraten sind repetitiv und bilden daher eine Genfamilie, die aus mehreren Subfamilien besteht. Die Myoglobin-Subfamilie besteht aus nur einem einzigen Gen auf dem menschlichen Chromosom 22. Die Gene der α - und β -Subfamilien des Hämoglobins sind in zwei Clustern auf den menschlichen Chromosomen 16 und 11 organisiert. Im α -Cluster (Chr.16) liegt das Gen für die embryonale ζ -Kette und zwei Gene für die α -Ketten, die sowohl im embryonalen als auch im adulten Hämoglobin vorkommen.

Ein weiter abwärts lokalisiertes Gen für das theta (θ)-Globin, wird zwar offensichtlich transkribiert, aber nicht translatiert (Albitar et al., 1992; Clegg, 1987). Darüber hinaus sind dort drei Pseudogene ($\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$, $\psi\alpha_2$) enthalten. Erst kürzlich konnte jedoch nachgewiesen werden, dass das vermeintliche Pseudogen $\psi\alpha_2$ (Hardison et al., 1986) in erythroiden Geweben entwicklungsspezifisch exprimiert wird und für das sog. μ -Globin kodiert (Goh et al., 2005). Im β -Cluster (Chr. 16) folgen auf das Gen für die embryonale ϵ -Kette zwei Gene für die fetalen γ -Ketten und zwei Gene für die adulten δ - und β -Ketten. Alle Gene dieser „klassischen“ Globine weisen eine 3-Exon/2-Intron-Struktur auf, mit den Intronpositionen B12.2 und G7.0 (Hardison, 1996).

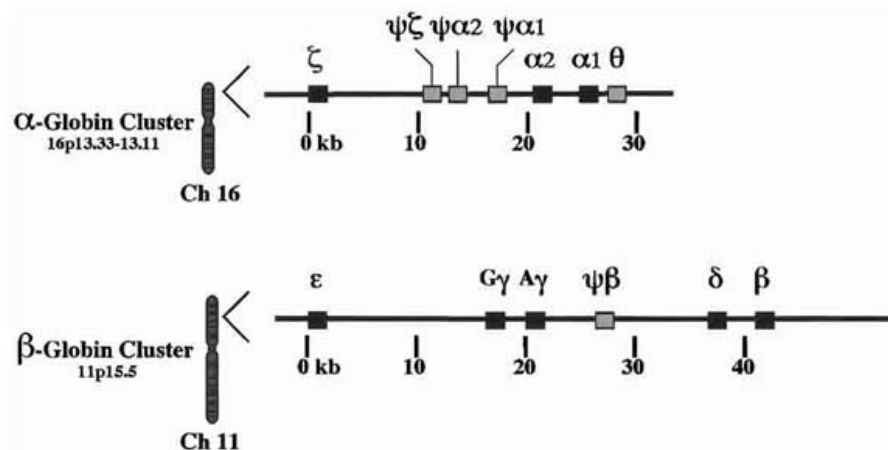


Abbildung 1-4 Die α - und β -Subfamilien des Hämoglobins. Die Expression während der Embryogenese erfolgt von 5' nach 3'. Pseudogene sind durch ψ gekennzeichnet. (Bildquelle: Waggoner and Liebhaber, 2003)

Die Neuroglobin- und Cytoglobin-Subfamilien bestehen wie das Myoglobin aus nur je einem Gen. Das Neuroglobin-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 14 und in der Maus auf Chromosom 12 lokalisiert. Es enthält drei Introns, von denen zwei an den konservierten Positionen B12.2 und G7.0 lokalisiert sind. Das dritte Intron an der Position E11.0 ist spezifisch für das Neuroglobin (Burmester et al., 2000).

Das Cytoglobin-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 17 und in der Maus auf Chromosom 11. Es enthält ebenfalls ein drittes Intron, jedoch in der C-terminalen Verlängerung der Proteinsequenz an der Position HC11.2 (Burmester et al., 2002).

Die Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen in den α - und β -Ketten des Hämoglobins liegen bei ca. 50 %. Wird das Myoglobin in den Vergleich miteinbezogen, finden sich lediglich an 24 von 141 Positionen konservierte Aminosäuren. Das

Neuroglobin zeigt auf Aminosäureebene eine eher geringe Identität zum Myo- und Hämoglobin (<21 bzw. <25 %), offenbart aber Ähnlichkeiten zu einigen Nervenglobinen der Invertebraten (Burmester et al., 2000). Die größte Übereinstimmung des Cytoglobins zeigt sich mit Myoglobin (30 % AS-Sequenzidentität). Diese Verwandtschaft wird auch durch einen Vergleich der chromosomalen Regionen beider Gene unterstützt. Es handelt sich um lange paraloge DNA-Abschnitte, was auf die Entstehung beider Gene durch Genduplikation hindeutet (Burmester et al., 2002).

Offensichtlich gehen die verschiedenen Globine der Vertebraten aus zwei getrennten Linien von Metazoenglobinen hervor (Roesner et al., 2005). Neuroglobin gehört einer Vorläuferlinie an, die bereits vor der Trennung der Protostomier und Deuterostomier vor mehr als 600 Millionen Jahren von den anderen Globinen divergierte (Burmester et al., 2000). Zu dieser Linie gehören auch die kürzlich entdeckten *Ciona intestinalis*-Globine (Ebner et al., 2003) sowie das Nervenglobin des Anneliden *Aphrodite aculeata* (Burmester et al., 2000; Dewilde et al., 1996). Die Trennung des Myo- und Cytoglobins vom Hämoglobin-Vorläufergen erfolgte vor 500-600 Millionen Jahren. Infolge mehrerer Duplikationsereignisse entstanden vor ca. 450 Millionen Jahren schließlich die α - und β -Ketten des Hämoglobins (Goodman et al., 1987). Ungefähr zur gleichen Zeit trennte sich auch der gemeinsame Stamm von Myoglobin und Cytoglobin (Burmester et al., 2002), nachdem die Auftrennung von Kieferlosen (*Agnatha*) und Kiefertragenden Vertebraten (*Gnathostomata*) stattgefunden hatte.

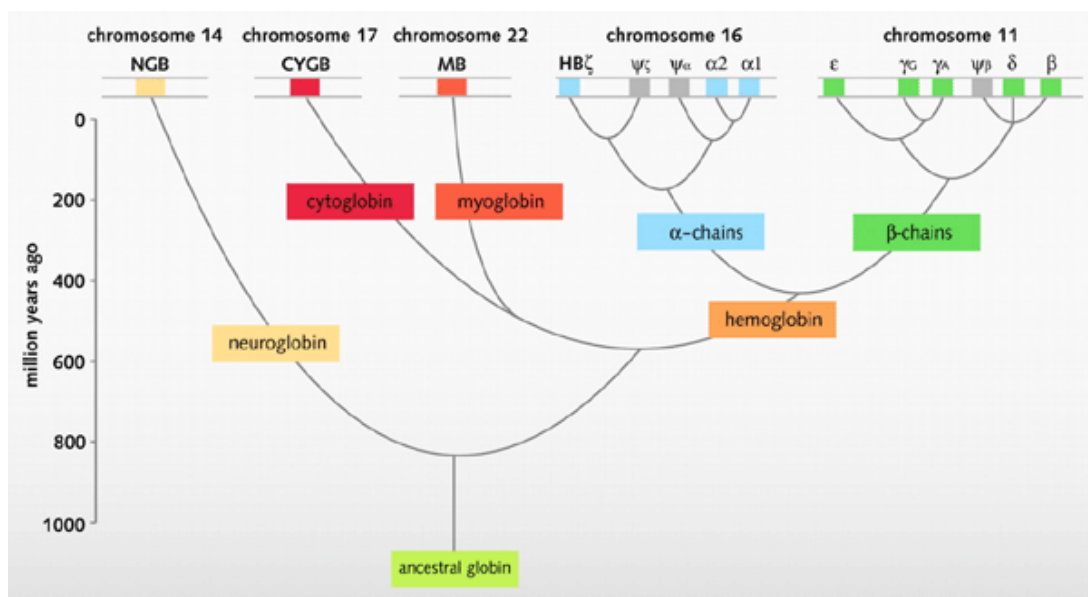


Abbildung 1-5 Phylogenetischer Stammbaum der Vertebratenglobine.
(Bildquelle: Pesce et al., 2002)

1.1.3.2 Hämoglobin

Das Hämoglobin (Hb) im Blut der Vertebraten gewährleistet den Sauerstofftransport von respiratorischen Oberflächen (Alveolenepithel der Lunge) zu den verbrauchenden Geweben (Dickerson and Geis, 1983). Ebenso wichtig ist aber auch der CO₂-Abtransport von den Geweben zur Lunge, für den ebenfalls das Hämoglobin verantwortlich ist. Durch das Hämoglobin wird die im arteriellen Blut des Menschen vorhandene O₂-Menge von 0,29 auf 20,3 Vol-% erhöht, was in etwa der O₂-Konzentration der Atmungsluft entspricht (Penzlin, 2005). Das Hämoglobin ist in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) lokalisiert. Die Erythrozyten enthalten keinen Zellkern und keine Mitochondrien, ihre Energiegewinnung stützt sich überwiegend auf die Glykolyse. Jedes rote Blutkörperchen enthält ca. 3×10^8 Hämoglobin-Moleküle (Wehner and Gehring, 1995). Die Hämoglobinkonzentration im Blut eines gesunden Menschen beträgt somit ca. 15 g pro 100 ml Blut (Hardison, 1996). Da die Erythrozyten eine Lebensdauer von nur 100-120 Tagen haben, müssen sie ständig im Knochenmark nachgebildet werden. Die Erythropoese (beim Menschen 160×10^6 Zellen pro Minute) kann bei Blutverlusten, Hypoxie und Kältestress zusätzlich gesteigert werden. Die Expression des verantwortlichen Hormons Erythropoietin (Epo) wird dabei in Abhängigkeit von Sauerstoff über den hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert (Ebert and Bunn, 1999).

Die Aufklärung der dreidimensionalen Hämoglobinstruktur erfolgte bereits 1959 durch Perutz (Perutz, 1964). Es handelt sich um ein fast kugelförmiges Molekül mit einem Durchmesser von 5,5 nm. Das Hämoglobin adulter Vertebraten (Hb A) ist ein tetrameres Molekül aus zwei α - und zwei β -Ketten mit einem Molekulargewicht von 67 kDa. Die Länge der α -Ketten beträgt 141 Aminosäuren und die der β -Ketten 146 AS. Jeweils zwei $\alpha\beta$ -Heterodimere lagern sich zu einem funktionellen Hämoglobinmolekül zusammen. Die Tertiärstruktur jeder der vier Einzelketten entspricht der oben beschriebenen typischen Globinfaltung. Die aktiven Zentren befinden sich auf der Außenseite des Tetramers.

Liegt das Eisenatom in der zweiwertigen Fe(II)-Form vor, so wird es als Ferrohämoglobin bezeichnet, während in der Fe(III)-Form vom Ferrihämoglobin bzw. Methämoglobin gesprochen wird. Ferrihämoglobin entsteht, wenn Ferrohämoglobin durch den gebundenen Sauerstoff oxidiert wird. Im funktionsfähigen Molekül wird diese Reaktion durch die Proteinstruktur verhindert, betrachtet man jedoch isolierte Häm-Gruppen geschieht dies relativ schnell. Auf diese Weise entsteht das Methämoglobin,

in dem die sechste Koordinationsstelle vom Wasser besetzt wird und keine Sauerstoffbindung mehr eingehen kann. Zu einem geringen Teil wird auch das Hämoglobin in den Erythrozyten autooxidiert (ca. 4% am Tag) (Johnson et al., 2005), jedoch befindet sich dort die Methämoglobin-Reduktase, die ein solches Fe(III)-Ion wieder reduziert.

Die Bindung von O_2 an die sechste Koordinationsstelle des zweiwertigen Eisenions bewirkt eine Veränderung in der Elektronenkonfiguration, was den Farbwechsel des Blutes von dunkel- nach hellrot bewirkt (Stryer, 1995). Hill (1913) war der erste, der festgestellt hat, dass die Bindung des ersten Liganden an eine Häm-Gruppe im Hämoglobin, die Bindung des zweiten erleichtert. Dieser Vorgang ist mit strukturellen Veränderungen im Molekül verbunden, das dabei vom Tense (T)-Zustand mit niedriger O_2 -Affinität in die oxygenierte Relaxed (R)-Form mit hoher O_2 -Affinität, aber geringer Bindungskapazität für CO_2 , Protonen und organische Phosphate, übergeht (Barvitenko et al., 2005). Diese sauerstoffabhängige Steigerung der O_2 -Affinität im Hb-Tetramer wird durch die kooperativen Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten ermöglicht. Die Kontakte zwischen den Untereinheiten werden durch die Helices C, G und H hergestellt, während sich die Helices E und F an der Oberfläche des Tetramers befinden (Perutz et al., 1987). Es gibt zwei Typen von α - β -Kontaktflächen im Hämoglobinmolekül. Während die $\alpha 1$ - $\beta 2$ - und $\alpha 2$ - $\beta 1$ -Wechselwirkungen mit der kooperativen Bindung des Sauerstoffs assoziiert sind, kontrollieren die $\alpha 1$ - $\beta 1$ - und $\alpha 2$ - $\beta 2$ -Kontakte die Stabilität dieser Bindungen (Shikama, 2006). Dieses kooperative O_2 -Bindungsverhalten spiegelt sich in einem sigmoidalen Verlauf der O_2 -Dissoziationskurve wieder (Stryer, 1995).

Die O_2 -Affinität wird als P_{50} angegeben, was gleichbedeutend mit dem O_2 -Partialdruck ist, bei dem das Hämoglobin zu 50% mit Sauerstoff gesättigt ist. Je geringer der P_{50} -Wert also ist, desto höher die Affinität. Die Sauerstoffaffinität kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden. Durch den von Christian Bohr (1904) entdeckten und nach ihm benannten Bohr-Effekt wird in saurem und CO_2 -haltigem Milieu die Affinität des Hämoglobins zum O_2 vermindert. Zusätzlich wird die O_2 -Affinität des Hämoglobins durch das organische Phosphat 2,3-Bisphosphoglycerat (BPG), das in den Erythrozyten in gleicher Konzentration wie das Hämoglobin enthalten ist, reguliert. Das anionische BPG bindet an die positiv geladenen Aminosäuren Val, His und Lys (Barvitenko et al., 2005) im Deoxyhämoglobin, wobei die T-Form stabilisiert und die O_2 -Affinität von 1 auf 26 Torr herabgesenkt wird (Benesch and Benesch, 1967). Infolgedessen nimmt das Hämoglobin in O_2 -reichem Gewebe z.B. den Alveolen der Lunge, in denen der O_2 -Partialdruck etwa 100 Torr beträgt, Sauerstoff auf, wohingegen

es ihn in stoffwechselaktiven Geweben mit geringem O_2 -Partialdruck (im Durchschnitt ca. 20 Torr) abgibt. Zudem begünstigen die dort herrschenden erhöhten CO_2^- und H^+ -Konzentrationen die Freisetzung des O_2 (Stryer, 1995).

Neben dem O_2 - und CO_2 -Transport kann auch das Hämoglobin der Vertebraten eine Vielzahl anderer Funktionen ausüben. Beispielsweise ist es in die Stickoxid (NO)-vermittelte Regulation des Blutflusses involviert. NO wird normalerweise von endogenen NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin synthetisiert und dient als wichtiger Botenstoff innerhalb des Körpers. Es leitet beispielsweise die Vasodilatation der Blutgefäße unter hypoxischen Bedingungen ein. Es kann aber auch die Enzyme der Atmungskette inhibieren, was die Toxizität dieser Verbindung in zu hohen Konzentrationen erklärt. Das Hämoglobin kann neben dem Sauerstoff auch NO binden, wodurch das sog. S-Nitrosohämoglobin (SNOHb) entsteht. Die Bindung erfolgt an zwei konservierten Cysteinresten im oxygenierten Hb-Molekül. Geht das Hämoglobin nun infolge der Sauerstoffabgabe in den Kapillaren von der R- in die T-Form über, wird die SNOHb-Bindung destabilisiert und das vasoaktive SNO freigesetzt (Doctor et al., 2005; McMahon et al., 2002; Stamler et al., 1997).

Im deoxygenierten Zustand verfügt das Hämoglobin außerdem über eine Nitritreduktase-Aktivität und kann Nitrit (NO_2^-) unter Bildung von methHb zu NO reduzieren (Altschul et al., 1990; Cosby et al., 2003; Crawford et al., 2006; Huang et al., 2005; Nagababu et al., 2003). Oxygeniertes Hb hingegen wandelt das Nitrit in Nitrat (NO_3^-) um, wobei ebenfalls methHb entsteht. Nitrit konnte in relativ hohen Konzentrationen (300 nM) in Erythrozyten nachgewiesen werden (Dejam et al., 2005). Inwiefern diese beiden Mechanismen tatsächlich zur Hämoglobin-vermittelten Vasodilatation beitragen ist allerdings noch unklar (Bonaventura et al., 2004; Gladwin et al., 2000; Robinson and Lancaster, 2005).

Das oxygenierte Hämoglobin kann allerdings auch die Funktion einer NO-Dioxygenase (NOD) übernehmen und das toxische $NO^•$ unter Verwendung beider Sauerstoffmoleküle und Bildung von methHb in das harmlose Nitrat (NO_3^-) umwandeln. Dies geschieht jedoch mit deutlich geringeren Umsatzraten, als es für die bakteriellen Flavohämoglobine und Hämoglobine bekannt ist (Gardner, 2005). Die Kompartimentierung des Hämoglobins in den roten Blutzellen reduziert die NO-Umsatzrate zusätzlich, da die Zellmembran eine physikalische Barriere für die NO-Aufnahme darstellt. Zellfreies Hämoglobin hingegen kann Stickoxid mit 500-1000fach höherer Effizienz entgiften (Azarov et al., 2005; Gladwin et al., 2003). Gäbe es die schützende Zellmembran nicht, könnte das NO möglicherweise bereits vor der Bewerkstelligung seiner Aufgaben beseitigt werden (Vaughn et al., 2000).

1.1.3.3 Myoglobin

Das erste Protein, dessen Tertiärstruktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bis in atomare Details geklärt werden konnte, war das Myoglobin (Kendrew, 1961). Aufgrund dessen lieferte es gemeinsam mit den Hb-Untereinheiten die Grundlagen zur Aufklärung der typischen dreidimensionalen Struktur der Globinfaltung, die trotz unterschiedlicher Primärstrukturen in diesen Peptiden nahezu identisch ist. Beim Myoglobin (Mb) handelt es sich um ein kompaktes monomeres Molekül mit einer Gesamtausdehnung von 4,5 x 3,5 x 2,5 nm. Es besteht aus einer 153 Aminosäuren langen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 17,6 kDa.

Das Myoglobin wird in der gestreiften Herz- und Skelettmuskulatur sowie in der glatten Muskulatur des Darms und des Uterus exprimiert (Qiu et al., 1998). Die durchschnittliche Mb-Konzentration im Herz- und Skelettmuskel beträgt ca. 0,5 mM (Hochachka, 1999). Die Sauerstoffaffinität des Myoglobins kann je nach physiologischen Bedingungen zwischen 1 und 2 Torr variieren, ist jedoch in jedem Fall wesentlich höher als die des Hämoglobins, wodurch eine Übernahme des angelieferten O₂ im stoffwechselaktiven Muskel begünstigt wird. Die Rolle des Myoglobins als kurzfristiger O₂-Speicher (Millikan, 1937) ist unumstritten. Ein Beleg dafür bietet die 10- bis 22-mal höhere Mb-Konzentration in der Muskulatur tieftauchender Säuger, die eine ausreichende Versorgung des oxidativen Stoffwechsels mit O₂ während der Tauchgänge gewährleistet (Davis and Kanatous, 1999; Kanatous et al., 2002; Kanatous et al., 1999; Kooyman and Ponganis, 1998). Des Weiteren wurde infolge der Anpassung an akute sauerstoffarme Bedingungen eine Erhöhung der Myoglobin-Konzentration im Muskel um ca. 70% nachgewiesen. Somit können Sportler ihre Leistungsfähigkeit steigern, indem sie ihre Trainingseinheiten in höher gelegenen Regionen unter entsprechend geringeren O₂-Partialdrücken absolvieren (Vogt et al., 2001). Demgegenüber hat die Anpassung an chronische Hypoxie offensichtlich einen Rückgang des Mitochondriengehaltes und somit des aeroben Stoffwechsels zur Folge (Hoppeler and Vogt, 2001).

Eine Beteiligung des Myoglobins an der O₂-Diffusion von der Zellmembran (Sarkolemm) zu den Mitochondrien innerhalb der Muskelzelle (Wittenberg and Wittenberg, 1987; Wittenberg and Wittenberg, 1989), als „*myoglobin-facilitated oxygen diffusion*“ bezeichnet, wird dagegen kontrovers diskutiert. Durch Messungen der O₂-Verteilung innerhalb einzelner Muskelzellen räumten Gayeski and Honig (1986) dem Myoglobin eine wichtige Rolle beim intrazellulären O₂-Transport ein. Dies würde mit der

beobachteten Reduktion des freien Sauerstoffs durch Myoglobin in der Nähe des Sarcolemmas übereinstimmen (Wittenberg and Wittenberg, 2003). Dagegen spricht allerdings der von Jürgens und Mitarbeitern (1994) ermittelte Diffusionskoeffizient des Myoglobins innerhalb einer Muskelfaser, der mit $1,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ mindestens 3- bis 10-mal niedriger ist, als bis dahin anhand von *in vivo*-Versuchen angenommen wurde. Zusammen mit der Beobachtung, dass sich Mitochondrien in der unmittelbaren Nähe zu Kapillaren in Clustern anhäufen (Hoppeler et al., 1981), lässt dies eine maßgebliche Beteiligung des Myoglobins am Sauerstofftransport innerhalb der Muskelzellen anzweifeln (McGuire and Secomb, 2001). Eine dritte vermutete Funktion des Myoglobins ist die Pufferung des O_2 -Partialdruckes in Muskelzellen (Conley et al., 2000; Ordway and Garry, 2004).

Untersuchungen an Myoglobin-knock out (ko)-Mäusen zeigten überraschenderweise, dass alle oben aufgeführten Funktionen nicht als elementar für den Organismus gelten. Bedingt durch eine Anzahl von kompensatorischen Mechanismen, wie u.a. erhöhte Hämoglobinkonzentration und Kapillarendichte, entspricht die Funktionsfähigkeit der Skelett- und Herzmuskulatur in den ko-Tieren derjenigen der Wildtyp-Mäuse (Garry et al., 1998; Godecke et al., 1999). Trotzdem haben Untersuchungen an isolierten Herzmuskeln, in denen das Myoglobin durch CO inhibiert wurde und die knock out-Tiere als adäquate Kontrollen fungierten, eine wichtige Funktion des Myoglobins beim intrazellulären O_2 -Transport nahegelegt (Kanatous and Garry, 2006; Merx et al., 2001).

1.1.3.4 Neuroglobin

Die Entdeckung eines neuen Globingens (*dmeglob1*) im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* (Burmester and Hankeln, 1999) war der Auslöser für systematische Suchen in Sequenzdatenbanken der humanen und Maus-Genomprojekte nach noch unbekannten Globinen in Vertebraten. Daraufhin wurden kurze Zeit später in den EST-Datenbanken cDNA-Sequenzen aus Mensch und Maus identifiziert, die mit keinem der bis dahin bekannten Vertebratenglobine übereinstimmten. Anhand von Northern Blot-Hybridisierungen wurde eine prädominante Expression des neuartigen Globins im zentralen und peripheren Nervensystem (ZNS, PNS) nachgewiesen, was die Entdecker zu der Namensgebung Neuroglobin (Ngb) veranlasste (Burmester et al., 2000). Des Weiteren wurde Ngb-Expression in endokrinen Zellen (Reuss et al., 2002) sowie in der neuronalen Retina von Mäusen detektiert (Schmidt et al., 2003).

Obwohl das Neuroglobin mit seiner Länge von 151 AS lediglich zu 25 % mit den Häm- und Myoglobinen der Vertebraten übereinstimmt, zeigen strukturelle Analysen, dass es die typische Globinfaltung einnimmt (Pesce et al., 2002). Es handelt sich um ein monomeres, hexakoordiniertes Globin (Couture et al., 2001; Du et al., 2003; Kriegl et al., 2002; Trent et al., 2001; Uno et al., 2004) mit einem Molekulargewicht von 17 kDa und der Fähigkeit zur reversiblen Sauerstoffbindung (Hamdane et al., 2003). Wie für hexakoordinierte Globine bereits beschrieben, muss zunächst der endogene Ligand (His E7) von der sechsten Koordinationsstelle verdrängt und die reaktive pentakoordinierte Spezies hergestellt werden, damit die Bindung des exogenen Liganden (O_2) erfolgen kann. Sowohl die Dissoziation des distalen Histidins als auch die Dissoziation des Sauerstoffs von der sechsten Koordinationsstelle im Ngb-Molekül verläuft sehr langsam und zeugt von einer hohen intrinsischen Affinität für beide Liganden (Dewilde et al., 2001; Trent et al., 2001). Möglicherweise geht die Bindung eines Liganden mit einer Konformationsänderung im Globin einher, die eine wichtige Rolle in der Modulation der Bindungsaffinität für externe Liganden spielen könnte (Pesce et al., 2003b). Zusätzlich ist das O_2 -Bindungsverhalten des humanen Neuroglobins vom Redoxzustand der Cysteinreste CysCD7 und CysD5 abhängig, die eine intramolekulare Disulfidbrücken-Bindung aufbauen können (Hamdane et al., 2003). Die Ausbildung der Disulfidbrücke begünstigt die pentakoordinierten Ngb-Form mit einer hohen O_2 -Affinität von 1-2 Torr (Burmester et al., 2000; Dewilde et al., 2001; Fago et al., 2004a; Hamdane et al., 2004).

Andererseits stabilisiert die Eliminierung dieser Bindung durch Reduktion (z.B. durch Zugabe von DTT) die hexakoordinierte Form und führt zu einer um den Faktor 10 verringerten Sauerstoffaffinität (Hamdane et al., 2003; Hamdane et al., 2004). Fago und Mitarbeiter (2004a) haben auch ohne die Zugabe von DTT unter sog. „physiologischen“ Bedingungen mit entsprechendem pH und Temperatur eine deutlich niedrigere Affinität des humanen Ngb-Moleküls zum Sauerstoff ($P_{50} = 7,5$) gemessen. Dies würde bedeuten, dass bei den stark variierenden O_2 -Partialdrücken zwischen 1 und 40 Torr in verschiedenen Gehirnregionen (Erecinska and Silver, 2001) dennoch ein beachtlicher Teil des Neuroglobins mit Sauerstoff gesättigt wäre. Zudem könnte auf diese Weise die O_2 -Affinität des humanen Neuroglobins direkt an den Redoxzustand der Zelle gekoppelt sein. Verminderte Sauerstoffzufuhr führt zur vermehrten Bildung von Reduktionsäquivalenten (NADH) in der Zelle (Zarchin et al., 2002). So könnte unter hypoxischen Bedingungen die Disulfidbrücke im Neuroglobin reduziert und der gebundene Sauerstoff abgegeben werden. Bei ansteigender O_2 -Konzentration würde infolge der Oxidation der freien Cysteine die Disulfidbrücke wieder hergestellt werden und die verringerte O_2 -Affinität die Bindung des O_2 an das Neuroglobin begünstigen

(Hamdane et al., 2003). Interessanterweise besteht im Maus-Ngb keine Möglichkeit zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke, da das Cystein an der Position CD7 fehlt. So bleibt die O₂-Affinität von 2,2 Torr erhalten. Dieser Mangel an evolutionärer Konservierung stellt daher den oben beschriebenen Mechanismus in Frage.

1.1.3.5 Cytoglobin

Kurz nach der Entdeckung des Neuroglobins wurde ein weiteres Globin in Vertebraten identifiziert, das Cytoglobin. Es wurde unabhängig voneinander von drei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Burmester et al., 2002; Kawada et al., 2001; Trent and Hargrove, 2002). Anhand der durchgeführten Northern Blot-Analysen, die zunächst auf eine ubiquitäre Expression des Proteins hindeuteten, wurde die Bezeichnung Cytoglobin (Burmester et al., 2002) bzw. Histoglobin (Trent and Hargrove, 2002) gewählt. Zur gleichen Zeit wurde ein Protein beschrieben, dessen Expression in den Sternzellen fibrotischer Rattenleber stark heraufreguliert wurde, das „*stellate cell activation-associated protein*“ bzw. STAP (Kawada et al., 2001). Die Autoren erkannten zwar nicht, dass STAP ein Protein der Globinfamilie ist, räumten ihm aber aufgrund der AS-Sequenzähnlichkeit zum Myoglobin eine mögliche Funktion im intrazellulären O₂-Transport in fibrotisiertem Gewebe ein.

Das Cytoglobin (Cygb) hat eine Molekularmasse von 21 kDa und ist mit 190 AS deutlich länger als die Myo-, Häm- und Neuroglobine der Vertebraten (140-160 AS). Die Extensionen liegen dabei am N- und C-Terminus der AS-Kette, wie sie in respiratorischen Proteinen mancher Invertebraten und primitiver Vertebraten bereits beobachtet wurden (Alayash et al., 2001; Hardison, 1998) und haben keine Auswirkung auf die typische Globinfaltung (de Sanctis et al., 2004; Makino et al., 2006). Die Verlängerung des C-Terminus des Proteins kommt durch ein zusätzliches Exon zustande, wohingegen die N-terminale Verlängerung auf eine direkte Duplikation von 21 Nukleotiden zurückzuführen ist (Burmester et al., 2002). Das vierte Exon scheint säugerspezifisch zu sein, da es im Cytoglobin-Gen von Fischen (Burmester et al., 2002; Fuchs et al., 2005) und Amphibien (Fuchs et al., 2004) fehlt.

Die Aminosäuresequenzen von humanem und murinem Cygb sind zu 95 % identisch. Dies zeigt, dass Cygb, genau wie Ngb, zu den am höchsten konservierten Proteinen innerhalb der Säugetiere gehört. Spektroskopische Studien sowie biphasische Sauerstoffbindungskinetiken zeigen, dass es sich beim Cytoglobin ebenfalls um ein

hexakoordiniertes Globin handelt (de Sanctis et al., 2004; Fuchs et al., 2004; Trent and Hargrove, 2002). Unter Umständen übt auch hier der endogene Ligand (His E7) einen regulatorischen Effekt auf die O₂-Bindung aus. Zusätzlich liegt das humane Cytoglobin unter physiologischen Bedingungen möglicherweise als Dimer vor, was eine Erklärung für die von Fago et al. (2004a) beobachtete kooperative O₂-Bindung im Cytoglobin sein könnte. Die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken wäre dabei prinzipiell denkbar, konnte jedoch in bisherigen Massenspektroskopie-Experimenten nicht nachgewiesen werden (de Sanctis et al., 2004). Aus strukturellen Analysen des humanen Cytoglobins geht ferner hervor, dass es ähnlich wie das Neuroglobin eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten CysB2 und CysE9 ausbilden kann, die jedoch einen wesentlich schwächeren Einfluss auf das Sauerstoffbindungsverhalten ausübt. Somit liegt die Sauerstoffaffinität des Cytoglobins mit 1-2 Torr im Bereich der des Myoglobins (Fago et al., 2004a; Hamdane et al., 2003).

Anhand von immunohistologischen Studien wurde die Zelltyp-spezifische Expression des Cytoglobins beschrieben. Es konnte in den Sternzellen der Leber, in Fibroblasten der Bindegewebe, in Chondroblasten und Osteoblasten (Knochen- und Knorpelbildungszellen) sowie in distinkten Zellschichten in der Retina nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Das neuronale Expressionsmuster des Cytoglobins wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation detailliert untersucht.

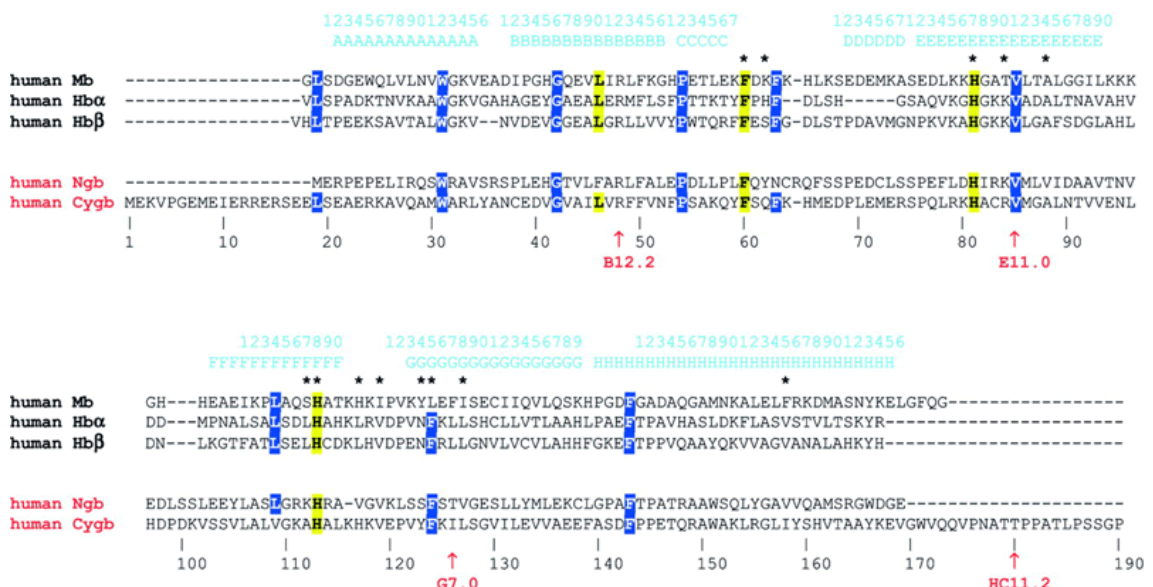


Abbildung 1-6 Aminosäurenvergleich der humanen Globine. Mb, Myoglobin; Hbα, Hbβ, Hämoglobin α- und β-Ketten, Ngb, Neuroglobin; Cygb, Cytoglobin; Die α-Helices im Myoglobin sind in hellblau beschriftet. Die Intronpositionen sind unten in Rot vermerkt. Für die O₂-Bindung wichtige AS sind gelb, für die Struktur relevante AS blau unterlegt. (Bildquelle: Pesce et al., 2002)

1.1.3.6 Mögliche Funktionen von Neuro- und Cytoglobin

Obwohl bisher diverse Funktionen für das Neuro- und Cytoglobin der Vertebraten vorgeschlagen wurden, ist ihre tatsächliche Aufgabe im Organismus bislang unklar (Brunori and Vallone, 2006; Burmester and Hankeln, 2004; Hankeln et al., 2005). Folgende Möglichkeiten werden zurzeit diskutiert (Abb1-7):

- a) Analog zum Myoglobin im Muskel könnten die beiden neu entdeckten Proteine als intrazelluläre O_2 -Speicher fungieren und zusätzlich den O_2 -Transport von der Zellmembran zu den Mitochondrien erleichtern („facilitated oxygen diffusion“) (Wittenberg and Wittenberg, 1987; Wittenberg and Wittenberg, 2003).
- b) Beide Globine könnten als O_2 -Sensormoleküle fungieren (Kriegl et al., 2002). Diese Fähigkeit wurde bereits für Archae- und Bakterienglobine beschrieben (Freitas et al., 2004; Hou et al., 2001). Alternativ könnten sie in andere Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle involviert sein (Wakasugi et al., 2003).
- c) Ngb und Cygb könnten als terminale Oxidasen die Regenerierung von NAD^+ bewerkstelligen und somit die Energiegewinnung durch die Glycolyse unter hypoxischen Bedingungen aufrechterhalten. Diese Funktion wird bereits für einige Bakterienglobine (Dikshit et al., 1992; Ermler et al., 1995) sowie die nicht symbiotischen Hämoglobine aus Gerste und Mais propagiert (Sowa et al., 1998).
- d) Beide Proteine könnten bei der Entgiftung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies eine Rolle spielen, wie sie beispielsweise nach Ischämie/Reperfusion vermehrt anfallen (Herold et al., 2004). Auch dem Myoglobin wird diesbezüglich eine Schutzfunktion zugeschrieben (Flogel et al., 2004).
- e) Ngb und Cygb könnten, wie für das Myoglobin bereits beschrieben (Flogel et al., 2001), als NO-Dioxygenasen wirken und schädliche Mengen $NO^•$ in das harmlose Nitrat (NO_3^-) umwandeln (Kundu et al., 2003).
- f) Eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen innerhalb der Zelle erfordert molekularen Sauerstoff. So könnten beide Globine die entsprechenden Enzyme mit adäquaten O_2 -Mengen versorgen. Prolylhydroxylasen benötigen beispielsweise für die posttranslationale Modifizierung von Kollagen und HIF-1 α Sauerstoff (Kivirikko and Pihlajaniemi, 1998; McNeill et al., 2002). Auch die NO-Synthase verwendet molekularen Sauerstoff zur Erzeugung von NO (Leone et al., 1991).

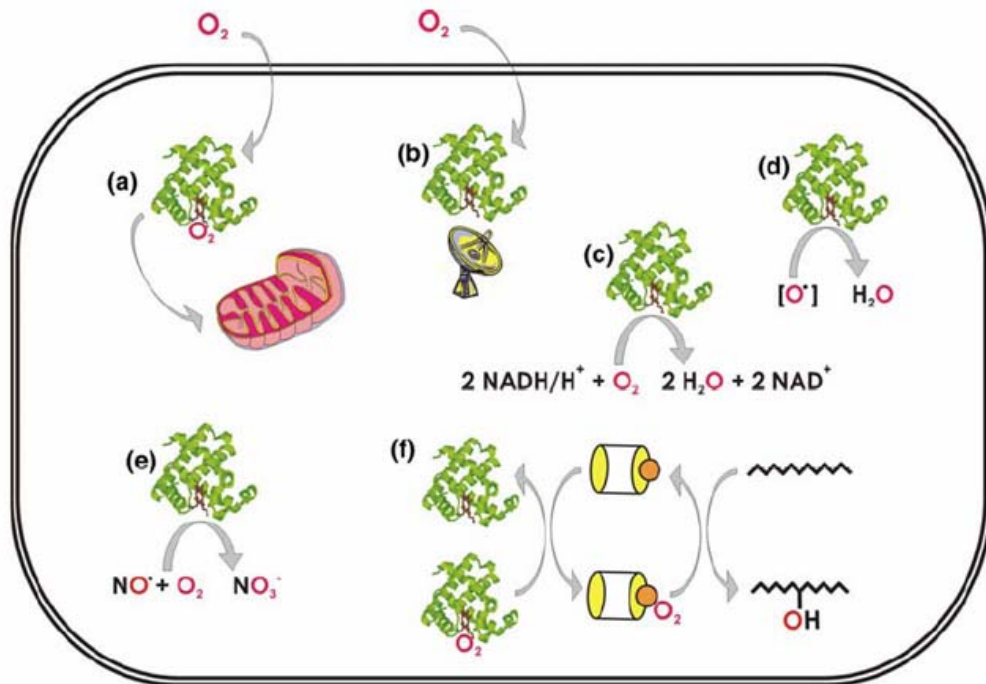


Abbildung 1-7 Hypothetische Funktionen intrazellulärer Globine. (a) O₂-Transport zu den Mitochondrien (b) O₂-Sensor (c) Regeneration von NAD⁺ (d) Entgiftung von ROS und (e) NO[•] (f) O₂-Lieferant für enzymatische Reaktionen (Bildquelle: Hankeln et al., 2005)

1.2 „reactive oxygen species“ (ROS)

Die maßgebliche Beteiligung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen an diversen pathophysiologischen und neurodegenerativen Prozessen im Organismus wird gegenwärtig stark diskutiert und ist Gegenstand zahlreicher experimenteller Fragestellungen. Ziel ist die Erforschung der zellulären Schutzmechanismen, die zur Entgiftung dieser Radikale beitragen. In diesem Zusammenhang wird auch eine mögliche Rolle der beiden neuentdeckten Globine postuliert (Herold et al., 2004).

1.2.1 Entstehung von ROS

Molekularer Sauerstoff spielt als finaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette eine essentielle Rolle für die Energiegewinnung und somit für die Zellfunktion aerob lebender Organismen. Unmittelbar damit verbunden ist aber auch die Entstehung von

Radikalen, den sog. „reactive oxygen species“ (ROS), die für die Zellen toxisch sein können. Dabei werden ca. 92 % der freien Radikale in den Mitochondrien gebildet (Anton et al., 2005), womit diese als der maßgebliche Entstehungsort wie auch als das Hauptangriffsziel von ROS gelten (Cadenas, 2004; Genova et al., 2004). Es wird angenommen, dass während der normalen Zellatmung ca. 1 bis 6 % des in den Mitochondrien verwendeten Sauerstoffs infolge unvollständiger Reduktion in das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) umgewandelt werden (Boveris, 1984; Kowaltowski and Vercesi, 1999). Für die Entstehung des Superoxids sind hauptsächlich zwei Bestandteile der Atmungskette verantwortlich, das Ubihydrochinol/Ubichinon (Komplex III) und die FMNH₂/FMN-Komponente der NADH-Dehydrogenase (Komplex I). In beiden Fällen werden die intermediären Semichinone UQH $^{\cdot-}$ und FMNH $^{\cdot-}$ durch molekularen Sauerstoff autooxidiert (Boveris and Cadenas, 2000; Boveris et al., 1976). Ein großer Teil der Superoxidanionen wird anschließend von der mitochondrialen Mn-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD; SOD2) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Ein geringer Anteil (ca. 1%) wird dabei direkt zu dem hochreaktiven Hydroperoxidradikal ($HO_2^{\cdot-}$) protoniert (Jezek and Hlavata, 2005). Daneben führt die Reaktion des hauptsächlich durch die mitochondrienspezifische Isoform der NO-Synthase (mtNOS) (Ghafourifar and Cadenas, 2005) produzierten NO $^{\cdot}$ mit $O_2^{\cdot-}$ zur Entstehung von Peroxynitrit ($ONOO^-$), einer weiteren hochreaktiven Spezies (Cadenas, 2004; Freitas et al., 2002). Überdies spielen Metallionen wie Fe^{2+} und Cu^{1+} eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Entstehung des extrem zytotoxischen Hydroxylradikals ($OH^{\cdot-}$), indem sie in der sog. Fenton-Katalyse die Reduktion des H_2O_2 bewerkstelligen (Schipper, 2004).

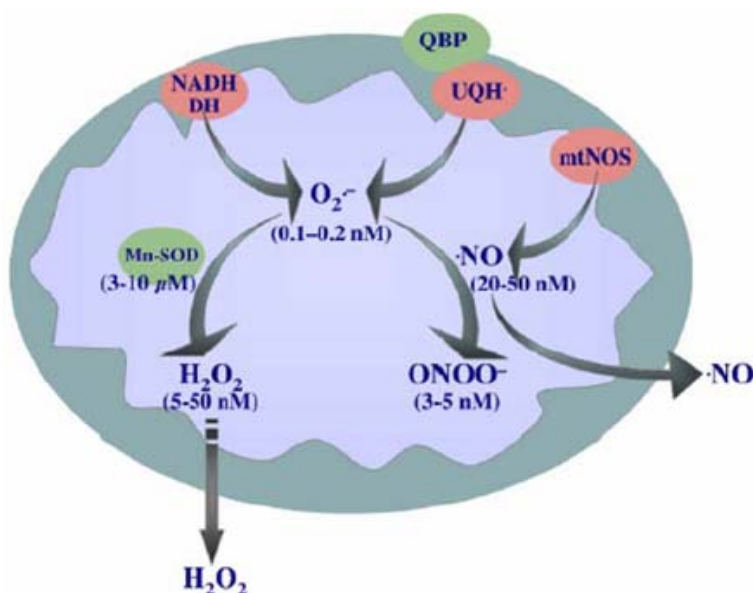


Abbildung 1-8 ROS- und NO-Metabolismus in der mitochondrialen Matrix.
(Bildquelle: Cadenas, 2004)

Normalerweise spielen die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies („*reactive nitrogen species*“; RNS) in geringen Konzentrationen eine wichtige Rolle als sekundäre Botenstoffe. Als solche übernehmen sie wichtige Aufgaben in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Regulation der Genexpression, in der Muskelkontraktion sowie in der Signaltransduktion, beim Zellwachstum und der Apoptose (Boyd and Cadenas, 2002; Martindale and Holbrook, 2002; Sen and Packer, 1996; Suzuki et al., 1997; Wang et al., 1998). In erhöhten Konzentrationen dagegen verursachen die freien Radikale oxidativen Stress in der Zelle. Aus diesem Grund werden unter normalen physiologischen Bedingungen die produzierten ROS- und RNS-Mengen durch endogene Schutzmechanismen streng kontrolliert. Dazu gehören zum einen spezielle Schutzenzyme, wie die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (CAT) und Glutathion-Peroxidase (GPx) sowie die sog. Antioxidantien, wie Vitamin C und E, Karotinoide, Thioredoxin und Glutathion (GSH) (Freitas et al., 2002).

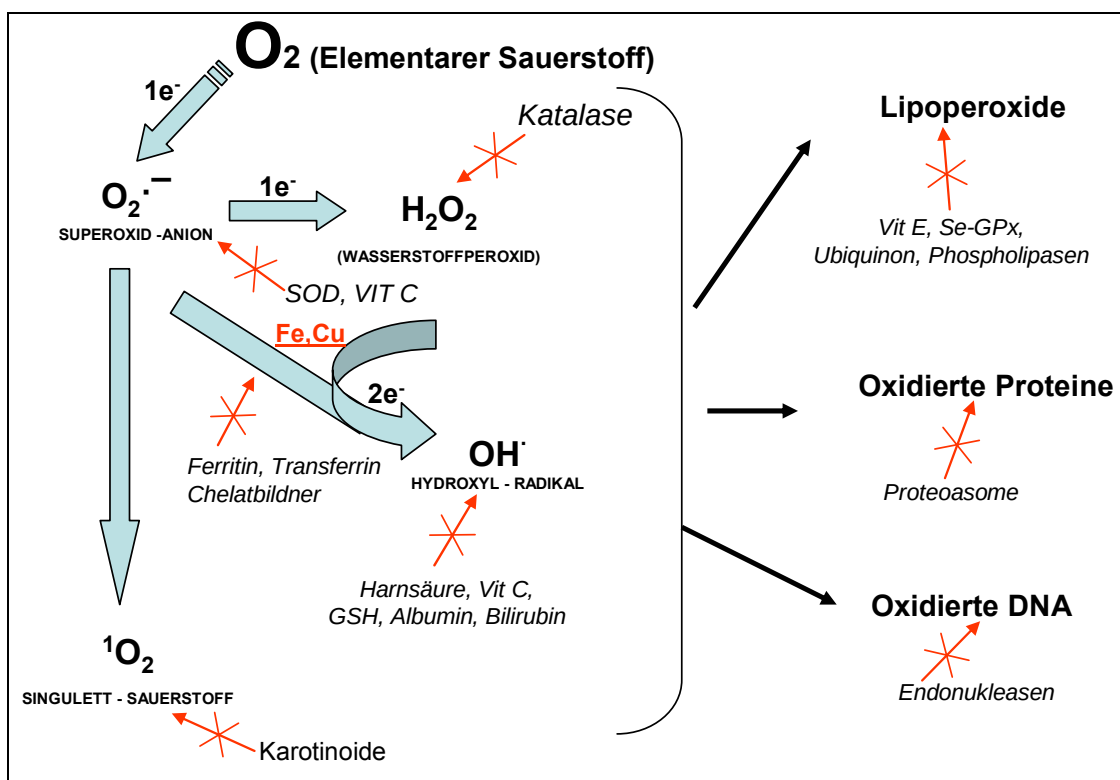


Abbildung 1-9 Pro- und Antioxidantien.

(Bildquelle (modifiziert): http://www.probiox.com/de/html/body_stressoxydant.htm)

1.2.2 ROS im Alterungsprozess

Der biologische Alterungsprozess geht mit großen Veränderungen auf biochemischer und morphologischer Ebene in Zellen einher und wird durch einen zeitabhängigen Verfall physiologischer Funktionen charakterisiert. Die klassischen Theorien zu den molekularen Ursachen des Alterns stützen sich zum einen auf die Verkürzung der Telomere und zum anderen auf den erhöhten oxidativen Stress in den Zellen (Balaban et al., 2005; Beckman and Ames, 1998; Harley et al., 1990; Harman, 1981). Die sog. Theorie der freien Radikale (Harman, 1956) besagt, dass das Altern mit Defiziten im Energiestoffwechsel und einer gesteigerten Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies assoziiert ist. Zudem nimmt die Schutzantwort vermutlich ab (Tsay et al., 2000), so dass sich das Gleichgewicht zwischen ROS/RNS und Antioxidantien zugunsten der Prooxidantien $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot-}$, $NO^{\cdot}$ und $ONOO^-$ verlagert. Die damit einhergehenden Schäden an Zellmembranen, Proteinen und Nukleinsäuren können zu physiologischen Fehlfunktionen bis hin zum Zelltod (Cadenas, 2004; Freitas et al., 2002; Radi et al., 2001). Ferner wird die natürliche Verkürzung der Telomere durch erhöhte ROS-Konzentrationen im Alter noch verstärkt (Skulachev, 2000).

In Versuchen mit transgenen Invertebraten, welche die o.g. Schutzenzyme überexprimieren, konnte bestätigt werden, dass die endogene Produktion von ROS einen wesentlichen Einfluss auf die Lebensdauer hat (Orr and Sohal, 1994; Parkes et al., 1998; Sun et al., 2002). Entsprechend starben SOD2 (Mn-SOD)-knock out-Mäuse innerhalb der ersten Lebenswochen (Melov, 2002). In transgenen Mäusen, in denen die Enzyme SOD1 (Cu/Zn-SOD) (Huang et al., 2000), Glutathionperoxidase (McClung et al., 2004) bzw. Katalase (Schriner et al., 2000) überexprimiert wurden, konnte hingegen keine Verlängerung der Lebensdauer beobachtet werden (de Magalhaes and Church, 2006). Die Verfütterung von Antioxidantien an Nager führte wiederum zum leichten Anstieg der Lebenserwartung, verzögerte allerdings nicht den Alterungsprozess (Comfort et al., 1971; Hagen et al., 2002; Heidrick et al., 1984). Ob nun die Disregulation der Kontrollmechanismen, die in die Entstehung und Beseitigung von ROS involviert sind und die damit einhergehende Steigerung der oxidativen Schäden ein Effekt oder der Grund für die Zellalterung ist, konnte bislang nicht eingehend geklärt werden (de Magalhaes and Church, 2006). Jedoch ist im Alter eine Zunahme sowohl der Produktion der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies als auch der anfallenden Oxidationsprodukte zu verzeichnen (Balaban et al., 2005; Beckman and Ames, 1998; Finkel and Holbrook, 2000).

1.2.3 Reaktionen von Globinen mit ROS

Vor mehr als 100 Jahren wurde zum ersten Mal die Reaktion des Hämoglobins mit H_2O_2 beschrieben und bereits 1923 wurde über die Peroxidase-Aktivität des Hämoglobins berichtet (Kobert, 1900; Wu, 1923). Die aktiven Zentren im Hämoglobin und Myoglobin teilen viele physikalische, strukturelle und chemische Eigenschaften mit den aktiven Zentren von Peroxidasen, dennoch ist die Reaktion der beiden Globine mit H_2O_2 viel langsamer als die der Katalasen und Peroxidasen (Svistunenko, 2005). Die Reaktion von H_2O_2 mit Fe(II)-Hämoglobin (oxyHb und deoxyHb) und Fe(III)-Hämoglobin (metHb) führt zur Erzeugung der hoch reaktiven Fe(IV) Ferryl-Hämoglobin- bzw. Oxo-ferryl-Hämoglobin-Intermediate. Dabei handelt es sich um stark oxidierende Agenzien, die zur Schädigung der Zellen durch ROS beitragen (Alayash et al., 2001; Reeder et al., 2004; Svistunenko and Cooper, 2004). Aus diesem Grund müssen sie so schnell wie möglich beseitigt werden. Dabei tritt die überaus effektive antioxidante Aktivität des oxy-Fe(II)-Hämoglobins zutage. In einer sog. Komproportionsreaktion („*comproportionation reaction*“) wird das Ferryl-Hb durch einen Tyrosinrest des oxyHb reduziert. Dabei entsteht metHb, aus dem schließlich mit Hilfe der metHb-Reduktase die Ferro-Fe(II)-Form des Hämoglobins regeneriert wird (Giulivi and Davies, 1990). Reagiert Ferryl-Hb mit Wasserstoffperoxid, entstehen metHb und Superoxid. Reagiert das H_2O_2 jedoch mit Oxo-ferryl-Hb, so entsteht Sauerstoff anstelle von Superoxid. Diese Reaktion könnte möglicherweise zur katalytischen Entsorgung von H_2O_2 beitragen (Nagababu and Rifkind, 2000). Diese sog. Pseudoperoxidase-Aktivität des Hämoglobins ist wahrscheinlich nur eine Nebenreaktion des Moleküls, könnte aber unter ganz speziellen Bedingungen zum Schutz vor Radikalen beitragen (Cooper et al., 2005).

Aber auch die Entstehung von H_2O_2 in den roten Blutzellen steht mit Hämoglobin im Zusammenhang. Die Autooxidation des oxy-Hämoglobins führt zur Bildung von metHb und Superoxid (O_2^-), das von der Superoxiddismutase zu H_2O_2 und Wasser umgesetzt wird (Johnson et al., 2005; Misra and Fridovich, 1972). Obwohl die Autooxidationsrate des Hb durch Ausbildung der tetrameren Struktur im Vergleich zu den Einzelketten deutlich herabgesetzt ist (Tsuruga et al., 1998), trägt sie vermutlich mit 3 bis 4% zum ständigen Fluss von reaktiven Sauerstoffspezies bei und könnte somit am oxidativen Stress innerhalb der Erythrozyten beteiligt sein (Nagababu and Rifkind, 2000).

Des Weiteren kann Peroxynitrit in rote Blutzellen diffundieren und dort mit oxygeniertem Hämoglobin reagieren. Das Hämoglobin katalysiert die Isomerisierung

von Peroxynitrit zu Nitrat (NO_3^-). Das dabei entstehende metHb wird wahrscheinlich über die Fe(IV) Ferryl-Zwischenstufe gebildet, die jedoch in der Reaktion des Hb mit Peroxynitrit weitaus weniger stabil ist als das in den Reaktionen des Hb mit H_2O_2 gebildete Ferryl-Intermediat (Romero et al., 2003). Auf diese Weise senkt das oxyHb den intravaskulären Peroxynitrit-Spiegel und verhindert so die Entstehung der nitrierenden Spezies NO_2^+ (Radi, 2004). Ähnliche Funktion könnte auch das deoxyHb ausüben, das Nitrit zu NO^+ und darüber hinaus Peroxynitrit zu Nitrit reduzieren kann (Cosby et al., 2003). Auch metHb kann die Isomerisierung von Peroxynitrit zu Nitrat katalysieren und somit zur Entgiftung des Peroxynitrits beitragen (Herold and Shivashankar, 2003). Andererseits kann das metHb als metallhaltiges Protein auch die Nitrierung freier Tyrosine bei Anwesenheit von Nitrit und H_2O_2 vermitteln (Herold, 2004).

Für das Myoglobin konnte mit Hilfe der Myoglobin-knock out-Mäuse die Beteiligung des Proteins am Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen werden (Flogel et al., 2004). Zum einen setzte die externe Zugabe von H_2O_2 die Kontraktionsfähigkeit der knock out-Herzen im Vergleich zu den Wildtyp (WT)-Herzen viel stärker herab, zum anderen war die gebildete ROS-Menge im ko-Herz nach Ischämie und anschließender Reperfusion (IR) deutlich höher als im WT-Herzen. Wahrscheinlich führt *in vivo*, ähnlich wie beim Hämoglobin, die sog. Komproportionsreaktion der Ferryl-Mb-Zwischenstufe mit oxyMb zur Bildung von metMb, aus dem mit Hilfe einer spezifischen metMb-Reduktase die aktive Ferro(II)-Form des Myoglobins regeneriert wird.

Die stark erhöhte NO-Konzentration in Myoglobin knock out-Mäusen deutet außerdem auf eine Funktion des Myoglobins bei der Entgiftung von Stickoxid (NO^+) hin (Flogel et al., 2001). Aufgrund der inhibitorischen Wirkung des NO auf die Cytochrom c-Oxidase der Atmungskette (Antunes et al., 2004; Brown, 2001) übt das Myoglobin möglicherweise durch die katalytische Umwandlung des NO zu Nitrat indirekten Einfluss auf die Regulation der oxidativen Phosphorylierung aus (Brunori, 2001; Flogel et al., 2001; Wittenberg and Wittenberg, 2003).

Ähnlich wie das Hämoglobin ist auch das Myoglobin in der Lage die Isomerisierung von Peroxynitrit zu Nitrat zu katalysieren. Neben der Schutzfunktion könnte es sich hierbei ebenfalls um einen regulatorischen Einfluss auf die Zellatmung handeln, denn auch das Peroxynitrit kann die Cytochrom c-Oxidase irreversibel hemmen (Herold and Shivashankar, 2003; Herold et al., 2002).

1.3 Tiermodelle zur funktionellen Genanalyse in Säugern

Tiermodelle sind für die funktionelle Analyse von Genen schon seit geraumer Zeit von großer Bedeutung. In Tieren lassen sich Gene zum einen gezielt inaktivieren (knock out-Modelle), zum anderen kann ein einzelnes Gen zusätzlich ins Genom eingefügt (transgene Tiermodelle) und die Auswirkungen auf den Organismus erforscht werden. Die Maus dient aufgrund der biologischen und genetischen Ähnlichkeiten zum Menschen als ein gängiger Modellorganismus zur Erforschung von Genfunktionen und Krankheitsbildern (Bogue, 2003a; Bogue, 2003b). Das Genom der Maus gleicht dem des Menschen hinsichtlich der Größe und der Anzahl der Gene und ist inzwischen ebenfalls vollständig sequenziert (Waterston et al., 2002). Eine hohe Reproduktionsrate und kurze Lebenserwartung sind weitere Vorteile der Maus als Modellorganismus, die es erlauben, die Effekte von veränderten Genen über mehrere Generationen hinweg zu beobachten. Heutzutage werden routinemäßig genetisch modifizierte Mäuse hergestellt, zum einen durch die Injektion der Fremd-DNA in Embryonen im Einzell-Stadium (transgene) oder durch Transfektionen in embryonale Stammzellen (knock out).

1.3.1 Gezieltes Ausschalten von Zielgenen in knock out-Mäusen

Knock out-Mäuse entstehen, wenn ein definierter DNA-Bereich eines Gens zielgerichtet gegen einen nicht-funktionellen Abschnitt ausgetauscht wird. Das Prinzip der als „gene targeting“ bezeichneten Methode beruht auf der homologen Rekombination (Deng and Capecchi, 1992). Hierzu werden genomische Sequenzabschnitte des zu untersuchenden Gens in einen Vektor kloniert (Targeting-Konstrukt) und dabei wichtige funktionelle Bereiche des Gens (z.B. Start-Codon, funktionelle Exons) durch ein Markergen (Neomycinresistenzgen; Neo) ersetzt. Dieser Vektor wird in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transformiert, in denen das Wildtyp-Gen infolge homologer Rekombination durch das modifizierte Gen aus dem Vektor ersetzt wird. Isolierte Stammzellen werden bereits seit den 80er Jahren zur Generierung von knock out-Mäusen verwendet. Sie sind für genetische Manipulationen leicht zugänglich und besitzen aufgrund ihrer Pluripotenz die Fähigkeit, sich in die verschiedenen Gewebe eines Organismus zu differenzieren (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Die homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis, das etwa 10^4 - 10^5 -mal seltener auftritt als eine zufällige Integration. Die Häufigkeit hängt sowohl von der Länge der homologen Regionen des Targeting-Konstrukts, als auch von deren Übereinstimmungsgrad mit dem Zielgen ab (Hasty et al., 1991). Ab einer DNA-Länge von 2 kb nimmt bis max. 14 kb die Zahl der homologen Rekombinationsereignisse exponentiell zu (Deng and Capecchi, 1992). Ferner erhöht die Verwendung von isogener DNA aus dem passenden Mausstamm die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination um das ca. 20fache (te Riele et al., 1992).

Das Targeting-Konstrukt wird mittels Elektroporation in ES-Zellen gebracht, die dann in Anwesenheit des Antibiotikums Neomycin bzw. G418 wachsen. ES-Zellen, die das Konstrukt in ihr Genom integriert haben, können somit durch die Expression der Antibiotikaresistenz selektiert und z.B. mittels PCR auf homologe Rekombination untersucht werden. Ein zweites Markergen, beispielsweise das Gen für die Thymidinkinase (*TK*), das flankierend zum homologen Sequenzbereich im Targeting-Konstrukt enthalten ist, erlaubt dabei die negative Selektion der unspezifisch rekombinierten ES-Zellen. Nach der Zugabe des toxischen Thymidinanalogon Gangcyclovir sterben die ES-Zellen ab, die unspezifisch das Targeting-Konstrukt einschließlich des *TK*-Gens in ihr Genom integriert haben.

ES-Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, werden anschließend in eine Spenderblastocyste injiziert und in den Uterus einer scheinschwangeren Maus reimplantiert. Die chimären Nachkommen dieser Maus besitzen eine mosaikartig zusammengesetzte Fellfarbe, da die ES-Zellen von braunen (*agouti*) Mäusen (129/SvJ) stammen, wohingegen die Blastocysten aus schwarzen C57/B6 Mäusen isoliert werden. Durch die nachfolgende Kreuzung der chimären Mäuse mit schwarzen C57/B6 Mäusen lässt sich feststellen, ob das mutierte Allel in die Keimbahn der Chimären gelangt ist. Da das braune *Agouti*-Gen dominant über die schwarze Fellfärbung ist, tragen nach Mendel 50 % der braunen Nachkommen das mutierte Allel. Schwarze Nachkommen enthalten keine Mutation im zu untersuchenden Gen. Mit Hilfe von Southern Blot-Analysen oder über PCR kann das ausgeschaltete Allel molekular nachgewiesen werden. Die Kreuzung zweier heterozygoter Mäuse resultiert schließlich in 25 % homozygoter Nachkommen (Capecchi, 1989a; Capecchi, 1989b).

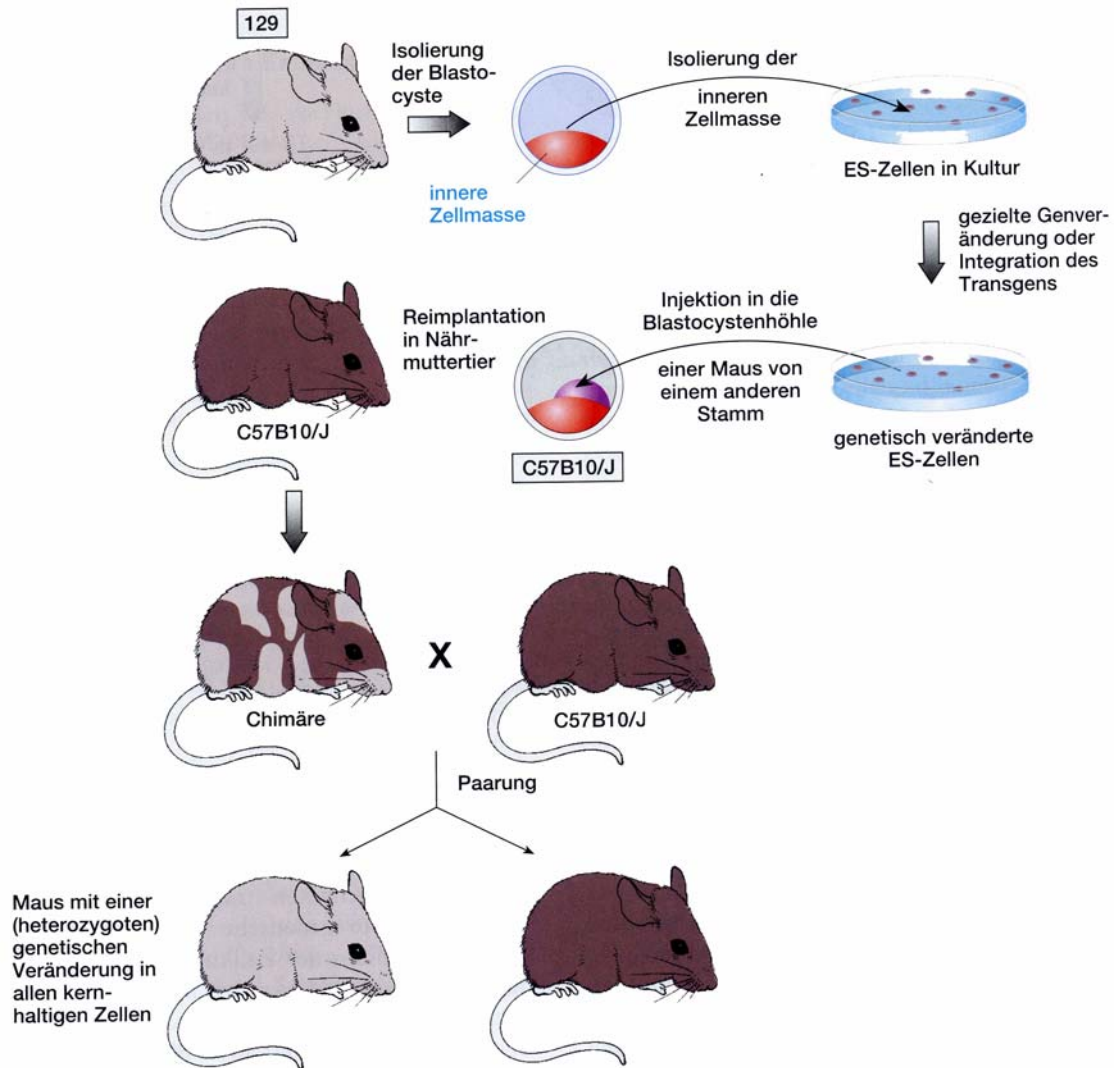


Abbildung 1-10 Generierung einer knock out-Maus. Die ES-Zellen werden aus der Blastocyste eines geeigneten Mausstammes (z.B. 129/SvJ) isoliert und in Kultur gesetzt. In Kultur können sie durch Einschleusen von Fremd-DNA genetisch verändert werden. Die veränderten ES-Zellen können dann in isolierte Blastocysten eines anderen Mausstammes (z.B. C57B10/J oder C57/B6) injiziert werden. Die Mäuse dieses Stammes besitzen eine schwarze Fellfarbe, die gegenüber der Agouti-Färbung des Stammes 129/SvJ rezessiv ist. Die anschließende Entwicklung der eingeführten Blastocyste führt zu einer Chimäre, die (auch in den Keimbahnzellen) zwei Zellpopulationen enthält, die von zwei verschiedenen Zygoten stammen und sich in der gefleckten Fellfarbe widerspiegeln. Die Rückkreuzung der Chimären führt zu Mäusen, die für die genetische Veränderung heterozygot sind. Durch die anschließende Inzucht heterozygoter Tiere entstehen schließlich homozygote Mutanten. (Bildquelle: Strachan und Read, 2005).

Neben dem dauerhaften, vollständigen Ausschalten einer Genfunktion werden heute verstärkt Techniken eingesetzt, die es ermöglichen Gene zu definierten Zeiten während der Entwicklung oder in bestimmten Zellen bzw. Geweben abzuschalten. Man spricht von konditionellen knock out-Mutanten. Die Technik basiert auf der Verwendung eines Rekombinase-Systems aus dem Bakteriophagen P1 (Cre/loxP;)

(Lakso et al., 1992; Orban et al., 1992). Die Cre-Integrase („*causes recombination*“) vermittelt eine zielgenaue Rekombination zwischen den 34 bp langen *loxP* („*locus of crossing over*“) Sequenzen. Die Integrase kann *loxP*-tragende Sequenzen deletieren, invertieren oder auch translozieren. Zielgensequenzen werden in ES-Zellen so verändert, dass Exonbereiche auf beiden Seiten von *loxP*-Elementen flankiert sind (Abb.1-11a). Diese „geflochten“ Gene werden in der transgenen Maus normal exprimiert solange kein Cre-Enzym vorhanden ist. Die Cre-Integrase wird in eine zweite transgene Maus eingebracht. Inzwischen sind viele Mauslinien verfügbar, die Cre zelltypspezifisch und sogar induzierbar exprimieren. Wird die „geflochte“ und die Cre-Maus miteinander gekreuzt, wird in den Nachkommen das Rekombinase-System aktiviert und das geflochte Zielgen ausgeschaltet (Abb. 1-11b).

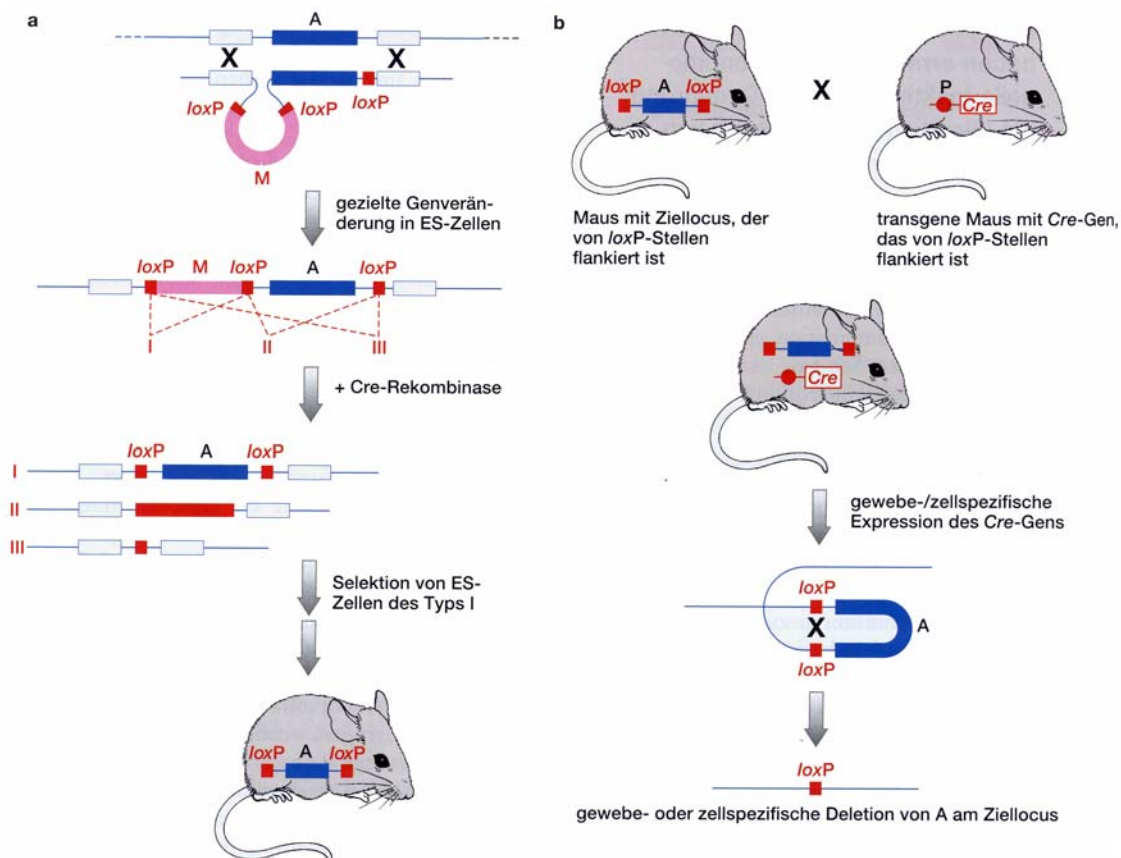


Abbildung 1-11 Das Cre-*loxP*-Rekombinationssystem erlaubt die gezielte Inaktivierung eines Gens in bestimmten Zelltypen. Dafür werden *loxP*-Stellen zusammen mit einem Markergen M am Ziellocus A eingeführt (a). Die anschließende Transfektion mit einem Cre-Rekombinasegen führt zur Rekombination zwischen den eingefügten *loxP*-Stellen und zur Entstehen der sog. Typ I-Rekombinanten, bei denen der Ziellocus von zwei *loxP*-Stellen flankiert wird. Diese Mäuse werden mit transgenen Mäusen gekreuzt, die ein integriertes Konstrukt aus dem Cre-Rekombinasegen und einem gewebespezifischen Promotor tragen (b). (Bildquelle: Strachan und Read, 2005).

1.3.2 Überexpression von Genprodukten in transgenen Mäusen

Transgene Tiere charakterisieren sich durch die Expression eines oder mehrerer exogen eingeführten Gene. Die Integration der zusätzlichen Gene ins Genom erfolgt dabei zufällig an Einzelstrangbrüchen in der DNA. Oft werden mehrere Kopien an einer einzigen Stelle in die chromosomale DNA integriert, was zur Entstehung von sog. Kopf-Schwanz-Konkatemeren mit 50 oder mehr Kopien führt (Strachan and Read, 2005). Dafür wird entweder der gesamte genomische Abschnitt oder durch reverse Transkription hergestellte cDNA der kodierenden Sequenz (CDS) des zu untersuchenden Gens einschließlich des Start-Kodons in ein entsprechendes Vektor-Plasmid kloniert. Wichtig für die anschließende Transkription ist dabei die Orientierung des klonierten Abschnitts relativ zum minimalen CMV-Promotor und dem Polyadenylierungssignal im Expressionskonstrukt. Durch Mikroinjektion wird die exogene DNA anschließend direkt in den männlichen Pronucleus einer befruchteten Eizelle eingebracht. Die transformierte Eizelle wird in den Eileiter eines scheinschwangeren Muttertieres eingesetzt. Erfolgt die Integration des Transgen-Konstruktes unmittelbar, ist die neugeborene Maus transgen. Meistens wird jedoch die DNA erst nach einer oder zwei Zellteilungen integriert, so dass die Maus ein Mosaik aus transgenen und nicht-transgenen Zellen darstellt, die dennoch von derselben Zygote stammen. Sobald transformierte Zellen an der Bildung der Keimbahn beteiligt sind, wird das Transgen auf die nächste Generation übertragen. Die Verwendung eines Reportergens vereinfacht die Selektion der transgenen Tiere. Eine gängige Vorgehensweise ist die Verwendung von Plasmid-Vektoren, die zusätzlich für ein Reporterprotein kodieren, wie z.B. das grün fluoreszierende Protein („*enhanced green fluorescent protein*“; EGFP). Die Expression des Reportergens wird gleichzeitig mit der Expression des klonierten Gens von einem bidirektionalen Promotor (z.B. CMV) aus reguliert und kann infolge der Fluoreszenz entsprechend nachgewiesen werden.

Durch die Verwendung von induzierbaren Promotoren, die durch die Zugabe spezifischer chemischer Liganden ein- oder ausgeschaltet werden, lässt sich die entwicklungs- bzw. gewebsspezifische Expression in transgenen Tieren am besten kontrollieren. Im Allgemeinen wird die Struktur der Transkriptionsfaktoren, die solche Promotoren regulieren, durch den Liganden verändert. Ein Beispiel dafür ist das Tet-Off bzw. Tet-On-System, in dem die Promotoraktivität abhängig von Tetracyclin (Tc) bzw. Doxycyclin (Dox) reguliert wird (Abb. 1-12).

Im Tet-Off-System (Gossen and Bujard, 1992) bindet, solange kein Dox verabreicht wird, das Protein tTA („*tetracycline-dependent transactivator protein*“) an das TRE („*tetracyclin-responsive element*“) im Promotor und induziert die Expression benachbarter Gene. Durch die Wechselwirkung mit Dox verliert das tTA die Fähigkeit an das TRE zu binden. Ohne tTA ist der minimale Promotor nicht funktionsfähig.

Im Tet-On-System (Gossen et al., 1995) wird eine mutierte Form des Proteins tTA, das sog. rtTA („*reverse tetracycline-dependent transactivator protein*“) verwendet, das ohne Dox nicht an den Promotor binden kann. Erst in Anwesenheit von Dox kann rtTA an das TRE binden und die Transkription der dahinter liegenden Gene starten.

In beiden Fällen wird das Transaktivator-Protein (tTA bzw. rtTA) auf einem weiteren Plasmid kodiert, das je nach gewünschtem Ort der Expression mit einem gewebe- bzw. zellspezifischen Promotor ausgestattet sein kann. Es existieren bereits zahlreiche Effektor-Mäuse, die eines dieser Proteine in bestimmten Geweben exprimieren (<http://www.zmg.uni-mainz.de/tetmouse/index.htm>), mit denen die selbst hergestellten transgenen Tiere gekreuzt werden können. Auf diese Weise kann zum einen die Funktionsfähigkeit der transgenen Vektoren überprüft werden, indem die Expression im Gewebe, in dem normalerweise kein Genprodukt nachzuweisen ist, angeschaltet wird. Das eigentliche Ziel ist jedoch, dass durch entsprechende Kreuzungen die bereits vorhandene Genexpression gesteigert und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das Tier analysiert werden können.

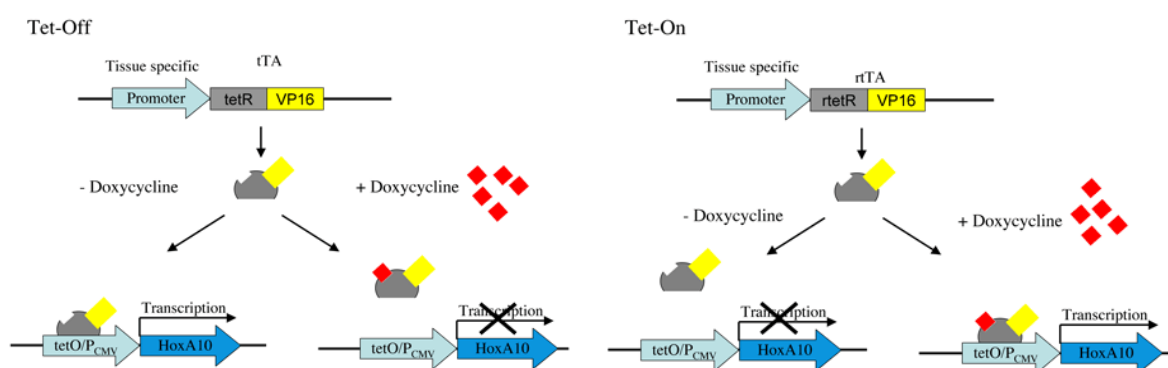


Abbildung 1-12 Das Tetracyclin-Transaktivator-System. Das System kann entweder zur Aktivierung (Tet-ON) oder Inhibition (Tet-OFF) der Expression des Transgens verwendet werden. Tet-OFF: Der Transaktivator rtTA setzt sich zusammen aus dem Repressorprotein (tetR) und VP16, bindet in Abwesenheit von Tetracyclin bzw. Doxycyclin an die Operatorssequenz (tetO), dort wirkt er als starker Transkriptionsaktivator. Im Tet-ON System ist das TetR-Protein durch vier AS-Austausche so verändert, dass es nur in Anwesenheit von Tetracyclin bzw. Doxycyclin an tetO binden und die Transkription des exogen eingefügten Gens aktivieren kann. (Bildquelle: http://www.molmed.lu.se/hematopoiesis_p04.htm)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten mit Hilfe von bioinformatischen, molekulargenetischen und zellbiologischen Methoden grundlegende Daten zu den Expressionsmustern, zur Regulation und zu den möglichen Funktionen von Neuroglobin und Cytoglobin ermittelt werden.

- o In komparativen Sequenzanalysen der humanen und murinen Neuroglobingen-Regionen sollten konservierte, nicht-kodierende Sequenzabschnitte identifiziert werden, die den möglichen Promotor des Ngb-Gens mit den putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten und einen Einblick in potentielle Mechanismen der Genregulation geben könnten. Solche computergestützten Analysen sind Voraussetzung für die experimentelle Durchführung von funktionellen Promotoranalysen.
- o Um Rückschlüsse auf die mögliche Funktion eines Proteins ziehen zu können, ist die genaue Kenntnis seiner Expressionsorte unumgänglich. Anhand von mRNA-*in situ*-Hybridisierungen und indirekten Immunfluoreszenzanalysen sollte eine detaillierte Analyse der zellulären und subzellulären Verteilung von Ngb und Cygb in murinen Geweben durchgeführt werden. Dabei sollte das Hauptaugenmerk auf neuronale und endokrine Gewebe gerichtet sein.
- o Mit Hilfe von Realtime Q-PCR-Analysen sollte eine mögliche differentielle Regulation von Ngb und Cygb während des zellulären Alterungsprozesses untersucht werden. Hierfür sollten die mRNA-Mengen aus verschiedenen Hirnbereichen von jungen und alten Individuen der Säugerspezies *Phodopus sungorus* (dsungarischer Zwerghamster) miteinander verglichen werden. Hintergrund der Analyse waren Hypothesen, die die Expression und Funktion beider Globine in Zusammenhang mit der Stoffwechselaktivität neuronaler Zellen und mit der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sehen.
- o Für funktionelle Analysen eines Proteins *in vivo* ist die Verfügbarkeit von entsprechenden transgenen und knock out-Mäusen eine wichtige Voraussetzung. Für die Generierung von Ngb- und Cygb-knock out-Mäusen sollten entsprechende „gene-targeting“-Vektorkonstrukte hergestellt werden. Darüber hinaus sollten Nachweis-Verfahren etabliert werden, welche die Genotypisierung von embryonalen Stammzellen (ES) nach erfolgtem Targeting ermöglichen. Für die Herstellung transgener, Ngb-/Cygb-überexprimierender Mäuse sollten ebenfalls entsprechende Vektor-Konstrukte hergestellt und die Nachweisverfahren etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsmaterial und Tiere

Zur Präparation von RNA und genomischer DNA sowie zur Herstellung von Proteinextrakten wurden verschiedene Gewebe des Balb/C-Stammes von *Mus musculus* aus dem Tierstall des Instituts für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Mainz verwendet.

Für die Herstellung von Gewebeschnitten für mRNA-*in situ*-Hybridisierungen und Immunohistochemie verwendete adulte Mäuse (Balb/C) und Ratten (Wistar) wurden aus dem Tierstall des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Mainz bezogen.

Für RNA-Präparationen zur Untersuchung der Ngb- und Cygb-Expression im Alter wurden jung-adulte und senile Zwerghamster der Spezies *Phodopus sungorus* von Prof. Stefan Reuss vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Als Ausgangsmaterial für die Konstruktion der knock out-Vektoren wurde der murine PAC-Klon D08616Q2 aus der Klonbibliothek 704 des Ressourcenzentrums des Deutschen Human-Genomprojektes in Berlin eingesetzt. Alternativ wurde genomische DNA aus embryonalen Stammzellen E14Tg2a von *Mus musculus* verwendet, die vom Kooperationspartner Dr. Stefan Wiese in Würzburg zur Verfügung gestellt wurden.

Die Transformationen der knock out-Vektoren in embryonale Stammzellen E14Tg2a der R1 ES Line (Heid et al., 1996; Nagy et al., 1993) aus *Mus musculus* wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Sendtner am Institut für Klinische Neurobiologie in Würzburg durchgeführt. Bei der R1 ES Linie handelt es sich um ein F1 Hybrid aus zwei SJ129 Maus-Stämmen (129/Svcp x 129/SvJ).

Die Injektionen der transgenen Vektoren in die Eizellen des *Mus musculus* Stammes FvB wurden in der Arbeitsgruppe Dr. Bockamp im Institut für Toxikologie der Universität Mainz durchgeführt.

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

2.2.1 Standard-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Zugabe von 0,2 Vol DNA-Ladepuffer auf vertikalen 0,8-2,5 %igen Agarosegelen in Kammern der Firma Genterprise (Mainz) bei einer Stromstärke von 15-30 mA bzw. einer Spannung von 130 V. Als Laufpuffer wurde entweder 1xTBE- oder 1xE-Puffer verwendet. Als Molekulargewichtsstandards dienten mit *HindIII* restringierte Lambda-DNA und mit *EcoRI* und *Hind III* restringierte pF-DNA. Darüber hinaus wurden DNA-Marker der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Färbung der DNA erfolgte in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml in 1x E-Puffer), die Sichtbarmachung auf einem UV-Transilluminator IL-200 M bei 312 nm. Die Gelbilder wurden mit einem „Image Documentations-System CSI“ (Cybertech) aufgenommen.

Die Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) nach Angaben des Herstellers.

RNA wurde auf vertikalen 0,8 %igen Agarosegelen mit einer Endkonzentration von 5,5% Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet, zur Färbung wurde die RNA-Probe mit 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (5 mg/ml) versetzt. Die Denaturierung der Sekundärstrukturen wurde durch die Zugabe von 3 Vol RNA-Ladepuffer und anschließender Inkubation für 10 min bei 70 °C erzielt. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt, mit 1/10 Vol RNA-Färbelösung versetzt und auf das Gel geladen. Die Sichtbarmachung konnte direkt auf dem Gel mit Hilfe des UV-Transilluminators IL-200 M bei 312 nm erfolgen und mit dem „Image Documentation System CS1“ (Cybertech) aufgenommen werden.

2.2.2 DNA-Fällung

Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol 10x Dialysepuffer bzw. 3 M Natriumacetat (NaAc) und 2-3 Vol eiskaltem Ethanol abs. für mindestens 30 min bei -20 °C. Die gefällte DNA wurde 45 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, anschließend mit 50-100 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut 5-10 min zentrifugiert. Nach dem Trocknen in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) wurde die DNA in HPLC-Wasser gelöst.

2.2.3 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA mit Endonukleasen wurde unter den von den Enzymherstellern empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für Doppelrestriktionen wurde die Internetoption <http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html> der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) genutzt.

2.2.4 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-DNA-Extraktion

Für die Inaktivierung von Enzymen in Restriktionsansätzen wurde die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-DNA-Extraktionsmethode (PCI) angewendet. Der Ansatz wurde mit 1 Vol Phenol (gesättigt mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) überschichtet und 2-5 min invertiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 14000 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert bis sich zwei deutlich getrennte Phasen gebildet hatten. Die obere wässrige, DNA-haltige Phase wurde abgenommen und erneut mit 1 Vol Phenol versetzt. Die untere Phenol-Phase wurde mit 1 Vol TE-Puffer versetzt, um eventuelle DNA-Reste der Phenolphase zurückzugewinnen. Nach erfolgter Zentrifugation wurden beide wässrigen Phasen abgenommen und vereint. Um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurde dem Ansatz 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, die Proben 2-5 min invertiert und mit 14000 rpm bei RT zentrifugiert, bis sich erneut zwei deutlich unterscheidbare Phasen gebildet hatten. Dieser Schritt wurde ebenfalls zwei Mal durchgeführt. Die DNA aus der oberen wässrigen Phase wurde anschließend gefällt und gewaschen.

Für die Aufreinigung der Ngb und Cygb knock-out Vektoren nach der Linearisierung mit Not I wurde alternativ das „Phase Lock Gel™ (PLG, heavy)“ der Firma Eppendorf (Hamburg) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.5 Standard-PCR

Die PCR (Saiki et al., 1988) wurde in 50 µl Ansätzen mit 10-100 ng Matrizen-DNA, je 10 pmol der beiden Primer, 0,2 mM dNTP's und 2,5-5 U DNA-Polymerase in 1x PCR-Puffer durchgeführt. Unter Standardbedingungen wurde, nach einer 3 minütigen Denaturierung bei 94 °C, folgendes Programm verwendet:

Denaturierung:	95 °C	30 sec
Annealing:	55-65 °C	30 sec
Elongation:	72 °C	30 sec - 2 min

Die Probe durchlief 35-40 solcher Amplifikationzyklen in einem PTC 200-Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf) bzw. primus 96 advanced-Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen). Im Anschluss wurde ein zusätzlicher Elongationsschritt von 5-10 min bei 72°C durchgeführt um die Vollständigkeit der PCR-Produkte zu gewährleisten. Nach erfolgter Amplifikation wurden 5 µl der PCR-Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.6 „Long Template“ und „Proofreading“ PCR

Fragmente, die aufgrund ihrer Länge und der hieraus resultierenden Fehlerrate nicht durch die oben beschriebene PCR amplifiziert werden konnten, wurden mit Hilfe des „Expand Long Template PCR System“ der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) nach dem beiliegenden Protokoll vervielfältigt. Mit dessen Hilfe können Fragmente bis max. 22 kb amplifiziert werden, was durch den Einsatz eines Enzym-Mixes ermöglicht wird. Dieser enthält neben einer herkömmlichen Taq-Polymerase eine weitere hitzestabile DNA-Polymerase mit einer „proofreading“-Funktion.

„Proofreading“ bedeutet 3'→5' Exonuclease-Aktivität, welche die Reparatur von Fehleinbauten gewährleistet, die aufgrund der Länge der Amplifikate am 3'Ende akkumulieren und die weitere Polymerisierung verhindern würden. Die Vorbereitung des PCR-Ansatzes erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden Mastermix 1 mit 0,5 µg genomische bzw. 0,1 µg PAC DNA, je 10 pmol der beiden Primer und 0,5 mM dNTP's sowie Mastermix 2 mit 1xPuffer 2 und 3,75 U Polymerase-Mix in getrennten Gefäßen angesetzt und unmittelbar vor Beginn der PCR-Reaktion miteinander gemischt. Nach einleitender Denaturierung von 2 min bei 94 °C in einem PTC 200-Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf) bzw. primus 96 advanced-Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), durchlief der Ansatz folgende Zyklen:

Denaturierung:	94 °C	10 sec	
Annealing:	55-58 °C	30 sec	
Elongation:	68 °C	8 min	10x
	68 °C	8 min + 5 sec pro Zyklus	25x

Nach dem abschließenden Endfilling-Schritt für 7 min bei 68 °C wurden die Produkte auf 0,8 %igen Agarosegelen aufgetrennt.

Weiterhin wurde das „Proof-Start® PCR-System“ der Firma Qiagen (Hilden) zur Amplifikation langer PCR-Fragmente und der cDNA-Fragmente zur Klonierung in transgene Vektoren verwendet. Pro 50 µl Ansatzvolumen wurden ca. 1 µg genomische DNA bzw. 0,3 µg cDNA aus *Mus musculus*, 25 pmol beider Primer, 0,3 mM dNTP-Mix, 5 Units Qiagen™ Taq DNA-Polymerase in 1x Qiagen PCR-Puffer (enthält 1,5 mM MgCl₂) und 0,2 U „ProofStart“ DNA-Polymerase (verdünnt in 1x„ProofStart“ PCR-Puffer) in 1xQSolution eingesetzt.

Unter Standardbedingungen durchlief der Ansatz nach einem initiiierenden Aktivierungsschritt von 2 min bei 95°C die folgenden Amplifikationszyklen (nach Protokoll der Firma Qiagen):

Denaturierung:	94 °C	10 sec
Annealing:	55-61 °C	1 min
Elongation:	68 °C	1 min pro kb Amplifikatgröße

Nach 40 Zyklen und abschließendem Polymerisationsschritt in einem PTC 200-Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf) bzw. primus 96 advanced-Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), wurde die PCR beendet.

2.2.7 Kolonie PCR-Screening-Methode

Kolonien, die auf Amp-Agarplatten gewachsen waren, wurden in einem Schnellverfahren durch Kolonie-PCR auf die enthaltenen Plasmid-Konstrukte hin getestet. Dies macht insbesondere dann Sinn, wenn aufgrund des verwendeten Klonierungsvektors auf die „Blau-Weiß“-Selektion verzichtet werden muss, wie z.B. bei den transgenen- und knock-out-Vektoren. Hierfür wurden einzelne Klone mit einer sterilen Pipettenspitze von der Amp-Agarplatte gepickt und für 5 min in 10 µl HPLC-Wasser gelöst. Für die Kolonie-PCR wurde ein Mastermix mit je 10 pmol beider Vektor-Standard-Primer, 0,2 mM dNTPs und 2,5 Units Taq-Polymerase in 1xPCR-Puffer angesetzt. Jeweils 5 µl der Klon-Suspensionen wurden für einen PCR-Ansatz verwendet. Da die DNA-Matrize hierbei, im Gegensatz zu einem Standard PCR-

Protokoll, nicht frei vorliegt, muss der erste Denaturierungsschritt verlängert werden. Unter Standardbedingungen durchlief der Ansatz nach einer Denaturierung bei 95°C für 5 min das folgende Programm:

Denaturierung:	94 °C	1 min
Annealing:	55-60 °C	30 sec
Elongation:	72 °C	30 sec - 1 min

Nach 40 Zyklen und abschließendem 5 minütigen Elongationsschritt in einem PTC 200-Thermocycler® der Firma Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf) bzw. primus 96 advanced-Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) wurde die PCR beendet und mittels Agarosegel analysiert. Bei positiven Ergebnissen konnten die übrigen 5 µl der Klon-Suspensionen zum Animpfen entsprechender ÜN-Kulturen verwendet werden.

2.2.8 Aufreinigung der PCR-Produkte

War nur ein PCR-Produkt auf dem Gel zu sehen, so wurde der Rest der Probe mit dem „Concert Rapid PCR Purification Kit“ der Firma Gibco BRL Life Technologies GmbH bzw. „E.Z.N.A Cycle Pure Kit“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) nach dem beiliegenden Protokoll für die Sequenzierung bzw. Klonierung aufgereinigt. Bei mehreren Produkten wurden die einzelnen Banden aus einem präparativen Agarosegel herausgeschnitten und mit dem „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) aufgereinigt. Allen oben erwähnten Kits liegt ein gemeinsames Prinzip zugrunde. Dabei wird die negativ geladene DNA an positiv geladene Silica-Säulchen gebunden.

2.2.9 Klonierung in Plasmidvektoren

Die Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten oder PCR-Amplifikaten erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook, 1989). Zur direkten Klonierung von PCR-Amplifikaten wurde das „pGEM-T®Easy Vector System“ der Firma Promega (Mannheim) in Kombination mit dem Bakterienstamm *E. coli* RRI ΔM15 (Rüther, 1982) bzw. DH10B (Calvin and Hanawalt, 1988) verwendet. Dem System liegt die Tatsache zugrunde, dass die zur Standard-PCR-Amplifikation verwendeten Taq-Polymerasen durch eine sog. terminale Transferase-Aktivität an beiden Enden des PCR-Produktes 3'-A-Überhänge synthetisieren. Entsprechend trägt das verwendete Plasmid 3'-T-Überhänge und ist darüber hinaus dephosphoryliert, was die Klonierungseffizienz zusätzlich positiv beeinflusst. Eine Selektion plasmidtragender Zellen ist nach der Transformation aufgrund der erworbenen plasmidkodierten Ampicillinresistenz leicht möglich. Die Identifizierung von Zellen mit rekombinanten Plasmiden erfolgt durch „Blau-Weiß“-Selektion auf der Basis der α -Komplementation des β -Galactosidase-Gens.

2.2.9.1 dA-tailing von PCR-Fragmenten

Da „Proofreading“-DNA-Polymerasen keine terminale Transferase-Aktivität aufweisen, musste im Fall einer Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pGEM-T®Easy ein sog. dA-tailing nachträglich durchgeführt werden. Hierzu wurden zu 0,5 µg des PCR-Fragments in Anwesenheit von 2 mM dATP sowie 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte der Ansatz ohne weitere Reinigungsschritte direkt für eine Ligation verwendet werden. Darüber hinaus konnten PCR-Produkte, die nach einer Gelaufreinigung Probleme bei der Ligation bereiteten, nach einem dA-tailig mit gesteigerter Effizienz kloniert werden.

2.2.9.2 Dephosphorylierung von Plasmidvektoren

Bei einer gerichteten Klonierung kann durch Dephosphorylierung der Vektorenden die Effizienz der Ligation von PCR-Produkten gesteigert und die Selbstligation des Vektors verhindert werden. Hierfür wurden unter Verwendung der „calf intestinal phosphatase“ (CIP) der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) die Phosphatreste am 5'Ende des geschnittenen Vektors entfernt. Die CIP-Behandlung des geschnittenen Vektors wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach erfolgter CIP-Behandlung wurde der Vektor durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (2.2.4) aufgereinigt.

2.2.10 Elektrokompente Bakterien und Elektroporation

Für die Herstellung von elektrokompenten Bakterien wurde eine 20 ml Übernacht-Kultur mit einem Einzelklon des *E.coli*-Stammes RRIΔM15 (Rüther, 1982) bzw. DH10B (Calvin and Hanawalt, 1988) in 500 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ 0,6-0,8 auf dem Schüttler GFL 3019 bebrütet. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (4000xg, 15 min, 4 °C) und zwei Mal mit eiskaltem A. bidest. gewaschen. Der dritte Waschschrift erfolgte mit eiskaltem A. bidest./10 % Glycerin. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 1-2 ml eiskaltem A. bidest./10 % Glycerin resuspendiert, in 50 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompenten Bakterien wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Transformation von *E.coli*-Bakterien des Stammes RRIΔM15 und des Stammes DH10B erfolgte durch Elektroporation (2500 Volt, 5 msec Impulsdauer) mit Hilfe des Easyject Prima Gerätes der Firma EQUIBIO. Anschließend wurden die transformierten Zellen in 1 ml sterilem L-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C bebrütet. Je Ansatz wurden 100 bzw. 200 µl auf eine XGal/IPTG/Amp- oder Amp-Agarplatte ausplattiert.

Der Wechsel des Bakterienstammes von RRIΔM15 auf den endonukleasefreien *E.coli*-Stamm DH10B wurde notwendig als die Plasmid-Präparationen vom „Concert Rapid Plasmid Preparation Kit“ der Firma Gibco BRL Life Technologies GmbH auf ein ähnliches Produkt der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) umgestellt wurden. Das „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ gewährleistet im Gegensatz zum ersten Kit keine vollständige Entfernung der endogen vom Bakterienstamm RRIΔM15 produzierten Endonukleasen, was zur Degradierung der Plasmide führen kann.

2.3 DNA Präparation

2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *Mus musculus*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schmidt et al. (1980). Dafür wurden jeweils 1-5 g Maus-Gewebe (Leber) in einen Potter überführt und pro 1 Gramm Gewebe 2 ml Homogenisierungspuffer (eiskalt) hinzugefügt. Nach Zugabe von 0,1 Vol 10 % Triton-X-100 wurde unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine Gaze filtriert, die mit 0,5 Vol Homogenisierungspuffer nachgespült wurde. Nach Zentrifugation des Filtrats für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Sediment in Homogenisierungspuffer resuspendiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde noch zweimal durchgeführt. Das Pellet wurde in 0,1 Vol des Ausgangsvolumens des Homogenisierungspuffers resuspendiert. Nach Zugabe von einer Spatelspitze Proteinase K, 0,1 Vol 10 % SDS und 0,1 Vol 10x Dialysepuffer wurde das Gemisch invertiert 1-2 Stunden bei 60 °C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nachdem 0,1 Vol gesättigtes Tris pH 8,5 und 0,25 Vol 5 M NaClO₄ hinzugefügt und der Ansatz invertiert wurde, folgte die Zugabe von 1 Vol Phenol/Chloroform. Das Gemisch wurde 5 min invertiert und 10 min bei 5000 rpm und 20 °C (RT) zentrifugiert. Diese Extraktion wurde viermal wiederholt, wobei jedes Mal die untere Phenol-Phase entfernt und frisches Phenol/Chloroform-Gemisch hinzugegeben wurde. Abschließend wurde die obere wässrige Phase ohne Interphasematerial abgehoben und in neues Zentrifugenglas überführt. Es folgte eine zweimalige Extraktion mit Chloroform, wobei jedes Mal nach der anschließenden Zentrifugation die obere wässrige Phase abgehoben und in ein neues Falcon-Gefäß überführt wurde. Der Überstand wurde mit 2 Vol eiskaltem Ethanol absolut (-20 °C) überschichtet. Die DNA wurde dann auf einem Glasstab aufgewickelt, in 70 % Ethanol gewaschen, kurz angetrocknet und in 200 µl -1 ml A. bidest. abgespült und gelöst. Wenn die DNA nicht in ausreichendem Maß gewickelt werden konnte, wurde sie aus der wässrigen Phase gefällt (2.2.2).

2.3.2 Plasmidisolierung nach der „TELT-Schnellmethode“

Entsprechende Kolonien wurden in 3 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Kultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 30 sec bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl TELT-Puffer resuspendiert und mit gleichem Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach 15 sec vortexen und einem Zentrifugationsschritt für 2 min bei 14000 rpm wurde die obere wässrige DNA-Phase abgenommen und mit 250 µl EtOH abs. versetzt. Nach kurzem Invertieren und einem 5-10 minütigen Inkubationsschritt bei -20 °C wurde erneut für mindestens 10 min zentrifugiert, das Pellet mit 70 %igem EtOH gewaschen, 2 min zentrifugiert und nach dem Trocknen in 20 µl A. bidest. gelöst. Für einen Restriktionsverdau wurden 5 µl verwendet.

2.3.3 Minipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem „Concert Rapid Plasmid Preparation Kit“ der Firma Gibco BRL Life Technologies GmbH sowie mit dem „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH Biotechnologie GmbH (Erlangen), nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Das Prinzip beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979).

2.3.4 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers gewonnen. Das Isolierungsprinzip basiert wie im Abschnitt 2.3.3 auf der alkalischen Lyse nach Birnboim and Doly (1979). Durch dieses Verfahren kann die Plasmid-DNA in größeren Mengen und höherer Qualität isoliert werden. Der „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ ermöglicht es, die Plasmid DNA aus *E.coli*-Stämmen ohne störende Endotoxine zu isolieren. Diese können bei der Transfektion eukaryotischer Zellen eine nicht kalkulierbare Fehlerquelle darstellen (Weber et al., 1995). Dabei wurden die knock out-Plasmide als sog. „low copy“ Plasmide eingestuft und die ÜN-Kulturen entsprechend angesetzt, um die maximale Ausbeute zu erzielen.

Die Plasmid-DNA wurde vor der Durchführung der Maxipräparation in den *E.coli*-Stamm DH10B retransformiert und auf einer selektiven Amp-Agarplatte ausplattiert. Aus selektierten Klonen wurde zur Überprüfung zunächst eine Plasmid-DNA-Minipräparation angefertigt und mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Erst wenn die Testrestriktion positiv ausfiel wurde nach Angaben des Herstellers das Maxipräparationsprotokoll durchgeführt.

2.3.5 Präparation der knock out-Plasmide

Da die Herstellung der knock-out Mäuse in Kooperation mit der AG Sendtner in Würzburg geschah, sollen hier die in Mainz durchgeführten Schritte aufgeführt werden:

- o Klonierung des ko-Vektors
- o Endotoxinfreie Maxi-Plasmid-Präparation (2.3.5)
- o Linearisierung des ko-Vektors mit *Not I*
- o Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion des Vektors (2.2.4)
- o Fällung des Vektors mit 3 M NaAc (2.2.2)
- o 2x 25 µg in HPLC-Wasser gelöster, linearisierter ko-Vektor wurden schließlich nach Würzburg geschickt (Konzentration 0,5-1 µg/µl)

Die Elektroporation der ES-Zellen sowie sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden in Würzburg durchgeführt. Die G-418-Selektion wurde 24h nach der Elektroporation eingeleitet und hielt ca. 6-7 Tage an. Danach wurden die Zellen auf 96er well-Platten vereinzelt und weitere 3 Tage bebrütet. Anschließend mussten die Zellen gesplittet werden, damit ein Teil für die PCR-Tests verwendet werden konnte und der andere für den weiteren Versuchsablauf zur Verfügung stand. Die Zellen für die PCR-

Genotypisierung wurden 3 Tage weiterkultiviert, bevor sie abzentrifugiert, in Wasser gelöst und mit Proteinase K (50 °C über Nacht) behandelt wurden. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch eine Inkubation bei 95 °C für 10-15 min.

Diese ES-Zell-Lysate wurden auf Trockeneis nach Mainz geschickt und jeweils 5-8 µl der Zell-Lysate per PCR-Genotypisierungstest untersucht.

Wurden dabei eventuelle positive Klone identifiziert, wurden in Würzburg die entsprechenden Zell-Klone aufgetaut und für eine DNA-Präparation weiterkultiviert. In Lysispuffer gelöste ES-Zellpellets wurden auf Trockeneis nach Mainz geschickt.

Die genomische ES-Zell-DNA wurde mittels PCI-Methode (2.3.1) extrahiert, wobei eine Homogenisierung nicht erforderlich war und die Lyse durch Zugabe von Proteinase K (20 mg/ml; 50 µl/ 1 ml Lysispuffer) und RNase A (10 mg/ml; 50 µl/ 1 ml Lysispuffer) direkt eingeleitet werden konnte. Die präparierte ES-Zell-DNA wurde für den Southern-Nachweis verwendet.

2.4 RNA-Präparation

Die RNA-Isolierung aus Maus-Geweben erfolgte nach der GITC-Methode (Sambrook, 1989). Die Homogenisierung der Gewebe wurde je nach Art und Menge der Probe individuell entschieden. Größere Gewebe-Mengen, z.B. Maus-Leber, wurden mit Hilfe von Mörser und Pistill unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff zunächst zu Pulver verarbeitet. Anschließend wurden die pulverisierten Gewebe in ein Eppendorf-Gefäß überführt, gewogen und mit entsprechender Menge Denaturierungslösung mit einem Eppendorf-Potter homogenisiert. Ebenfalls für größere Gewebe-Mengen sowie für Herz- und Skelettmuskel-Proben geeignet ist ein Glaspotter mit einem Metallstab, der in ein Rührwerk RZR0/RZR1-Gerät der Firma Heidolph eingespannt wurde und bei definierter Umdrehungszahl die Gewebe, unter Eiskühlung von außen mechanisch homogenisierte. Hierfür mussten die Gewebe vorher gewogen und mit entsprechender Menge Denaturierungspuffer versetzt werden. Wegen der begrenzten Mengen mancher Proben wurden diese direkt im Eppendorf-Gefäß gewogen, mit Denaturierungspuffer versetzt und mit einem Eppendorf-Potter auf Eis homogenisiert.

Pro 100 mg Gewebe wurde 1 ml Denaturierungslösung zugesetzt. Nachdem das Gewebe vollständig homogenisiert war, wurde es in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit 1/10 Vol 2 M Natriumacetat (NaAc), pH 4 versetzt und invertiert. Das Homogenat wurde anschließend mit 1 Vol wassergesättigtem Phenol versetzt und 3-5 min invertiert. Anschließend wurde 1/5 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) dazugegeben und wiederholt invertiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis (4 °C) für 15 min und eine 30 minütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C. Für jede weitere Extraktion wurde die obere wässrige Phase in einem neuen Gefäß wiederholt mit 1/10 Vol 2 M NaAc, 1 Vol Phenol und 1/5 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) versetzt, 3-5 min invertiert, 15 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert. Die Extraktionen wurden so oft durchgeführt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Anschließend wurde die obere wässrige Phase ein bis zwei Mal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, um Phenol-Rückstände zu entfernen. Danach wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1 Vol Isopropanol versetzt, 30 min bei -20 °C inkubiert und im Anschluss entweder 1 h bei 5000 rpm oder 30 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 1/3 Vol Denaturierungslösung resuspendiert wurde, erfolgte eine zweite Fällung mit entsprechendem Volumen Isopropanol. Anschließend wurde das Pellet mit 1 Vol 75 %igem Ethanol durch schwenken gewaschen, 5 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in 100-200 µl DEPC-Wasser gelöst.

Alternativ wurde zur RNA-Isolierung das „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Präparationen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei zur RNA-Präparation aus Maus Gehirn und Leber das Standard-Protokoll angewendet wurde, während zur Isolierung von RNA aus Herz und Muskel die Erweiterung „RNeasy Mini Protocol for Isolation of total RNA from Heart, Muscle, and Skin Tissue“ befolgt wurde.

Die RNA-Präparation aus murinen embryonalen Stammzellen wurde nach dem „Trizol® Reagent“ Protokoll der Firma Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt, da die ES-Zellen bereits in Würzburg mit der Trizol-Lösung versetzt und auf Trockeneis nach Mainz geschickt wurden.

2.4.1 DNase-Verdau nach der Präparation der RNA

Für einen DNase-Verdau der isolierten RNAs wurde die „Desoxyribonuclease I“ (RNase-free) der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) nach der beiliegenden Anleitung verwendet. Eingesetzt wurde jeweils 1 µg gesamt-RNA und 1 U DNase. Die Ansätze wurden zunächst für 30 min bei 37 °C und nach Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA noch mal für 10 min bei 65 °C im primus 96 advanced-Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) inkubiert.

2.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA

Die Konzentration einer DNA- bzw. RNA-Lösung wurde durch die Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt. Die Extinktion wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ (E =Extinktion; ϵ =Extinktionskoeffizient, der für DNA 47 µg/µl und für RNA 40 µg/µl beträgt; c =Konzentration, d =Schichtdicke der Küvette, entspricht 1 cm) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in die Konzentration umgerechnet: $c = E / \epsilon \cdot d$.

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

2.6 Reverse Transkription und RACE

Zur Herstellung von cDNA wurden je nach Verfügbarkeit 0,5-2,5 µg der präparierten gesamt-RNA eingesetzt. Die reverse Transkription wurde unter Verwendung des „Superscript™II Reverse Transcriptase“ Kits der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nicht im Kit enthalten ist der Oligo(dT)12-18 Primer, von dem 1 µl in einer Konzentration von 500 µg/ml für die Reaktion eingesetzt wurde. Die Inkubationen wurden im primus 96 advanced-Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) durchgeführt. Für die quantitative Realtime RT-PCR wurden die cDNAs nach Abschluss der reversen Transkription 1:1 mit HPLC-Wasser verdünnt.

Rapid amplification of cDNA ends (RACE) wurde unter Verwendung des „Gene Racer™“ Kits Version F092001 der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente 1 µg der gesamt-RNA. Nach Dephosphorylierung, Entfernen der Cap-Struktur und dem Annealing eines RNA-Oligos an das 5' Ende, sowie anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion (alle Reagenzien sind im o.g. Kit enthalten), wurde die mRNA mit Hilfe des „Gene Racer Superscript™II Module“ (Invitrogen, Karlsruhe), in cDNA umgeschrieben.

Die Amplifikation der 5'- und 3'-Enden wurde mit Hilfe des „AccuPrime™Taq DNA Polymerase Systems“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach der beiliegenden Anleitung durchgeführt.

2.7 Konzentrationsbestimmung der cDNA mit Hilfe von „PicoGreen“

Eine optische Messung der RNA-Konzentration, die im späteren Versuchsablauf für quantitative Realtime RT-PCR-Analysen verwendet werden soll, beschränkt sich praktisch auf die rRNA und setzt voraus, dass immer vergleichbare Mengen mRNA darin enthalten sind. Weiterhin können Verunreinigungen z.B. aromatische Verbindungen die OD-Messung verfälschen. Nicht zuletzt können bei der reversen Transkription Schwankungen in der Effizienz auftreten. Um diese Fehlerquellen zu umgehen wurden die Konzentrationen der cDNA vor der Durchführung der quantitativen Real Time PCR bestimmt. Das Prinzip der „PicoGreen“-Messung beruht auf einer Interaktion des Farbstoffes mit den DNA-Doppelsträngen bzw. DNA-RNA-Hybriden. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur DNA-Konzentration zu. Im Gegensatz zu Ethidiumbromid, das zwischen die Basen in DNA-DNA-, DNA-RNA- aber auch RNA-RNA-Doppelsträngen interkaliert, kann der Fluoreszenzfarbstoff „PicoGreen“ keine Wechselwirkungen mit RNA-RNA-Hybriden eingehen (Chadwick et al., 1996). Für die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des „PicoGreen®dsDNA Quantitation Reagent“ der Firma Invitrogen (Molecular Probes, Karlsruhe) wurde die cDNA zunächst 1:30 in 1x TE-Puffer verdünnt. Die PicoGreen-Stammlösung (-20 °C) wurde vor jeder Messung in benötigter Menge frisch 1:200 in 1x TE-Puffer verdünnt. Anschließend wurden je 30 µl zu den cDNA-Verdünnungen dazupipettiert, die Ansätze kurz gevortext und in 100 µl Küvetten der Firma Wheaton (USA) überführt. Es schloss sich eine 10-15 minütige Inkubation im Dunkeln an. Anschließend konnte die Konzentration bei einer Wellenlänge von 520 nm im Spektrofluorometer TBS-380 der Firma Turner BioSystems gemessen und durch den Vergleich mit einer Standardreihe bestimmt werden.

2.8 Quantitative Realtime RT-PCR

Die quantitative Realtime RT-PCR (Realtime Q-PCR) stellt eine modifizierte Version der oben beschriebenen Polymerase Kettenreaktion dar (siehe 2.2.5), bei der alle entstehenden Amplifikate mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes detektiert wurden. Die Fluoreszenz stieg dabei proportional zur Anzahl der Amplifikate an und wurde durch ein spezielles Detektionssystem gemessen und graphisch dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „ABI PRISM®7000 Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) sowie die dazugehörige Software verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten cDNAs, die durch reverse Transkription (2.6) aus je 0,5 µg gesamt-RNA hergestellt wurden. Die Konzentrationen der cDNA wurden mit Hilfe des PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent“ bestimmt.

2.8.1 Durchführung der Realtime Q-PCR mit SYBR-Green

Ein Großteil der durchgeführten Realtime Q-PCR-Ansätze erfolgte mit dem „QuantiTect™SYBR®Green PCR Kit“ der Firma Qiagen. Alternativ wurde der kostengünstigere „ABsolute SYBR Green ROX Mix“ der Firma ABgene eingesetzt, da die erzielten Ergebnisse dem o.g. Kit der Firma Qiagen entsprachen. Die Methode beruht auf der Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I in die große Furche doppelsträngiger DNA zu interkalieren (Morrison et al., 1998). Dadurch entsteht detektierbare Fluoreszenz (530 nm), die proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte ansteigt. Da dieser Farbstoff sich jedoch unspezifisch in jede doppelsträngige DNA einlagert, musste nach der PCR anhand einer Dissoziationskurve überprüft werden, ob wirklich nur das spezifische Amplifikat detektiert wurde (Ririe et al., 1997). Hierbei wurden die Proben nach der Realtime Q-PCR einer steigenden Temperatur ausgesetzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Erschien in der Dissoziationskurve mehr als ein peak, so könnte es sich um Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikate handeln, die aufgrund unterschiedlicher Fragmentlängen und GC-Gehalte einen anderen Schmelzpunkt aufweisen als das spezifische Amplifikat. In einem solchen Fall wurde die Detektionstemperatur entsprechend angepasst.

Um Schwankungen zwischen den verschiedenen Ansätzen durch Pipettierfehler zu minimieren, wurden die einzelnen Komponenten zu großvolumigen Mastermixes addiert. Außerdem wurde stets gründlich gevortext und abzentrifugiert.

Folgender Ansatz wurde für die SYBR Green-Realtime Q-PCR verwendet:

10 µl	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2,5 mM MgCl ₂)
bzw.	2x ABsolute SYBR Green ROX Mix
0,38 µl	Primer Q-PCR-for (10 mM)
0,38 µl	Primer Q-PCR-rev (10 mM)
7,24 µl	HPLC-Wasser

Anschließend wurden entweder 36 µl oder 54 µl des Mastermix zu je 4 µl bzw. 6 µl der 1:1 mit Wasser verdünnten cDNAs (10pg-100ng) pipettiert, so dass doppelte bzw. dreifache Ansätze entstanden. Von denen wurden nach wiederholtem vortexen je 18,5 µl auf die wells einer optischen 96-well-Platte der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) pipettiert. Die 96-well-Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie versiegelt, kurz abzentrifugiert und in das Gerät gestellt. Nach einem 15 minütigen

Initiationsschritt bei 95 °C, schlossen sich folgende 40 Zyklen an:

Denaturierung:	94 °C 15 sec
Annealing:	56 °C 30 sec
Elongation:	72 °C 30 sec
Detektion (optional):	75 °C 30 sec

2.8.2 Durchführung der Realtime Q-PCR mit einer „TaqMan“-Sonde

Diese Methode beruht auf dem Prinzip des „5′Nuclease-Assays“ bzw. „TaqMan®-Assays“ (Livak et al., 1995). Hierbei wird eine zwischen den PCR-Primern lokalisierte genspezifische fluorogene „TaqMan“-Sonde verwendet, die direkt an einzelsträngige DNA bindet. Die Bindung zwischen der Sonde und dem spezifischen Bereich der Einzelstrang-DNA wurde durch ein an den N-Terminus der Sonde gebundenes DPI3 (dihydrocytopyrroloindol-Tripeptid) stabilisiert, das sich in die kleine Furche der DNA einlagerte (minor groove binder, MGB) (Kutyavin et al., 2000). Durch dieses angehängte DPI3 konnte die MGB-Sonde im Gegensatz zur herkömmlichen „TaqMan“-Sonde (etwa 30 Basen) aus noch weniger Nukleotiden (18-20 Basen) generiert werden, was eine noch höhere Spezifität gewährt. Die Sonde besaß an ihrem 5′Ende einen Reporterfarbstoff (z.B. die Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM oder VIC) sowie an ihrem 3′Ende einen „Dark Quencher“. Wurde der Reporterfarbstoff der intakten Sonde durch Licht zur Fluoreszenz angeregt, so adsorbierte der „Dark Quencher“ wegen seiner räumlichen Nähe diese Fluoreszenz. Dieser, als „Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (FRET) bezeichnete Vorgang, bewirkte die Übertragung der Energie auf den Quencher, der diese als Wärme und nicht als Fluoreszenz abgab. Während der Replikation wurde die an die Einzelstrang-DNA gebundene Sonde durch die doppelstrang-spezifische (Heid et al., 1996) 5′-3′-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* abgebaut, so dass der „Dark Quencher“ vom Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM bzw. VIC separiert wurde. Bei der Anregung des Farbstoffs wurde nun Licht emittiert, welches detektiert werden konnte. Die Realtime Q-PCR wurde mit dem „QuantiTect™Probe PCR Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt.

Ansatz der Proben für die „TaqMan“-Realtime Q-PCR:

10 µl	2 x QuantiTect Probe PCR Master Mix
0,38 µl	Primer Ngb-for (10 mM)
0,38 µl	Primer Ngb-rev (10 mM)
0,4 µl	Sonde (10 mM)
6,84 µl	HPLC-Wasser

Wie bereits unter 2.8.1 beschrieben erfolgte die Verteilung des Mastermix auf die cDNAs und anschließend auf die 96-well-Platte. Im „ABI PRISM®7000 Sequenz Detection System“ durchliefen die Proben nach einem Aktivierungsschritt für 15 min bei 95 °C folgende 40 Zyklen:

Denaturierung:	94 °C 15 sec
Annealing und Elongation:	60 °C 1 min

2.8.3 Auswertung der Q-PCR anhand von Standardplasmiden

Die Verwendung von Standardplasmiden war notwendig, um die Effizienzen der RT-PCR-Läufe vom Ziel- und Haushaltsgen unter den angewendeten Bedingungen zu überprüfen. Die Effizienzen der quantitativen Realtime Q-PCR mussten identische Werte aufweisen, um eine relative Quantifizierung der Zielgen-mRNA mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchführen zu können. Um einschätzen zu können, wie viele Kopien der erstellten Standardplasmide in den jeweiligen Q-PCR-Ansätzen eingesetzt wurden, erfolgte eine Berechnung der Kopien pro μl . Hierbei wurde zunächst der DNA-Gehalt über die Messung der optischen Dichte ($1\text{OD}_{260} = 50\mu\text{g/ml DNA}$) bestimmt. Aus der bekannten Größe des Plasmids (ca. 3115 bp inklusive Insert) konnte die molare Konzentration berechnet werden, wobei das Molekulargewicht eines Basenpaares näherungsweise als 660 g/mol angenommen wurde. Über die Avogadro-Konstante ($6,022 \times 10^{23}$ Moleküle pro Mol) konnte nun die absolute Molekülzahl berechnet werden.

$$\text{DNA [mol]} = \text{Masse [g]} / 660 \text{ [g/mol]} \times \text{bp}$$

$$\text{Molekülzahl} = \text{DNA [mol]} \times N_A$$

Um die Effizienz der PCR-Läufe mit diesen Plasmid-Matrizen, den verwendeten Primern und den angewendeten Bedingungen zu überprüfen, wurden von den Plasmidisolaten 10-fach Verdünnungsreihen angefertigt und Q-PCR-Ansätze mit je 2 μl der Verdünnungen als Template durchgeführt.

Die Programmooption: „Standard curve“ der ABI PRISM®7000 SDS Software ermöglichte die Erstellung einer Standardkurve anhand der eingesetzten Plasmidverdünnungen. Die in folgender Abbildung dargestellte Standardkurve ergibt sich aus Q-PCR-Läufen mit Standardplasmiden der Verdünnungen 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 . Die Abszisse bezeichnet den log der eingesetzten Molekülzahl, die Ordinate den C_t -Wert, d.h. die Zyklenanzahl bei der die Fluoreszenz der entstehenden PCR-Produkte einen zuvor gesetzten Schwellenwert übertrat und detektiert wurde.

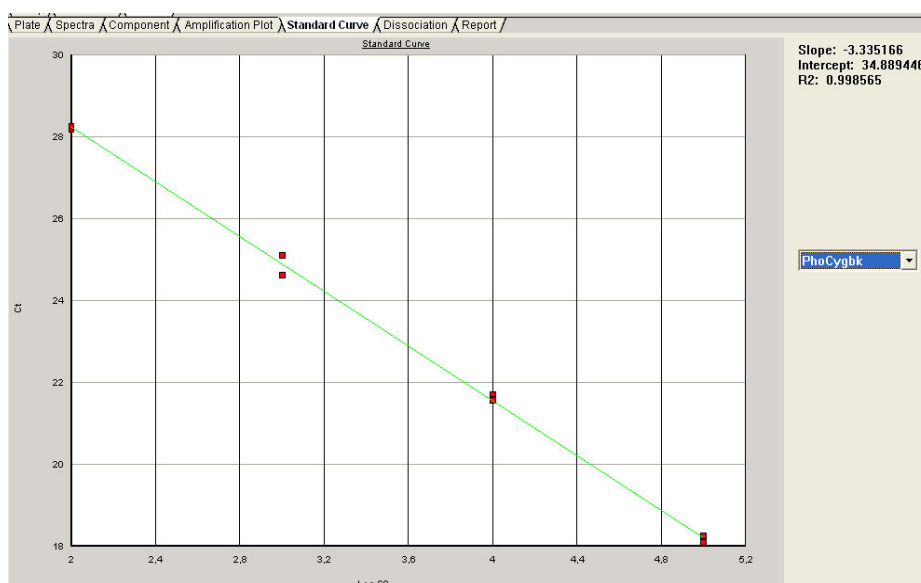


Abbildung 2-1 Die Realtime Q-PCR Standardkurve ergibt sich aus Q-PCR-Läufen mit Cygb-Standardplasmiden der Verdünnungen 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 . Die Abszisse bezeichnet den log der eingesetzten Molekülzahl, die Ordinate den C_t -Wert.

Die Steigung einer optimalen Standardkurve, die mit Hilfe einer seriellen 10-fach-Verdünnungsreihe erstellt wurde, liegt zwischen -3,32 (100 %ige Effizienz) und -3,4. Somit konnte im oben abgebildeten Fall von einer nahezu 100%igen Effizienz der Q-PCR ausgegangen werden, das bedeutet, dass bei jedem Zyklus eine Verdopplung der Template-DNA stattfand.

2.8.3.1 Relative Quantifizierung - $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ist eine Möglichkeit, die relativen Unterschiede von mRNA-Konzentrationen eines Zielgens in unterschiedlichen Geweben festzustellen. Hierzu waren pro Gewebe zwei parallele Realtime Q-PCR-Ansätze mit derselben cDNA als Martize erforderlich: eine Q-PCR mit einem Haushaltsgen und eine mit dem Zielgen. Um $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Berechnungen anstellen zu können, mussten beide Q-PCR-Reaktionen eine vergleichbare Effizienz aufweisen. Bei jeder Berechnung wurden zwei Gewebeproben miteinander verglichen. Dabei diente eine als Kalibrator- und die andere als Zielgewebe. Aus der Berechnung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes ergab sich ein „Multiplikator der Genexpression“, der besagte, um wie viel mehr (oder weniger) die mRNA des Zielgens in dem Zielgewebe, verglichen mit dem Kalibratorgewebe, vorlag.

Die Berechnung dieses Multiplikatorwertes ergab sich aus folgender Formel:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{Zielgewebe Zg}} - \text{Ct}_{\text{Zielgewebe Hg}}) - (\text{Ct}_{\text{Kalibratorgewebe Zg}} - \text{Ct}_{\text{Kalibratorgewebe Hg}})$$

Aus $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ ergibt sich der Multiplikator

(Zg = Zielgen; Hg = Haushaltsgen)

2.8.3.2 Relative Quantifizierung - Standardkurvenmethode

Unterschieden sich die PCR-Effizienzen der endogenen Kontrolle und des Zielgens zu sehr, konnte die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nicht angewendet werden. In diesem Fall wurde die Standardkurvenmethode zur Detektion der Expressionsunterschiede des Zielgens herangezogen. Auf Grundlage der Standardkurve wurde die cDNA-Menge in den Proben bestimmt und für die Berechnungen anhand folgender Formel verwendet:

$$\text{Faktor der Regulation} = \frac{\text{cDNA-Menge}_{\text{Zielgewebe Zg}} / \text{cDNA-Menge}_{\text{Zielgewebe Hg}}}{\text{cDNA-Menge}_{\text{Kalibratorgewebe Zg}} / \text{cDNA}_{\text{Kalibratorgewebe Hg}}}$$

(Zg = Zielgen; Hg = Haushaltsgen)

2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der auf dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese beruhenden Methode von Sanger (1977), modifiziert durch Prober (1987), Carothers (1989) und Lee (1992). Als Matrize für die Sequenzierung dienten entweder doppelsträngige Plasmid-DNA (300-500 ng) oder aufgereinigte PCR-Produkte (20-100 ng) in einem 20 µl bzw. 10 µl Endvolumen umfassenden Ansatz mit 10 pmol des verwendeten Primers. Die Sequenzierung erfolgte durch „cycle sequencing“ unter Einsatz fluoreszenzmarkierter Terminatoren. Verwendet wurde der „ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ Version 2.0 bzw. 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers unter Einsatz von 2-4 µl Reaktionsgemisch (Version 2.0) bzw. 1 µl Reaktionsgemisch („Premix“) und 2 µl 5x Sequenzierpuffer (Version 3.1) pro Sequenzierungsansatz. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach einem Zwei-Schritt-Protokoll im PTC 200-Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik GmbH (Hess. Oldendorf) bzw. primus 96 advanced- Thermocycler der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) und umfasste 30-35 Zyklen.

Denaturierung: 96 °C 15 sec

Annealing und Synthese: 55 °C 3-4 min

Die Sequenzierungsansätze mit der „BigDye“ Version 3.1 wurden anschließend mit 0,022 % SDS behandelt um die Ausbildung der so genannten Dye-Blobs zu unterbinden, die aus den nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotiden entstehen. Diese würden in den Kapillaren den Sequenzen vorauslaufen und aufgrund ihrer starken Fluoreszenz die Detektion der kleinen Sequenzierungsprodukte verhindern. Die Inkubation erfolgte ebenfalls im Thermocycler, zunächst für 5 min bei 98 °C und anschließend für 10 min bei 25 °C. Die Aufreinigung dieser Proben für den Kapillar-Sequenzierer wurde von der Firma Genterprise (Mainz) übernommen und erfolgte im 96er Format über mit Sephadex™ (G-50, Fine DNA Grade, Amersham Pharmacia) gefüllte Säulen (Multi Screen Filtration System, Milipore).

Die Aufreinigung einzelner Sequenzierungsproben, die mit dem „BigDye“ Version 2.0 angesetzt wurden, erfolgte durch Fällung mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (NaAc), pH 5,2 und 50 µl EtOH abs. und einer Inkubation von 30 min bei -20 °C. Nach einer 45 min Zentrifugation wurde das Pellet mit 100 µl 70 % EtOH gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und die automatische Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgten entweder auf 5 %igen Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff mit den Sequenzierautomaten „373 stretch“ und „PRISM™ 377“ der Firma PE Biosystems (Weiterstadt) oder auf dem 96 Kapillar-Sequencer ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Darmstadt).

2.10 Computerunterstützte Analyse der Sequenzdaten

Die Computerunterstützte Analyse der Sequenzdaten wurde zum Teil mit Hilfe der 377-Software für Apple Macintosh-Computer (ABI, Weiterstadt) bzw. mit dem Programm Chromas (Firma Technolysium Pty Ltd) sowie der „Lasergene Sequence Analysis Software“ (DNASTAR Inc., USA) durchgeführt. Zur Erstellung von Alignments diente die Programmoption SEQMAN (DNASTAR Inc., USA). Die Restriktionsschnittstellen-Analysen wurden mit dem Lasergene-Programm MAPDRAW durchgeführt.

Datenbanksuchen wurden mit den Algorithmen BLASTN, BLASTX und FASTA (Altschul et al., 1990) über das World Wide Web am „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, Bethesda, USA; www.ncbi.nih.nlm.gov) durchgeführt.

Für die komparative Sequenzanalyse und für die Konstruktion der ko-Vektoren mussten die repetitiven Elemente identifiziert und maskiert werden, was mit der WWW-Version des Programms Repeatmasker2 (<http://ftp.genome.washington.edu>) bewerkstelligt wurde.

Mit dem Programm PIPMAKER (<http://bio.cse.psu.edu/pipmaker>) wurde ein Percent Identity Plot (PIP) erstellt, der die Sequenzvergleiche zwischen Mensch, Maus und Ratte graphisch darstellt.

Die Vorhersage von möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren erfolgte mit Hilfe der WWW-Option rVISTA (<http://rvista.dcode.org/>; (Loots et al., 2002). Hierfür wurde entweder das lokale Alignment genomischer Mensch- und Maus-Ngb-Sequenzbereiche aus den PIPMAKER Daten verwendet oder alternativ ein globales Alignment mit der mVISTA-Option (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>) erstellt. Anschließend durchsuchte das Programm rVISTA die Sequenzen sowohl einzeln wie auch in konservierten Bereichen der Alignments nach Erkennungsmotiven für Transkriptionfaktoren. Die Suche basierte auf der TRANSFAC-Datenbank (<http://www.gene-regulation.com/>), (Wingender et al., 2000), konnte jedoch durch eigene Sequenzmotive ergänzt werden. Dabei wurden die Parameter „core similarity“ 0,9 und „matrix similarity“ 0,85 gewählt. Kurze Sequenzbereiche aus dem 5'- und 3'-Bereich der Gene wurden mit dem Programm TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/teess/>), dem ebenfalls die TRANSFAC-Datenbank zugrunde liegt, analysiert und vervollständigt. Die o.g. Parameter wurden beibehalten.

Die Suche nach dem neuronenspezifischen Transkriptionsfaktor NRSE (neuron-restrictive silencer element) wurde mit der WWW-Programmooption MSCAN (<http://tfscan.cgb.ki.se/cgi-bin/MSCAN>) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst aus der Literatur bekannte NRSE-Sequenzmotive zu einer „position weight matrix“ zusammengestellt. Diese wurde anschließend zur Analyse der menschlichen und murinen Ngb-Gensequenzen verwendet.

2.11 Präparation muriner Gewebe und Herstellung von Gewebeschnitten für mRNA-*in situ*-Hybridisierungen und Immunohistochemie

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden zum einen frische Maus- bzw. Ratte-Gewebe verwendet, von denen an einem Cryostat der Firma Leica bei -20 °C Gefrierschnitte von 7-12 µm Dicke angefertigt wurden. Die frischen Gewebe wurden aus Tieren präpariert nachdem diese durch Begasung mit Kohlendioxid und zusätzliche Überstreckung des Rückgrats getötet wurden. Die Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme auf ein teflonbeschichtetes Kupferstück gelegt und auf Trockeneis aufgefroren. Die auf den Kupferstücken eingefrorenen Gewebe wurden in Petrischalen mit Parafilm luftdicht verschlossen und bis zum Schneiden bei -80 °C gelagert. Zum anderen wurden aus perfundierten Maus- bzw. Ratte-Geweben an einem Gefriermikrotom Typ Frigomobil der Firma Reichert Jung (Nußloch) 40 µm dicke Schnitte angefertigt. Der Vorteil dieser Methode liegt zum einen darin, dass die Gewebe noch innerhalb des Organismus fixiert werden, zum anderen sind Schnitte dieser Dicke sehr stabil und als Schwimmschnitte für Antikörperinkubationen viel besser zugänglich. Die Tiere wurden hierzu mit einer Äther-Überdosis getötet und direkt im Anschluss über den linken Herzventrikel zunächst mit 100 ml heparinhaltiger Vorspüllösung, danach mit 200-300 ml eiskalter Paraformaldehyd-Lysin-Periodat (PLP)-Lösung nach McLean (1974) mit einer konstanten Rate von 10 ml/min perfundiert. Das rechte Atrium wurde durch einen Schnitt geöffnet, um das Abfließen der Lösungen zu ermöglichen. Die Organe wurden entnommen, für mind. 1 h in der PLP-Lösung nachfixiert und danach in 30 % Zucker (in PBS) bei 4 °C bis zum Schneiden aufbewahrt. Sollten die perfundierten Gewebe für längere Zeit aufbewahrt werden, so wurden sie entweder in PBS bei 4 °C gelagert oder geschnitten in 30 % Zucker bei -20 °C eingefroren.

2.11.1 Zuckerreihe für perfundierte Gewebe

Perfundiertes Gewebe darf nicht direkt aus dem PBS in 30 % Zucker überführt werden. Dies muss in mehreren Schritten erfolgen, um eine Zerstörung des Gewebes zu verhindern. Zunächst wurde das Gewebe in 10 % Zucker bei 4 °C gelagert, bis es auf den Boden des Gefäßes sank (ca. 30 min). Anschließend konnte es in 20 % Zucker überführt werden, wo es ebenfalls auf den Boden absinken musste, was je nach Größe des Gewebes bis zu mehreren Stunden dauerte. Erst danach konnte das Gewebe in 30 % Zucker über Nacht bei 4 °C gelagert werden.

2.12 Markierung der Sonden für Hybridisierungsversuche

2.12.1 Radioaktive DNA-Markierung

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte nach der von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1983) entwickelten Methode des „random primed oligo labeling“ mit Hilfe des entsprechenden Kits der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim). Die Methode beruht auf der enzymatischen Synthese eines DNA-Strangs unter Einbau von radioaktiv markierten dNTPs. Der Synthesestart wurde durch die Zugabe eines Hexanukleotid-Gemisches, das statistisch alle möglichen Primersequenzen abdeckt, eingeleitet. Eingesetzt wurden 50-500 ng gereinigter DNA und 35-50 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, wobei die nicht eingebauten Nukleotide durch anschließende Fällung entfernt wurden. Danach wurde der Markierungsansatz mit heterologer Carrier-DNA (Endkonzentration 25 $\mu\text{g/ml}$) versetzt und nach Hitzedenaturierung zur Hybridisierung verwendet.

2.12.2 RNA-Markierung durch Einbau von Digoxigenin-UTP

Die Markierung der RNA-Sonden mit Digoxigenin-UTP erfolgte durch *in vitro* Transkription mit SP6 und T7 RNA Polymerasen. DIG-UTP dient dabei als Substrat und wird in das Transkript eingebaut. Verwendet wurde der „DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)“ der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial für die Markierungsreaktion wurde 1 μg eines, die CDS des zu untersuchenden Gens enthaltenden, Plasmids (pGEM-T[®] easy) verwendet. Das Plasmid enthält Promotoren für die SP6 und T7 RNA-Polymerasen, von denen ausgehend, nach der Linearisierung der Template-DNA, mit Hilfe der RNA-Polymerasen so genannte „run off“-Transkripte erzeugt wurden. Alternativ wurden PCR-Produkte hergestellt, an deren Enden mit Hilfe von entsprechenden Primern entweder SP6 oder T7 Bindestellen synthetisiert wurden (SP6/T7for-Primer für die „sense“-, SP6/T7rev-Primer bei der „antisense“-Sonde). Es wurden immer „antisense“ und „sense“ RNA-Moleküle synthetisiert. Die ersteren sollten zur Detektion der mRNA im Gewebe dienen, während die „sense“-Sonden als negativ-Kontrollen dienen sollten.

2.12.2.1 Überprüfen der Markierungseffizienz

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde die in der Kit-Anleitung empfohlene direkte Detektionsmethode durchgeführt. Hierzu wurden auf einen schmalen Nylonmembranstreifen Verdünnungen der DIG-markierten RNA und der im Kit enthaltenen Kontroll-RNA aufgetragen und durch „crosslinking“ (Stratalinker 2400, Stratagene) mit UV-Licht fixiert. Die Membran wurde zunächst in Puffer 1 (ISH) 5 min gewaschen und anschließend 15 min in Puffer 2 (ISH) geblockt. Der Nachweis der eingebauten Dig-Moleküle erfolgte durch einen, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten, anti-DIG-Antikörper (Anti-DIG AP, F_(ab)-Fragment der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Der Antikörper wurde 1:5000 in Puffer 2 (ISH)

verdünnt und für 30-45 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran 2x 10 min in Puffer 1 (ISH) gewaschen und 5 min in Puffer 3 (ISH) äquilibriert. Die Substratreaktion erfolgte im Dunkeln durch Inkubation der Membran in einer NBT/BCIP-Substratlösung (1:100 in Puffer 3 verdünnt, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für 15-30 min. Die Farbreaktion wurde schließlich mit PBS gestoppt.

2.12.2.2 Northern Blot-Test der DIG-markierten Sonden

Eine weitere Möglichkeit, die Markierung der Sonden und Ihre Spezifität zu überprüfen, stellt die Northern-Hybridisierung dar. Hierdurch sollte außerdem ausgeschlossen werden können, dass die markierte „sense“-Sonde an unmarkierte „sense“-RNA bindet. Analog darf die markierte „antisense“-Sonde nicht an unmarkierte „antisense“-Moleküle binden. Hierzu wurden mit dem o.g. Kit *in vitro* transkribierte „sense“ und „antisense“ RNA-Moleküle aus unmarkierten Ribonukleosidtriphosphaten hergestellt, auf einem denaturierendem Formaldehydgel aufgetrennt und mittels eines Blot-Transfers (Sambrook, 1989) auf eine positiv geladene Nylonmembran der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) übertragen. Nachdem die RNA durch UV-crosslinking (Stratalinker 2400, Stratagene) auf der Membran fixiert wurde, musste die Membran zunächst in zwei Teile geschnitten werden, wobei auf jeder Hälfte jeweils eine Spur mit der „antisense“ und „sense“ Probe enthalten war. Nach einer 30 min Prähybridisierung in 2x PM/6x SSC bei 68 °C, folgte die Hybridisierung über Nacht mit der markierten „antisense“- bzw. „sense“-Sonde (1:500 in 1x PM/3x SSC verdünnt) bei ebenfalls 68 °C. Die Membranen wurden bei 68 °C zunächst für 10 min mit 2x SSC/0,1 % SDS gewaschen und danach für 30 min mit 0,1x SSC. Anschließend wurden die Membranen kurz in Maleinsäure-Waschpuffer äquilibriert und 30 min in Puffer 2 (ISH) geblockt. Die immunologische Detektion erfolgte mittels eines AP-konjugierten Anti-DIG-Antikörpers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), der in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockierungslösung für weitere 30 min zu den Membranen gegeben wurde. Nachdem die Membranen für 30 min in Waschpuffer gewaschen wurden, folgte ein 5 minütiger Waschschrift in Detektionspuffer (Puffer 3, ISH). Danach wurde das Farbsubstrat NBT/BCIP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 1:50 in Detektionspuffer verdünnt und die Membranen darin 10-30 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde schließlich durch Waschen mit A. bidest. gestoppt.

2.12.3 Markierung von Oligosonden mit Digoxigenin-ddUTP

Für die Herstellung von DIG-markierten Oligonukleotiden wurde der „DIG-Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd generation“ der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wird mit Hilfe einer terminalen Transferase das 3' Ende der Oligonukleotide mit jeweils einem DIG-ddUTP-Molekül versehen (Schmitz et al., 1991). Die so hergestellten Sonden wurden anschließend mit 4 M Lithiumchlorid (LiCl) und EtOH abs. gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl HPLC-Wasser gelöst.

2.13 Hybridisierungstechniken

2.13.1 DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern

Auf Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden entsprechend der von Southern (1975) entwickelten Methode, modifiziert nach Sambrook (1989), auf eine Nitrocellulose-Membran der Firma Schleicher und Schuell (Porengröße 0,45 µm) transferiert und durch zweimaliges UV-crosslinking (je 120000 µJoules) darauf fixiert (Stratalinker 2400, Stratagene). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese für mind. 2 Std. mit 2x PM/6x SSC/1 % SDS (Denhardt, 1966) bei 60 °C bzw. 62 °C im Hybridisierungssofen Hybridiser HB-2 bzw. HB-10 der Firma Techne präinkubiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde, gelöst in 1x PM/3x SSC/0,5 % SDS bei 60 °C bzw. 65 °C über Nacht. Das Waschen erfolgte dreimal für je eine Stunde bei 60 °C bzw. 62 °C mit 2x SSC unter Zugabe von 10 %igem SDS. Danach wurde die Nitrozellulosemembran kurz in 0,1x SSC gewaschen und bei RT getrocknet. Zur Signaldetektion diente ein Röntgenfilm (Fuji Super RX, Fuji Japan), der auf den Filter aufgelegt wurde. Eine zusätzliche Signalverstärkung wurde durch die Verwendung einer Verstärkerfolie (Dupont cronex Hi-Plus, Dr. Groos-Suprema) erzielt. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke zwischen 2 Std. und 1 Woche bei -80 °C.

2.13.2 Koloniefilterhybridisierung

Rekombinante Plasmidklone können in größerer Anzahl nach der von Grunstein und Hogness (1975) entwickelten Methode selektiert werden. Zu untersuchende Bakterienklone wurden auf zwei Nitrozellulosefilter auf X-Gal/Ampicillin-haltigen Agarplatten an identische Positionen überimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Ein Filter wurde zur Denaturierung für 7 min auf ein, in 0,5 M NaOH getränktes Filterpapier, gelegt. Nachdem der Filter unter dem Abzug getrocknet wurde, folgte die Neutralisierung für 5 min auf in 1,5 M Tris/HCl pH 7,4 getränkten Filterpapieren. Nach kurzem Trocknen wurde der Filter für 5 min in 0,5 M Tris/1,5 M NaCl getaucht und getrocknet. Die bakteriellen Proteine wurden im Anschluss mit Proteinase K (1 mg/ml in 1x SSC) verdaut. Durch kurzes Eintauchen in EtOH abs. wurde die Reaktion nach 30 min gestoppt. Danach wurde der Filter für 5 min in 0,3 M NaCl inkubiert und durch das Pressen zwischen zwei Lagen Filterpapier von den Resten der Bakterienkolonien befreit. Durch zweimaliges crosslinking mit UV-Licht (je 120000 µJoules) im UV-Stratalinker 2400 der Firma Stratagene wurde die DNA auf der Nitrozellulosemembran fixiert. Die Prähybridisierung und die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde erfolgten wie unter 2.13.1 beschriebenen. Kolonien, die sich hierbei als positiv erwiesen, wurden von der zweiten Platte zum Animpfen von Übernacht-Kulturen verwendet.

2.13.3 Northern Hybridisierung

Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem VE-Wasser angesetzt. Die RNA wurde zunächst unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehydgel aufgetrennt (2.2.1) und anschließend 10 min in 20x SSC äquilibriert. Die RNA-Moleküle wurden über Nacht unidirektional auf eine Nitrocellulosemembran der Firma Schleicher und Schuell (Porengröße 0,45 µm) bzw. eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), mittels eines von Southern (1975) entwickelten und nach Sambrook (1989) modifizierten Blotaufbaus, transferiert. Die RNA wurde durch zweimaliges UV-crosslinking (je 120000 µJoules) im Stratalinker 2400 der Firma Stratagene auf der Membran fixiert. Für die Prähybridisierung wurde 2x PM/6x SSC/1 % SDS bzw. Hybridisierungslösung für Northern-Light-Blot verwendet. Die Prähybridisierung erfolgte für mind. 2 h bei 68 °C bzw. 42 °C im Hybridisierungssofen vom Typ Hybridiser HB-2 bzw. HB-10 der Firma Techno. Anschließend wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde in 10 ml 1x PM/3x SSC/0,5 % SDS bzw. Hybridisierungslösung für Northern-Light-Blot gelöst und die Membran darin über Nacht bei 42 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 2x 15 min in 2x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur und anschließend 2x 15 min in 0,1x SSC/0,1 % SDS bei 42 °C gewaschen. Der Blot wurde feucht auf einem Filterpapier fixiert, mit Folie überzogen und in eine Expositionskassette gelegt. Aufgelegt wurde der Röntgenfilm Fuji Super RX der Firma Fuji (Japan) und die Expositionszeit bei -80 °C erstreckte sich von einer Stunde bis zu mehreren Tagen.

Es ist möglich eine bereits hybridisierte Membran mehrmals zu verwenden, um sie z.B. mit einem Kontroll-Gen zu hybridisieren. Vorher muss die Membran jedoch von der hybridisierten Sonde befreit werden, was nach dem Protokoll von Sambrook (1989) durchgeführt wurde. Hierzu wurde die Membran 1 bis 2 h in vorgewärmter „Stripping“-Lösung (50 % Formamid/0,1x SSC/0,1x SDS) bei 68 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2x SSC wurde die Membran für erneute Prähybridisierung/Hybridisierung verwendet.

2.13.4 mRNA-*in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierter RNA-Sonden

Die perfundierten Schnitte wurden 1-2 min bei 37 °C mit Proteinase K (Stammlösung: 10 mg/ml; 1:1000 in PTW verdünnt) vorbehandelt, um die Zugänglichkeit des Gewebes für die RNA-Sonden zu gewährleisten. Diese Reaktion wurde durch das Eintauchen der Schnitte in eiskaltes Glycin (2 mg/ml PTW) gestoppt.

Die Gefrierschnitte mussten vor der Hybridisierung fixiert werden. Dies geschah durch eine 15 min Inkubation in 4 % PFA/PBS. Anschließend konnte mit beiden Arten von Gewebeschnitten in gleicher Weise verfahren werden.

Es folgten Waschungen für 2x 5 min in PTW und 1x 5 min in PBS. Um die Schnitte herum wurden die Objektträger mit einem fuselfreien Tuch getrocknet, 80 µl der markierten Sonden (1:50 bzw. 1:100 in Hybridisierungspuffer (ISH) verdünnt) aufgetragen und die Schnitte mit Deckgläschen bedeckt. Die Hybridisierung der Sonden erfolgte über Nacht bei 42 °C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x 5 min in 2x SSC bei 55 °C und 1x 20 min in 0,1x SSC bei 65 °C gewaschen.

Ungebundene einzelsträngige RNA wurde anschließend durch 30 minütige Inkubation der Schnitte in einer RNaseA-Lösung (63 µl der Stammlösung [10 mg/ml] in 2x SSC) bei 37 °C abgebaut. Die Schnitte wurden danach 3x 5 min in 2x SSC gewaschen und kurz in PBT gespült. Um freie Bindungsstellen für Peptide auf dem Objektträger abzusättigen, folgte eine Inkubation für 15 min in Puffer 2 (ISH) bei Raumtemperatur. Der anti-Digoxigenin-Antikörper (Anti-DIG AP, F_(ab)-Fragment der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde 1:100 in P2 (ISH) verdünnt und 80 µl dieser Lösung auf jeden Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden mit Deckgläschen bedeckt und für 60 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur belassen. Es folgten Waschungen für 2x 5 min in PBT und 1x 5 min in NBT (P3, ISH). Das Farbsubstrat „NBT/BCIP Stock Solution“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde 1:50 in P3 (ISH) verdünnt. Auf jedem Schnitt wurden 80 µl der Substratlösung verteilt und in einer Dunkelkammer die Substratreaktion so lange durchgeführt, bis sich eine deutliche Blaufärbung der Gewebe zeigte (ca. 15-30 min). Die Färbereaktion wurde durch mehrmaliges Waschen für 5 min in PBS gestoppt. Die Schnitte wurden nach dem Trocknen mit PBS/Glycerin (1:1) eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

2.13.5 mRNA-*in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten Oligonukleotiden

Der Versuchsablauf entspricht im Prinzip dem oben beschriebenen. Da es sich aber um eine Hybridisierung mit DNA-Sonden handelt und die mRNA-DNA-Hybride weitaus weniger stabil als RNA-RNA-Hybride sind, mussten die Hybridisierungs- und die Waschttemperaturen niedriger gewählt werden. Vor der Verwendung mussten die markierten Oligonukleotid-Sonden für 1 min bei 94 °C denaturiert werden. Danach wurden sie 1:50 bzw. 1:100 in Hybridisierungspuffer (ISH; + 500 µg/ml Carrier-DNA) verdünnt auf die Schnitte gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 32 °C in einer Feuchtkammer. Die Waschschrte wurden ebenfalls bei 32 °C ausgeführt. Da keine RNA-Sonden verwendet wurden, entfiel die RNaseA-Behandlung und es konnte direkt mit dem 5 min PBT- Waschschrte und der 15 min Inkubation in Puffer 2 (ISH) fortgefahren werden. Es folgte die Detektion, wie bereits unter 2.11.4 beschrieben.

2.14 Immunohistochemie

Mit Hilfe der Immunohistochemie können Proteine durch eine indirekte Fluoreszenzfärbung in Gewebeschnitten lokalisiert und zum Teil quantifiziert werden. Ein spezifischer Primärantikörper bindet zunächst an das entsprechende Epitop des zu untersuchenden Proteins und wird anschließend vom Sekundärantikörper erkannt. Der Sekundärantikörper erkennt die speziesspezifischen F_c-Fragmente des Primärantikörpers und somit verschiedene Antikörper, die in der gleichen Spezies generiert wurden. An den Sekundärantikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der nach Anregung mit der farbstoffspezifischen Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Immunohistochemie ausschließlich perfundierte Gewebeschnitte verwendet, die nach dem sog. Schwimmschnitt-Protokoll mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert wurden. Zunächst wurden die Schnitte 3x 8 min in 10 mM PBS pH 7,4 bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden

sie in 250-500 µl Inkubationslösung (10 mM PBS pH 7,4/1 % NSS/0,1 % Triton), die den primären Antikörper (siehe Anhang, Tab.7-8) enthielt, über Nacht bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3x 8 min in 10 mM PBS pH 7,4 gewaschen. Der Sekundärantikörper (siehe Anhang, Tab.7-9) wurde in der Verdünnung 1:200 in 10 mM PBS pH 7,4/1 % NSS zu den Schnitten gegeben und für 1,5 h abgedunkelt auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 3x 8 min in 10 mM PBS pH 7,4 gewaschen und auf beschichtete Objektträger im abgedunkeltem Raum aufgezogen. Sie trockneten über Nacht bei 4 °C und wurden am nächsten Tag nach kurzem Eintauchen in Xylol mit dem Eindeckmittel Merckoglas (Merck) und Deckgläschen eingedeckt. Alternativ wurden die Schnitte nach 1-2 h Trocknen mit dem, das „anti-fading“-Mittel Paraphenyldiamin enthaltenden, Einbettmedium (Johnson and Nogueira Araujo, 1981) eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

2.14.1 Kompetitionstest

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper ausschließen zu können, wurden Kompetitionstests durchgeführt. Dazu wurden die Antikörper in der oben beschriebenen Inkubationslösung verdünnt und mit zunehmenden Mengen rekombinant hergestellter Proteine versetzt. Anhängig von der Proteinmenge sollte die nachfolgende Inkubation der Gewebe-Schnitte deutlich abgeschwächte bis gar keine Immunfluoreszenz-Signale liefern. Vor dem Beginn der Absorptionstests sollte die eingesetzte Antikörpermenge so weit herabgesetzt werden, dass ein gerade noch sichtbares Signal entsteht. Dies war für die getesteten Antikörper bei einer Verdünnung von 1:1000 (Ngb) bzw. 1:2000 (Cygb) der Fall. In fünf Ansätzen wurde je 1 ml der Antikörperversdünnung 1:1000 bzw. 1:2000 in Inkubationslösung hergestellt, die aber zunächst nur auf 800 µl aufgefüllt wurde. Zum ersten Gefäß, das als positiv-Kontrolle dienen sollte, wurden 50 µl PBS dazugegeben. Zu den weiteren Gefäßen wurden 5 µg, 10 µg bzw. 15 µg rekombinanten Proteins dazugegeben und die Lösungsmenge entsprechend auf 1000 µl aufgefüllt. Es folgte eine Präinkubation ohne Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Am nächsten Tag wurden die gewaschenen Schnitte dazugegeben und das Schwimmschnitt-Protokoll wie oben beschrieben ausgeführt.

2.15 Mikroskopie und Photodokumentation

Die *in situ*-hybridisierten Schnitte wurden mit Hilfe eines „Olympus BX 51 System Microscope“ betrachtet und mit einer „Colorview-12“ Digitalkamera fotografiert. Für Immunofluoreszenzfärbungen wurde das gleiche Gerät verwendet, wobei zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs Cy 3 durch das Fluoreszenzsystem „U-LH 100 HG (Olympus)“ eine Anregungswellenlänge von 532 nm erzeugt wurde, woraufhin eine orangerote Emission entstand.

Alternativ wurde zur Dokumentation der *in situ*-Färbungen das Axioplan Mikroskop der Firma Zeiss mit dem zugehörigen Digitalkamera-System Prog/Res 3012 der Firma Kontron Elektronik der AG Technau verwendet.

Für die konfokalen Aufnahmen der Cygb-Immunfluoreszenzfärbungen wurde das Leica Mikroskop von Typ TCS SP2 der AG Technau verwendet.

2.16 Proteinbiochemische Standardmethoden

2.16.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Ornstein und Davis (1964) lassen sich Proteine unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen nach Ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch auftrennen (Laemmli, 1970; Raymond and Weintraub, 1959). Dithiothreitol (DTT) reduziert Disulfidbrücken in Proteinen zu Sulfhydrylgruppen, während sich das anionische Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) gleichmäßig in die Proteine einlagert und dabei nichtkovalente Wechselwirkungen unterbindet sowie die Eigenladung der Proteine maskiert (Stryer, 1995). Acrylamid ist nach Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxidsulfat (APS) und durch eine Katalyse mit Tetramethylethylen-diamin (TEMED) in der Lage lange Ketten auszubilden, die durch N, N'-Methylenbisacrylamid miteinander quervernetzt werden. Je nach Konzentration von Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid entstehen Netze bestimmter Porengröße, in denen entsprechend Proteine unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden können.

Die Polyacrylamidgele bestehen aus zwei Schichten, dem oberen Sammelgel mit einer Laufstrecke von 0,5-1 cm, in dem die Proteinproben in eine schmale Lauffront komprimiert werden, bevor ihre Auftrennung im Trenngel erfolgt. Die verwendeten Trenngele bestanden aus 12-14 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl pH 8,8 und 0,1 % (w/v) SDS. Die Sammelgele setzten sich zusammen aus 4 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 6,8 und 0,1 % (w/v) SDS. Unmittelbar vor dem Gießen wurde durch Zugabe von APS und TEMED (Endkonzentration je 0,1 % (w/v)) die Polymerisation eingeleitet und die Gele zügig in die vorbereiteten Kammern gegossen. Es wurde zunächst das Trenngel und ca. 30 min später das Sammelgel gegossen. Polyacrylamidgele konnten in Feuchte Tücher gehüllt und Frischhaltefolie eingepackt mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Für die Gelelektrophorese wurde die Kammer des „Mini-PROTEAN®3 Cell“-Systems (Bio-Rad) zunächst zu einem Drittel mit dem Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt und nachdem das Polyacrylamidgel gemäß der Anleitung darin befestigt wurde, das so entstandene zweite Pufferreservoir ebenfalls mit dem Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden 5:1 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5-10 min bei 95 °C denaturiert, dabei alle 2-3 min gevortext und schließlich in die Geltaschen aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurden Proteinmarker der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) aufgetragen. Der Lauf erfolgte im Sammelgel bei 100 V, im Trenngel bei 130 V und wurde gestoppt, sobald die blaue Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

2.16.2 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau beruht auf elektrostatischen Bindungen und apolaren Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem Protein (Andrews, 1986). Die Gele wurden 30 min bis über Nacht mit Coomassie-Färbelösung unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Hintergrund des SDS-Polyacrylamidgels durch Inkubation mit der Entfärbelösung solange reduziert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

2.16.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Dieser Methode liegt ebenfalls die Fähigkeit des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau zugrunde, mit Proteinen Wechselwirkungen einzugehen. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes im sauren Milieu von 465 nm 595 nm. Hierzu wurde zunächst eine Eichgerade mit Hilfe einer 1 µg/µl Rinder Serum Albumin (BSA) enthaltenden Stammlösung erstellt. Die Eichlösungen mit den Endkonzentrationen: 1 ng/µl; 5 ng/µl, 10 ng/µl, 15 ng/µl und 20 ng/µl BSA wurden auf 800 µl mit A. bidest. aufgefüllt und mit je 200 µl 5x Bradford-Reagenz versetzt. Eine Leerkontrolle mit 800 µl A. bidest. und 200 µl 5x Bradford-Reagenz wurde mitgeführt. Jeweils 2-5 µl der Proteinextrakte wurden für die Messungen eingesetzt und in gleicher Weise wie die Standards behandelt. Die Proben wurden nach gründlichem vortexen 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm in einem Eppendorf BioPhotometer gemessen.

2.17 Proteinextraktionsmethoden

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Geweben existiert eine Reihe von Vorschriften, von denen einige im Rahmen dieser Arbeit ausgeführt wurden. In der anfangs angewendeten Methode wurden die Gewebe mit 1 Vol auf 95 °C erhitztem 1x SDS-Probenpuffer im Eppendorf-Gefäß überschichtet und mit einem Potter homogenisiert. Durch 6malige Exposition mit Ultraschallwellen für jeweils 30 sec bei ca. 100 W wurden die Homogenate lysiert. Genomische DNA, die die Zellextrakte viskos machte, wurde durch 30 min Zentrifugation bei 14 000 rpm und 4 °C pelletiert. Die Proteinextrakte wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.17.1 Isolierung von Proteinen aus Zellplasma und Zellkern

Mit dieser Methode ist es möglich in zwei Schritten die cytoplasmatischen und die Zellkern-Proteine aus Zellkultur bzw. aus Geweben voneinander zu trennen. Zunächst wurde hierfür ein Kernfraktionierungsprotokoll der AG Müller-Esterl verwendet. Das Gewebe wurde mit 1 Vol Lysepuffer, der unmittelbar vor der Verwendung mit DTT und Pefablock der Firma Roth sowie den „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ Tabletten der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) vervollständigt wurde, versetzt und mit einem Glas-Potter auf Eis 20mal vorsichtig gepottert. Das Homogenat wurde anschließend 10 min bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die cytosolische Fraktion befand sich im Überstand und wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das Kernpellet wurde zum Waschen zwei mal mit 500 µl Lysepuffer versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und jeweils 10 min bei 4 °C und 2500 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde das Kernpellet in 100 µl Lysepuffer resuspendiert.

Die zweite Methode, um die Cytoplasma- und Zellkern-Proteine aus Maus-Geweben getrennt untersuchen zu können, wurde einer von Dr. Nothwang und Mitarbeitern veröffentlichten Arbeit entnommen (Guillemin et al., 2005). Jeweils 0,5 g der Gewebe wurden mit 1 ml CLB-Puffer versetzt und zweimal in einem Glas-Potter auf Eis gepottert. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Gewebe mit einem Glas/Teflon-Potter (eingespannt im Rührwerk RZR0/RZR1 der Firma Heidolph) bei 250

rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 0,1 Vol 2,5 M Saccharose versetzt und 10 min bei 6300xg zentrifugiert. Die cytoplasmatische Proteinfraction im Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, während das Pellet in 1 ml TSE-Puffer resuspendiert und wiederholt 30mal im elektrischen Glas/Teflon-Potter bei 250 rpm gepottert wurde. Nach einem 4 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4000xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet mehrmals mit TSE-Puffer gewaschen, bis der Überstand klar wurde. Abschließend wurde das Pellet, das die nukleären Proteine enthielt in 100 µl TSE-Puffer resuspendiert. Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Konzentration nach Bradford bestimmt.

2.18 Western Blot

Bei der von Burnette (1981) als Western-Blotting bezeichneten Methode wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine PVDF- (Hybond-P PVDF (Polyvinylidendi-fluorid)-Membran, Amersham Biosciences) bzw. Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen (Towbin et al., 1979). Über hydrophobe Wechselwirkungen wurden die Proteine auf der Membran immobilisiert und standen in dieser Form immunochemischen Untersuchungen zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür das „Mini Trans-Blot® Elektrophoretic Transfer Cell“-System der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA) verwendet. Die hydrophobe Oberfläche der PVDF-Membran wurde durch Inkubation für 10 sec in Methanol und nach kurzem Waschen in Wasser für 10 min in Transfer- (Blotting-) Puffer äquilibriert. Die Nitrocellulose-Membran wurde für 10 min direkt in Transfer- (Blotting-) Puffer inkubiert. Der Transfer erfolgte für 1 h im Transfer-/Blotting-Puffer bei einer Stromstärke von 350 mA und einer Spannung von 100 V. Ein aufgetragener „prestained“-Proteinmarker der Firma Bio-Rad bzw. Fermentas ließ erste Schlüsse über den Erfolg des Transfers zu. Zusätzlich wurde das Gel anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt.

2.18.1 Immundetektion von Proteinen

Der Western Blot wurde zum Absättigen freier Bindestellen in 25 % Blocking Reagenz der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) oder 5% Magermilchpulver der Firma Applichem (Darmstadt) in PBS- oder TBS-Tween (0,1 %) 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Der Nachweis von reaktiven Proteinbanden erfolgte durch indirekte Immunodetektion. Die spezifischen primären Antikörper (Anhang, Tab.7-8) wurden mit Hilfe von Enzym-gekoppelten sekundären Antikörpern (Anhang, Tab.7-9) detektiert. Alle Inkubationsschritte fanden auf einem Wippschüttler und, soweit nicht anders angegeben, bei RT statt. Nach entfernen der Blockierungslösung wurde der Blot 2x kurz in 10 ml PBS- oder TBS-Tween (0,1 %) gewaschen. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran 2x kurz in 10 ml, 1x 15 min in 100 ml und 3x 5 min in 10 ml PBS- oder TBS-Tween (0,1 %) gewaschen, bevor sich eine 1stündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper anschloss. Danach wurde die Membran 2x kurz in 10 ml, 1x 15 min in 100 ml und 3x 5 min in 10 ml PBS- oder TBS-Tween (0,1 %) gewaschen, bevor die Nachweisreaktion erfolgte.

2.18.2 Nachweisreaktion mit dem NBT/BCIP-System

Der Nachweis erfolgte unter Verwendung eines sekundären Antikörpers, an den das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war. Der Blot wurde 2x in P3 (ISH) äquilibriert und anschließend mit der Substratlösung (NBT/BCIP Stock Solution 1:50 in P3 verdünnt) für 5 bis 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, wobei die Proteine als bläuliche Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde durch Waschen in PBS gestoppt. Anschließend wurde der Blot auf Filterpapier luftgetrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

2.18.3 Nachweisreaktion mit dem ECL-System

Verwendet wurde das „ECL plus™ Western blotting reagent pack“ der Firma Amersham Biosciences (Freiburg). Hierbei war der sekundäre Antikörper mit einer Meerrettich-Proxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt, die als Substrat H_2O_2 benötigte. Bei der Reaktion entstand ein Sauerstoffion, das unter Einfluss des Reduktionsmittels Luminol oxidierte. Dabei wurde Luminol zu 3-Aminophthalat umgewandelt, das bei der Rückkehr in den Grundzustand Photonen der Wellenlänge 425 nm emittierte (Roswell and White, 1978). Da die Lichtemission proportional zur Enzymkonzentration und damit zur AK-Konzentration war, eignete sich das ECL-System für quantitative Vergleiche.

Die Substratlösung wurde kurz vor der Verwendung im Verhältnis 40:1 aus Substratlösung A und Substratlösung B angesetzt, wobei beide vorher für ca. 15 min im Dunkeln bei RT äquilibriert wurden. Der Blot wurde in der Dunkelkammer angetrocknet, mit 2 ml Substratlösung bedeckt und für 5 min inkubiert. Schließlich wurde die Substratlösung soweit möglich entfernt und die Membran, in eine Plastikfolie eingeschlagen, in die Expositionskammer gelegt. Es wurden mehrere Röntgenfilme (Hyperfilm™, Amersham Biosciences) nacheinander aufgelegt, wobei die Expositionszeit zwischen 30 sec und 1 h betragen konnte.

2.19 Lösungen und Materialien

Agar-Platten	15 g Agar Agar ad 1000 ml L-Medium, 100 µg/ml Ampicillin 0,2 mM IPTG 0,05 % (w/v) X-Gal 0,2 % Dimethylformamid (v/v)
„anti-fading“-Einbettmedium	7 ml 1x PBS 1 g Elvanol 3 ml Glycerin 10 mg Paraphenyldiamin pH 8
5xBradford-Reagenz	25% EtOH [95 %] (v/v) 50% konz. Phosphorsäure (v/v) 0,05% (w/v) Coomassie- Brillant- Blue G-250
CLB-Puffer (Kernfraktionierung)	10 mM HEPES 10 mM NaCl 1 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM NaHCO ₃ 5 mM EDTA 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂
Coomassie-Färbelösung für SDS-Gele	40 % Methanol (v/v) 12,5 % Essigsäure (v/v) 0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue G-250
Denaturierungspuffer (Blot)	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Denaturierungslösung (RNA-Extraktion)	Stammlösung 0,1 M β-Mercaptoethanol
50x Denhard's Lösung	1 % Ficoll-400 (w/v) 1 % Polyvinylpyrrolidone (w/v) 1 % BSA (w/v) steril filtriert
Dialysepuffer (10x)	0,25 M Tris 3 M NaCl 0,1 M Na ₂ EDTA
DNA-Ladepuffer	4 M Harnstoff 0,1 M Na ₂ EDTA 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 50 % (w/v) Saccharose

Kapitel 2

Elektrophorese-Laufpuffer (SDS-PAGE)	192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 25 mM Tris/HCl pH 8,3
Elektrophoresepuffer (= 1x E-Puffer)	36 mM Tris 30 mM NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 10 mM Na ₂ EDTA
Entfärbelösung für SDS-Gele	20% Isopropanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Ethidiumbromid-Färbelösung	5 µg/ml in 1x E-Puffer
Homogenisierungspuffer (DNA-Extraktion)	58 g Saccharose 10 ml 0,1 M Na ₂ EDTA pH 7,4 2,5 ml 0,1 M Na ₂ EGTA pH 7,4 50 ml Puffer A (10 x) ad 500 ml A. bidest.
Hybridisierungspuffer (ISH)	50% 4x SSC (w/v) 50% deion. Formamid (v/v)
Hybridisierungsmedium (= 1x PM)	0,02 % Ficoll-400 (w/v) 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (w/v) 0,02 % BSA (w/v) 0,5 % SDS (w/v) in 3x SSC
Hybridisierungslösung (Northern-Light-Blot)	50 % Formamid (v/v) 5x SSC 0,1 % SDS (w/v) 5x Denhard's Lösung 0,1 % NaHPO ₄ (w/v) 50 mM NaPO ₄ (w/v) pH 6,8
Inkubationslösung (Immunfluoreszenz)	10 mM PBS pH 7,4 1 % NSS (normales Schweineserum) (v/v) 0,1% Triton (v/v)
LB-Medium	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 0,5 % NaCl (w/v)
Lysepuffer (Kernfraktionierung)	10 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,1 % Nonidet P-40 (v/v) 10 mM Tris/HCl pH 7,4 (+Proteaseinhibitoren)

Maleinsäure-Waschpuffer (Northern Blot)	0,1 M Maleinsäure 1,15 M NaCl pH 7,5
MOPS (10x)	0,2 M 3-(N morpholin)-Propan-Sulfonsäure 0,05 M Na-Acetat 0,01 M Na ₂ EDTA pH 7,0
Neutralisierungspuffer (Southern Blot)	3 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
Paraformaldehyd-Lysin-Periodat (PLP-Lsg) (Perfusion)	1 x PBS 4 % Paraformaldehyd (w/v) 1,37 % L-Lysin (w/v) 0,21 % Natriumperjodat
PBS (10x)	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄
10 mM PBS (10x; Immunfluoreszenz)	150 mM NaCl 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS (ISH)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,15 mM KH ₂ PO ₄ 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ ·x2H ₂ O
PBT (ISH)	BSA (2 mg/ml) in PTW
Prähybridisierungsmedium (= 2x PM)	2x PM (siehe 1xPM) in 6x SSC
PTW (ISH)	0,1 % Tween in PBS (v/v)
Puffer A (10x; DNA-Extraktion)	150 ml 2 M KCl 37,5 ml 2 M NaCl 7,5 ml 0,1 M Spermin 25 ml 0,1 M Spermidin 75 ml 1 M Tris/HCl ad 500 ml A. bidest. pH 7,4
Puffer 1 (BAC-/PAC-/P1-Isolierung)	0,01 M EDTA pH 8
Puffer 2 (BAC-/PAC-/P1-Isolierung)	0,2 M NaOH 1 % SDS (w/v)
Puffer 3 (BAC-/PAC-/P1-Isolierung)	50 ml Kaliumacetat 7,5 M 23 ml Essigsäure (konz) 127 ml A. bidest.

Kapitel 2

Puffer 1 (ISH)	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,5
Puffer 2 (ISH)	1 % (w/v) "Blocking Reagenz" der Firma Roche in Puffer 1
Puffer 3 (ISH)	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl pH 9,5
RNA-Ladepuffer	500 µl Formamid (deionisiert) 100 µl 10x MOPS-Puffer 150 µl Formaldehyd (filtriert)
RNA-Färbelösung	50 % Glyzerin (v/v) 0,001 M Na ₂ EDTA pH 8,0 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylencyanol FF (w/v)
5xSDS-Probenpuffer (Protein-Ladepuffer)	50 mM DTT 10 % SDS (w/v) 0,5 % Bromphenolblau (w/v) 50 % Glycerin (v/v) 250 mM Tris/HCl pH 6,8
Stammlösung (RNA-Extraktion)	0,5 % N-Laurylsarkosin (v/v) 4 M Guanidin-Thiocyanat 0,25 mM Natriumacetat pH 7,0
Standard-Saline-Citratpuffer (=1x SSC)	0,15 M NaCl 0,015 M Natriumcitrat
"stripping"-Lösung (Northern Blot)	50 % Formamid (v/v) 0,1 % SSC (v/v) 0,1 % SDS (w/v)
„stripping“-Lösung (Western Blot)	100 mM β-Mercaptoethanol 2 % SDS (w/v) 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7
TELT-Puffer:	2.5 M LiCl 4 % Triton X-100 (v/v) 62.5 mM Na ₂ EDTA 50 mM TrisHCl pH 8
Transfer- (Blotting-) Puffer (Western Blot)	192 mM Glycin 20 % Methanol (v/v) 0,1 % SDS (w/v) 25 mM Tris pH 8,3

Triton X-Mix (Clewell und Helinski):	62,5 mM EDTA 0,2 % (v/v) Triton X-100 50 mM Tris HCl pH 8,0
Tris-Borat-Elektrophorese-Puffer (=1x TBE)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na ₂ EDTA
Tris Buffered Saline (Western Blot) (=10x TBS)	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl pH 7,5
Tris-EDTA-Puffer (=TE-Puffer)	1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl pH 7,5
TSE-Puffer (Kernfraktionierung)	300 mM Saccharose 1 mM EDTA 0,1 % IGEPAL-CA 630 (v/v) bzw. Triton-X 100 10 mM TRIS pH 7,5
Verspüllösung (Perfusion)	1x PBS 15000 IU heparin

2.20 Bezugsquellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden Enzyme und Reaktionssysteme der Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Qiagen (Hilden), Eppendorf (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), Amersham Biosciences (Freiburg), Applied Biosystems (Darmstadt), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) Biotechnologie GmbH (Erlangen) und Promega (Mannheim) verwendet. Chemikalien und Feinchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Applichem (Darmstadt) bezogen, Kunststoff-Verbrauchsmaterialien von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht) und Starlab (Ahrensburg).

Die als Primer verwendeten Oligonucleotide wurden von den Firmen Gen Tech (Mainz), Sigma-ARK GmbH (Steinheim), Qiagen-Operon (Köln), Metabion (Planegg-Martinsried) und Biomers (Ulm) synthetisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Komparative Sequenzanalyse des Neuroglobingens

Die vergleichende Sequenzanalyse von orthologen Genomregionen verwandter Organismen stellt eine wichtige und gängige Methode zur Identifizierung von konservierten und somit funktionell wichtigen kodierenden und nicht-kodierenden Sequenzbereichen dar (Frazer et al., 2003; Hardison, 2000; Hardison et al., 1997). Insbesondere bei Genen, deren Funktion noch nicht geklärt ist, können solche Analysen in Bezug auf die Regulation der Genexpression sehr aufschlussreich sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollten konservierte nicht-kodierende Abschnitte des Neuroglobingens zunächst identifiziert und dann auf die Anwesenheit möglicher Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren überprüft werden. Dabei lag ein besonderer Fokus auf Sequenzmotiven, die einen Hinweis auf mögliche Regulation der Ngb-Expression unter Hypoxie liefern würden (Tab. 3-2). Zudem sollte der Ngb-Genbereich auf die Anwesenheit von spezifischen Signalsequenzen, die für die überwiegend neuronale Expression des Proteins verantwortlich sein könnten, untersucht werden.

Grundlage für die folgenden Analysen waren bereits in der Arbeitsgruppe ermittelte mRNA- und Genom-Sequenzen der Neuroglobine aus Mensch und Maus (Wystub, 2000). Durch Datenbankrecherchen konnten diese mit Hilfe von Einträgen, die zusätzliche umfangreiche Sequenzdaten enthielten, ergänzt werden. Auf diese Weise wurden auch andere Organismen in den Vergleich miteinbezogen. Die verwendeten Sequenzeinträge sind in Tab. 3-1 zusammengefasst.

Sequenzname	Eigene Sequenzeinträge	Ergänzende Datenbankeinträge
Hsa Ngb-mRNA	AJ_245946	NM_021257
Mmu Ngb-mRNA	AJ_245945	NM_022414
Hsa Ngb genomisch	AJ_245944	NT_026437
Mmu Ngb genomisch	AJ_580010	NT_039551
Rno Ngb genomisch	-	NW_047762
Tni Ngb genomisch	-	FS_Contig5794_1 (genoscope)
Tru Ngb genomisch	-	CAAB010000170
Dre Ngb genomisch	-	AL_953899

Tabelle 3-1 Zusammenstellung der Ngb-Datenbankeinträge, die als Grundlage für die komparative Sequenzanalyse und die Suche nach putativ regulatorischen Elementen verwendet wurden. Hsa: *Homo sapiens*; Mmu: *Mus musculus*; Rno: *Rattus norvegicus*; Tni: *Tetraodon nigroviridis*; Tru: *Takifugu rubripes*; Dre: *Danio rerio*

3.1.1 Genomische Struktur und Organisation des Neuroglobins im Interspeziesvergleich

Das humane *NGB*-Gen liegt auf Chromosom HSA14q24.3 (Burmester et al., 2000) und wird distal vom proteinkodierenden Gen für die Protein-O-Mannosyltransferase 2 (*POMT2*) und proximal von einem hypothetischen Gen unbekannter Funktion (DKFZp43P011; syn. DUF221; „*domain of unknown funktion*“) flankiert. Die murinen Ngb-Gene liegen auf syntänen Bereichen der Chromosomen MMU12 und RNO6. Im „*Percent Identity Plot*“ (PIP; Abb. 3-1) stellt die menschliche *NGB*-Sequenz die Referenz dar, mit der die murinen Sequenzen verglichen wurden. Dabei werden Übereinstimmungen von 50 % und mehr als Punkte bzw. Linien im Graphen sichtbar. Die im PIP gezeigte 80 kb lange genomische Region besitzt einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 50.3, 47.9 und 49.1% in Mensch, Maus und Ratte. Der PIP-Vergleich spiegelt die generelle Interspezies-Verwandtschaft der untersuchten genomischen Regionen aus Mensch und Maus wieder. Der Vergleich mit der Ratten-Sequenz, sofern diese in den Datendanken vorhanden war, lieferte keine zusätzlichen Informationen zum Mensch-Maus Vergleich.

Die Übereinstimmungen in den genomischen Ngb-Sequenzen umfassen vor allem sehr kurze Nukleotidabschnitte mit Identitäten zwischen 60 und 90 %. Diese werden durch Regionen unterbrochen, in denen sich repetitive Sequenzen angehäuft haben (z.B. Position 67-70 K). Neben den kurzen Übereinstimmungen findet man längere

Bereiche, deren Identität mindestens 75 % beträgt. Es handelt sich hierbei meistens um kodierende Exons. Im Bereich des Neuroglobin-Gens zeichnen sich die vier Exons durch einen sehr hohen Grad an Konservierung aus. In den Introns hingegen, sowie in den 5'- und 3'-Bereichen, einschließlich der 5'- und 3'-UTRs (untranslatierte Region), nimmt die Identität deutlich ab. Die 3'-UTR zeigt keine höhere durchschnittliche Konservierung als der unmittelbar angrenzende 3'-flankierende Bereich (beide zeigen über einen Abschnitt von 1 kb ca. 55 % Übereinstimmung). Kurze Abschnitte von Sequenzübereinstimmungen erstrecken sich über einen Bereich von ca. 500 bp aufwärts vom Translationsstartkodon ATG. Dieser Abschnitt umfasst die 5'-UTR und die putative Promotorregion. Anschließend folgt eine Region, die einige Alu- und MIR-Repeats enthält und deshalb wahrscheinlich keine regulatorischen Elemente birgt. Weitere repetitive Elemente an konservierten Positionen konnten innerhalb des *Ngb*-Gens identifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein $(GA)_n$ „simple repeat“ innerhalb des Intron 1 und um ein kurzes MIR-Element aufwärts des Exon 4. Exon 1 und ein großer Teil des ersten Introns des Neuroglobin-Gens enthalten sog. CpG-Inseln, die innerhalb einer Region mit über 50 %iger Sequenzübereinstimmung zwischen Mensch und Maus lokalisiert sind und ein weiterer Hinweis auf die minimale Promotorregion sein könnten.

Im Rahmen der durchgeführten PIP-Analysen konnten im Neuroglobin-Gen von Mensch und Maus keine Bereiche länger als 100 bp mit auffallend hohen Sequenzidentitäten identifiziert werden, die laut Literatur (Hardison et al., 1997; Loots et al., 2000) konservierte regulatorische Elemente, wie beispielsweise Enhancer oder Lokus-Kontrollelemente, enthalten könnten.

Über den Mensch-Maus-Vergleich hinaus wurden *Ngb*-Gensequenzen aus Fischen für weitere Analysen herangezogen. Deren Aminosäuresequenzen sind im Vergleich zu Säuger-Neuroglobinen zu etwa 60 % konserviert (Awenius et al., 2001). Dabei stellte sich jedoch heraus, dass ein direkter Vergleich zwischen Säugern und Fischen auf Nukleotidebene nicht sinnvoll ist, da die Sequenzidentität lediglich im Bereich der Exons zu erkennbaren Balken im PIP führte. Weder Intron- noch Intergen-Bereiche enthielten entsprechende Übereinstimmungen. Aus diesem Grund wurde mit den *Ngb*-Sequenzen der Pufferfische *T. nigroviridis* und *T. rubripes* und des Zebrafisches *D. rerio* ein separater PIP erstellt (ohne Abb.). Ein Vergleich zwischen *T. rubripes* und *D. rerio* zeigte jedoch ebenfalls eine Konservierung nur im Bereich der Exons, während weder die Introns, noch die 5'- und 3'-flankierenden Abschnitte der beiden UTRs und des Promotors Übereinstimmungen von mehr als 50 bp Länge enthielten. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der Neuroglobin-Gene der beiden Pufferfische *T.*

nigroviridis und *T. rubripes* einen so hohen Grad der Sequenzübereinstimmung, dass es unmöglich war, selektiv konservierte von neutral evolvierenden Abschnitten zu unterscheiden.

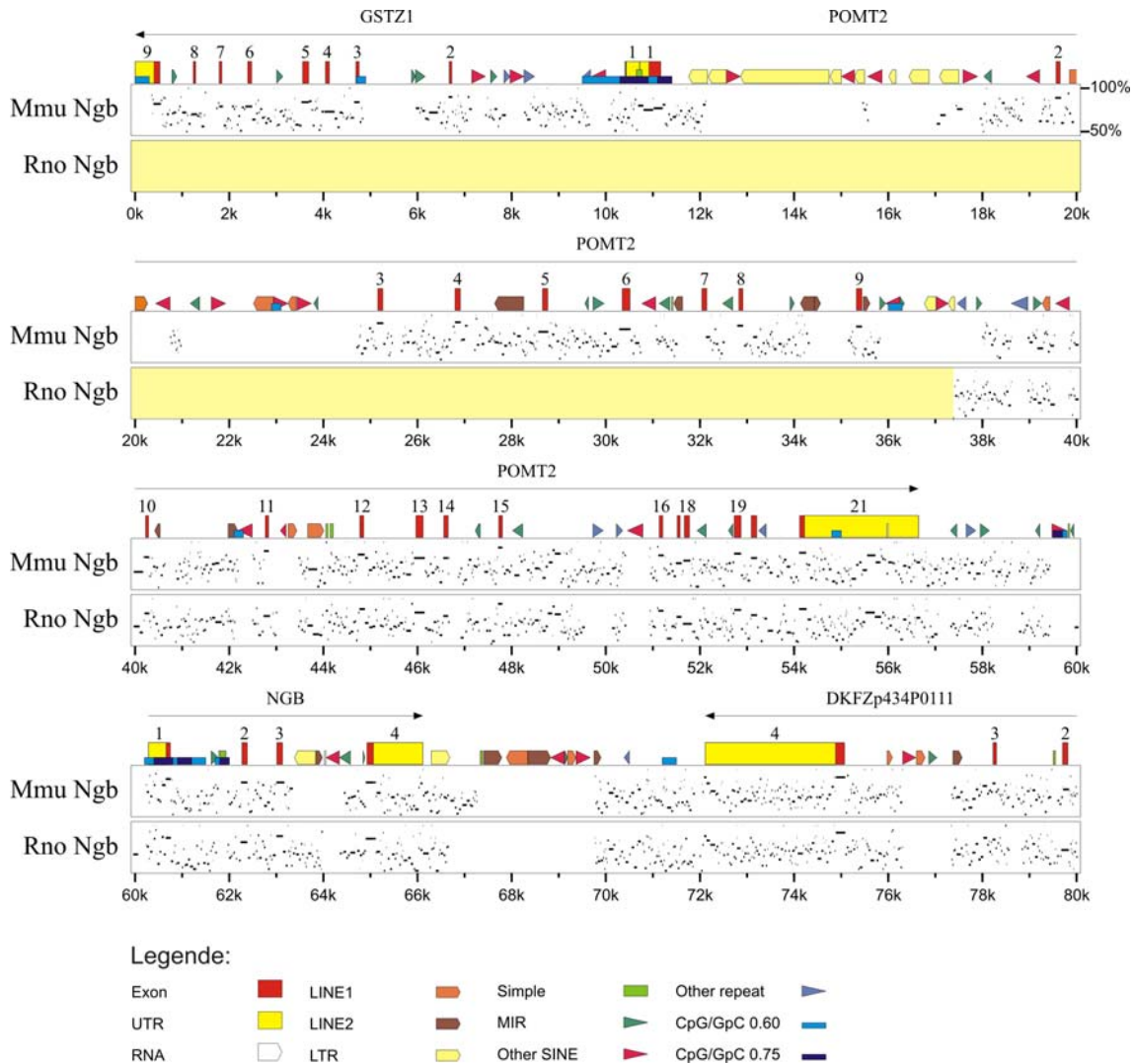


Abbildung 3-1 Der NGB/Ngb-„Percent Identity Plot“ (PIP) zeigt den Sequenzvergleich des humanen (Hsa), Maus (Mmu)- und Ratte (Rno)-Neuroglobin-Gens und der flankierenden Regionen. Die Gene und deren Orientierung sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die humane Sequenz dient als Referenz. Die Sequenzübereinstimmungen zum Maus- und Ratte-Ngb sind als Balken in der Skala zwischen 50 und 100 % sichtbar. Die entsprechenden Sequenzen wurden unmaskiert verwendet, um möglicherweise im Bereich der Repeats liegende regulatorische Elemente zu detektieren. Durch die „*chaining*“-Option sollten Anhäufungen von Alignments im Bereich der repetitiven Elemente vermieden werden. (Bildquelle: Wystub et al., 2004)

3.1.2 Mögliche regulatorische Elemente in nicht-kodierenden Sequenzbereichen des *Ngb*-Gens

Im Rahmen der komparativen PIP-Analyse der Neuroglobin-Gene aus Mensch, Maus und Ratte konnten keine langen konservierten Sequenzbereiche identifiziert werden, die mögliche regulatorische Elemente bergen könnten. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der vergleichenden Sequenzanalysen die Verteilung und die Konservierung potentieller Bindestellen für regulierende Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der Internetoptionen rVISTA und TESS, beide basierend auf der TRANSFAC-Datenbank, untersucht. Wie bereits erwähnt lag der Schwerpunkt auf der Identifizierung möglicher „*hypoxia-responsive-elements*“ (HREs) und verwandter Sequenzmotive in konservierten, nicht-kodierenden Sequenzabschnitten des Neuroglobin-Gens. Die meisten HREs wurden bisher in den 5'-Promotor und Enhancer-Regionen hypoxieregulierter Gene identifiziert (Fink et al., 2002; Lu et al., 2002; Semenza et al., 1996). Es gibt aber auch Beispiele für funktionelle HREs im 3'-UTR, wie beispielsweise beim Epo-Gen (Ebert and Bunn, 1999). HREs werden generell durch das gut konservierte konsensus-Bindemotiv für den Transkriptionsfaktor HIF-1 „*hypoxia-inducible transcription factor*“ charakterisiert (5'-RCGTG-3'; Camenisch et al., 2001). Typischerweise sind entweder zwei HIF-1 Motive (in der selben oder invertierten Orientierung) oder ein HIF-1 Motiv in Kombination mit anderen co-stimulierenden Sequenzen (z.B. EPO-Box; Semenza and Wang, 1992; „*HIF ancillary sequence*“ HAS; Kimura et al., 2001) innerhalb eines Abschnitts von ca. 50 bp angeordnet. Die oben genannten Elemente wurden zusammen mit weiteren aus der Literatur bekannten funktionellen Sequenzmotiven, die in der Hypoxie-vermittelten Genregulation eine Rolle spielen, in Tab. 3-2 zusammengefasst. Ergänzt wurde die Suche durch das Sequenzmotiv HIPBS („*hypoxia-inducible protein binding site*“), welches die mRNA diverser Hypoxie-regulierter Gene stabilisiert und dort jeweils im 3'-UTR lokalisiert wurde (Czyzyk-Krzeska and Beresh, 1996).

Mit der online-Programmooption rVISTA können konservierte, putativ regulatorische Elemente in langen genomischen Sequenzen identifiziert und visualisiert werden (Loots et al., 2002). Im Verlauf der Analysen stellte sich heraus, dass die globalen Alignments, die mit Hilfe der mVISTA-Option des Internetportals VISTA erstellt wurden, teilweise fehlerhaft platzierte Lücken in konservierten Bereichen enthielten, so dass dort enthaltene Motive nicht detektiert wurden. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Suchen ein lokales Alignment der humanen und Maus-Ngb-Sequenzen unter Verwendung der „*advanced*“-Version des PipMaker-Programms angefertigt. In

die Suchen miteinbezogen wurden die Intergenregionen bis hin zu den flankierenden Genen, so dass insgesamt ein Abschnitt von etwa 10 kb analysiert wurde. rVISTA durchsuchte entweder die komplette Referenzsequenz (Sequenz 1; Mensch) oder nur die konservierten Bereiche beider Sequenzen nach möglichen Erkennungsmotiven für Transkriptionsfaktoren und veranschaulichte das Ergebnis in einer Graphik (Abb. 3-2). Einerseits wurde dabei die TRANSFAC-Datenbank als Grundlage verwendet. Des Weiteren konnten durch Literatursuche ermittelte mögliche Erkennungssequenzen, die in TRANSFAC nicht enthalten waren (z.B. HRE), per Hand eingegeben und die Analysen somit ergänzt werden.

Bindungsstelle	Sequenzmotiv	Referenz
HRE (<u>h</u> ypoxia- <u>r</u> esponsive- <u>e</u> lement)	RCGTG (core)	Semenza et al., 1996 Camenisch et al., 2001 Fink et al., 2002 Miyazaki et al., 2002
HAS (<u>H</u> IF <u>a</u> ncillary <u>s</u> equences)	CAGGT (core)	Kimura et al., 2001
Epo-Box	CACAG	Semenza and Wang, 1992 Fink et al., 2002 Miyazaki et al., 2002
Epo-like	CACTG	Palmer and Johns, 1998
AP-1	*	Yamashita et al., 2001
CCAAT	*	Nishiyama et al., 2001
C/EBP	*	Nishiyama et al., 2001
GC-Box/ SP-1	*	Nishiyama et al., 2001
NF-1	*	Yamashita et al., 2001
NFκB	*	Glasgow et al., 2001
P300/CBP	*	Yamashita et al., 2001 Semenza, 2002
EP17	CCCCACCCCCACCCGC	Gupta et al., 2000
EP17-like	CCCCCAGCCCCA	Gupta et al., 2000
HIPBS („ <u>h</u> ypoxia- <u>i</u> nducible <u>p</u> rotein <u>b</u> inding <u>s</u> ite“)	YYCCC _n T (core)	Czyzyk-Krzeska and Beresh, 1996 Scandurro and Beckman, 1998 Yamashita et al., 2001

Tabelle 3-2 Auswahl einiger Sequenzmotive, die an der Hypoxie-induzierten Regulation bekannter Gene beteiligt sind. (*) Bindestellenmotive, die in der TRANSFAC-Datenbank eingetragen sind; (core) bezeichnet den konservierten Ausschnitt aus meist längeren, jedoch an weiteren Positionen abweichenden Erkennungssequenzen.

Im Rahmen der rVISTA-Analyse des Neuroglobin-Genbereiches aus Mensch und Maus war es nicht möglich in den beiden Spezies konservierte HREs zu identifizieren. Nicht eine einzige konservierte HIF-1-Bindestelle trat dabei zum Vorschein. Im 3'-UTR konnten hingegen perfekt konservierte HIPBS-Motive, ca. 100 bp vom Stopkodon entfernt, lokalisiert werden (Abb. 3-2 und Abb. 4-2B Diskussion). Sie sind von pyrimidinreichen Sequenzabschnitten flankiert, wie das auch von anderen Hypoxie-regulierten HIPBS-enhaltenden Genen her bekannt ist.

Zur Überprüfung unserer Analysemethode und um sicherzustellen, dass dabei tatsächlich die wichtigsten Kandidaten für regulatorische Sequenzabschnitte herausgefiltert werden, wurden entsprechende Analysen mit bereits bekannten Sequenzmotiven durchgeführt. Anhand von biochemischen Studien erwiesenermaßen funktionelle HIF-1 Bindestellen, wurden auf ihre Konservierung zwischen Mensch und Maus hin untersucht. In den Hypoxie-regulierten Genen *GAPDH*, *Eno-1*, *Epo*, *Ldh* und *VEGF* waren die definierten funktionellen HIF-1 Motive (Lu et al., 2002; Semenza et al., 1996)) perfekt konserviert. Dies stimmt mit den experimentellen Daten für den Promotor des humanen „plasminogen inhibitor-1“ (*PAI-1*)-Gens überein, die bestätigten, dass von fünf möglichen HIF-1-Bindestellen lediglich eine, die zwischen Mensch und Ratte konservierte, auch funktionell ist (Fink et al., 2002).

Ein Vergleich der *Ngb*-Promotor-Sequenzen aus Mensch und Maus führte zur Identifizierung eines vergleichsweise gut konservierten Bereichs, der möglicherweise den minimalen Promotor darstellt. Es handelt sich um eine sehr GC-reiche Region von ca. 500 bp aufwärts des Translationsstartkodons, in der durch vorangegangene RACE-Experimente kombiniert mit den cDNA-Datenbankeinträgen aus Mensch und Maus, mehrere Transkriptionsstartpunkte ausgemacht wurden (Weich, 2000). Konform hierzu ist das Fehlen einer TATA-Box zu verzeichnen, während mehrere Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 (GC-Boxen) und NF-1 in Ihrer Sequenz und Position zwischen Mensch und Maus konserviert sind. Weiterhin sind Erkennungsmotive für AP-1 in konservierten Bereichen zu finden, sowie jeweils eine Bindestelle für NF6B in Mensch und Maus, die sich allerdings an unterschiedlichen Positionen befinden. Für alle der o.g. Faktoren wurde bereits eine Funktion in der Regulation Hypoxie-induzierter Gene beschrieben, ebenso wie für das EP17 im Promotor des EPO-Gens. Ein solches Motiv konnte im Neuroglobin-Gen jedoch nicht identifiziert werden (Gupta et al., 2000).

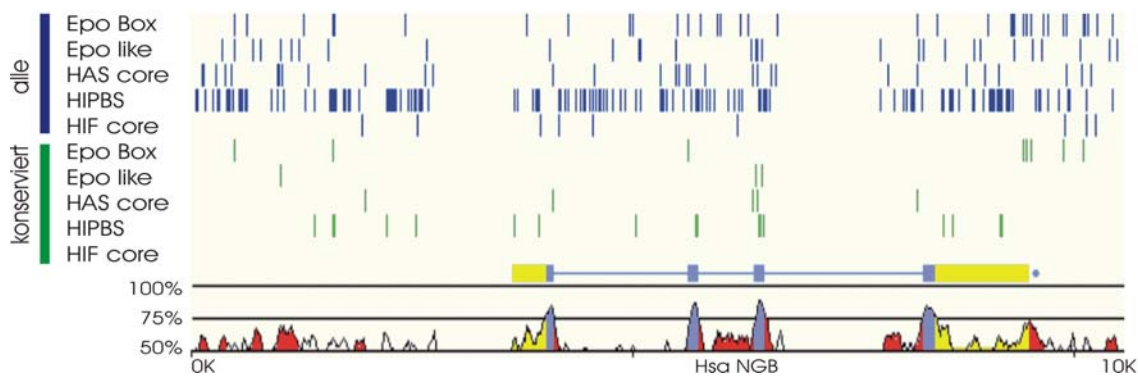


Abbildung 3-2 Graphische Darstellung der rVISTA Suchergebnisse. Oben sind alle gesuchten Motive und ihre Lage in der humanen Sequenz zu sehen. Im unteren Bereich sind nur zwischen Mensch und Maus konservierte Erkennungssequenzen eingezeichnet. Hier findet man zwar keine konservierten Bindestellen für HIF-1, dafür aber konservierte HIPBS im 3'-UTR. Parameter: core similarity: 0.9; matrix similarity: 0.85.

Da Neuroglobin vorwiegend in neuronalem Gewebe exprimiert wird, sollte der Ngb-Promotor auf die Anwesenheit entsprechender Signalsequenzen hin untersucht werden. Die hauptsächlich Neuronen-spezifische Expression zahlreicher Säugergene wird durch das so genannte NRSE („*neuron-restrictive silencer element*“) und das entsprechende Bindeprotein NRSF („*neuron-restrictive silencer factor*“) vermittelt (Schoenherr et al., 1996; Shimojo et al., 2001). Das NRSE ist ein 21 bp langes Sequenzmotiv, das innerhalb der gesamten Gensequenz sowie in flankierenden Bereichen lokalisiert und in beiden Orientierungen funktionell sein kann (Thiel et al., 1998). NRSF wird fast ausschließlich in nicht-neuronalen Zellen gebildet und inhibiert dort die Expression von NRSE-enthaltenden Genen (Schoenherr and Anderson, 1995).

Für die folgende Analyse wurde eine „*positional frequency matrix*“ (PFM) aus den Erkennungssequenzen von 16 funktionellen NRSE-Motiven und deren Homologen aus anderen Spezies, folglich aus insgesamt 36 NRSE-Motiven erstellt (Tab. 3-3). Diese diente als Basis für die mit Hilfe der Online-Programmooption MSCAN (<http://tfscan.cgb.ki.se/cgi-bin/MSCAN>) durchgeführte Suche in den menschlichen und Maus Neuroglobin-Sequenzen (AJ_245944 und AJ_580010; Tab. 3-1). Das MSCAN-Programm transformierte die PFM in eine „*positional weight matrix*“ (PWM), die zur anschließenden Sequenzanalyse verwendet wurde (Abb. 4-1). Im 5'-Bereich des menschlichen Neuroglobin-Gens konnte dabei eine gut übereinstimmende Sequenz identifiziert werden, an die NRSF möglicherweise bindet. An der entsprechenden Position in der Maus Ngb-Sequenz ist das Motiv viel schwächer ausgeprägt und konnte deshalb mit dem verwendeten Suchalgorithmus nicht detektiert werden. Andererseits existiert ein ähnlich schwach erhaltenes NRSF-Bindemotiv im Vassopressin-Gen, dessen Funktionalität bereits experimentell bestätigt werden konnte (Coulson et al.,

1999). Weiterhin wurde ein konserviertes NRSE-Motiv im Exon 2 der Neuroglobin-Sequenz aus Mensch und Maus detektiert, das jedoch eine deutlich geringere Identität der Matrix-Sequenz aufzeigt. In den als interne Kontrolle mitgeführten Sequenzen des Synapsin I- und Synaptophysin-Gens konnten die bekannten Motive problemlos mit Hilfe der angewendeten Methode mit wesentlich höheren Übereinstimmungen von $1,65e-11$ bzw. $2,92e-09$ identifiziert werden.

Gen	Spezies	<u>TTCAGCACCACGGACAGCGCC</u>	Lokal.	Fkt.
Synapsin I	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Promoter	+
	mmu	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Promoter	
	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Promoter	
Synaptophysin	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Intron I	+
	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Intron I	+
SCG10	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Promoter	+
type II sodium channel	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Promoter	+
BDNF	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Intron	+
NMDA receptor 1	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'UTR	
	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'UTR	+
	duck	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'UTR	
nicotinic AChR $\beta 2$	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'UTR	+
	mmu	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
$\beta 4$ -Tubulin	chicken	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Intron	+
middle neurofilament	chicken	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'Reg	+
GlyR $\alpha 1$	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'UTR	+
	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'UTR	+
L1	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Intron	+
atrial natriuretic peptide	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	mmu	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	3'UTR	+
	horse	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	cow	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	guinea pig	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
Calbindin	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	mmu	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	5'UTR	+
	chicken	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
GABA-A rec. δ subunit	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Intron	+/-
m4mAChR	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		+
CRH	hum	TTCAGCACCACGGACAGCGCC	Intron	+
	mmu	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	rat	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	sheep	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		
	xenopus	TTCAGCACCACGGACAGCGCC		

Tabelle 3-3 Zusammenstellung aus der Literatur bekannter funktioneller NRSE-Motive und ihrer Homologen aus verwandten Spezies. Diese Sequenzen dienen als Grundlage zur Erstellung einer „positional weight matrix“ (PWM), die für die Analyse der humanen und Maus-Ngb-Gensequenz verwendet wurde. Die Abweichungen zur obersten Konsensussequenz (Schoenherr et al. 1996) sind rot unterlegt. Das (+) in der letzten Spalte kennzeichnet die experimentell bestätigten funktionellen Motive, daneben ist ihre Lokalisation notiert.

3.2 Expressionsanalyse von Neuroglobin

Zu Beginn meiner Arbeit lagen bereits erste Daten zur Ngb-Expression in humanen und murinen Geweben in Form von RNA Northern Blot-Analysen und *in situ*-mRNA-Hybridisierungen an Maus-Gehirnschnitten vor. So konnte die Ngb-mRNA hauptsächlich in neuronalen Geweben des zentralen Nervensystems, aber auch in endokrinen Organen und Testis detektiert werden (Burmester et al., 2000). In Hinblick auf die Funktionsdiskussion eines unbekannten Proteins ist es essentiell, die Orte seiner Expression genau zu kennen. Zunächst wurde in ausführlichen *in situ*-mRNA-Hybridisierungsstudien an diversen murinen Organen die Lokalisation der Ngb-mRNA näher untersucht. Für die *in situ*-Hybridisierungen (ISH) wurden sowohl durch *in vitro*-Transkription hergestellte und markierte antisense-RNA-Sonden als auch am 3'-Ende markierte synthetische Oligonukleotide (40mere) verwendet, die identische Muster der Ngb-mRNA-Verteilung lieferten. Sobald ein entsprechender polyklonaler anti-Ngb-Antikörper (AK) zur Verfügung stand, konnten diese Studien durch immunhistochemische Nachweise des Ngb-Proteins ergänzt werden. Die Experimente wurden fast ausschließlich an perfundierten Gewebeschnitten muriner Organe durchgeführt. Ein Vergleich mit Gefrierschnitten aus frischen Geweben lieferte prinzipiell ähnliche Ergebnisse, jedoch mit deutlich mehr Hintergrundfärbung und weniger guter Gewebeerhaltung. Die Immunfärbungen (IF) wurden mit den anti-Ngb-Antikörpern (AK) TB1 und TB 5a aus Kaninchen durchgeführt (Anhang, Tab. 7-8), wobei beide ebenfalls identische Bilder lieferten. Die Spezifität der Antikörper wurde durch einen Kompetitionstest bestätigt (2.14.1). Hierfür wurde der Antikörper mit ansteigenden Mengen rekombinanten Ngb-Proteins (5-15 µg) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der anschließenden Inkubation des geblockten Antikörpers mit Maus-Gehirnschnitten konnte ab der Proteinkonzentration von 0,5 nmol eine deutliche Abschwächung der Ngb-Immunfluoreszenzen beobachtet werden, während bei der 0,75 nmolaren Konzentration des rekombinanten Proteins keine Signale mehr detektiert wurden (Abb. 3-3G).

3.2.1 Lokalisation von Neuroglobin im zentralen Nervensystem

Gehirn (Encephalon) und Rückenmark (Medulla spinalis) bilden zusammen das zentrale Nervensystem (ZNS). Um die Verteilung des Neuroglobin-Proteins im murinen Gehirn näher zu untersuchen, wurden drei Mäusehirne in 40 µm dicke Scheiben frontal in Serie geschnitten und nach der Inkubation mit einem anti-Ngb-Antikörper miteinander verglichen. Die Verteilung des Ngb-Proteins stimmte in allen drei Gehirnen überein. Weiterhin wurden 40 µm dicke Querschnitte des Rückenmarks von je zwei Mäusen und Ratten mittels indirekter Immunfärbung auf Ngb-Expression hin untersucht.

Im ZNS wurde Ngb-mRNA und -Protein fast ausschließlich in der grauen Substanz detektiert. Vereinzelt deplazierte Neurone in der weißen Substanz, die hauptsächlich aus Fortsätzen der Nervenzellen gebildet wird, enthielten ebenfalls Neuroglobin. Die rein cytoplasmatischen Signale wurden nicht nur in den Perikaryen, sondern auch in den Fortsätzen von Neuronen detektiert. Sowohl in den vergleichsweise kurzen Dendriten, als auch den langen Neuriten (Axonen) konnte Ngb-mRNA und -Protein identifiziert werden. Demgegenüber wurde weder im Zellkern der Neurone, noch in Gliazellen Neuroglobin nachgewiesen. Die meisten, aber nicht alle Neurone im Gehirn waren Ngb-positiv. Zudem war eine Variabilität der Signalstärken in Neuronen jeweils innerhalb derselben Hirnregionen sowie zwischen verschiedenen Hirnbereichen zu verzeichnen, was ein Hinweis auf eine differentielle Expression des Neuroglobins im Maus-Gehirn sein könnte.

In der **Großhirnrinde** (*Cortex cerebri*, cerebraler Cortex) konnte Neuroglobin in den Laminae II-VI lokalisiert werden, wobei die Expression in den funktionell unterschiedlichen Bereichen, wie z.B. im motorischen im Vergleich zum sensorischen oder olfaktorischen Cortex, keinen erkennbaren Variationen unterlag (Abb. 3-3 D-F). Die Ngb-IF-Signale im cerebralen Cortex konnten im Rahmen des Kompetitionstests vollständig geblockt werden (Abb. 3-3 G).

Im *Bulbus olfactorius* des **Vorderhirns** (*Telencephalon*) war eine intensive Färbung der periglomerulären Neurone, der Neurone in der Mitral- und der Körnerzellschicht sowie im lateralen olfaktorischen Nucleus zu sehen, während in den Glomeruli kein Neuroglobin exprimiert wurde (Abb. 3-3 A-C).

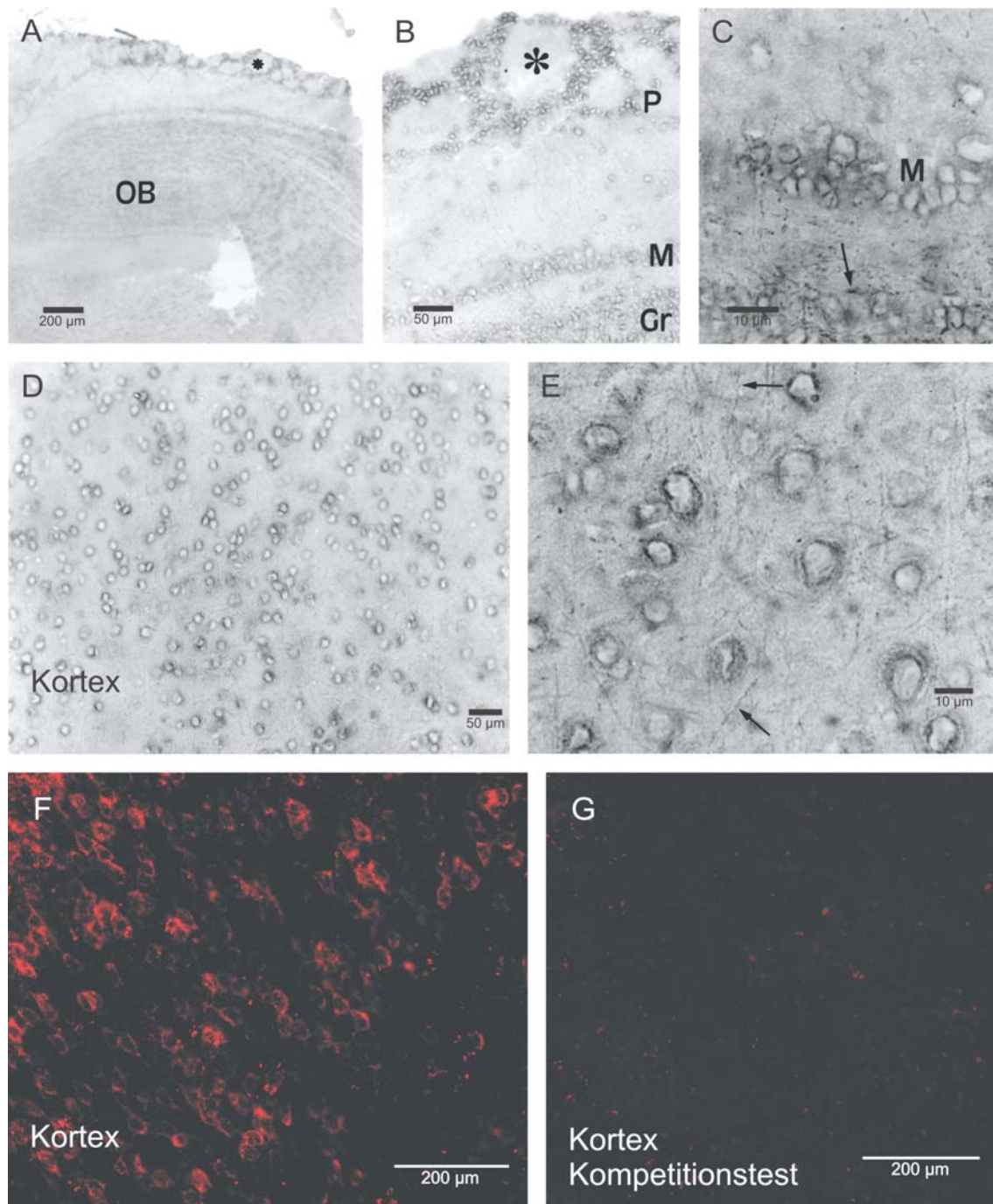


Abbildung 3-3 NgB-ISH und IF-Signale im Maus-Vorderhirn. In den periglomerulären Zellen (P) sowie in Neuronen der Mitral- (M) und Körnerzellschicht (Granula, G) des *Bulbus olfactorius* (olfactory bulb; OB; A-C) wurden NgB-mRNA-Signale detektiert, während die Glomeruli (*) keine Färbung zeigten. Im cerebralen Cortex konnte in allen Zellschichten NgB-mRNA (D, E) und Protein (F) nachgewiesen werden. In höherer Vergrößerung (B, C) ist die cytoplasmatische Färbung der Nervenzellen sowie ihrer Fortsätze zu erkennen (Pfeil). Nach der Präinkubation des Antikörpers mit rekombinantem NgB-Protein konnten keine NgB-Signale im Maus-Gehirn mehr detektiert werden (G).

In den subkortikalen Regionen waren vergleichsweise starke Signale im Hippocampus, sowohl in den Pyramidenzellen der Formationen CA1 bis CA4 (*Cornu ammonis*, Ammonshorn) als auch in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (*Dentate gyrus*, DG) zu verzeichnen (Abb. 3-4). Der Hippocampus stellt ein wichtiges Zentrum des limbischen Systems dar, das unter anderem bei Lernvorgängen und für die Gedächtniskonsolidierung von Bedeutung ist. Auch im Striatum (*Corpus striatum*) und in der Amygdala (*Corpus amygdaloideum*; Mandelkern) wurde Neuroglobin detektiert. Das Striatum als Teil der sog. Basalganglien umfasst die Kerngebiete *Putamen* und *Nucleus caudatus* und hat eine wichtige Funktion bei der Steuerung motorischer Funktionen. Die Amygdala ist neben dem Hippocampus als ein weiteres bedeutendes Zentrum des limbischen Systems verantwortlich für die Stabilisierung der Gemütslage und ist des Weiteren eine wichtige Schnittstelle für das Agressions- und Sozialverhalten.

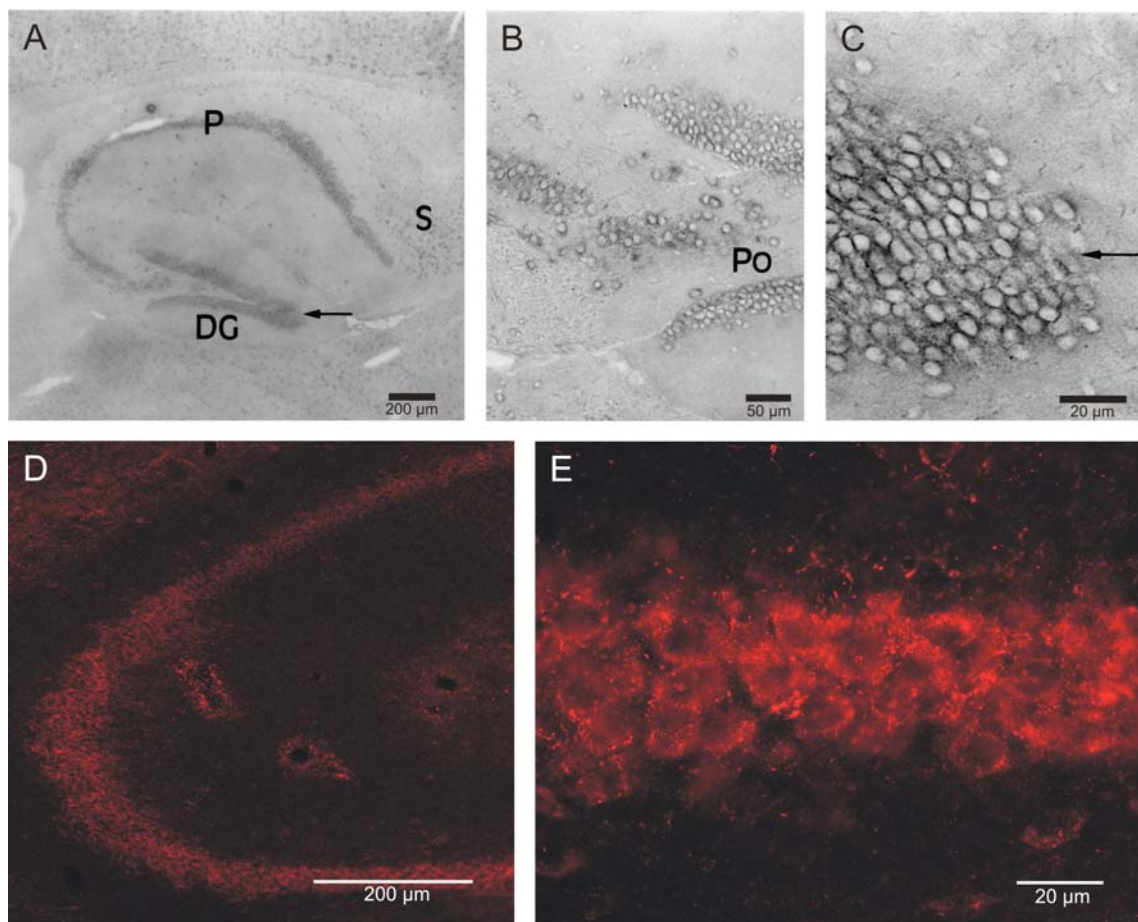


Abbildung 3-4 Ngb-mRNA und Protein im Hippocampus. Im Hippocampus war eine intensive Ngb-mRNA-Färbung (A-C) sowie Protein-Immunreaktivität (D, E) in den Pyramidenzellen (P) der Bereiche CA1 bis CA, in den Körnerzellen des Gyrus dentatus (*Dentate gyrus*, DG) sowie in Zellen des Subiculum (S) zu sehen. In vergrößerter Ansicht (B) ist die Färbung der polymorphen Zellschichten (Po) und (C) das caudale Ende des DG (Pfeil) sowie die cytoplasmatischen IF-Signale in den Pyramidenzellen (E).

In Neuronen des **Zwischenhirns** (*Diencephalon*) wurde ebenfalls starke bis mäßige Ngb-mRNA- und Proteinexpression detektiert. Der Thalamus ist eine wichtige Schaltstelle für motorische und sensorische Bahnen. Der ventral liegende Hypothalamus nimmt mit seinen neurosekretorischen Zentren zusammen mit der Hypophyse (Hirnanhangdrüse) wichtige homöostatische Funktionen im Organismus wahr, wie die Regulation des Wasser- und Ionenhaushaltes, der Körpertemperatur etc. Vom Hypothalamus werden auch wichtige Verhaltensweisen, wie beispielsweise Fress-, Abwehr- und Sexualverhalten, gesteuert. Hier exprimierten zahlreiche Regionen wie z.B. der *Ncl. suprachiasmaticus* (SCN), *Ncl. supraopticus*, *Ncl. paraventricularis* (PVN) und der *Ncl. arcuatus* (Regulation der Nahrungsaufnahme) sowie das Subfornikalorgan (*Organum subfornicale*) des dritten Ventrikels (regelnde Tätigkeit im Liquorhaushalt), Neuroglobin-mRNA und -Protein.

Zahlreiche Strukturen im **Hirnstamm** zeigten starke immunreaktive Färbungen des Cytoplasmas ihrer Neurone. Der Hirnstamm setzt sich zusammen aus dem Mittelhirn (*Mesencephalon*), dem Pons des Hinterhirns (*Metencephalon*) und der *Medulla oblongata* (verlängertes Mark). Er erstreckt sich zwischen *Diencephalon* (Zwischenhirn) und *Medulla spinalis* (Rückenmark).

Im Bereich des Mittelhirns konnten Ngb-Signale in den *Colliculi inferiores* (unterer Reflexbogen; akustische Zentren) und *Colliculi superiores* (Tectum; oberer Reflexbogen; optische Fasern) identifiziert werden. Weiterhin exprimierten Neurone des *Ncl. mesencephalicus nervi trigemini* und u.a. in der *Pars reticulata* der *Substantia nigra* Neuroglobin.

Im unteren Bereich des Hirnstamms, des *Pons* (Brückenhirn) und im verlängerten Rückenmark, zeigten weitere Bereiche, beispielsweise die Kerne der oberen Olive (*Nucleus olivaris superior*) (Abb. 3-5 A und C) und des Gesichtsnervs (*Nucleus nervi facialis*) (Abb. 3-5 B und D), der *Ncl. paragigantocellularis* (LP) sowie die laterale *Formatio reticularis* (LRt) Neuroglobin-Expression (Abb. 3-5 A). Die *Formatio reticularis*, die eine eher diffuse Lokalisation im Hirnstamm aufweist, erhält Kollateralen von sensorischen Projektionsbahnen und spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Wachheit und Aufmerksamkeit. Auch zahlreiche weitere Brückenkerne (*Nuclei pontis*) zeigten intensive Ngb-Färbung. Hier findet die Verschaltung von Neuronen aus den Großhirnhemisphären zum Kleinhirn statt. Einige dieser Neurone zeigten Signale außerordentlicher Intensität.

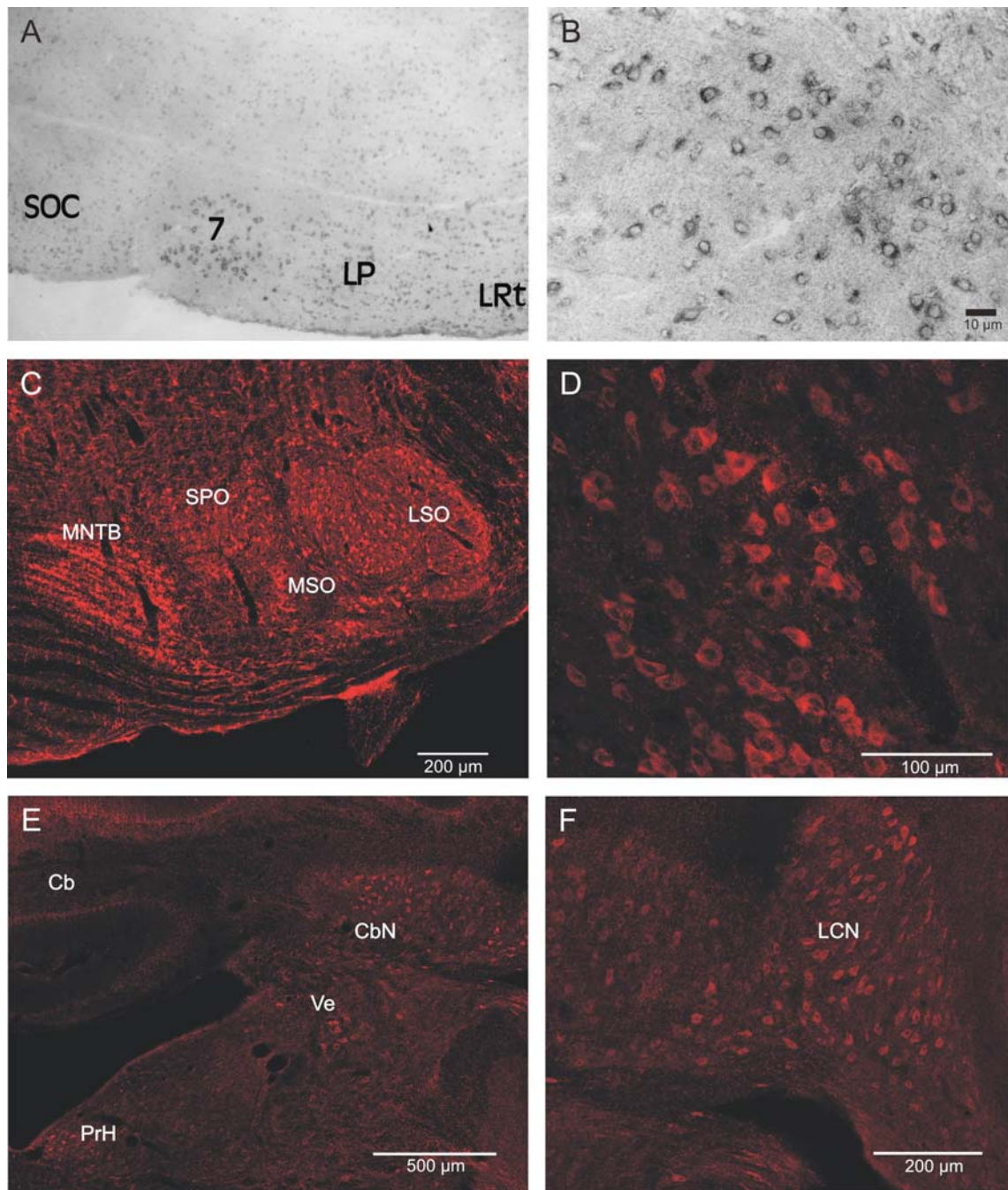


Abbildung 3-5 NgB-Signale im Hirnstamm. NgB-ISH- (A, B) und IF-Signale (C-F) wurden in zahlreichen Kernen des Hirnstamms, wie z.B. im oberen Olivenkomplex (SOC), im lateralen *Ncl. paragigantocellularis* (LP) und in der lateralen *Formatio reticularis* (LRt) (A) detektiert. Kerne des oberen Olivenkomplexes (C), u.a. die mediale und laterale superiore (obere) Olive (MSO, LSO), der superiore Paraolivenkern (SPO), der ventrale Paraolivenkern (VPO) und der mediale Ncl. des Trapezkörpers (*Ncl. corporis trapezoidei*, MNTB) exprimierten intensive NgB-mRNA- und IF-Signale. Auch die Kerne des Gesichtsnervs wiesen starke NgB-Immunfärbung auf (B, D). Weitere Strukturen des dorsalen Hirnstamms, wie *Nucleus hypoglossus* (prepositus hypoglossus; PrH) sowie die vestibulären (Ve) und lateralen Kleinhirnkern (*Nucl. cerebellaris*; LCN) zeigten NgB-IF-Signale (E, F).

Im **Kleinhirn** (*Cerebellum*; dorsaler Teil des Metencephalons) waren intensive Signale der Ngb-mRNA in den Zellkörpern und Fortsätzen der Purkinje-Zellen sowie in den kleinen Neuronen der Körnerzellschicht zu verzeichnen (Abb. 3-6 A, B). Dagegen zeigten nur wenige Neurone in der äußeren Molekularschicht, die überwiegend aus Stern- und Korbzellen (Interneurone) sowie den Dendriten der Purkinje-Zellen gebildet wird, Färbung. Das Protein konnte vor allem in den Somata der Purkinje-Zellen, deren weit reichende Dendritenbäume sich im *Striatum moleculare* erstrecken, lokalisiert werden (Abb. 3-6 B, D).

In Querschnitten des **Rückenmarks** waren fast alle Neurone der grauen Substanz gefärbt. Sowohl die großen somatomotorischen Neurone im Vorderhorn (*ventral horn*, VH) als auch die deutlich kleineren Somata der Schaltneurone im Hinterhorn (*dorsal horn*; DH), auf die sensorische Neurone projizieren, zeigten intensive Neuroglobin-Signale, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Eindeutige Signale waren auch in den Fortsätzen dieser Zellen erkennbar (Abb. 3-7).

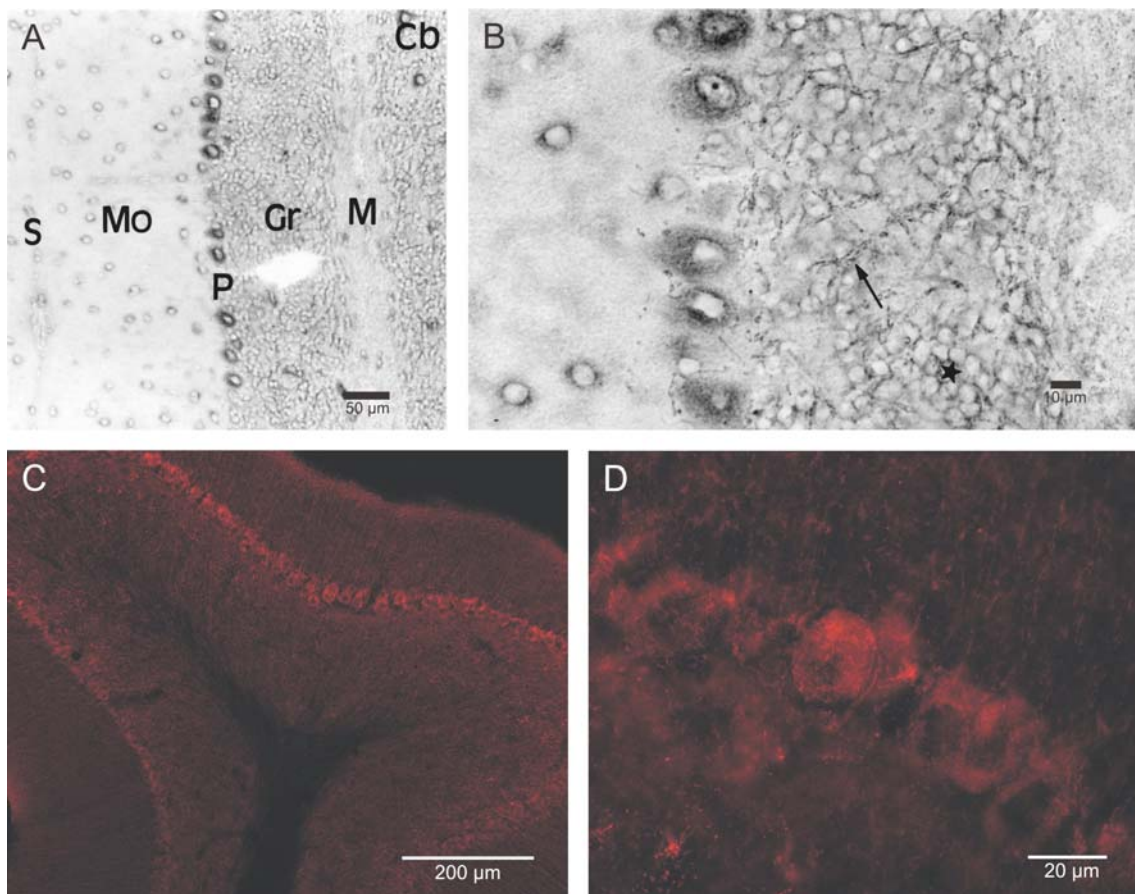


Abbildung 3-6 Ngb-Nachweis im Kleinhirn. Frontalschnitte eines Mausgehirns im Bereich des Kleinhirns zeigten Ngb-mRNA (A, B) und IF-Signale (C, D) in der Körnerzellschicht (*granula layer*, Gr) und in der Molekularschicht (Mo), unterdessen blieb die Markregion (Medulla, M) ungefärbt. Die stärksten Ngb-ISH- und Immunreaktivitäten konnten in Purkinje-Zellen und deren Fortsätzen (Pfeil) detektiert werden.

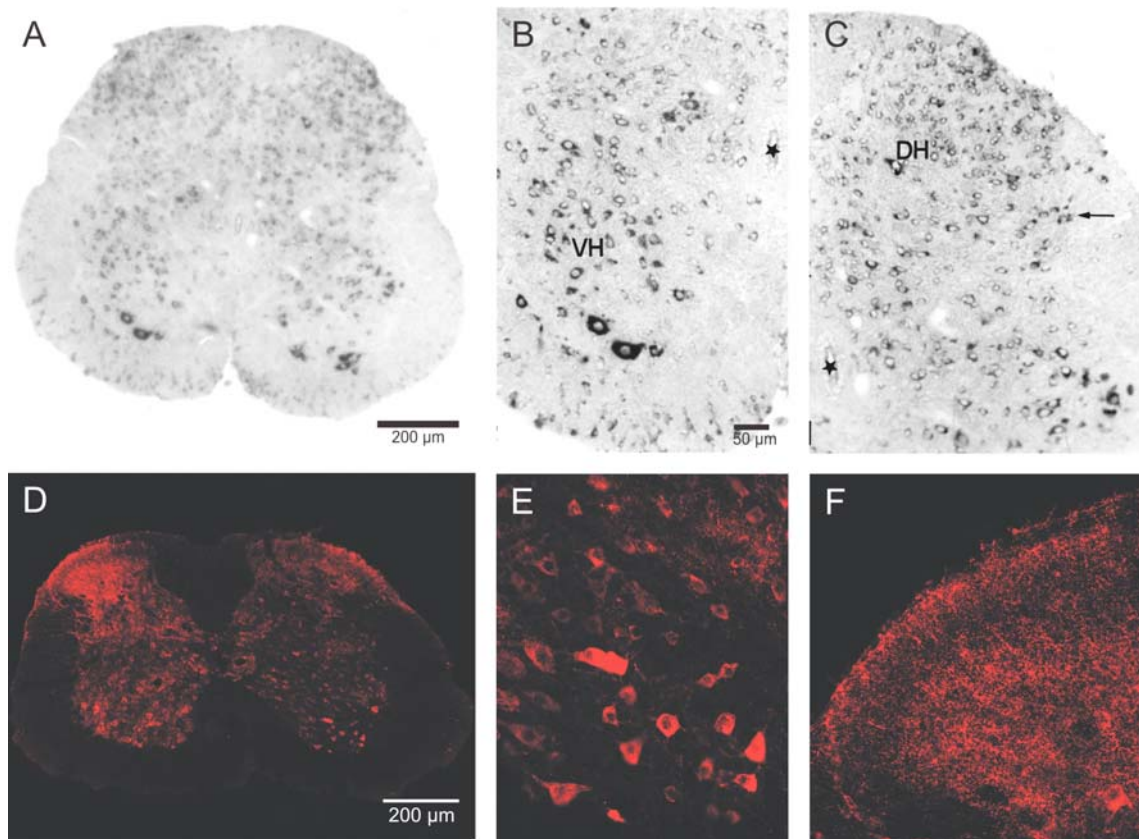


Abbildung 3-7 Ngf-Detektion im Rückenmark. Querschnitte des Maus-Rückenmarks zeigten Ngf-mRNA (A-C) und IF-Signale (D-E) in der gesamten grauen Substanz. Sowohl die den Zentralkanal (*) umgebenden Neurone (B, C) als auch die Nervenzellen im Vorderhorn (VH; B, E) und Hinterhorn (DH; C) sowie die zahlreichen Ausläufer im Hinterhorn (F) waren intensiv gefärbt.

Ferner wurde im Rahmen der detaillierten Analyse der Ngf-IF-Signale anhand von seriellen Maus-Gehirnschnitten beobachtet, dass oft in der Nähe von Blutgefäßen, die sich als dunkle Hohlräume deutlich vom Hintergrund abheben, vermehrt intensiv gefärbte Ngf-haltige Neurone zu finden sind. Zudem werden manche Blutgefäße im Gehirn von einem dichten Netz aus neuronalen Fortsätzen umgeben, die große Mengen Ngf enthielten (Abb. 3-8).

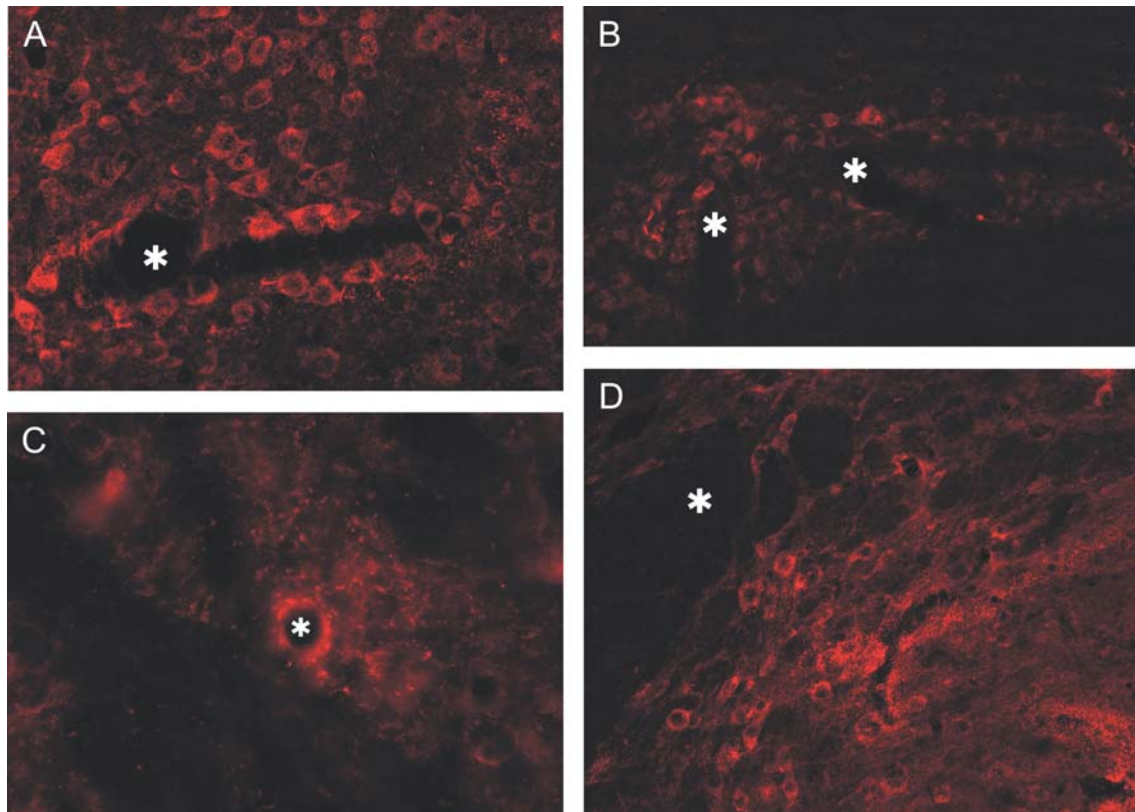


Abbildung 3-8 Ngb-IF-Signale in der Nähe von Blutgefäßen. Ansammlungen von intensiv gefärbten Neuronen (A, B, D) und Fortsätzen (C) in der unmittelbaren Umgebung von Kapillaren (*).

3.2.2 Neuroglobin im peripheren Nervensystem und endokrinen Geweben

Neuroglobin-mRNA und Protein wurden außerdem in sensorischen Ganglien detektiert. Sowohl im *Ganglion trigeminale* als auch in den Hinterwurzelganglien (*dorsal root ganglion*; DRG), in denen die Zellkörper der afferenten Nervenzellen lokalisiert sind, konnte Ngb nachgewiesen werden. Im Trigeminalganglion war so gut wie jedes neuronale Perikaryon sehr intensiv gefärbt, während in den Faserregionen zwischen den Neuronen fast kein Ngb detektiert wurde (Abb. 3-9 A-E). In den DRG zeigten ebenfalls fast alle Neurone sehr intensive Ngb-Signale, wobei hier auch die Fortsätze sichtbar gefärbt waren (Abb. 3-9 F, G).

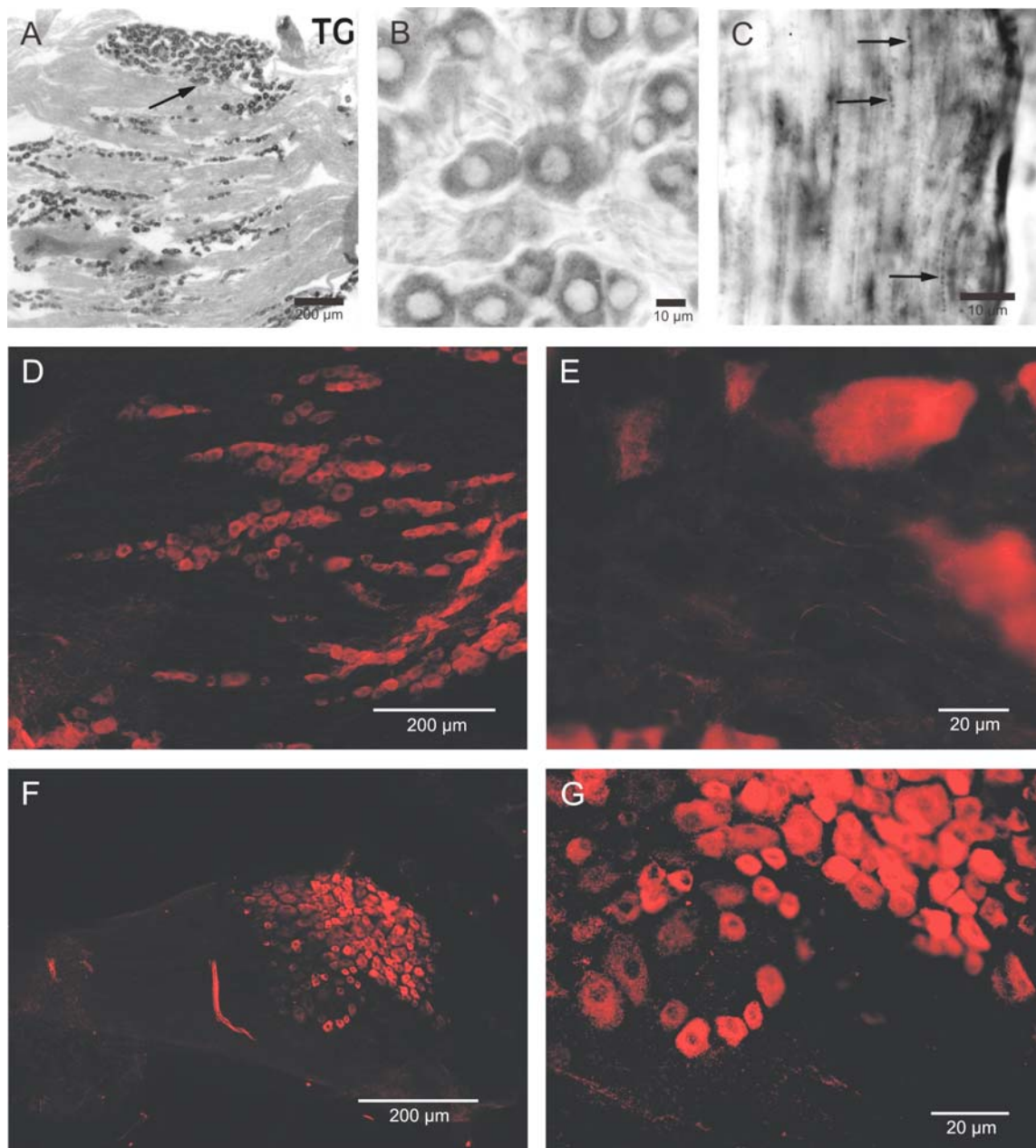


Abbildung 3-9 NgB-Signale in sensorischen Ganglien. Im Trigeminalganglion (TG) wurden cytoplasmatische Signale in Neuronen, sowie deutlich schwächere Signale in den Fortsätzen (Pfeile) detektiert (A-E). Im Hinterwurzelganglion (DRG) konnten sowohl in den Perikaryen wie auch in den Fortsätzen der Neurone intensive NgB-IF-Signale nachgewiesen werden (F, G).

Weiterhin exprimierte das sympathische *Ganglion cervicale superius* (SCG) der Ratte sowie intramurale Ganglien aus verschiedenen Abschnitten des murinen Gastrointestinaltraktes Neuroglobin. Das enterische Nervensystem (Darmnervensystem) besitzt in etwa so viele Neurone wie das Rückenmark (10^8) und ist dafür zuständig, dass der Magen-Darm-Trakt autonom funktionieren kann. Es

besteht aus zwei Nervengeflechten in den Wänden (intramural) des Verdauungstraktes: *Plexus myentericus* (Auerbach-Plexus) zwischen der Längs- und der Ringmuskulatur und *Plexus submucosus* (Meissner-Plexus) in der Submucosa. Anhand von Querschnitten von Ösophagus sowie Dünn- und Dickdarm von Maus und Ratte konnte das Ngb-Signal in Neuronen des enterischen Nervensystems lokalisiert werden, wie in Abb. 3-10 am Beispiel von Dickdarm (*Colon*) dargestellt. Sowohl die Neurone des Auerbach'schen Plexus als auch die des Meissner'schen Plexus zeigten intensive Ngb-Färbung auf mRNA- und Proteinebene. Zusätzlich war ein weiterer Zelltyp, vermutlich enteroendokrine Zellen, in der Darmschleimhaut (*Mucosa*) gefärbt.

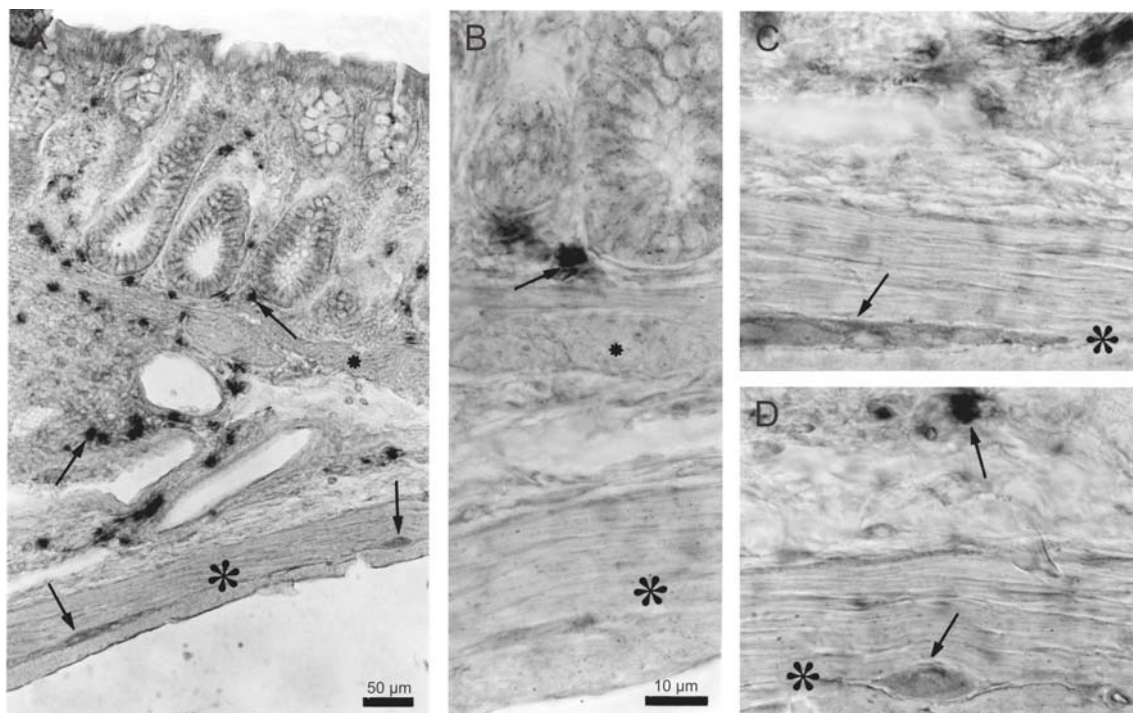


Abbildung 3-10 Neuroglobin im PNS. In Dickdarm-Querschnitten aus Ratte konnte mRNA-Ngb-Färbung in den Ganglienzellen des Auerbach'schen Plexus (Pfeile in A, C, D) zwischen der Ring- und Längsmuskulatur (*) sowie in den Neuronen des Meissner'schen Plexus detektiert werden. Zudem zeigte ein weiterer Zelltyp Ngb-Signale, dabei handelt es sich wahrscheinlich um enteroendokrine Zellen der Darmschleimhaut (Pfeil in B).

Aus dem endokrinen System wurde die Hypophyse, das Pinealorgan (Zirbeldrüse) und die Nebenniere aus Maus und Ratte sowie Maus-Testis untersucht. Es wurden keine Unterschiede in der Ngb-Expression zwischen Maus und Ratte festgestellt.

Im **Testis** beschränkten sich die Ngb-Signale auf die Spermatogonien und möglicherweise primäre Spermatocyten in den äußeren Regionen der Tubuli (Abb. 3-

11 A-D).

In der **Hypophyse** (*Glandula pituitaria*, Hirnanhangdrüse) war Ngb-Expression in den endokrinen Zellen der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) sichtbar, während in der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) keine Signale sichtbar waren (Abb. 3-12 A-C).

In der **Nebeniere** (*Glandula suprarenalis*) wurden Signale sowohl im Cortex als auch in der *Medulla* identifiziert. Zellen der kortikalen *Zona glomerulosa*, direkt unterhalb der Kapsel, zeigten intensive Ngb-Färbung, während Zellen in der *Zona fasciculata* und die der *Zona reticularis* selten oder gar nicht gefärbt waren (Abb. 3-12 D, E).

Im **Pinealorgan** (*Epiphyse*; Zirbeldrüse) konnte Ngb-Protein in den parenchymalen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-12 F, G).

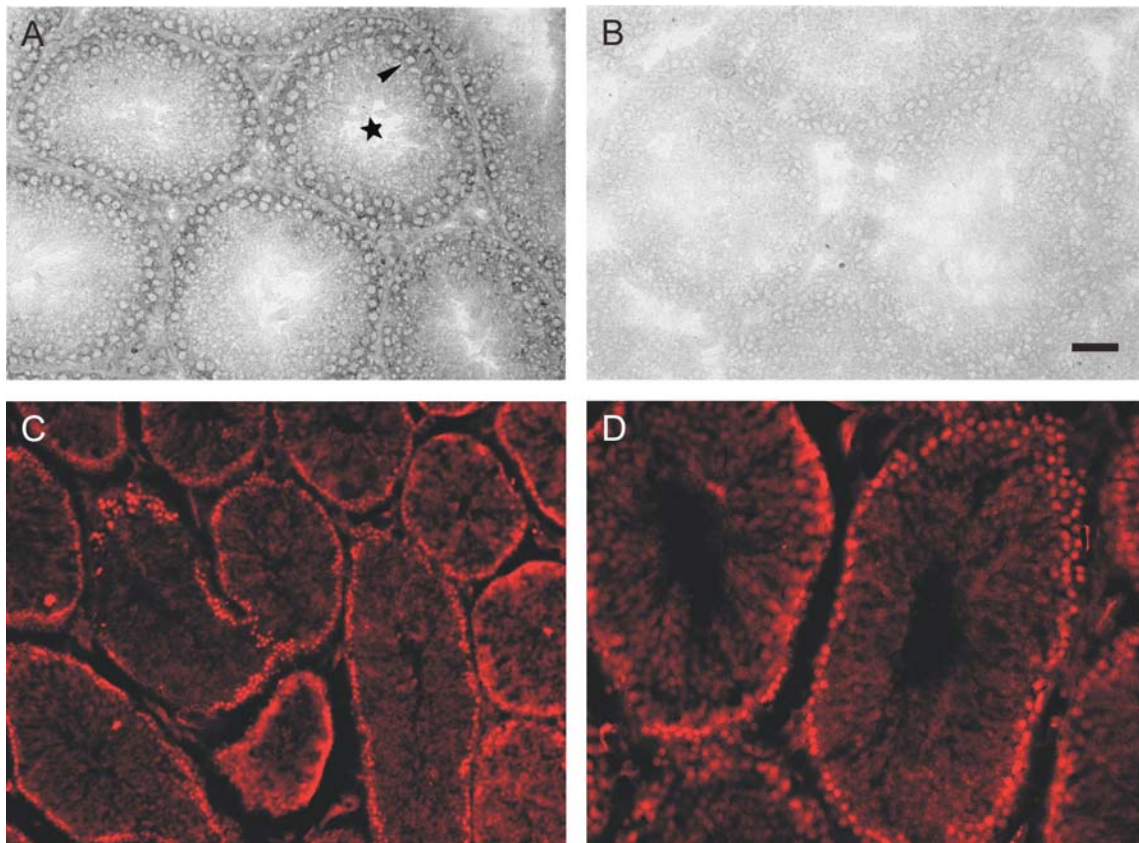


Abbildung 3-11 Ngb-Signale im Maus-Testis. Ngb-mRNA (A) und Protein (C, D) konnte in den zwei äußeren Schichten der Tubuli identifiziert werden, in denen die Spermatogonien und primären Spermatocyten lokalisiert sind. Nach einer Inkubation mit Ngb-sense-RNA wurden keine ISH-Signale im Testis detektiert (B).

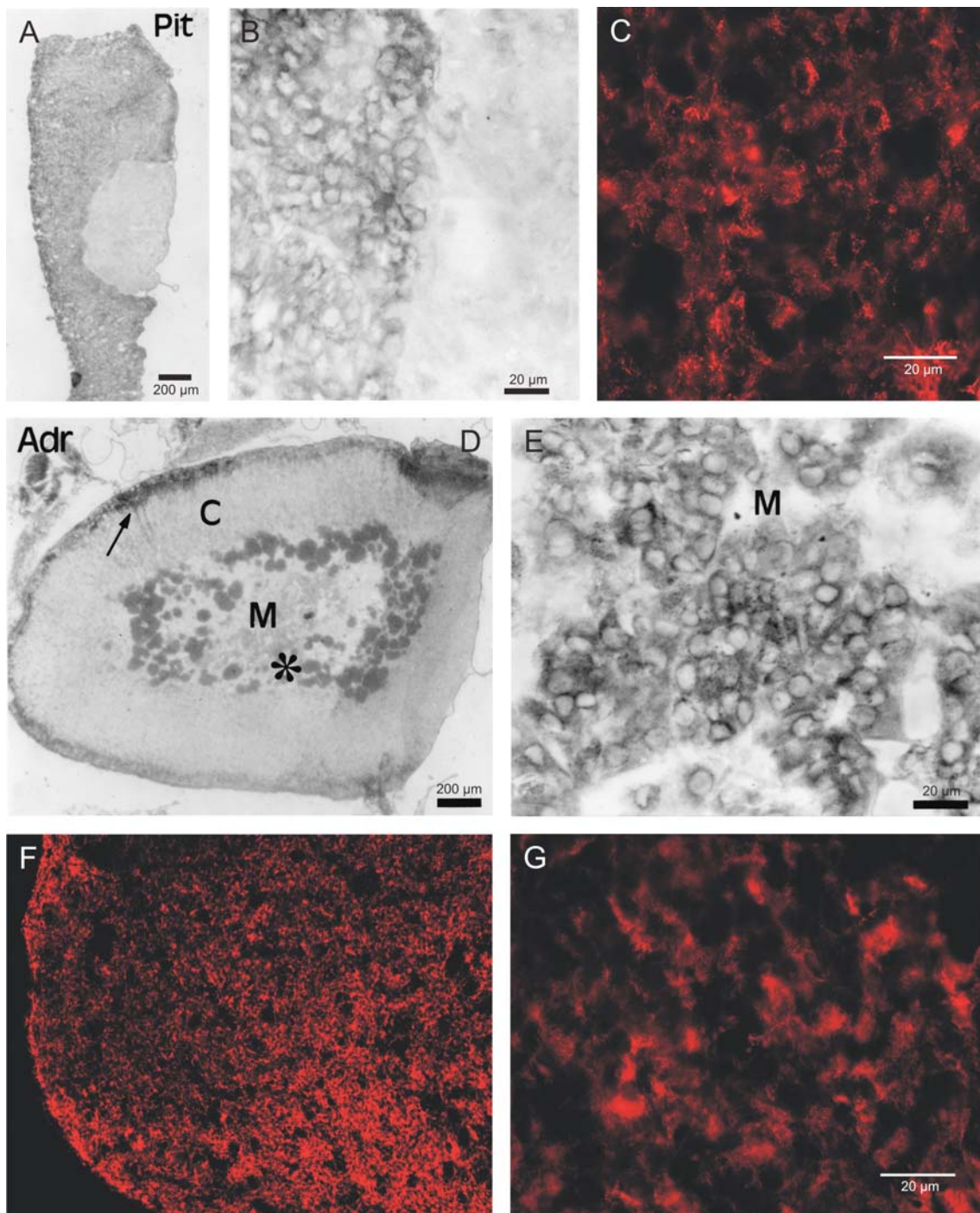


Abbildung 3-12 Ngb-Expression in endokrinen Geweben. Querschnitte aus Maus Hypophyse (*pituitary gland*, Pit; A-C), Nebenniere (*adrenal gland*, Adr; D, E) und dem Pinealorgan (PO; F, G), die mit antisense-RNA (A, B, D, E) bzw. mit anti-Ngb-AK inkubiert wurden. In der Neurohypophyse (A und B rechts) wurde keine Ngb-mRNA detektiert, während in der Adenohypophyse Ngb-Signale sowohl auf mRNA-Ebene (A und B links) wie auch auf Proteinebene (C) identifiziert werden konnten. In der Nebenniere wurde Ngb-mRNA im Mark (*Medulla*, M; D, E) und im Cortex (C), vor allem in der äußeren Zona glomerulosa (Pfeil) detektiert. Fettzellen zwischen Medulla und Cortex lieferten unspezifische ISH-Signale (*). Parenchymale Zellen des Pinealorgans (PO) zeigten intensive Ngb-Immunfärbung (F, G).

3.2.3 Co-Lokalisation von Ngb und nNOS

In Hinblick auf die hypothetische Funktion des Neuroglobins im NO-Stoffwechsel wurde in Doppelmarkierungsexperimenten die eventuelle Co-Lokalisation des Ngbs mit der neuronalen NO-Synthase untersucht. Hierfür wurden Maus-Gehirnschnitte mit anti-Ngb und einem anti-nNOS-Antikörper aus Schaf co-inkubiert und anschließend mit zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3 und Cy2) tragenden sekundären Antikörpern detektiert. In den meisten Gehirnbereichen überstieg die Anzahl der Ngb-exprimierenden Zellen deutlich die der nNOS-exprimierenden Neurone (Abb.3-13 A-F), bis auf wenige Ausnahmen wie z.B im medialen Nucleus des Trapezkörpers im oberen Olivenkomplex wo der umgekehrte Fall eintrat (Abb.3-13 G-I). Anhand der durchgeführten Analysen lässt sich deshalb eine durchgängige Co-Expression beider Proteine im Maus-Gehirn in jedem Fall ausschließen.

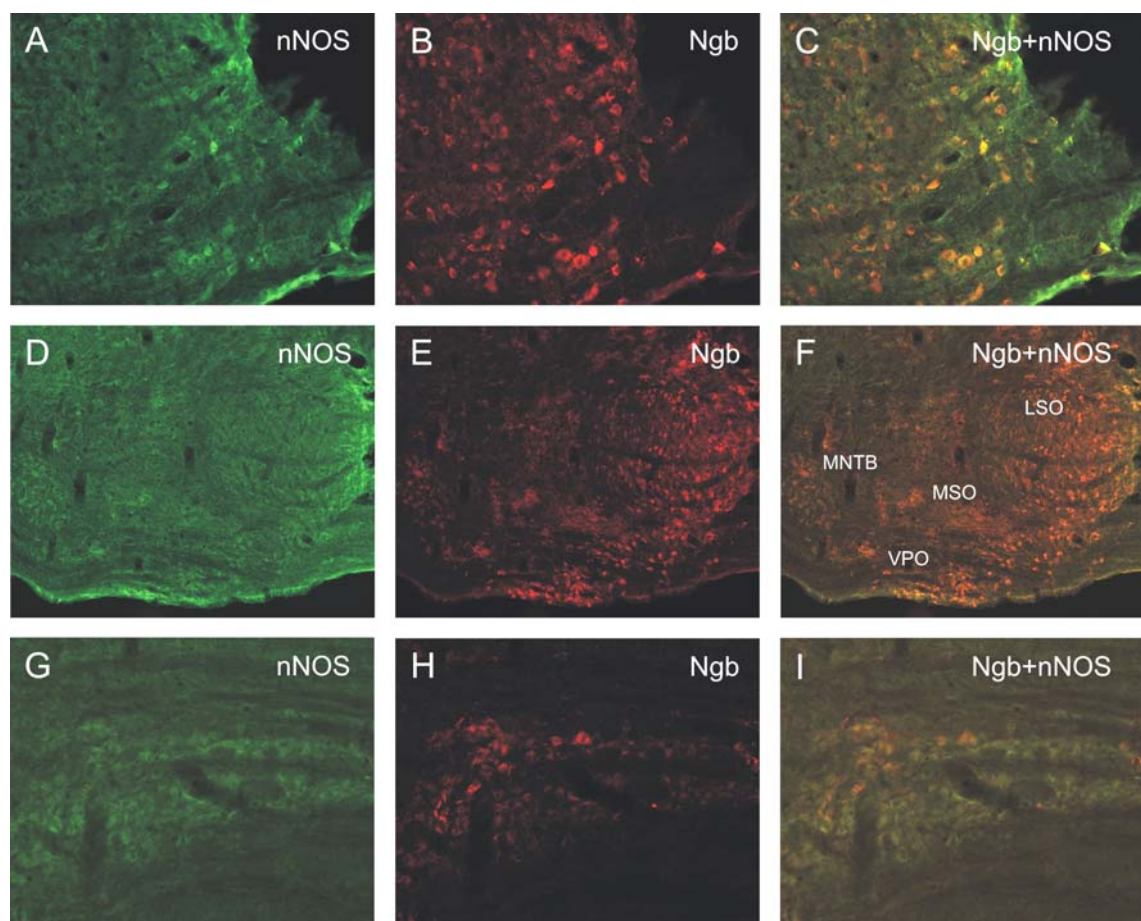


Abbildung 3-13 Co-Lokalisation von Ngb mit nNOS. Die nNOS- und Ngb-immunreaktiven Zellen heben sich deutlich vom Hintergrund ab, wobei ihre Expressionsmuster keineswegs deckungsgleich sind. In manchen Hirnregionen sind deutlich mehr Ngb-Signale erkennbar, wie am Beispiel des Hirnstamms und des oberen Olivenkomplexes in Abbildungen A bis F zu sehen ist, während in anderen, wie beispielsweise im medialen Ncl. des Trapezkörpers die Anzahl der nNOS-positiven Zellen überwiegt (G-H).

3.3 Expressionsanalyse von Cytoglobin

Anhand von Northern Blot-Analysen wurde eine ubiquitäre Expression der Cytoglobin-mRNA in zahlreichen Säugergeweben detektiert (Burmester et al., 2002; Trent and Hargrove, 2002). Neben den besonders intensiven Signalen in Herz, Lunge, Magen und Darm, wurde das Cytoglobin (Cygb) dabei auch im Gehirn nachgewiesen. Ähnlich wie beim Neuroglobin ist die Funktion des Cytoglobins noch ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus diesem Grund eine detaillierte Analyse der zellulären und subzellulären Verteilung des Cygb-Proteins im Maus-Gehirn durchgeführt. Die Immunfärbungen wurden an 40 µm dicken Frontalschnitten von perfundierten Maus-Gehirnen durchgeführt. Insgesamt wurden vier verschiedene polyklonale anti-Cygb-Antikörper aus Kaninchen verwendet (Anhang, Tab.7-8). Drei der Antikörper (anti-Cygb1-3) lieferten identische Ergebnisse, während der vierte (anti-Cygb4) keine spezifischen Signale lieferte. Die Spezifität der Antikörper wurde mittels eines Kompetitionstests überprüft. Hierbei wurde die Antikörperverschüttung mit steigenden Mengen rekombinanten Cygb-Proteins (5-15 µg) präadsorbiert, bevor Maus-Gehirnschnitte damit inkubiert wurden. Ab einer Proteinkonzentration von 0,5 nmol waren nach der AK-Inkubation keine Immunfluoreszenzsignale mehr auf den Gewebeschnitten sichtbar.

3.3.1 Lokalisation von Cytoglobin im zentralen Nervensystem (ZNS)

Um die Verteilung des Cytoglobin-Proteins im murinen Gehirn zu analysieren, wurden drei perfundierte Mäusehirne in 40 µm dicke Scheiben frontal in Serie geschnitten und nach der Inkubation mit den anti-Cygb-Antikörpern miteinander verglichen. Im Gegensatz zur ubiquitären Ngb-Verteilung im Maus-Gehirn wurde das Cytoglobin in distinkten Zellpopulationen in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems detektiert. Die Immunfluoreszenz-Signale variierten in ihrer Intensität von schwach (gerade über dem Hintergrund) bis hin zu sehr stark. Innerhalb einer bestimmten Region waren die Signale zwischen einzelnen Individuen identisch, d.h. es waren mit der angewendeten Methode weder Unterschiede in der Cygb-Verteilung noch in den Intensitäten der Färbung detektierbar. Überdies wurden zwischen weiblichen und männlichen Gehirnen keine Unterschiede festgestellt. Die Cygb-Signale waren sowohl in den Zellsomata als auch in den Ausläufern von Neuronen sichtbar. Die Morphologie

der Cygb-exprimierenden Zellen erstreckte sich von großen Neuronen mit langen, intensiv gefärbten verzweigten und unverzweigten Fortsätzen bis hin zu kleinen Zellen, deren Ausläufer keine detektierbaren Proteinmengen aufwiesen, was darauf hindeutet, dass unterschiedliche Typen von neuronalen Zellen Cytoglobin produzieren.

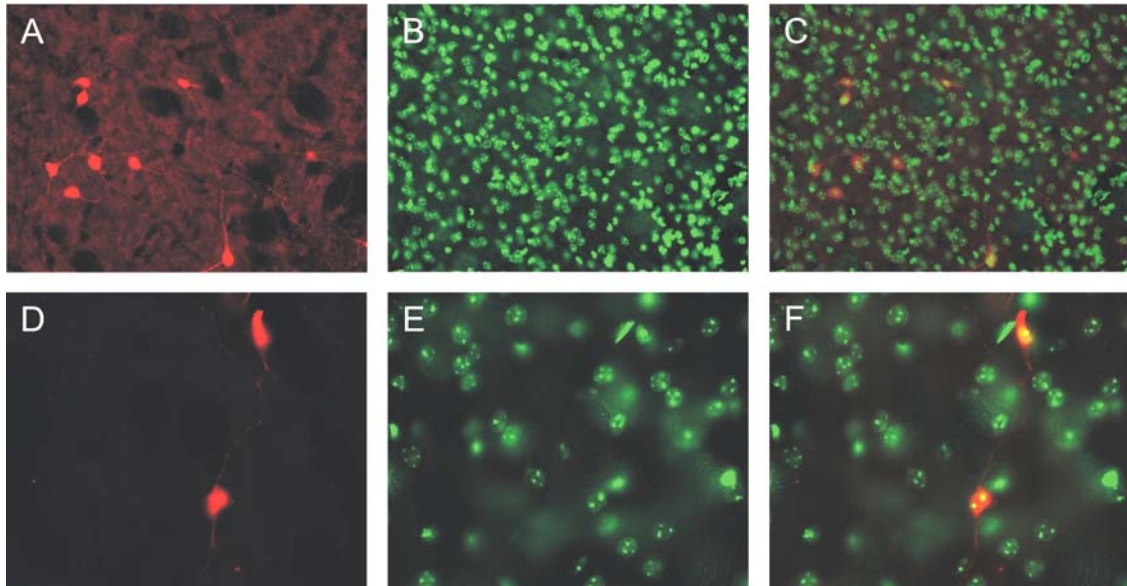


Abbildung 3-14 Cygb-Immunfärbung im Maus-Gehirn mit Kernfärbung. Intensive Färbung distinkter Populationen von multipolaren Neuronen im lateralen Striatum (A, D). Färbung aller Zellkerne im selben Schnitt mit Höchst 33342 (B, E).

In der **Großhirnrinde** (*Cortex cerebri*, cerebraler Cortex) wurden in allen Zellschichten (Laminae II-VI) sowohl der assoziativen als auch der motorischen und somatosensorischen Bereiche gefärbte Neurone detektiert (Abb. 3-15 A, B). Vereinzelte Signale von auffällender Intensität waren im gesamten Cortex zu verzeichnen, wobei sie maximal zehn Prozent der gesamten dort enthaltenen Nervenzellen kennzeichneten.

Im **Vorderhirn** (*Telencephalon*) zeigten die periglomerulären Neurone des *Bulbus olfactorius* Cygb-Färbung, außerdem wurden in der medialen und ventralen Ausdehnung des anterioren olfaktorischen Nucleus Signale lokalisiert.

Zahlreiche subkortikale Strukturen des Vorderhirns exprimierten große Mengen Cytoglobin. So konnte das Protein in zahlreichen Pyramidenzellen im Hippocampus, in den Bereichen CA1 bis CA4 sowie in den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* nachgewiesen werden (Abb. 3-16 A). Die intensiven Immunsignale in den Zellsomata und den langen Fortsätzen der Pyramidenzellen hoben sich deutlich von den

angrenzenden nicht gefärbten Neuronen ab Abb. 3-16 B. Zusätzlich waren vereinzelte Neurone in den benachbarten Zellschichten *Stratum oriens* und *Stratum radiatum* gefärbt.

In den Basalkernen zeigten die immunreaktiven Nervenzellen ein ähnliches Cygb-Expressionsmuster wie die Neurone im cerebralen Cortex. Dieses setzte sich in der gesamten anterior-posterior Ausdehnung der Basalganglien fort. Im Striatum (*Corpus striatum*; *Ncl. caudatus* und *Putamen*; CPu) war lediglich eine Subpopulation von Neuronen gefärbt, die ebenfalls nicht mehr als ein Zehntel der gesamten Nervenzellen in diesem Bereich darstellte (Abb. 3-15 A, C). Vorwiegend in großen multi- und bipolaren Neuronen konnten sehr intensive Signale sowohl in den Zellkörpern als auch in den teilweise sehr langen Fortsätzen beobachtet werden. Im ventralen Pallidum, dem funktionellen Antagonisten des Striatums, waren ähnlich intensive Färbungen in multipolaren Neuronen und ihren langen Fortsätzen zu verzeichnen (Abb. 3-15 E). Auch im *Nucleus accumbens* wurden Cygb-immunreaktive Zellen mit unterschiedlichen Signalstärken detektiert (Abb. 3-15 D). Auch Nuklei im Bereich des Septums (medialer septaler Nucleus), die mit dem Hypothalamus und anderen Strukturen im Vorderhirn in Verbindung stehen, exprimierten schwache Cygb-Signale. Eine weitere basale Vorderhirnstruktur, der vertikale Ast des *Nucleus of the diagonal band*, wies ähnlich abgeschwächte Cygb-Immunfärbung auf.

Weiterhin wurden in verschiedenen Teilen des **Zwischenhirns** (*Diencephalon*) diverse Cygb-exprimierende Strukturen detektiert. Der Thalamus enthielt etliche moderat gefärbte Neurone, darüberhinaus wiesen die Fasern im Bereich der *Stria medullaris* Cygb-Signale auf. Im basalen Hypothalamus war der anteriore Bereich des *Ncl. suprachiasmaticus* (SCN) fast frei von Immunsignalen, während in der Peripherie Cygb-exprimierende Neurone detektiert wurden. Im mittleren SCN wurden gefärbte Nervenzellen hauptsächlich in den ventralen Abschnitten detektiert (Abb. 3-17 A, B). Sowohl im posterioren SCN als auch in der subparaventriculären Zone waren gefärbte Neurone enthalten. Im *Ncl. paraventricularis* (Abb. 3-17 D) wurden relativ schwach gefärbte Neurone im anterioren magnozellularären Areal detektiert. Ferner wurden auch in Neuronen des *Ncl. supraopticus* sowie im *Chiasma opticum* Cygb-Signale beobachtet (Abb. 3-17 A). In der *Eminentia mediana* waren schwach immunreaktive Strukturen, offensichtlich Fortsätze, sichtbar (Abb. 3-17 C). Dieser Bereich besteht vor allem aus Axonen und Gliazellen und enthält demzufolge kaum neuronale Somata. Die *Eminentia mediana* gilt als wichtige Nahtstelle zwischen dem Nerven- und Hormonsystem. Überdies waren in den medialen Kernen der Habenulae (*Ncl. habenulares*) des *Epithalamus* sehr intensive Immunfluoreszenzsignale zu

verzeichnen, während Zellen im lateralen Abschnitt fast keine Färbung zeigten (Abb. 3-16 A, C, D). Die Habenularkerne stellen u.a. eine Verbindung zwischen Gehirn und Pinealorgan dar.

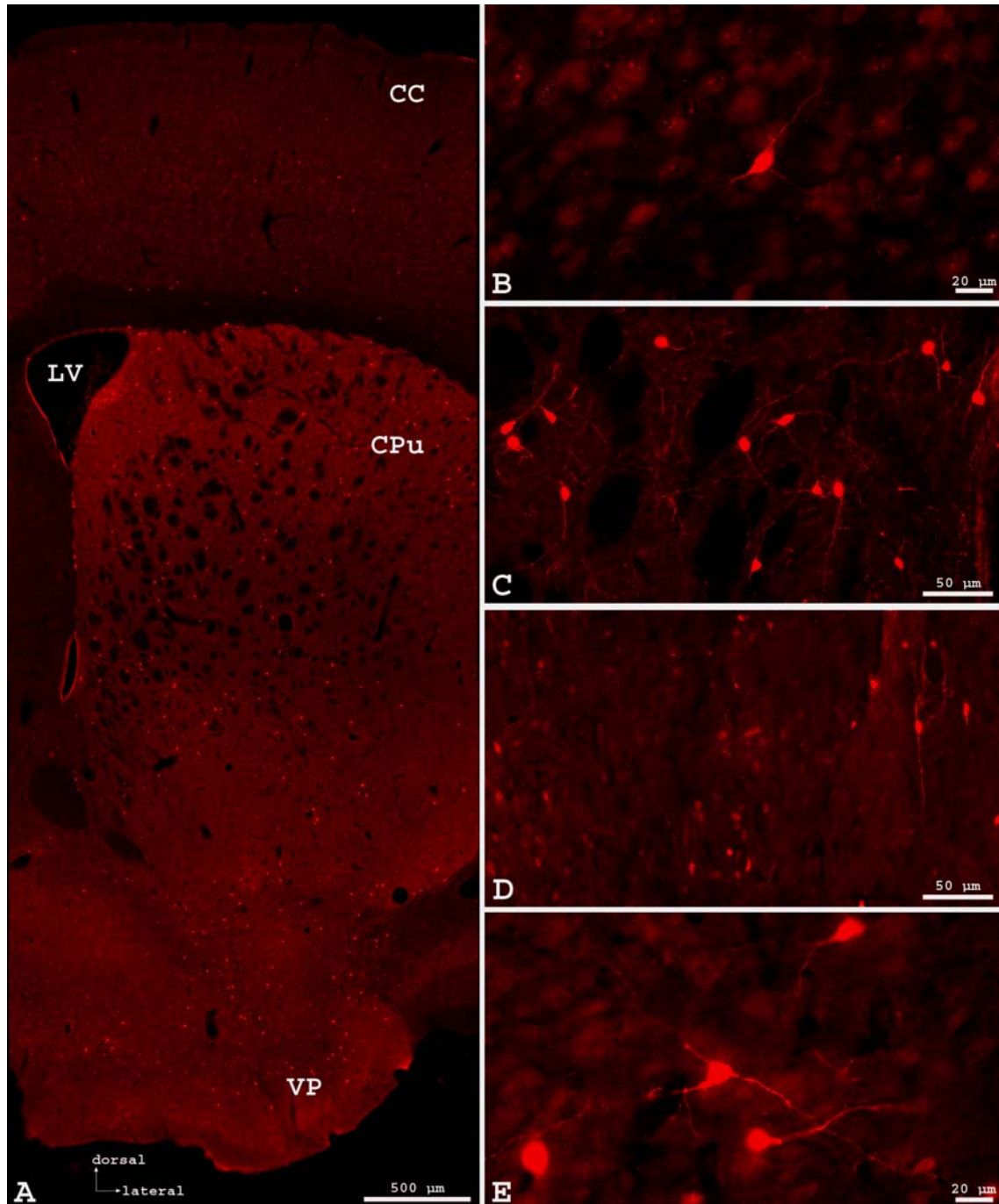


Abbildung 3-15 Cygb-IF im cerebralen Cortex und Striatum. Frontalschnitte eines Maus-Gehirns zeigen primäre motorische und somatosensorische Regionen des cerebralen Cortex (CC), den lateralen Ventrikel (LV), das Striatum (*Ncl. caudatus/Putamen, Cpu*) und das ventrale Pallidum (VP) in Übersicht (A). In höherer Vergrößerung sind die immunreaktiven Neurone in der Lamina IV des S1 Cortex (B), zahlreiche multipolare Neurone im ventralen Striatum (C), Nervenzellen mit unterschiedlichen Signalstärken im *Ncl. accumbens/Septum* (D) und multipolare Neurone mit langen Fortsätzen im ventralen Pallidum (E) dargestellt.

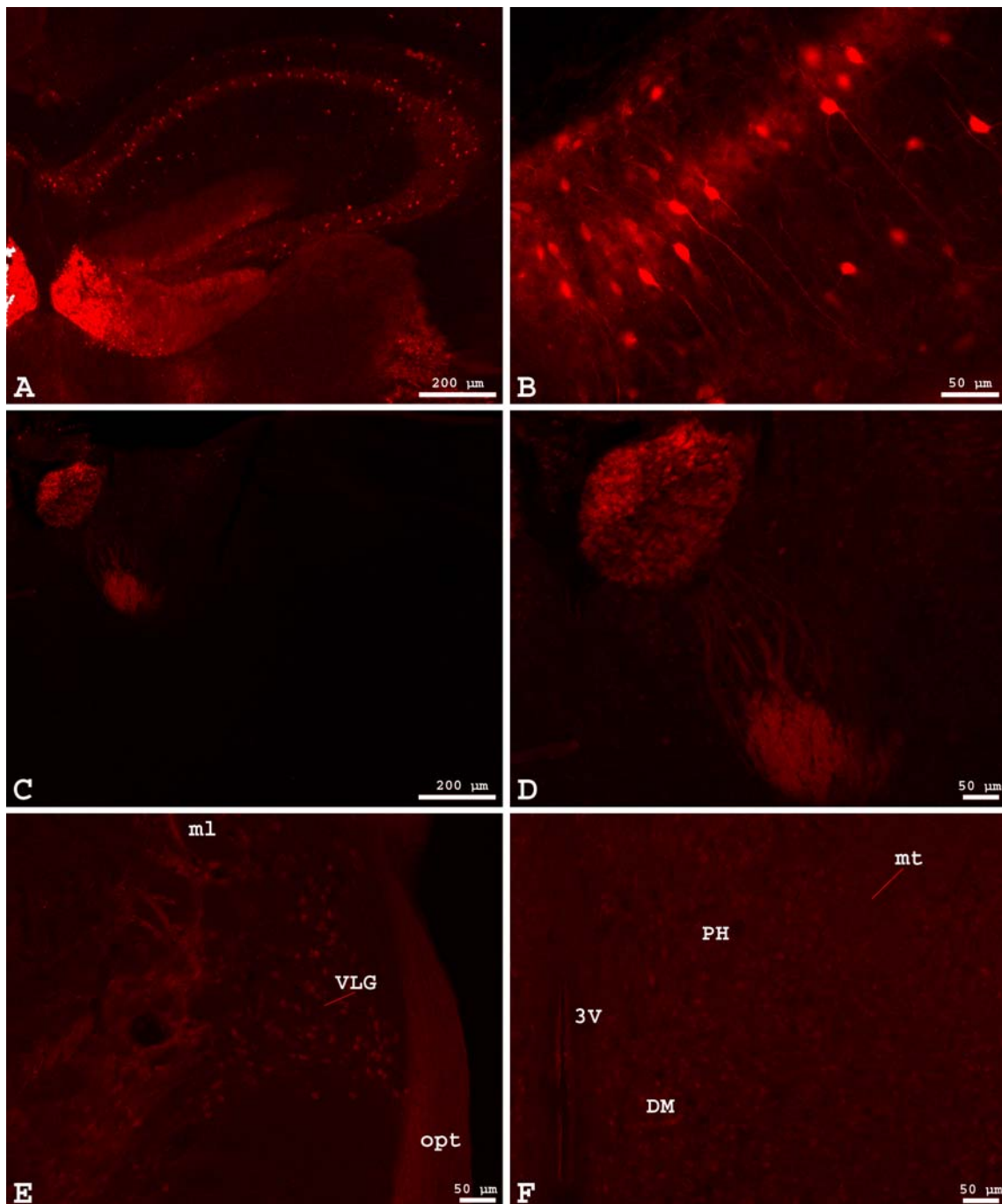


Abbildung 3-16 Cygb-IF in Hippocampus, Hypothalamus und den Habenulae. Frontalschnitte eines Maus-Gehirns zeigen starke Färbung zahlreicher, jedoch nicht aller Neurone der Pyramidenzellen des Hippocampus (A). In höherer Vergrößerung der CA1-Region sind deutlich die langen immunreaktiven Fortsätze dieser Zellen zu erkennen, außerdem sind ein paar Neurone in *Stratum oriens* und *Stratum radiatum* gefärbt (B). Intensive Färbung war in den Neuronen der medialen Habenularkerne zu verzeichnen (C, D). Cygb-immunoreaktive Strukturen im *Lemniscus lateralis* (medial lemniscus, ml) und im *Tractus opticus* (opt) sowie moderat gefärbte Neurone im *Corpus geniculatum laterale* (ventral lateral geniculate nucleus, VLG; E). In der Umgebung des dritten Ventrikels (3V) exprimierten Neurone im posterioren Hypothalamusabschnitt (PH) sowie im dorsomedialen hypothalamischen Nucleus (DM) Cygb, während der *Tractus mamillothalamicus* (mt) keine Färbung zeigte (F).

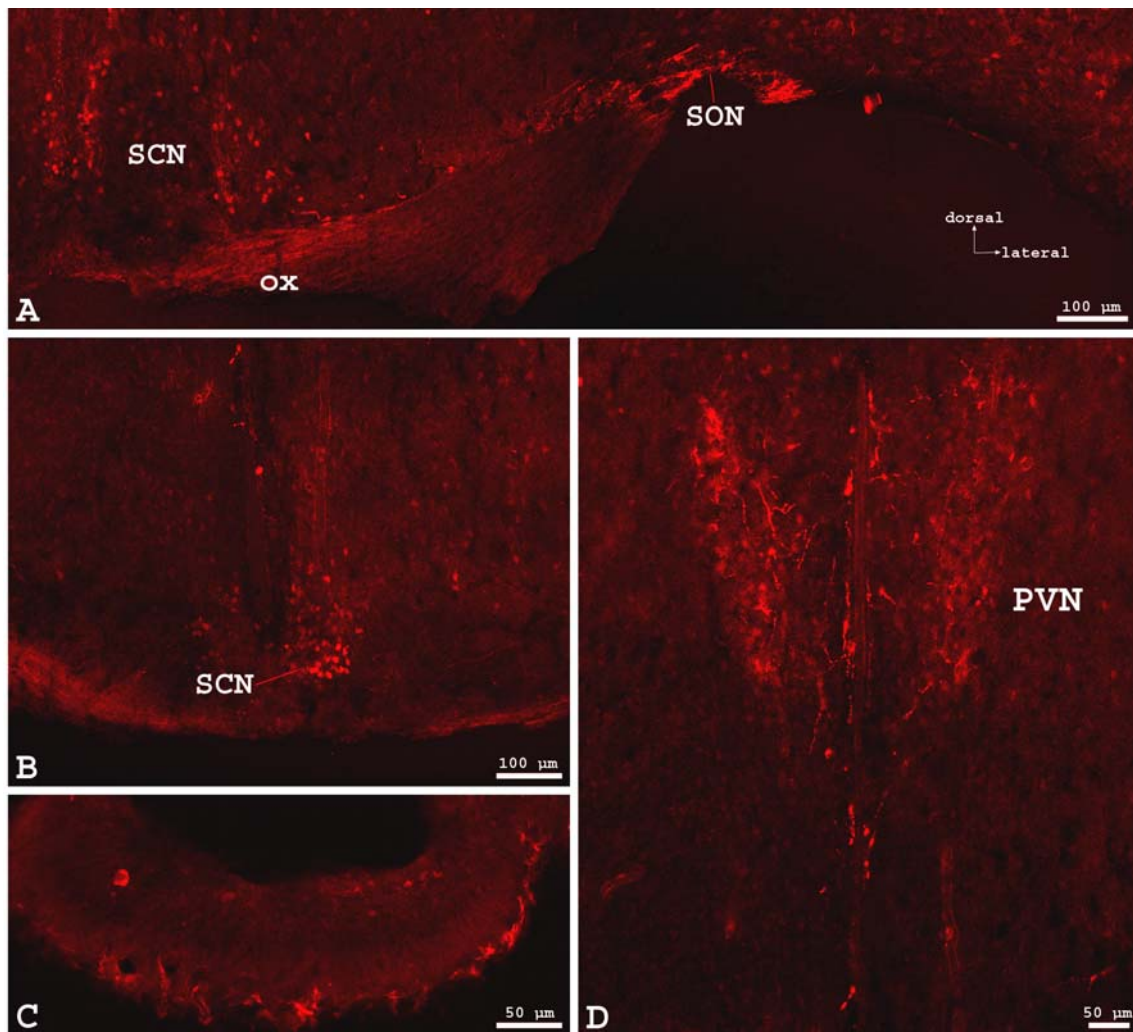


Abbildung 3-17 Cygb-IF im Hypothalamus. Eine Übersicht über die Cygb-Immunreaktivität im Bereich des *Chiasma opticum* (optic chiasm, ox) und des basalen Hypothalamus (A). Gefärbte Zellen wurden im *Ncl. supraopticus* (SON) sowie in den äußeren und Kernregionen des *Ncl. suprachiasmaticus* (SCN) identifiziert. Im posterioren SCN sind intensiv gefärbte Neurone sichtbar (B). In der *Eminentia mediana* sind kleine immunreaktive Strukturen zu sehen, die hauptsächlich aus Fortsätzen bestehen (C). Schwache Färbung konnte im anterioren magnozellulären Abschnitt des *Ncl. paraventricularis* (PVN) beobachtet werden (D).

Ferner wurden in distinkten Strukturen des **Hirnstamms** Cygb-Signale detektiert. Im Bereich des **Mittelhirns** (*Mesencephalon*) konnten immunreaktive Zellen sowohl in der *Pars compacta* als auch in der *Pars reticularis* der *Substantia nigra* (SNC/SNR) lokalisiert werden. Dabei war die Intensität der Signale in der melaninhaltigen SNC etwas höher als in der SNR (Abb. 3-18 A, D). Auch in den intermediären Abschnitten der *Colliculi superiores* wurden immunreaktive Strukturen sichtbar (Abb. 3-19 A, B).

Die dicht gepackten Fasern im *Fasciculus retroflexus* (Meynert-Bündel; fr), der die epithalamischen Habenularkerne mit dem *Tegmentum* verbindet, wiesen sehr starke Cygb-IF-Signale auf (Abb. 3-18 A, C). Desweiteren wurden intensiv gefärbte Neurone

im dorsalen Abschnitt des anterioren *Nucleus preectalis* (APTD), Oliven- *Nucleus preectalis* (OPT), *Nucleus retroparafascicularis* (RPF) detektiert (Abb. 3-18 A, B). Auch Neurone in den Brückenkernen (*Nuclei pontis*) zeigten Cygb-Signale. Zudem war ein Teil der Neurone im lateralen oberen Olivenkomplex (SOC; Abb. 3-20 A, D) gefärbt. Moderate Signale waren außerdem in den Neuronen im caudalen Abschnitt der dorsalen Raphekerne (DRC) in der *Formatio reticularis* zu verzeichnen (Abb. 3-19 A, E; Abb. 3-20 C). Weiterhin wurden stark immunreaktive Nervenzellen und Fasern in verschiedenen Abschnitten der *Nuclei nervi trigemini* und der tegmentalen Nuclei identifiziert (Abb. 3-19 A, C, D; Abb. 3-20 A, B, C, Abb. 3-21).

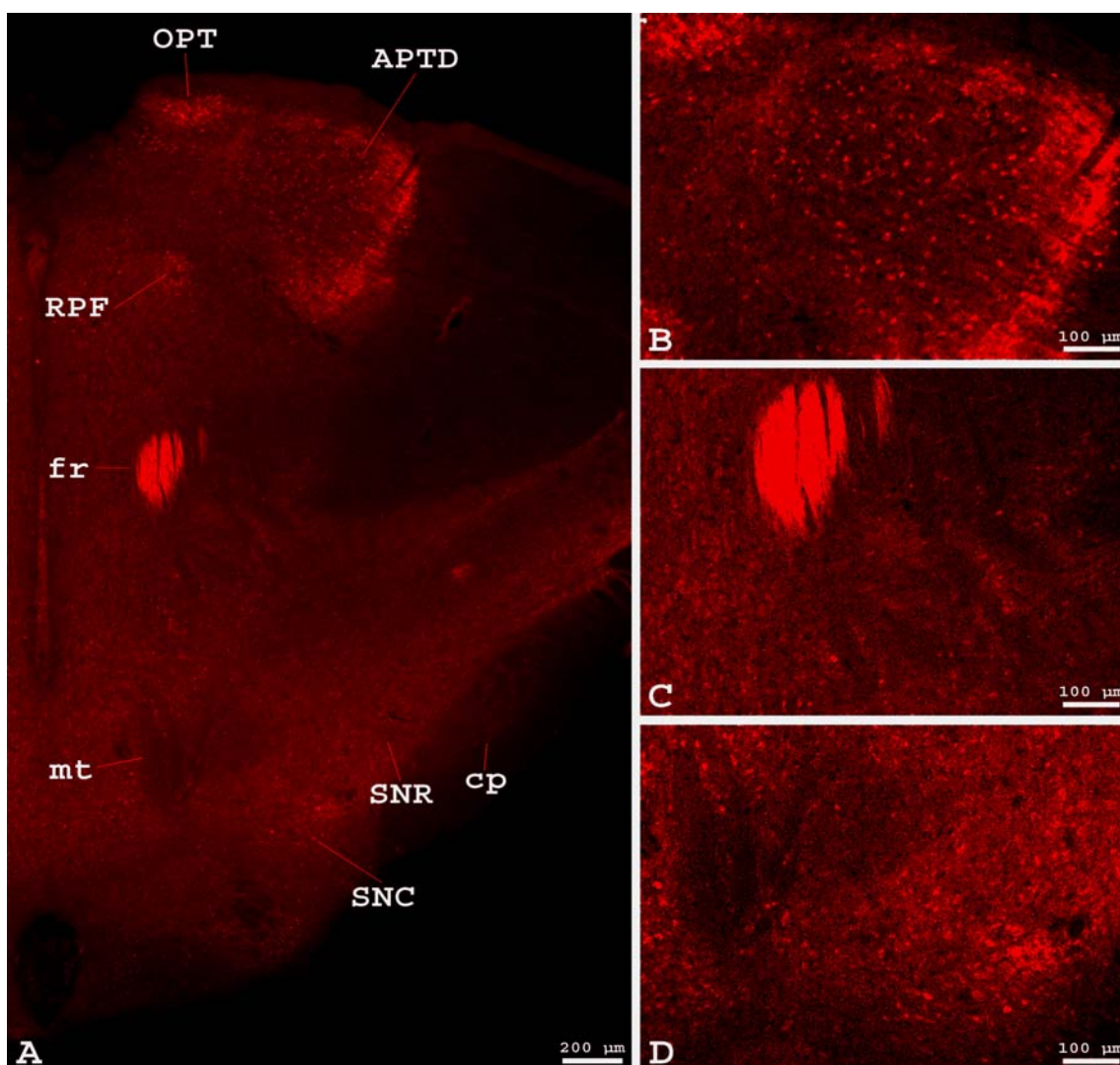


Abbildung 3-18 Cygb-Signale im Mesencephalon. In der Übersicht sind gefärbte Neurone im dorsalen Abschnitt des anterioren *Ncl. preectalis* (APTD), im Oliven- *Ncl. preectalis* (OPT), im *Ncl. retroparafascicularis* (RPF) sowie in der *Pars compacta* (SNC) und *Pars reticularis* (SNR) der *Substantia nigra* zu sehen (A). In höheren Vergrößerungen sind die immunreaktiven Neurone im APTD (B) intensiv gefärbte Fasern des *Fasciculus retroflexus* (fr; C) und die ungefärbten Neurone im Bereich des *Tractus mamillothalamicus* (mt) (D) dargestellt. Auch der basale Abschnitt des cerebralen Peduncle (cp) zeigt keine Färbung, im Gegensatz zur *Substantia nigra* (SNC; SNR).

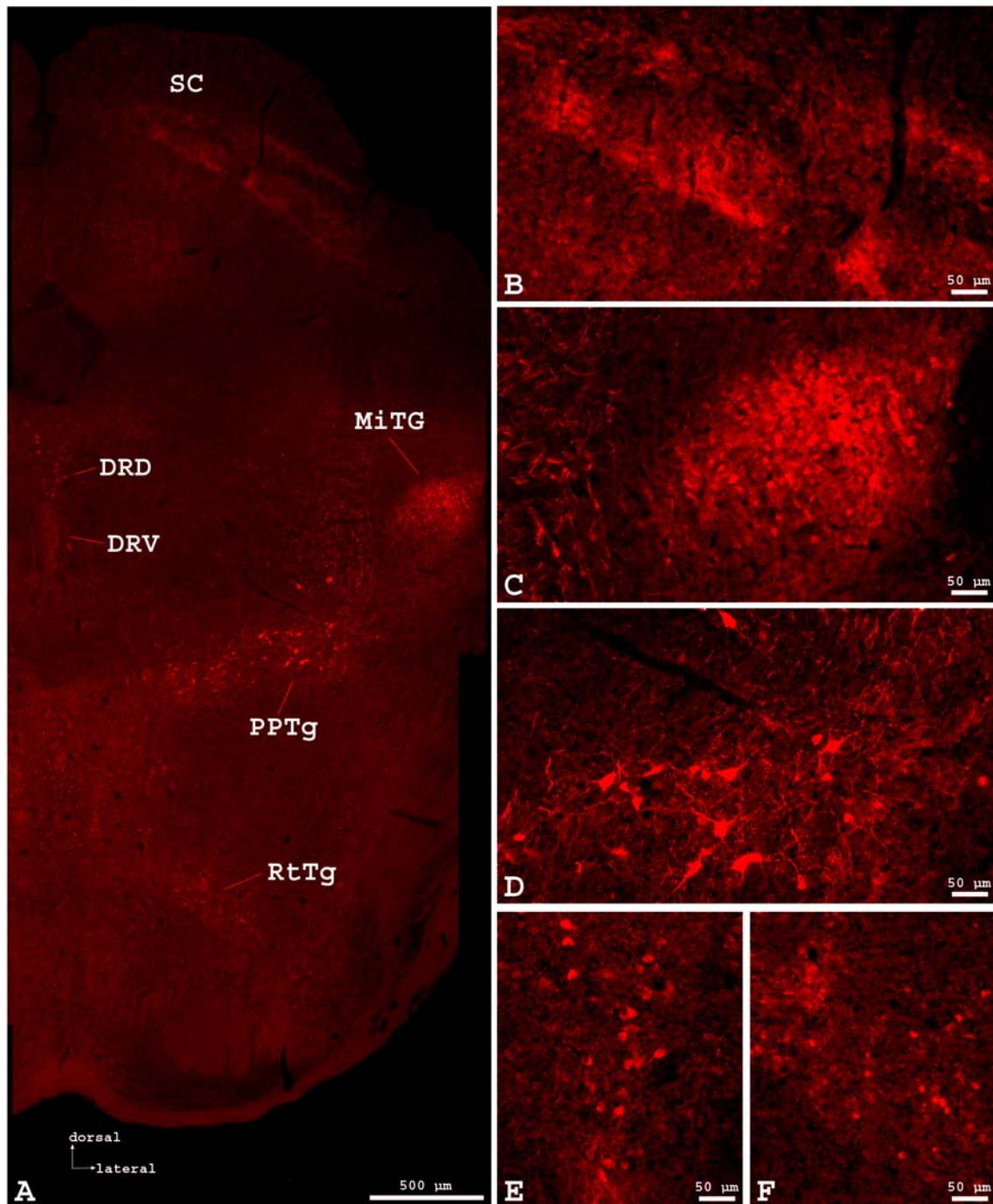


Abbildung 3-19 Cygb-Färbung im Tegmentum. Frontalschnitte eines Mausgehirns im Bereich des Hirnstamms zeigen in der Übersicht die *Colliculi superiores* (SC), dorsale Raphe und tegmentale Nuklei (A). In den intermediären grauen und weißen Schichten der *Colliculi superiores* wurden immunreaktive Strukturen sichtbar (B). Kleine Neurone mit wenigen Fortsätzen konnten im mikrozellulären tegmentalen Nucleus (MiTg) detektiert werden (C), während im pedunculopontinen tegmentalen Nucleus (PPTg) große Neurone mit zahlreichen Fortsätzen sichtbar wurden (D). Immunreaktive Neurone wurden außerdem im dorsalen und ventralen Abschnitt der dorsalen Raphekerne (DRD/DRV; E) und im reticulotegmentalen Nucleus des Pons identifiziert (RtTg; F).

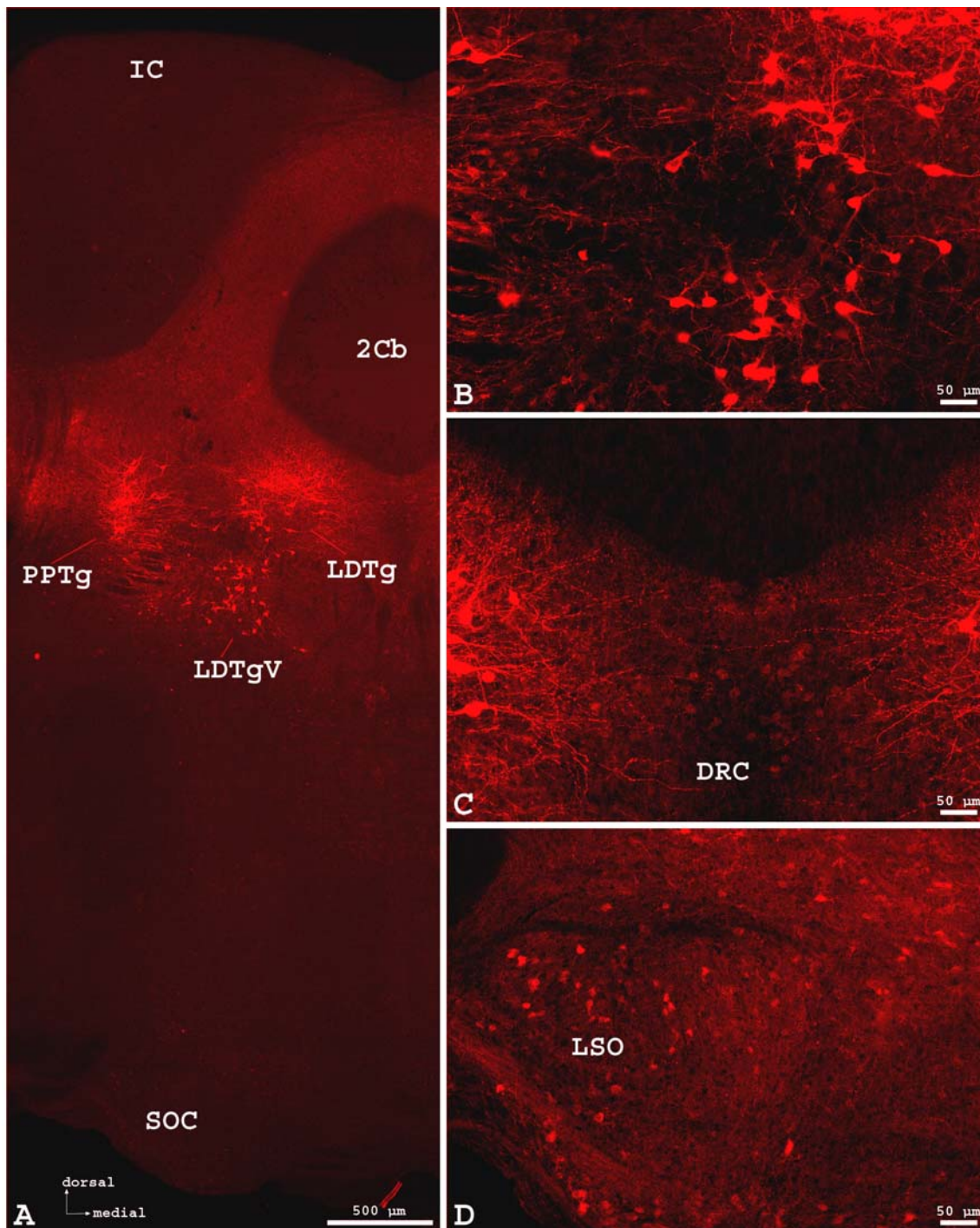


Abbildung 3-20 Cygb-Immunfärbung im Hirnstamm. Frontalschnitte eines Maus-Gehirns zeigen eine Übersicht aus dem hinteren Bereich des Hirnstamms, mit einem Teil des Cerebellums (cerebellar lobule 2, 2Cb), den *Colliculus inferior* (IC), den tegmentalen Nuklei und dem oberen Olivenkomplex (SOC). In höherer Vergrößerung sind die Cygb-positiven Neurone im laterodorsalen tegmentalen Nucleus (LDTg), in dessen ventralem Abschnitt (LDTgV) und im pedunculopontine *tegmental Nucleus* (PPTg; B) dargestellt. Die Fasern des LDTg schienen sich contralateral zu kreuzen (C). Leicht gefärbte Neurone im caudalen Bereich der dorsalen Raphekerne (DRC; C). Ein Teil der Neurone im lateralen oberen Olivenkomplex (LSO) ist Cygb-positiv (D).

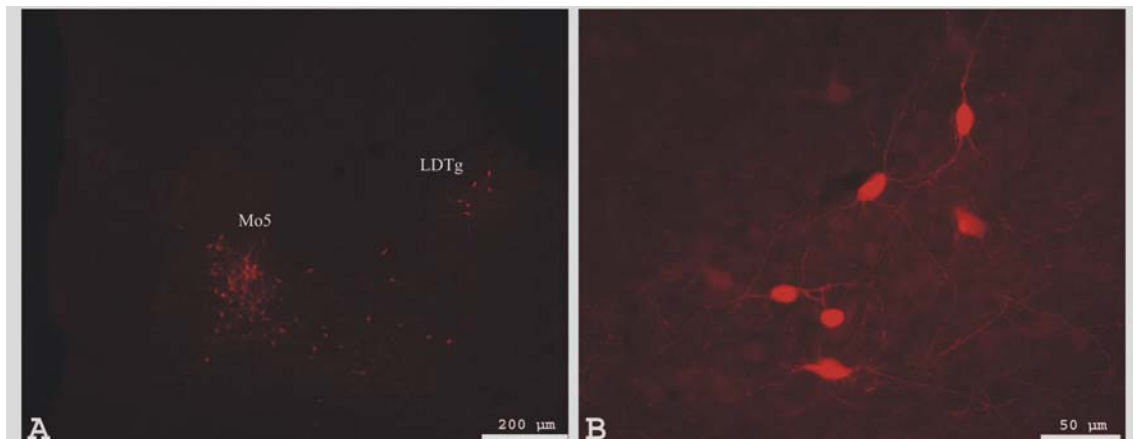


Abbildung 3-21 Cygb-IF im Hirnstamm. In frontalen Maus-Gehirnschnitten wurden intensiv gefärbte Neurone im Nucleus motorius nervi trigemini (Mo5) und leicht gefärbte Neurone in einem Teil der umgebenden Zellpopulationen, z.B. im caudalen Abschnitt der Nuclei pontis, den intertrigeminalen und supratrigeminalen Nuclei identifiziert (A). Neuronale Somata und Fortsätze im laterodorsalen tegmentalen Nucleus vergrößert (B).

Im **Kleinhirn** (Cerebellum) wurden einzelne immunreaktive Neurone in der Molekularschicht detektiert. Zusätzlich wurden intensive punkt- oder faserförmige Signale in der Körnerzellschicht sowie in der Ganglienzellschicht identifiziert. Purkinje-Zellen selbst zeigten dagegen keine Färbung, wurden allerdings sehr dicht von immunreaktiven Punktsignalen umgeben. Möglicherweise handelt es sich dabei um afferente Verbindungen (Kletterfasern) der Purkinje-Zellen.

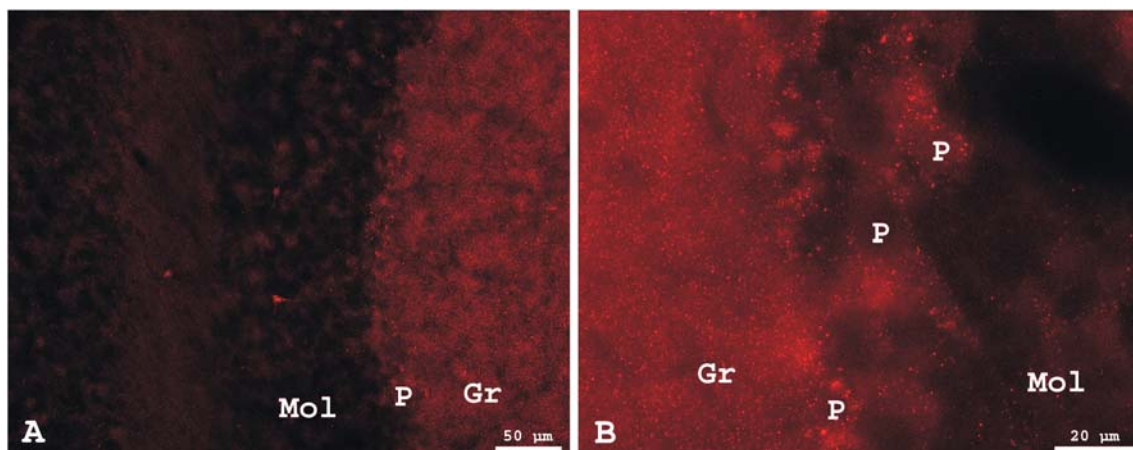


Abbildung 3-22 Cygb-IF im Cerebellum. Frontalschnitte eines Maus-Gehirns im Bereich des Kleinhirns zeigen einzelne immunreaktive Neurone in der Molekularschicht (Mol) des cerebellären Cortex (A). Große Mengen intensiv gefärbter Punkte, die vermutlich Anschnitte von Fortsätzen darstellen, konnten in der Körnerzellschicht (Granula, Gr) und im Bereich der Purkinje-Zellen lokalisiert werden. In höherer Vergrößerung sind deutlich die immunreaktiven Signale zu sehen, die die ungefärbten Purkinje-Zellen (P) in der Ganglienzellschicht umgeben (B).

3.3.2 Subzelluläre Lokalisation von Cytoglobin in Neuronen

Während im Fall von Neuroglobin die Lokalisation in Cytoplasma und Fortsätzen von Neuronen eindeutig ist, wurde das Cytoglobin anhand von oben gezeigten indirekten immunhistologischen Färbungen überraschenderweise sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern von neuronalen Zellen detektiert. Um diesen Sachverhalt abzusichern, wurden weitere experimentelle Studien durchgeführt. Zum einen wurden die Gehirnschnitte, die mit den drei verwendeten Antikörpern (anti-Cygb1-3) inkubiert wurden, mit Hilfe eines konfokalen Laserscan-Mikroskops (LSM) analysiert. Dabei wurden die 40 µm dicke Schnitte in mehreren Ebenen (z.B. 24) gescannt und die einzelnen Aufnahmen anschließend zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt. Auf diese Weise konnte man mit Hilfe eines Fadenkreuzes eine bestimmte Zelle in diesem Schnitt fixieren und einen Einblick in das intrazelluläre Färbemuster gewinnen (Abb. 3-24). In allen untersuchten Zellen aus den drei Antikörperinkubationen konnte ein homogenes Cygb-Signal sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus detektiert werden. Lediglich im Nucleolus war kein Cytoglobin enthalten, so dass charakteristische kleine schwarze Punkte innerhalb des Zellkerns sichtbar wurden. Ferner erschien die Cytoglobin-Immunreaktivität gleichmäßig im Cytoplasma und Zellkern der jeweiligen Nervenzelle verteilt.

Zusätzlich wurde die subzelluläre Cygb-Verteilung im Rahmen einer Western Blot-Analyse bestätigt. Hierfür wurden nach einem Kernfraktionierungsprotokoll (Guillemin et al., 2005) die cytoplasmatischen und die Zellkern-Proteine aus Maus-Gehirn und Leber getrennt isoliert. Das Cygb-Protein wurde daraufhin sowohl in der Cytoplasma- als auch in der Zellkernproteinfraktion im Maus-Gehirn detektiert. In der Leber konnte dagegen kein Cygb-Protein nachgewiesen werden. Vermutlich liegt die Cygb-Konzentration in nicht aktivierten Sternzellen unterhalb der Nachweisgrenze (s.u.).

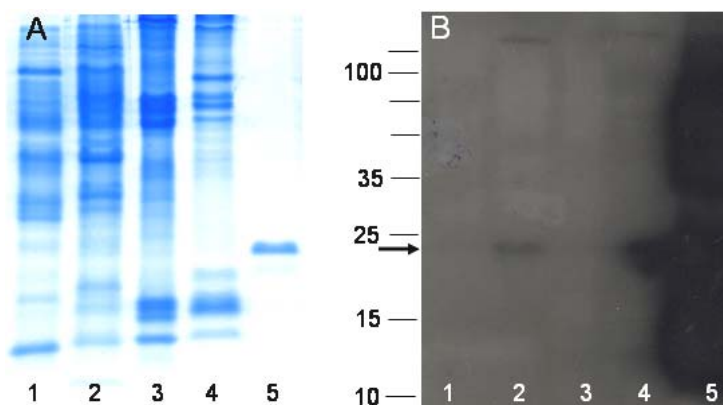


Abbildung 3-23 Cygb-Western Blot mit Cytoplasma- und Zellkernproteinextrakten aus Maus Leber und Gehirn. SDS-PAGE (A) Western Blot (B). Aufgetragen wurden je 100 µg Gesamtprotein 1: Leber Cytoplasmafraktion; 2: Gehirn Cytoplasmafraktion; 3 Leber Kernfraktion, 4 Gehirn Kernfraktion, 5 rek. Cygb.

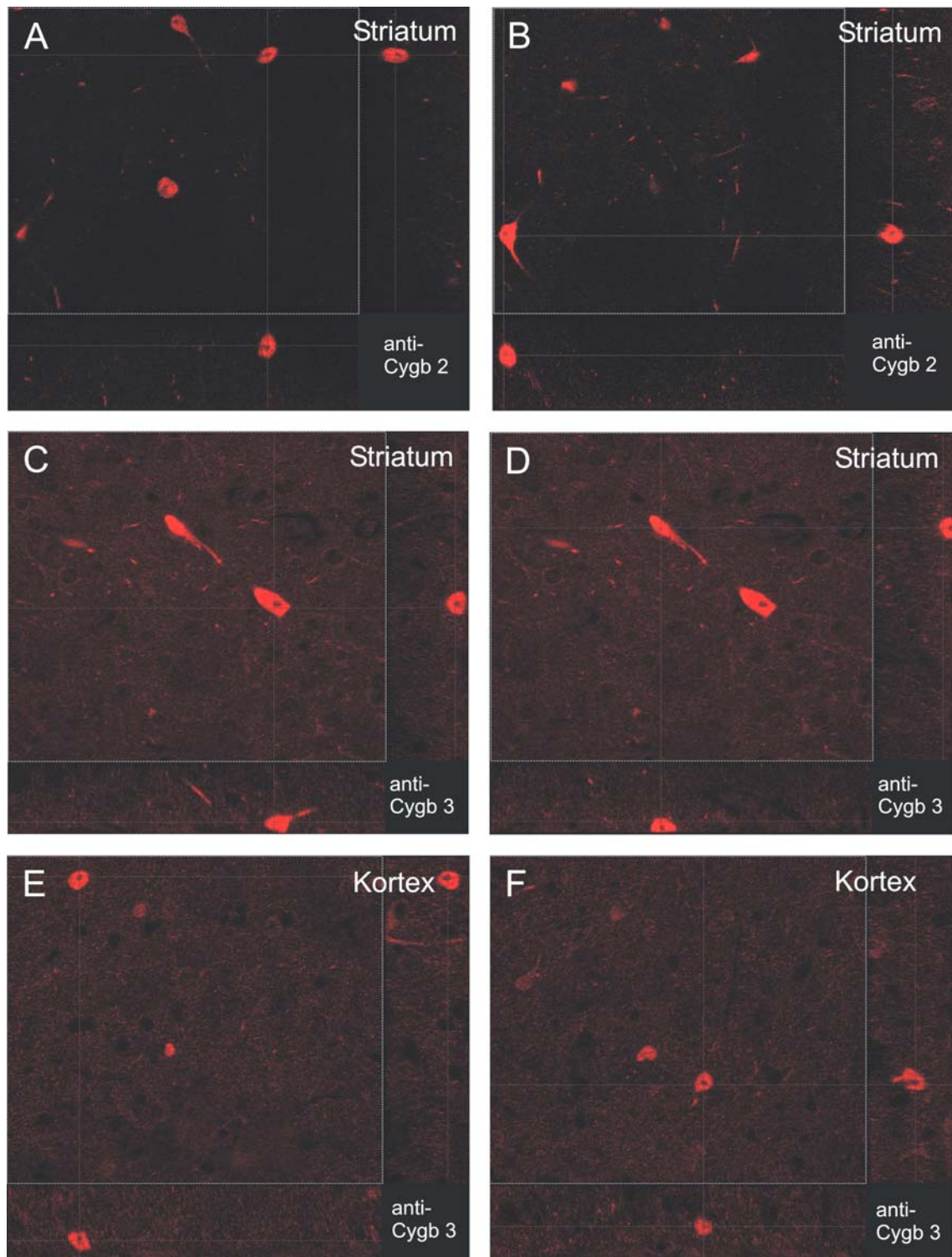


Abbildung 3-24 LSM-Aufnahmen Cygb-immunoreaktiver Zellen im Maus-Striatum und Cortex cerebri. Alle verwendeten Antikörper, von denen anti-Cygb2 (A, B) und anti-Cygb3 (C-F) hier dargestellt wurden, ergaben identische Verteilung des Cygb-Proteins im Cytoplasma und Nucleus von Neuronen. Lediglich die Nucleoli blieben signalfrei und somit als dunkle Punkte innerhalb der Zellkerne sichtbar.

3.3.3 Co-Lokalisation von Cygb und nNOS

In Hinblick auf eine mögliche Funktion des Cytoglobins im NO-Stoffwechsel wurde in Doppelmarkierungsexperimenten die Co-Lokalisation des Cytoglobins mit der neuronalen NO-Synthase untersucht. Hierfür wurden Maus-Gehirnschnitte mit anti-Cygb1 und einem polyklonalen anti-nNOS-Antikörper aus Schaf inkubiert und diese mit zwei, verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragenden sekundären Antikörpern detektiert. Die anschließende mikroskopische Analyse der beiden Fluoreszenzsignale ergab identische Muster, d.h. in allen untersuchten Cygb-exprimierenden Zellen wurde auch nNOS beobachtet (Abb. 3-26). Repräsentativ sind in der folgenden Bildtafel Ausschnitte aus dem cerebralen Cortex und dem Striatum sowie der mediale *Nucleus vestibularis* dargestellt. Das oben bereits beschriebene charakteristische Cygb-Expressionsmuster in distinkten Neuronenpopulationen dieser Regionen fand sich in der Verteilung beider Proteine wieder. In vereinzelt großen, bi- bzw. multipolaren Neuronen mit zum Teil verzweigten Fortsätzen konnten sowohl Cygb- als auch nNOS-Signale von hoher Intensität detektiert werden. Beide Färbungen wurden sowohl in den Zellkörpern als auch in den langen Fortsätzen lokalisiert, wobei die Nuklei dieser Zellen offensichtlich nur Cytoglobin, aber keine nNOS-Signale aufwiesen.

Ferner ist ein Teil der nNOS-exprimierenden Neuronen im Cortex auch positiv für den Neurotransmitter Neuropeptid Y (NPY). In Doppelmarkierungsexperimenten konnte NPY in Cygb-positiven Zellen im Striatum detektiert werden (Abb. 3-25).

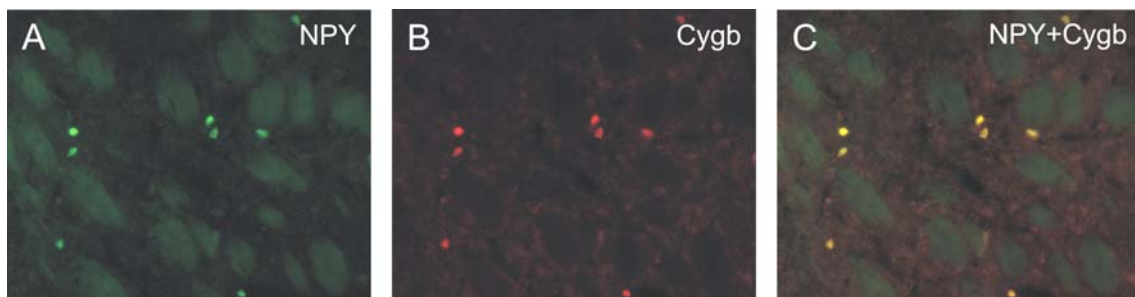


Abbildung 3-25 Co-Lokalisation von NPY und Cygb im Striatum. Im Rahmen weiterer Doppelmarkierungsexperimente konnte das für spezifische Interneuronen-Population im Striatum charakteristische Neuropeptid Y (NPY) auch in den Cygb-positiven Zellen detektiert werden.

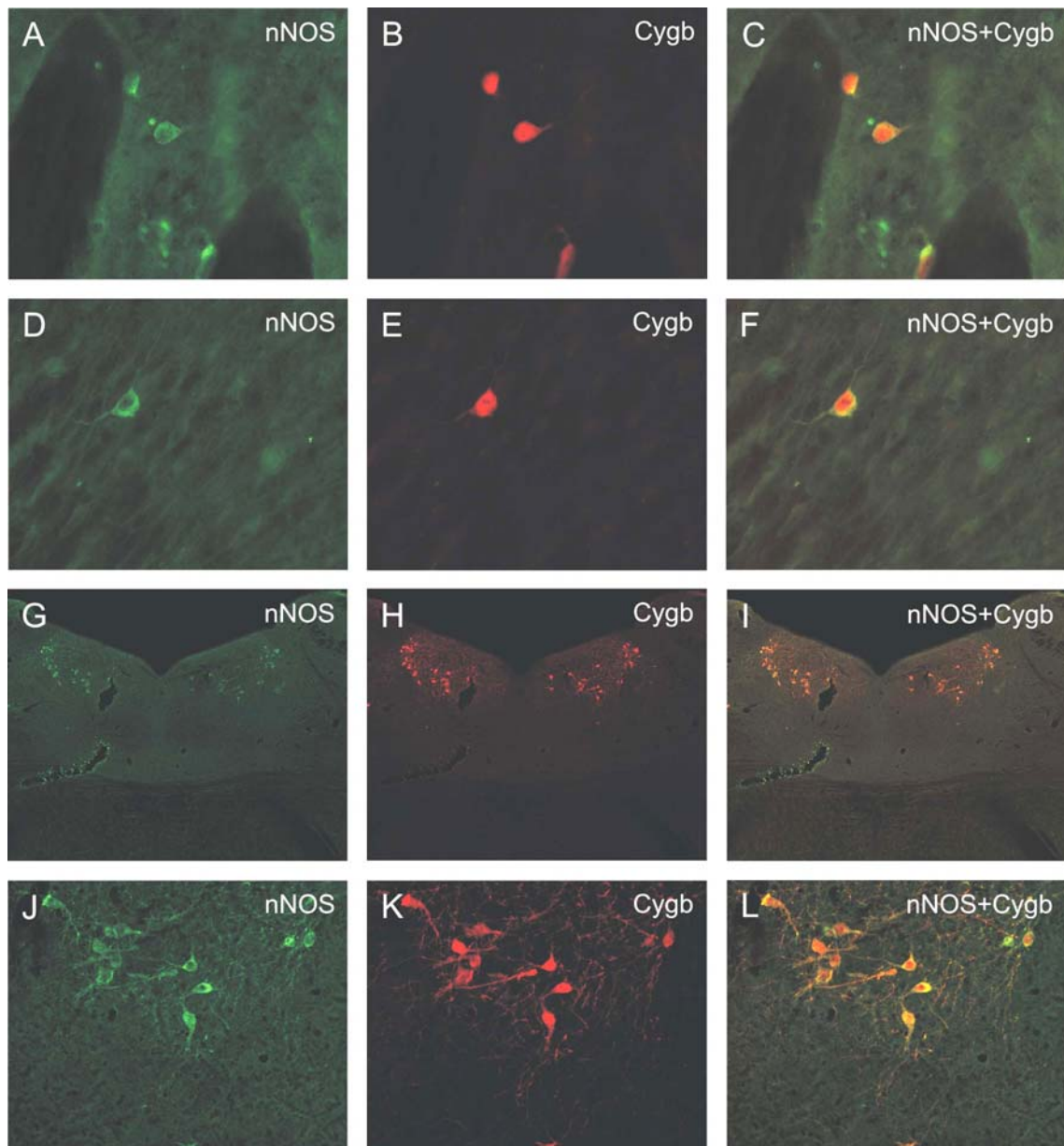


Abbildung 3-26 Co-Lokalisation von nNOS und Cygb im Maus-Gehirn. Exemplarisch werden Ausschnitte aus dem Striatum (A-C), dem cerebralen Cortex (D-F) und dem *Nucleus vestibularis* (G-L) gezeigt. Das Verteilungsmuster beider Proteine ist identisch, d.h. alle Cygb-positiven Zellen in den abgebildeten Regionen des Maus-Gehirns exprimieren auch die neuronale NO-Synthase (nNOS).

3.4 Neuroglobin- und Cytoglobin-Expression in seneszenten Hamstern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Neuroglobin- (Ngb) und Cytoglobin- (Cygb) mRNA in verschiedenen Hirnbereichen des dsungarischen Zwerghamsters *Phodopus sungorus* untersucht. Durch relative Quantifizierung mit Hilfe der Realtime RT-PCR (2.8) sollte die Expression beider Globin-Gene in den Gehirnen von jung adulten und senilen Hamstern miteinander verglichen werden. Hierzu wurden die Gehirne aus jeweils 6 Hamstern der zwei verschiedenen Altersgruppen präpariert und sagittal halbiert (Tab. 3-4). Die rechten Gehirnhälften wurden für Western Blot-Analysen aufbewahrt, während die linken Hälften in jeweils vier Bereiche unterteilt wurden, aus denen anschließend die Gesamt-RNA isoliert wurde (Abb. 3-27).

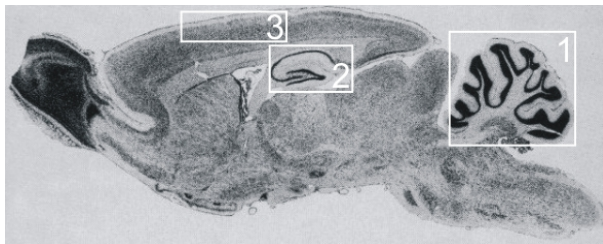


Abbildung 3-27 Sagittalschnitt eines Rattengehirns. Folgende Bereiche aus den Hamstergehirnen wurden in den Q-PCR-Analysen untersucht: 1. Kleinhirn; 2. Hippocampus; 3. Cortex; 4. Resthirn

(Bildquelle: Nauta und Feirtag (1984) Die Architektur des Gehirns)

Tier Nr.	Tag der Geburt	Tag der Präparation	Alter	Bezeichnung	Geschlecht
1	14.12.2003	26.04.2004	4 M 1 ½ W	jung adult	weiblich
2	19.01.2004	26.04.2004	3 M 1 W	jung adult	männlich
3	31.12.2003	26.04.2004	3 M 3 ½ W	jung adult	männlich
4	19.01.2002	26.04.2004	2 J 3 M 1 W	senil*	weiblich
5	19.01.2002	26.04.2004	2 J 3 M 1 W	senil*	weiblich
6	03.02.2002	26.04.2004	2 J 2 M 3 W	senil*	männlich
7	31.01.2002	08.10.2004	2 J 8 M 1 W	senil*	weiblich
8	28.03.2002	08.10.2004	2 J 6 M 1 ½ W	senil*	männlich
9	13.06.2002	08.10.2004	2 J 5 M	senil*	weiblich
10	29.05.2004	08.10.2004	4 M 1 W	jung adult	weiblich
11	29.05.2004	08.10.2004	4 M 1 W	jung adult	männlich
12	04.06.2004	08.10.2004	4 M	jung adult	weiblich

Tabelle 3-4 Präparation der Gehirne aus jungen und alten *Phodopus sungorus* (J=Jahre; M=Monate; W=Wochen). Als senil (*) galten Tiere eines Alters, in dem 50 % der Population bereits verstorben ist (bei *P. sungorus*: 2 Jahre).

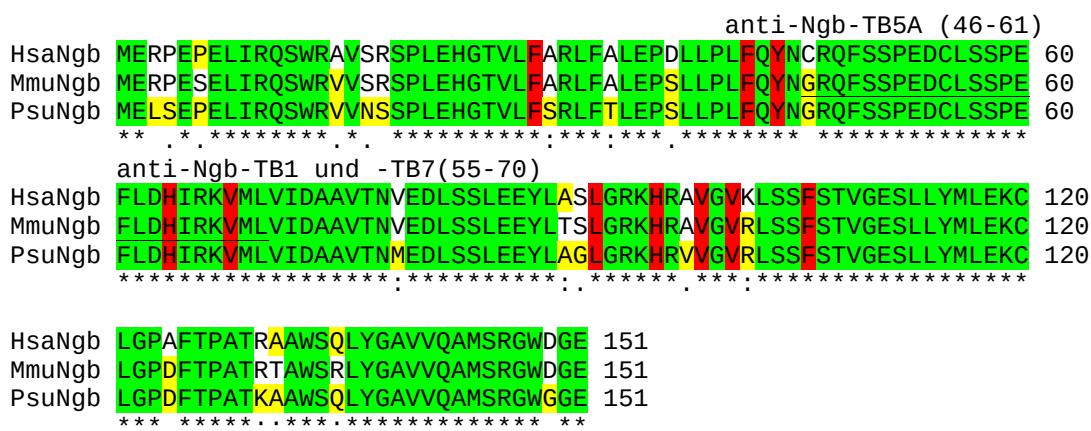
3.4.1 Klonierung und Sequenzierung der cDNAs für Ngb und Cygb aus *Phodopus sungorus*

Für die Realtime Q-PCR-Analysen mit *Phodopus sungorus*-Material war es notwendig, die authentischen speziesspezifischen Gensequenzen für das Design der PCR-Primer zu ermitteln. Erfahrungsgemäß kann schon der Austausch eines Nukleotids in der Primersequenz die Reaktion komplett zum Erliegen bringen, so dass die Verwendung von Primern, die anhand von Maus-, Ratte- oder Mensch-Sequenzen generiert wurden, wenig sinnvoll erschien. Zur Isolierung der *Phodopus*-Sequenzen von Ngb, Cygb und Haushalts- sowie Kontrollgenen wurden auf der Grundlage von bekannten humanen und murinen Gensequenzen zunächst degenerierte Primer entworfen, mit deren Hilfe die CDS bzw. Teile der CDS der korrespondierenden *Phodopus*-Gene amplifiziert werden konnten (Anhang 7.5). Die so gewonnenen partiellen CDS-Sequenzen dienten anschließend zur Generierung entsprechender intronüberspannender Q-PCR-Primer (Tab. 7-4). Diese Vorgehensweise wurde für Kandidatengene, die lediglich als Haushalts- und Kontrollgene verwendet werden sollten, als hinreichend erachtet. Die Neuroglobin- und Cytoglobin-mRNA von *Phodopus* sollte hingegen in voller Länge ihres Transkriptes sequenziert werden. Hierzu wurden in der sog. RACE-Reaktion („*rapid amplification of cDNA ends*“; 2.6) die 5'- und die 3'-UTRs der Gene amplifiziert.

Ein Alignment der kodierenden Sequenzen des Neuroglobins zeigte auf Nukleotidebene eine Übereinstimmung von 87 % zwischen *Phodopus sungorus* und Mensch sowie 92 % zwischen *Phodopus* und der Maus. Die Übereinstimmung zwischen der menschlichen und der Maus-CDS beträgt zum Vergleich 88 %.

Ein Vergleich der kompletten mRNA-Sequenz des Neuroglobins aus *Phodopus sungorus* (Abb. 3-28) mit den Ngb-mRNA Datenbankeinträgen aus Mensch (NM021275) und Maus (BC024263) bestätigte die Vollständigkeit der 896 bp umfassenden 3'-untranslatierten Region, worauf das Vorhandensein eines Polyadenylierungssignals in diesem Abschnitt bereits hindeutete. Der 5'-untranslatierte Bereich von 191 bp war im Vergleich zur humanen um ca. 200 bp und im Vergleich zur Maus-Sequenz um ca. 100 bp verkürzt. Bis auf eine Ausnahme wurden bei der Sequenzanalyse der 5'-RACE-Amplifikate meistens Fragmente gefunden, die um weitere 100 bp verkürzt waren. Da alle Produkte die Erkennungssequenz des 5'-RACE-Primers an ihrem 5'-Ende enthielten, lässt sich annehmen, dass im Rahmen dieser Analyse mehrere mögliche Transkriptionsstartpunkte des Ngb-Gens erfasst wurden.

Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz des Neuroglobins von *Phodopus sungorus* zeigte Übereinstimmungen von 89 % zur menschlichen und 90 % zur Maus-Sequenz. Entsprechend stimmt das humane NGB mit dem Maus-Ngb zu 94 % überein.



106

Ein Teil der kodierenden Sequenz des Cytoglobins aus *Phodopus sungorus* wurde bereits von einer Arbeitsgruppe in Münster ermittelt und von Prof. Burmester freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dennoch fehlte sowohl das Startkodon, als auch ein ca. 80 bp langes Fragment im 3'-Bereich inklusive des Stopkodons. Im Rahmen der durchgeführten RACE-Analysen konnten im Gegensatz zur kodierenden Sequenz die 5'- und 3'- untranslatierten Bereiche des Cytoglobins nicht vollständig ermittelt werden (Abb. 3-30). Da jedoch die Kenntnis der kompletten kodierenden Sequenz sowohl für die Generierung der Primer für die Realtime Q-PCR-Analysen als auch zur Identifizierung der Antikörper-Bindestellen völlig ausreichte, wurde von weiteren Analysen abgesehen.

```

1  GGACACTGAC ATGGACTGAA GGAGTAGAAA CGCTCGCACG CACCGGCCTC GGCTCGGGCT
61  CCCCGCTCCC GCCGCCAGC GAAGCCGCGC TGGGCTCCGA GTTGCTGCTC ATGGAGAAAG
121 TGCCAGGCGA CATGGAGAGA GAGCGAGGG AGCGGAGCGA GGAGCTGTCC GAGGCGGAGA
181 GGAAGGCGGT GCAGGCTACG TGGGCCCGGC TGTATGCCAA CTGCGAGGAC GTGGGGGTGG
241 CCATCCTGGT GAGGTTCTTC GTGAACTTCC CATCAGCCAA GCAGTACTTC AGCCAGTTCA
301 GGCACATGGA GGACCCCTTG GAGATGGAGA GGAGCCCCCA GCTGCGGAAG CATGCCTGCA
361 GGGTCATGGG GGCCCTCAAC ACTGTCGTGG AGAATCTGCA TGACCCAGAC AAGGTGTCCT
421 CTGTGCTTGC CCTGGTCGGC AAAGCACACG CCCTCAAGCA CAAGGTGGAA CCTGTGTACT
481 TCAGATCCT CTCTGGGGTC ATTCTGGAGG TGATCGCCGA GGAGTTTGCC AATGACTTCC
541 CTCCTGAGAC GCAGAAAGCC TGGGCCAAGC TGCGTGGTCT CATCTACAGC CATGTGACCG
601 CTGCCTACAA GGAAGTGGGC TGGGTACAGC AGGTCCCCAA CACTGCCACC CCACCGACCA
661 CACTACCCTC CTCGGGGCCA TAGGACCGCT CCCGGCTCCC CCGTCCCTGG CAGCACTTTG
721 GGCAGAAAGC TGAATTCTGA AGTCACTCCT TGACCTTCCA TTTCTGAACG CCAAGGAAGC
781 CGGAGGAACC CTGACTCAAC TTCCCGAAAG GAGGCCTTCC TCATGGCCCT GGTCCCCCAG
841 GCTGCTGGGA GGGGGCCTTG ACGCTGAACC TACAGTGGAG GGACTCTTCT GCCTCTCAGC
901 AGGGGGCGTC CTTGTCTTAG CTTTTCTACT TACGTTAGAG AGGGACCCAG CAAGTGGCCC
961 GTGGGAATCG AGGACAAGCC TGCGAGCCAC TTGGGAAAAG AAGTAGCTTC ATTCTGCCCA
1021 CCAGCATGCG GGTTCACGCC ACCATCTCTA GAGTATCACA CGCACATGTC TACCATATAT
1081 ACAATATAT TCTATATACG ATCTCTATAT AAATATATAT ACGTAC

```

Abbildung 3-30 Partielle mRNA Sequenz des Cytoglobins aus *Phodopus sungorus*
 Länge: 1126 bp (5'- und 3'-UTR sind unvollständig), **ATG** und **TAA**: Translationsstart und -stop. Die Lage der farblich markierten Exons **1 (143 bp)**, **2 (232 bp)**, **3 (164 bp)** und **4 (31 bp)** wurde anhand von bekannten Säuger-Ngb-Genomsequenzen bestimmt.

Ein Vergleich der ermittelten partiellen Zwerghamster Cygb-mRNA-Sequenz mit den Datenbankeinträgen zeigte, dass diese mit 1126 bp deutlich kürzer war als die menschlichen Cygb-Sequenzen mit 2156 bp (BQ881744 und NM134268) und die Maus-Cygb-mRNA-Sequenz mit einer Länge von 2330 bp (NM030206). Im 5'-Bereich fehlten im Vergleich zur menschlichen mRNA ca. 260 bp (BQ881744) und im Vergleich zur Maus-mRNA 315 bp. Im 3'-Bereich war die *Phodopus sungorus* Sequenz um ca. 810 bp kürzer als die humane und um ca. 950 bp kürzer als die Maus-mRNA.

Ein Alignment der kodierenden Nukleotidsequenzen zeigte Übereinstimmungen von 93% zwischen Zwerghamster-Cygb und Mensch- bzw. Maus-Cygb. Indessen stimmten Mensch- und Maus-Cytoglobin-CDS zu 92 % überein. Auch die Aminosäuresequenzen des Cytoglobins wiesen einen höheren Grad der Konservierung auf als die des Neuroglobins. So stimmte das Hamster-Cytoglobin zu 94 % mit der menschlichen und zu 96 % mit der Maus-Sequenz überein. Die Identität der Proteine aus Mensch und Maus betrug 95 %. Zudem handelt es sich bei den im Hamster-Protein abweichenden Aminosäuren, die in Mensch und Maus konserviert sind, lediglich um isofunktionelle Austausche, die wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Faltung und Funktionsfähigkeit des Proteins haben. Gerade beim Cytoglobin, für das mehrere Antikörper generiert wurden, die gegen unterschiedliche Domänen des Proteins aus Mensch gerichtet waren, war es wichtig, die Aminosäuresequenz des Proteins zu kennen. In der Abb. 3-31 ist die Aminosäuresequenz der Cytoglobine aus Mensch, Maus und Zwerghamster verglichen und die Lage der Antikörper-Epitope eingezeichnet. Die Antikörper anti-Cygb2 und 3 können zur Detektion des Cygb-Proteins aus Phodopus verwendet werden, während der Antikörper anti-Cygb1 aufgrund von zwei Aminosäureaustauschen innerhalb des Antigenpeptids nicht ohne Vorbehalte für Immunfärbungen bzw. Western Blot-Analysen eingesetzt werden sollte.

	anti-Cygb1-N-AK(2-16)	
HsaCygb	MEKVPGEIERRERSEELSEAERKAVQAMWARLYANCEDVGVAIVRFFVNFPSAKQYF	60
MmuCygb	MEKVPGDMEIERRERSEELSEAERKAVQATWARLYANCEDVGVAIVRFFVNFPSAKQYF	60
PsuCygb	MEKVPGDMEIERRERSEELSEAERKAVQATWARLYANCEDVGVAIVRFFVNFPSAKQYF	60

	anti-Cygb2-M-AK(66-80) anti-Cygb2-V-AK(92-106)	
HsaCygb	SQFKHMEDPLEMERSPQLRKHACRVMGALNTVVENLHDPKVSSVLALVGKAHALKHKVE	120
MmuCygb	SQFRHMEDPLEMERSPQLRKHACRVMGALNTVVENLHDPKVSSVLALVGKAHALKHKVE	120
PsuCygb	SQFRHMEDPLEMERSPQLRKHACRVMGALNTVVENLHDPKVSSVLALVGKAHALKHKVE	120

HsaCygb	PVYFKILSGVILEVVAEEFASDFPPETQRAWAKLRGLIYSHVTAAYKEVGWVQQVPNATT	180
MmuCygb	PMYFKILSGVILEVIAEEFANDFPVETQKAWAKLRGLIYSHVTAAYKEVGWVQQVPNTTT	180
PsuCygb	PVYFKILSGVILEVIAEEFANDFPETQKAWAKLRGLIYSHVTAAYKEVGWVQQVPNTAT	180

HsaCygb	PPATLPSSGP	190
MmuCygb	PPATLPSSGP	190
PsuCygb	PPTLPSSGP	190

Abbildung 3-31 Ein Vergleich der Cygb-Proteinsequenzen aus Mensch, Maus und Hamster; grün und gelb markiert sind die konservierten Positionen; rot unterlegt sind für die Globinfaltung essentielle Aminosäuren. Unterstrichen sind Peptide, die zur Generierung polyklonaler anti-Cygb-Antikörper verwendet wurden, darüber sind die Namen der Antikörper notiert.

3.4.2 Q-PCR-Analyse der Ngb- und Cygb-Expression in jung adulten und seneszenten *Phodopus sungorus*

Für die Analyse der Ngb- und Cygb-Expression in verschiedenen Hirnbereichen von jungen und alten Individuen der Spezies *Phodopus sungorus* wurden die Gehirne von insgesamt 12 Tieren entnommen (Tab. 3-4). Im ersten Versuchsdurchlauf wurden die Tiere 1 bis 6 (1-3 jung; 4-6 alt) präpariert und die RNA aus den vier verschiedenen Hirnbereichen (Kleinhirn, Hippocampus, Cortex und „Resthirn“) eines Tieres parallel isoliert. Der Q-PCR-Lauf im Anschluss zeigte teilweise sehr große Schwankungen in den Ngb-mRNA-Mengen zwischen den Hirnregionen der einzelnen Individuen, die die Auswertung der Daten maßgeblich erschwerten (Abb. 3-32A). Um dies zu umgehen, wurden bei der RNA-Präparation der folgenden sechs Tiere 7-12 (7-9 alt; 10-12 jung) die zu vergleichenden Hirnregionen aus allen 6 Tieren parallel bearbeitet. Dennoch konnten die individuellen Schwankungen in den mRNA-Mengen auf diese Weise nicht eliminiert werden (Abb. 3-32B), so dass es sich hierbei eventuell um einen biologisch relevanten Befund handelt. Die Analyse der Neuroglobin-Expression erfolgte anhand von insgesamt drei Q-PCR-Läufen. Zunächst wurden in zwei Ansätzen technische Replikate der Tiere 1 bis 6 (zwei cDNA-Synthesen mit der gleichen RNA als Matrize) untersucht. Anschließend wurden diese Daten mit den biologischen Replikaten der Tiere 7 bis 12 verglichen. Alle drei Q-PCR-Läufe lieferten ähnliche Ergebnisse, weshalb in den folgenden Abbildungen teilweise exemplarisch die Daten einzelner Läufe dargestellt sind aber auch Daten mehrerer Läufe zusammengefasst wurden.

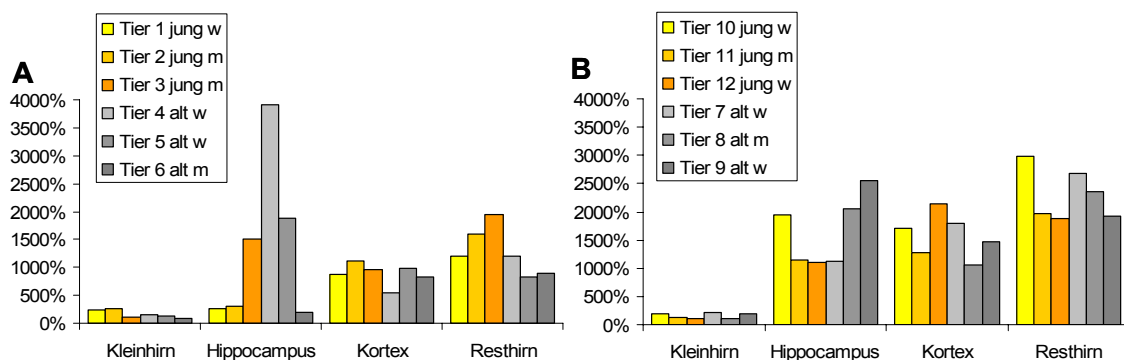


Abbildung 3-32 Ngb-mRNA-Expression in jungen und alten *Phodopus sungorus*. (A) Tiere 1 bis 6 und (B) Tiere 7 bis 12. Als Bezugswerte dienen die Ngb-mRNA-Mengen im Kleinhirn der jungen Tiere 3 und 12, die gleich 100% gesetzt wurden. Die Ngb-Expression im Kleinhirn war am geringsten, die anderen Hirnregionen wiesen ca. 20-30fach höhere Ngb-Konzentrationen auf. Die Ngb-mRNA-Mengen im Hippocampus der Einzeltiere unterlagen den größten Schwankungen mit Maximalwerten um Faktor 20 in Tieren 1-6 und Faktor 2,3 in Tieren 7-12.

In den oben abgebildeten Säulendiagrammen (Abb. 3-32) wurden die Einzelwerte der Ngb-mRNA-Mengen relativ zum niedrigsten Wert aufgetragen. Die größte Varianz zeigte sich im Ngb-mRNA-Gehalt im Hippocampus, wobei das Tier 4 im Vergleich zum Tier 6 eine fast 20fach höhere Konzentration aufwies. In der zweiten Verarbeitung der Proben (Tiere 7-12) tauchten solche großen Schwankungen zwar nicht auf, dennoch variierte die detektierte mRNA-Menge im Hippocampus der einzelnen Individuen immer noch um Faktor 2. Ein Grund für diese Abweichungen liegt möglicherweise in der Präparation der Gehirnbereiche. Während Kleinhirn und ein Stück des cerebralen Cortex ohne Probleme vom Gesamthirn abgetrennt werden konnten, wurden zusammen mit dem sehr kleinen Hippocampus-Areal möglicherweise ungleiche Mengen des umgebenden Gewebes verarbeitet, die die Unterschiede in den Ngb-mRNA-Konzentrationen verursachen könnten. Trotz der individuellen Schwankungen ließ sich aus den Daten entnehmen, dass die Ngb-mRNA-Expression im „Resthirn“ von *Phodopus* offensichtlich am höchsten war, während die durchschnittlichen mRNA-Konzentrationen im Cortex und Hippocampus miteinander vergleichbar und um ca. ein Drittel geringer waren. Im Vergleich dazu war die detektierte Ngb-mRNA-Menge im Kleinhirn der Tiere um den Faktor 10-15 geringer als in den übrigen Gehirnbereichen.

Die enormen Schwankungen der Ngb-mRNA-Mengen in den verschiedenen Hirnbereichen der Einzeltiere beeinflussten maßgeblich die Analyse der Ngb-Expression in jung adulten und seneszenten Tieren und erschwerten eine eindeutige Aussage über ihre mögliche Regulation im Alter. In der folgenden Abbildung 3-33 wurde der Vergleich zwischen der Ngb-Expression in allen untersuchten jungen und alten Individuen in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar und bringen die großen Schwankungen der Einzelwerte zum Ausdruck. Das Diagramm wurde anhand von Q-PCR-Daten erstellt, die auf die Konzentration der Gesamt-RNA normalisiert wurden. Obwohl für jede cDNA-Synthese entweder ARP oder GAPDH als Haushaltsgene mitgeführt wurden, stellte sich im Rahmen der Auswertung heraus, dass das Einbeziehen der Referenzen keinen Einfluss auf die erzielten Ergebnisse hatte. Aus diesem Grund wurde in der endgültigen Auswertung auf die Normalisierung auf Referenzgene verzichtet. Aufgrund der Daten aus allen drei durchgeführten Q-PCR-Läufen lässt sich keine signifikante altersabhängige Veränderung in der Ngb-Expression in den untersuchten Hirnbereichen von *Phodopus sungorus* feststellen.

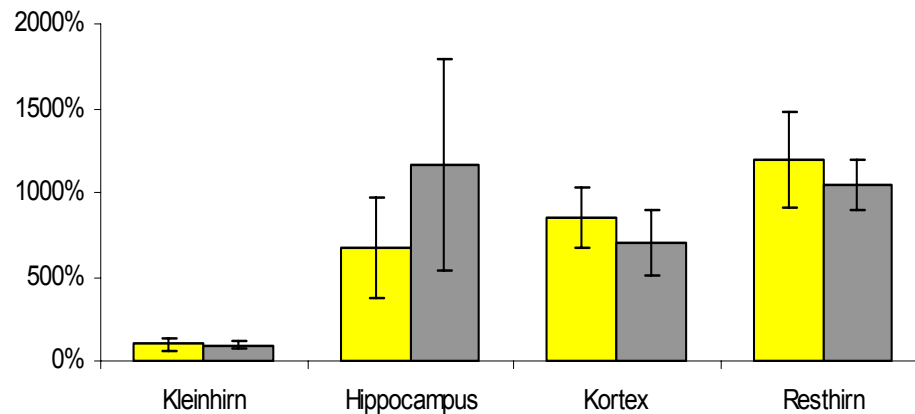


Abbildung 3-33 Ngβ-mRNA-Expression in verschiedenen Hirnbereichen von jungen und alten *Phodopus sungorus*. Eine Säule stellt jeweils den Mittelwert aus sechs jungen (gelb) bzw. (grau) alten Individuen dar (n=6). Als Bezugspunkt wurde das Gewebe mit der geringsten mRNA-Menge in jungen Tieren gewählt, d.h. Kleinhirn jung entspricht 100%. Die stark variierenden Einzelwerte spiegeln sich in den großen Fehlerbalken wieder. Im Rahmen der durchgeführten Q-PCR-Analysen konnte auch nach statistischer Auswertung (Student's t-Test) keine signifikante Veränderung der mRNA-Menge in den verschiedenen Hirnbereichen seneszenten Tiere detektiert werden.

Zur Analyse der Cytoglobin-Expression wurden ebenfalls drei Q-PCR-Analysen angefertigt. Ebenso wie beim Neuroglobin wurden zum einen die zwei technischen Replikate der Tiere 1-6 untersucht und anschließend mit dem biologischen Replikat anhand der Tiere 7 bis 12 verglichen. Auch hier stimmten die Ergebnisse der drei Läufe miteinander überein, wobei die Cygb-mRNA-Mengen weitaus geringeren Schwankungen sowohl zwischen den einzelnen Hirnregionen als auch zwischen den einzelnen Individuen unterlagen (Abb. 3-34).

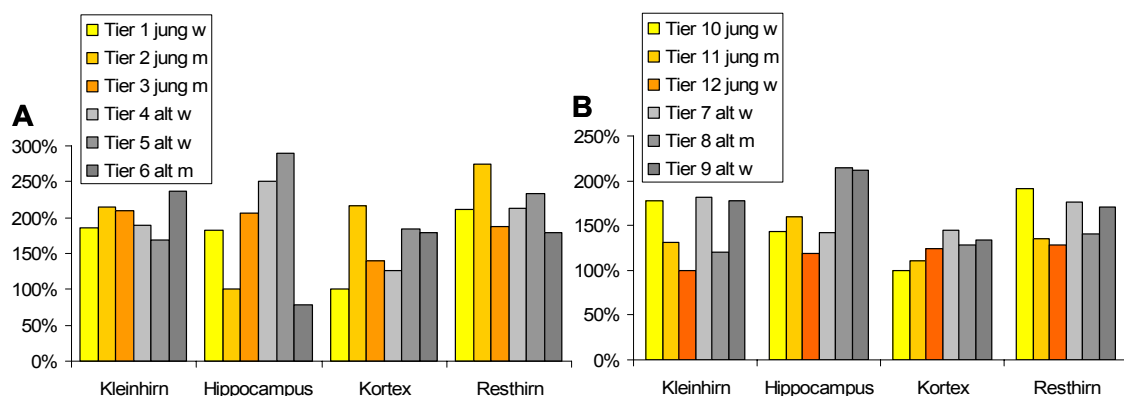


Abbildung 3-34 Cygb-mRNA-Expression in jungen und alten *Phodopus sungorus*. (A) Tiere 1 bis 6 und (B) Tiere 7 bis 12. Als Bezugswert wurde die Cygb-mRNA-Menge im Cortex der jungen Tiere 1 bzw. 10 gleich 100% gesetzt. Die einzelnen Hirnregionen enthielten vergleichbare Cygb-mRNA-Mengen, während sich die individuellen Schwankungen maximal um den Faktor 3 bewegten (Hippocampus Tiere 1-6), meistens jedoch den Wert von 1,8 nicht überschritten.

Auch im Fall von Cytoglobin konnten keine evidenten Unterschiede in den mRNA-Mengen in Gehirnen von jung adulten und seneszenten Individuen detektiert werden. Eine leichte Tendenz zur erhöhten Cygb-Expression im Kleinhirn, Hippocampus und Cortex von alternden Tieren war zwar zu verzeichnen, jedoch lagen die Differenzen auch hier innerhalb der Standardabweichungen und waren nach Student's t-Test-Berechnungen als nicht signifikant zu werten. Die Normalisierung erfolgte auch hier auf die Gesamt-mRNA-Menge, da die Einbeziehung der Referenzgene ARP und GAPDH zu keinen Veränderungen im Gesamtergebnis führte.

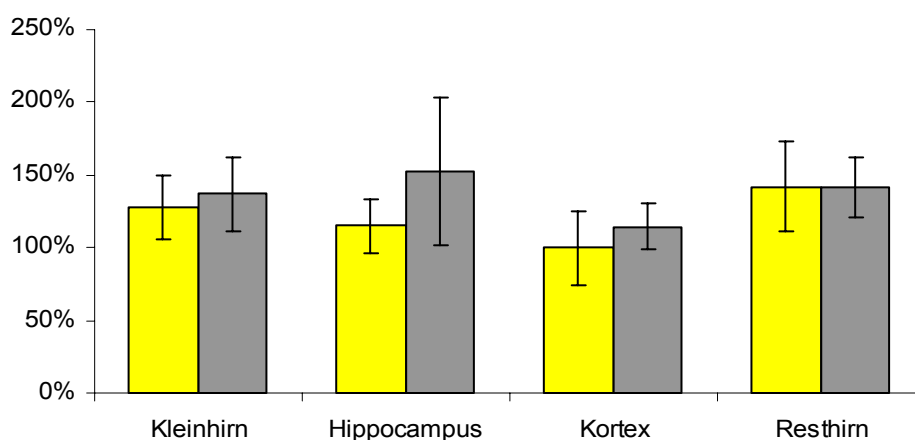


Abbildung 3-35 Cygb-mRNA-Expression in verschiedenen Hirnbereichen von jung adulten und seneszenten *Phodopus sungorus*. Als Bezugswert wurde die Cygb-mRNA-Menge im Cortex der jungen Tiere (gelb) gleich 100% gesetzt. Die grauen Balken stellen die Werte der alten Tiere dar. Jede Säule stellt einen Mittelwert aus 6 Tieren dar (n=6). Die Cygb-mRNA-Konzentrationen waren in allen untersuchten Hirnbereichen ungefähr gleich. Die individuellen Schwankungen waren geringer als beim Ngb, so dass die Fehlerbalken kleiner ausfielen. Dennoch konnte auch beim Cygb keine Regulation der Expression im Alter beobachtet werden.

3.4.3 Q-PCR-Analyse der Expression von Kontrollgenen während der *Phodopus*-Alterung

Im Rahmen der Genexpressionsanalysen von Neuroglobin und Cytooglobin im Alterungsprozess stellte sich die Frage, ob die Q-PCR eine geeignete Methode darstellt, um eventuelle Unterschiede in den mRNA-Mengen zwischen jungen und alten Individuen zu detektieren. Um dies zu untersuchen wurden weitere Gene in die Analysen miteinbezogen, deren Expression im Alter der Literatur nach einer Regulation unterliegt. Hierfür wurde ein Bestandteil des Immunsystems, das Complement 4 (C4), sowie die mRNA des Ca^{2+} -bindenden Proteins Calmodulin 1 (Calm1), das an vielen Signaltransduktionskaskaden beteiligt ist, ausgewählt. Für das erste Gen C4 wurde im Rahmen einer Microarray-Analyse im Mausgehirn eine altersabhängige Hochregulation um den Faktor 3,7 bis 4,9 sowohl im cerebralen Cortex als auch im Kleinhirn beschrieben, die zusätzlich mit einer Q-PCR-Analyse bestätigt wurde (Lee et al., 2000). Das Calm 1 sollte laut einer weiteren Microarray-Untersuchung im alternden humanen Cortex cerebrum um den Faktor 2,2 bis 4,1 herunterreguliert sein (Lu et al., 2004).

Die quantitative Realtime PCR-Analyse der C4-Expression umfasste zwei unabhängige Versuchsdurchführungen mit jeweils 3 jungen und 3 alten Tieren (Tiere 1-6 und Tiere 7-12). Beide Läufe zeigten übereinstimmende Ergebnisse, wobei auch hier ähnlich wie beim Neuroglobin die Schwankungen in den C4-mRNA-Mengen der einzelnen Tiere erheblich waren. Eine tendentiell erhöhte C4-Expression im Alter war zwar erkennbar, aufgrund der großen Standardabweichungen jedoch statistisch nicht signifikant.

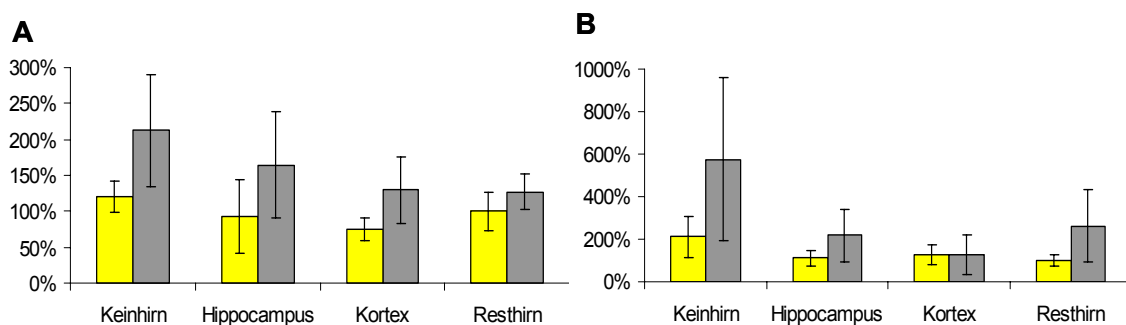


Abbildung 3-36 C4-mRNA-Expression in jungen und alten *Phodopus sungorus*. Die Säulen stellen den Mittelwert aus den C4-mRNA-Mengen in je drei jungen (n=3) und 3 alten (n=3) Tieren dar. Als Bezugswert wurde die mRNA-Menge im „Resthirn“ der jungen Tiere gewählt und gleich 100 % gesetzt. Aufgrund der starken Schwankungen der ermittelten C4-mRNA-Mengen in den Einzeltieren, konnte keine signifikante Regulation in der C4-Expression zwischen jungen und alten Individuen festgestellt werden, dennoch ließ sich eine Tendenz zur gesteigerten C4-Expression im Alter beobachten.

Während die Abweichungen der Individuen 1 bis 6 keiner erkennbaren Regelmäßigkeit unterlagen, fielen im Q-PCR-Lauf der Tiere 7 bis 12 die stark differierenden Werte des Tieres Nummer 8 auf (Abb. 3-37A). Nachdem diese extrem niedrigen Werte aus der Auswertung ausgeschlossen wurden, konnte eine signifikante Regulation des C4 sowohl im Kleinhirn ($p < 0,05$), wie auch im „Resthirn“ ($p \leq 0,01$) der Tiere 7 bis 12 beobachtet werden. Die ermittelte Hochregulation um den Faktor von 3,7 im Kleinhirn, sowie 3,6 im „Resthirn“ stimmte gut mit den aus der Literatur bekannten Werten überein. Auch im Hippocampus und im Cortex deuteten sich erhöhte C4-mRNA-Mengen in Gehirnen von alten Tieren an, die jedoch nach statistischer Bearbeitung der Ergebnisse keine signifikanten Werte erreichten (Abb. 3-37B).

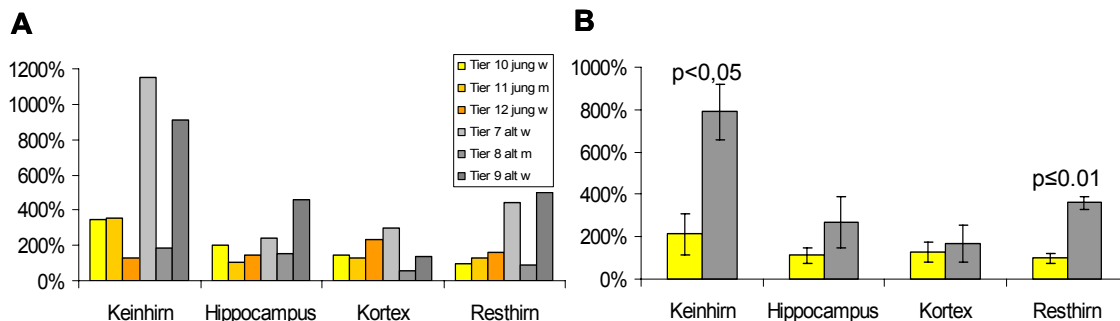


Abbildung 3-37 C4-mRNA-Expression in jung adulten und seneszenten *Phodopus sungorus*. Die C4-mRNA-Menge im „Resthirn“ des Tieres 10 wurde als Bezugswert gewählt und gleich 100% gesetzt. Zu sehen sind die großen Schwankungen zw. den einzelnen Individuen (A.). Die Säulen in B. stellen den Mittelwert aus den C4-mRNA-Mengen in drei jungen ($n=3$) und 2 alten ($n=2$) Tieren dar, in Bezug auf die mRNA-Menge im „Resthirn“ der jungen Tiere, die gleich 100% gesetzt wurde. Die um den Faktor 3,7 bzw. 3,6 erhöhten C4-mRNA-Mengen in Kleinhirn und „Resthirn“ sind signifikant (Student's t-Test: $p < 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$) und stimmen gut mit den Literaturwerten überein.

Nähere Untersuchungen der Q-PCR-Daten waren in Bezug auf Schwankungen der C4-mRNA-Menge in den Gehirnen der einzelnen Individuen sehr aufschlussreich. Es stellte sich heraus, dass während die C4-Expression in jungen Tieren keine maßgeblichen geschlechtsspezifischen Unterschiede aufzeigt, deren Hochregulation im Alter sehr wohl geschlechtsspezifisch ausfällt. Während in weiblichen *Phodopus sungorus* eine deutliche Heraufregulation der C4-mRNA in allen Hirnbereichen der alten Individuen zu verzeichnen ist, scheint die C4-Expression in alten Männchen kaum von der Expression in jungen Männchen abzuweichen. In Abb. 3-38 sind diese Beobachtungen in Form von Säulendiagrammen veranschaulicht.

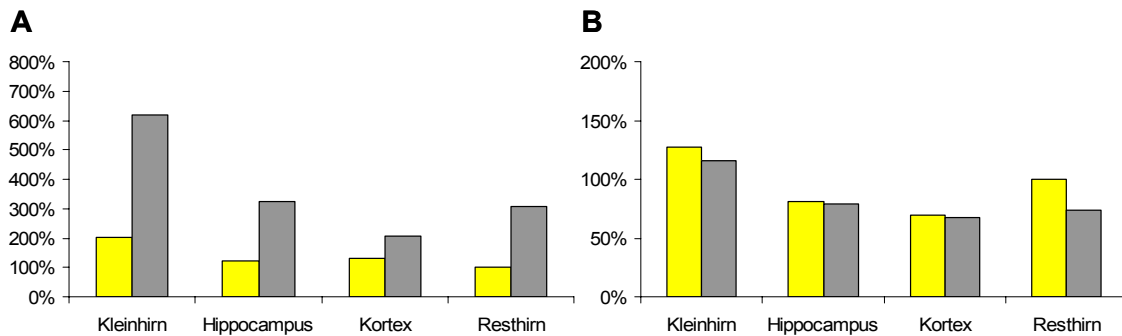


Abbildung 3-38 C4-mRNA-Expression in weiblichen (A) und männlichen (B) jungen und alten *Phodopus sungorus*. Die C4-mRNA-Menge im „Resthirn“ der jungen Tiere wurde als Bezugswert gewählt und jeweils gleich 100 % gesetzt. Für den geschlechtsspezifischen Vergleich wurden alle 12 Tiere zusammengefasst. In den weiblichen Tieren (jung: n=3; alt: n=4) war eine deutlich erhöhte C4-Expression im Alter zu verzeichnen, während in männlichen Individuen (jung: n=3; alt: n=2) keine signifikante Regulation zu beobachten war.

Im Gegensatz dazu waren die Expressionsanalysen der Calmodulin1-mRNA (Calm1 bzw. CaM I) weniger anschaulich. Es wurden wiederholt in zwei unabhängigen Q-PCR-Läufen zunächst die Proben der Tiere 1 bis 6 und anschließend die Proben der Tiere 7 bis 12 untersucht. Beide Läufe lieferten ähnliche Ergebnisse, wobei keine signifikante Veränderung der Calm1-mRNA-Expression im Alter zu verzeichnen war. In Abb. 3-39B sind die Säulendiagramme aus den Q-PCR-Daten der Tiere 7 bis 12 gezeigt. Eine Gegenüberstellung der Calm1-Q-PCR-Werte der einzelnen Tier-Proben (Abb. 3-39A) zeigte, dass diese vergleichsweise geringen Schwankungen unterlagen. Diese Gegebenheit unterstützte die Aussage, dass die Calmodulin1-mRNA-Expression in den untersuchten jungen und alten Hamstern keiner Regulation unterlag.

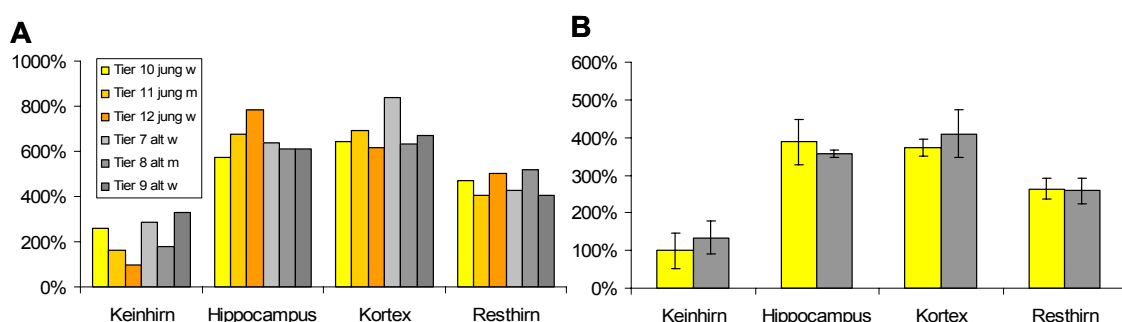


Abbildung 3-39 Calmodulin1-mRNA-Expression in jungen und seneszenten *Phodopus sungorus*. Die mRNA-Menge im Kleinhirn der jungen Tiere wurde als Referenzwert gleich 100 % gesetzt. Es war keine signifikante Herunterregulation der Calm1-mRNA-Expression im Alter zu erkennen. Im Hippocampus und Cortex wurde im Vergleich zum Kleinhirn eine vierfach höhere mRNA-Menge detektiert.

3.5 Experimente zur Herstellung einer Neuroglobin knock out-Maus

Um Erkenntnisse über die Funktion von Neuroglobin im gesamten Organismus zu gewinnen, sollte das *Ngb*-Gen in der Maus ausgeschaltet werden. Hierzu wurden im Laufe dieser Arbeit insgesamt drei verschiedene Targeting-Vektoren hergestellt (*Ngb*-ko1, *Ngb*-ko3.1 und 3.2). Das knock out-Projekt wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Sendtner am Institut für klinische Neurobiologie in Würzburg durchgeführt, in der die Kultivierung und Manipulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) sowie die Zucht von knock out-Mäusen routinemäßig durchgeführt wird. Das verwendete Plasmid pPNT (Tybulewicz et al., 1991) (Abb. 7-2 im Anhang) wurde uns von unserem dortigen Ansprechpartner Dr. Stefan Wiese freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der pPNT-Vektor enthält eine Neomycinresistenz-Kassette (Neo), die auf beiden Seiten von multiplen Klonierungsstellen (MCS) flankiert wird. 5' aufwärts der Neo-Kassette liegen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Not I, Xho I und Sda I (MCS 1), während 3' abwärts die Restriktionsschnittstellen Xba I, Bam HI, Acc 651, Kpn I und Eco RI (MCS 2) lokalisiert sind. In diese Schnittstellen erfolgte die gerichtete Klonierung der genomischen *Ngb*-Bereiche für die homologe Rekombination, wobei Exons 1 und 2 des Neuroglobins durch die Neomycinresistenz-Kassette ersetzt wurden. Zudem enthält der pPNT-Vektor 3'-abwärts der MCS 2 ein Gen für die Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase (HSV-tk), die ähnlich wie die Neo-Kassette unter der Kontrolle eines eigenen Phosphoglyceratkinase-1 Promotors (PGK-1 Pr) steht und eine negative Selektion von unspezifisch rekombinierten ES-Zell-Klonen ermöglichen sollte.

3.5.1 Konstruktion des Targeting-Vektors „*Ngb*-ko1“

Für die Herstellung der homologen Genbereiche des Targeting-Vektors *Ngb*-ko1 standen zunächst nur 7578 bp an genomischer Mausequenz zur Verfügung (AJ_580010). Dieser Datenbankeintrag wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit generiert und konnte zu diesem Zeitpunkt durch entsprechende Daten aus dem Maus-Genomprojekt noch nicht erweitert werden. Für das „gene-targeting“ war es wichtig,

dass bei der Konstruktion des knock out-Vektors Integrate verwendet wurden, die einen möglichst geringen Anteil an repetitiven Sequenzen aufwiesen. Dadurch sollte die spezifische homologe Rekombination begünstigt werden. Im Vergleich zum gesamten Maus-Genom enthält der genomische Ngb-Bereich einen eher geringen Anteil an repetitiven Elementen. Mit dem Online-Programm Repeatmasker wurden die Ngb-Sequenzabschnitte, die in den Targeting-Vektor kloniert werden sollten, einzeln analysiert (Tab. 3-5). Dabei wurden keine auffällig langen repetitiven Elemente identifiziert, die eine unspezifische Rekombination des Vektors ins Maus-Genom herbeiführen könnten. Im 5'-Integrat (Länge: 1045 bp) lag der Gesamtanteil der repetitiven Elemente bei 6,93 % und im 3'-Integrat (3313 bp) bei 14,93 %. Der GC-Gehalt der klonierten Fragmente lag bei 54 % (5'-Integrat) bzw. 52 % (3'-Integrat). Demnach waren Probleme aufgrund eines erhöhten AT-Gehalts ebenfalls nicht zu erwarten.

Tabelle 3-5 Repetitive Elemente in den homologen Abschnitten des Ngb-ko1-Targeting-Vektors 1: kurzer Arm, 2: langer Arm

	Repeat	Position (bp)	Länge (bp)
1	SINE/Alu (B1)	558-629	72
2	(CA) _n Simple_repeat	63-104	42
2	SINE/MIR (MIRm)	776-873	98
2	SINE/Alu (B1_Mus1)	896-1020	125
2	LTR/MaLR (MLT1H2)	1173-1279	107
2	LINE/L2	1481-1602	122

Die Klonierung des Targeting-Vektors Ngb-ko1 (Abb. 3-40) erfolgte in zwei Schritten, wobei zunächst der „kurze Arm“ (5'-Integrat, Tab. 3-6) in die MCS 1 des pPNT-Vektors und anschließend der „lange Arm“ (3'-Integrat, Tab. 3-6) in dessen MCS 2 integriert wurde. Das PCR-Amplifikat des 5'-Integrats umfasste ca. 1170 bp und enthielt eine künstlich mit Hilfe des eingesetzten Primers eingefügte, Not I-Schnittstelle am 5'-Ende sowie eine natürlicherweise in der Ngb-Gensequenz vorkommende Xho I-Schnittstelle im 3'-Bereich. Auf diese Weise konnte nach entsprechenden Restriktionen das um 125 bp verkürzte Fragment gerichtet in die MCS 1 des pPNT-Plasmids kloniert werden. Analog dazu wurde ein 5'-Kontroll-Integrat für die spätere Genotypisierung hergestellt. Das +K-PCR-Produkt wies am 5'-Ende eine Verlängerung um ca. 580 bp auf und wurde entsprechend in die MCS 1 eines pPNT-Vektors kloniert und als „+K in pPNT“ bezeichnet. Dieses Konstrukt diente später als Positivkontrolle bei den PCR-Schnelltests der embryonalen ES-Zell-Lysate (3.5.4). Für das 3'-Integrat des Ngb-ko1-Vektors wurde ein knapp 3500 bp langes PCR-Amplifikat generiert. Die nachfolgenden Restriktionen, an der am 5'Ende eingefügten Bam HI-Schnittstelle sowie an der Kpn I-

Erkennungssequenz im 3'-Bereich, ergaben ein 3313 bp langes Fragment („langer Arm“), das in die MCS 2, des bereits den „kurzen Arm“ enthaltenden Vektors, kloniert wurde.

Primer 1	Primer 2	PCR-Produkt	Schnittstellen	Fragmentlänge nach Restriktion	Bezeichnung
mmuNgb-ko_1 kurzer Arm (NotI)	mmuNgb-ko_2R kurzer Arm	1170 bp	Not I-Xho I	1045 bp	5'Integrat bzw. kurzer Arm
mmuNgb-ko_1b) Kontrolle(NotI)	mmuNgb-ko_2R kurzer Arm	1750 bp	Not I-Xho I	1620 bp	5'Kontroll- Integrat
mmuNgb-ko_3 langer Arm(BamHI)	mmuNgb- ko_8R Sonde2	3485 bp	Bam HI-Kpn I	3313 bp	3'Integrat bzw. langer Arm

Tabelle 3-6 Verwendete Primer und Fragmentlängen der Integrate im Targeting-Konstrukt Ngb-ko1

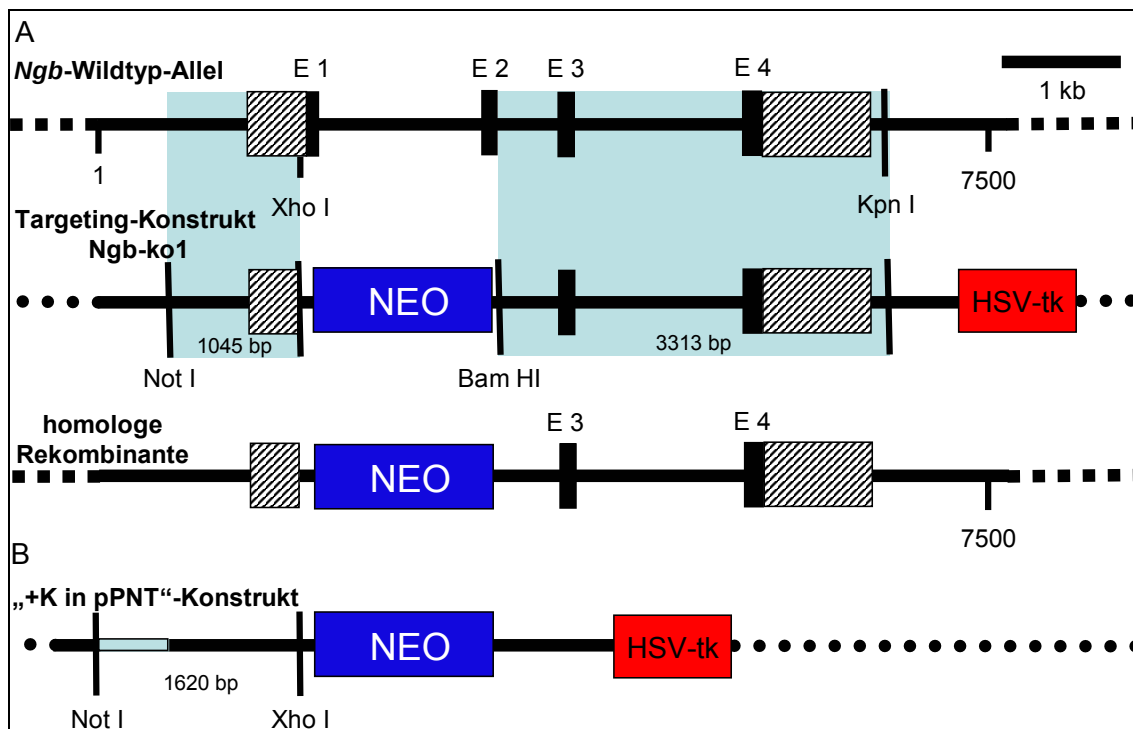


Abbildung 3-40 Skizze des Ngb-ko1-Targeting-Vektors. Unter A. ist im oberen Bereich die genomische Maus-Ngb-Sequenz entsprechend dem Datenbankeintrag AJ_580010 eingezeichnet. Darunter ist das Ngb-ko1-Targeting-Konstrukt, nach der Integration des 5'-kurzen (1045 bp) und 3'-langen Armes (3313 bp) des Neuroglobins dargestellt. Die homologen Bereiche sind hellblau unterlegt. Im Konstrukt wurden die Exons 1 und 2 des Ngb durch die Neomycin-Kassette ersetzt (NEO). Im unteren Bereich von A ist die Ngb-Gensequenz nach der homologen Rekombination dargestellt. B. Kontrollkonstrukt „+K in pNNT“ zur Etablierung eines PCR-Schnelltests für die Genotypisierung der rekombinanten ES-Zell-Klone.

3.5.2 Konstruktion des Targeting-Vektors „Ngb-ko2“

Im Laufe der Arbeit wurden regelmäßig die Datenbanken des Maus-Genomprojekts auf die Anwesenheit neuer genomischer Maus-Sequenzen überprüft. Als diese zur Verfügung standen, sollte ein neues Ngb-ko-Vektorkonstrukt hergestellt werden, dessen homologer Sequenzbereich wesentlich länger sein sollte, als im Ngb-ko1-Vektor. Dies sollte sich positiv auf die Spezifität und die Effizienz der homologen Rekombination auswirken. So sollte anhand des Datenbankeintrags NT_039551 aus dem 5'-Bereich des Ngb-Gens ein „kurzer Arm“ und aus dem 3'-Bereich ein „langer Arm“ zur Klonierung in den Ngb-ko2-Vektor hergestellt werden. Als problematisch stellte sich dabei eine Lücke in den Datenbankeinträgen des Maus-Ngb-Gens heraus, die ca. 570 bp 3'-abwärts des eigenen Datenbankeintrags vorhanden war. Um die Länge des „langen Arms“ deutlich erhöhen zu können, sollte diese durch eigene Sequenzierungen geschlossen werden. Da dies nicht auf Anhieb gelang, wurde ein Alternativkonstrukt, der Ngb-ko3-Vektor ausgearbeitet.

3.5.3 Konstruktion der Targeting-Vektoren „Ngb-ko3.1“ und „Ngb-ko3.2“

Der NCBI-Datenbankeintrag CAA01147488 enthielt eine insgesamt 17 535 bp lange Sequenz, die den lückenlosen Abschnitt des oben genannten Eintrages NT_039551 darstellte. Unter Verwendung dieser Sequenz konnte der bis dahin bekannte genomische Ngb-Bereich um 9386 bp am 5'-Ende und um 568 bp am 3'-Ende erweitert werden. Aus diesem Grund wurde für die Amplifikation des „langen Targeting-Arms“ diesmal der 5'-Bereich und für den „kurzen Arm“ der 3'-Bereich des Gens gewählt. Als Kandidaten für den „langen Targeting-Arm“ sollten drei verschieden lange Abschnitte aus dem 5'-Genbereich (10781 bp, 8130 bp, 6138 bp; siehe Tab. 3-8), im Hinblick auf mögliche technische Schwierigkeiten bei der Amplifikation oder der anschließenden Klonierung, hergestellt werden. Entsprechend wurde für den „kurzen Arm“ ein 1820 bp langer Sequenzanschnitt aus dem 3'-Bereich des Ngb-Gens gewählt (Abb. 3-41). Das 5'-Kontrollfragment für das +K-Konstrukt überspannte den kurzen Arm und enthielt zusätzliche 395 bp aus der genomischen Ngb-Sequenz am 3'-Ende.

Auch hier wurde in den homologen Ngb-Sequenzabschnitten der Anteil an repetitiven Elementen bestimmt (Tab. 3-7). Ähnlich wie beim ersten Konstrukt wurden dabei keine Auffälligkeiten beobachtet, die unspezifische Rekombinationsereignisse der Targeting-Konstrukte begünstigen könnten. Der „Repeats“-Anteil an der Gesamtsequenzlänge der klonierten homologen Fragmente lag bei 15,5 % im „langen Arm“ (10702 bp) und bei 6,9 % im „kurzen Arm“ (1818 bp). Der GC-Gehalt lag bei 49,4 % im langen und bei 51 % im kurzen Arm.

Die Klonierung wurde wieder in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde der „kurze Arm“, unter Verwendung von in der PCR-Amplifikation eingeführten Erkennungssequenzen, in die Schnittstellen Bam HI und Eco RI (MCS 2) des pPNT-Vektors eingefügt. Anschließend erfolgte die Integration der „langen Arme“ in denselben Vektor. Hierfür wurde an den 5'-Enden der PCR-Fragmente jeweils eine Not I-Schnittstelle eingefügt, während am 3'-Ende die bereits vorhandene Xho I-Erkennungsstelle genutzt wurde. Entsprechende Restriktionen führten zu einer Verkürzung der Fragmente um ca. 80 bp. Da die Klonierung der Fragmente 3.1 und 3.2 in die Schnittstellen Not I und Xho I der MCS 1 trotz der beachtlichen Längen von 10702 bp bzw. 8051 bp erfolgreich verlief, wurde auf die Herstellung des dritten Konstruktes Ngb-ko3.3 (6061 bp) verzichtet.

Tabelle 3-7 Repetitive Elemente in den homologen Abschnitten der Ngb-ko3.1 und -ko3.2-Targeting-Vektoren. 1: Langer Arm ko3.1, 2: langer Arm ko3.1 und 3.2, 3: kurzer Arm

	Repeat	Position (bp)	Länge (bp)
1	DNA/MER1_type	130-332	203
1	DNA/MER1_type	591-722	131
1	SINE/MIR	1866-2006	141
1	SINE/MIR	2426-2518	93
2	LINE/CR1	6335-6427	93
2	(T)n_Simple_repeat	7215 -7246	32
2	(TG)n_Simple_repeat	7280 -7318	39
2	SINE/Alu (B1_Mur3)	7338 -7471	134
2	DNA/AcHobo	7809 -7963	155
2	SINE/MIR (MIR_Mars)	8058 -8220	163
2	SINE/Alu (B1_Mus1)	8267 -8419	153
2	SINE/B4	9404 -9532	129
2	SINE/Alu	9563 -9657	95
2	SINE/B4	9597 -9685	89
2	SINE/Alu	10215-10286	72
3	SINE/AluB1_Mus1	389-513	125

Primer 1	Primer 2	PCR-Produkt	Schnittstellen	Fragmentlänge nach Restriktion	Bezeichnung
mmu-ko3-P1.1+Not	mmu-ko3-P2R	10781 bp	Not I-Xho I	10702 bp	5'-Integrat bzw. langer Arm (Ngb-ko3.1)
mmu-ko3-P1.2+Not	mmu-ko3-P2R	8130 bp	Not I-Xho I	8051 bp	5'-Integrat bzw. langer Arm (Ngb-ko3.2)
mmu-ko3-P1.3+Not	mmu-ko3-P2R	6138 bp	Not I-Xho I	6061 bp	5'-Integrat bzw. langer Arm3 (Ngb-ko3.3)
mmu-ko3-P3+Bam	mmu-ko3-P4R+Eco	1820 bp	Bam HI-Eco RI	1818 bp	3'-Integrat bzw. kurzer Arm
mmu-ko3-P3+Bam	Mmu-ko3-posKEco	2215 bp	Bam HI-Eco RI	2213 bp	3'-Kontroll-Integrat

Tabelle 3-8 Verwendete Primer und Fragmentlängender Integrate in den Targeting-Konstrukten Ngb-ko3.1, -ko3.2

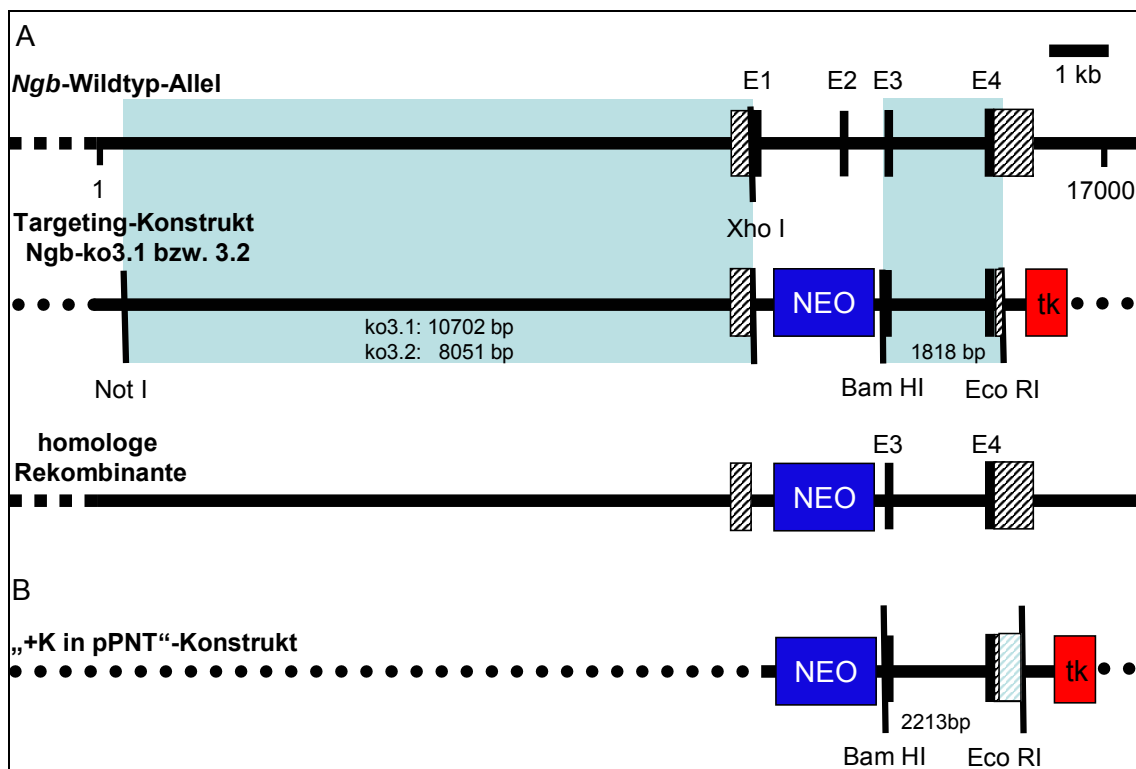


Abbildung 3-41 Übersichtsskizze der Vektorkonstrukte Ngb-ko3.1-ko3.3. Unter A. ist im oberen Bereich die genomische Maus-Ngb-Sequenz, entsprechend dem Datenbankeintrag CAA01147488 eingezeichnet. Darunter sind die Ngb-ko3.1 und Ngb-ko3.2-Targeting-Konstrukte dargestellt. Die homologen Bereiche sind hellblau unterlegt. Im Konstrukt wurden die Exons 1 und 2 des Ngb durch die Neomycin-Kassette ersetzt (NEO). Im unteren Bereich von A ist die Ngb-Gensequenz nach der homologen Rekombination dargestellt. B. Kontrollkonstrukt „+K in pPNT“ zur Etablierung eines PCR-Schnelltests für die Genotypisierung der rekombinanten ES-Zell-Klone.

3.5.4 Etablierung von PCR-Genotypisierungsmethoden zum Nachweis von Targeting-Ereignissen

Die erfolgreiche Aufnahme eines Ngb-Targeting-Vektors ins Maus-Genom würde bedeuten, dass in den entsprechenden embryonalen Stammzellen heterozygot ein Neuroglobin-Gen entsteht, dessen Exons 1 und 2 durch die Neo-Kassette ersetzt wurden. Um diesen Sachverhalt in der genomischen DNA der ES-Zellen per Test-PCR zweifelsfrei nachweisen zu können, musste eine PCR-Primer-Bindungsstelle in der vektorspezifischen Neo-Kassette lokalisiert sein und die andere in der genomischen Ngb-Sequenz außerhalb der klonierten homologen Bereiche liegen.

Zur Etablierung des sog. PCR-Schnelltests wurden für die knock out-Targeting-Vektoren entsprechende +K-Konstrukte hergestellt (Abb. 3-40B und 3-41B). Die 5'- bzw. 3'-Kontroll-Integrate überspannten den jeweiligen kurzen Arm und enthielten Sequenzverlängerungen an den der Neo-Kassette abgewandten Enden. Das Kontrollkonstrukt, mit dem die homologe Rekombination des Ngb-ko1-Targeting-Vektors imitiert werden sollte, enthielt folglich am 5'-Ende zusätzliche 577 bp aus dem flankierenden genomischen Bereich der Ngb-Sequenz, die als Bindungsstelle für einen entsprechenden Primer verwendet werden konnten (Abb.3-42). Der zweite PCR-Primer war spezifisch für den 5'-Bereich der Neo-Kassette. Mit diesem Primerpaar sollte in homolog rekombinierten ES-Zellen ein ca. 1700 bp langes Amplifikat nachgewiesen werden.

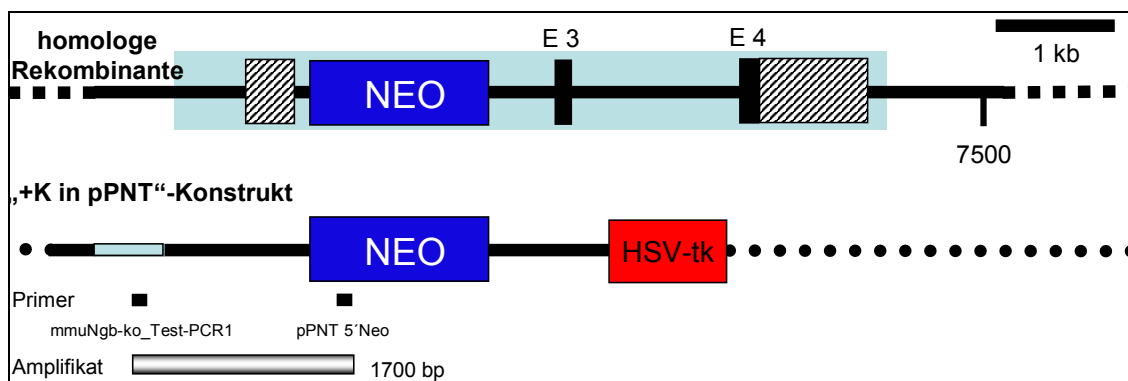


Abbildung 3-42 Kontrollkonstrukt zur Etablierung des PCR-Schnelltests für den Ngb-ko1-Targeting-Vektor. Das „+K in pPNT“-Konstrukt enthält den kurzen Arm des Ngb-ko1-Targeting-Vektors sowie zusätzliche 580 bp aus der 5'-flankierenden genomischen Ngb-Sequenz. Das Plasmid diente zur Etablierung eines PCR-Schnelltests zur Genotypisierung von rekombinanten ES-Zell-Klonen. Dabei wurde ein Primer im 5'-Bereich der Neomycin-Sequenz und der andere in der flankierenden genomischen Sequenz lokalisiert, wodurch in der PCR ein 1700 bp Fragment generiert wurde.

In den Ngb-ko3.1 und Ngb-ko3.2 Targeting-Konstrukten war der kurze Arm identisch. Aus diesem Grund wurde nur ein Kontroll-Konstrukt für beide Vektoren hergestellt. Hierbei lag eine Verlängerung um 395 bp am 3'-Ende des Kontrollfragments vor, die als Bindungsstelle für einen der PCR-Primer genutzt werden sollte. Da das +K-Fragment analog zum kurzen Arm in die MCS 2 3'-abwärts der Neo-Kassette des pPNT-Vektors einkloniert wurde, wurde der zweite Primer für die Test-PCR im 3'-Bereich der Neomycin-Sequenz gewählt (Abb. 3-43). Mit dieser Primerkombination sollte in positiven ES-Zell-Klonen ein ca. 2750 bp langes Fragment amplifiziert werden.

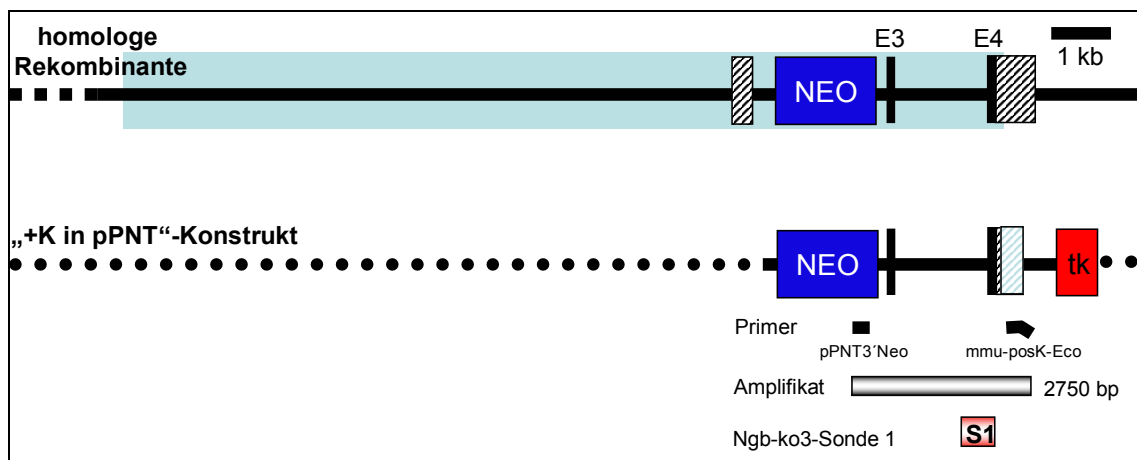


Abbildung 3-43 Kontroll-Konstrukt zur Etablierung des PCR-Schnelltests für die Ngb-ko3.1 und 3.2-Targeting-Vektoren. Das „+K in pPNT“-Konstrukt enthält den kurzen Arm der Ngb-ko3.1 und 3.2-Targeting-Konstrukte sowie zusätzliche 395 bp aus der 3'-flankierenden genomischen Ngb-Sequenz. Das Plasmid diente zur Etablierung eines PCR-Schnelltests zur Genotypisierung von rekombinanten ES-Zell-Klonen. Dabei wurde ein Primer im 3'-Bereich der Neomycin-Sequenz und der andere in der flankierenden genomischen Sequenz lokalisiert, wodurch in der PCR ein 2750 bp Fragment generiert wurde. Mit Hilfe der spezifischen Sonde (S1) sollten eventuell auf einem Gel nicht sichtbare Banden mittels einer Southern Blot-Hybridisierung der PCR-Ansätze detektiert werden.

Targeting-Konstrukt	Gen-spezifischer Primer	Neo-spezifischer Primer	Amplifikatlänge in homolog rekombinierten ES-Zellen
Ngb-ko1	mmuNgb-ko_Test-PCR1	pPNT5'Neo	1700 bp
Ngb-ko3.1 und 3.2	mmu-ko3-posK+Eco	pPNT3'Neo	2750 bp

Tabelle 3-9 Primerkombination und Fragmentlänge zum Nachweis von Targeting-Ereignissen mittels PCR

Durch entsprechende Verdünnungen der +K-Plasmide mit genomischer Maus-DNA wurde die Situation eines „single copy“ Gens im Maus-Genom imitiert, anhand derer die optimalen PCR-Bedingungen für eine effiziente Amplifikation des Fragments aus ES-Zell-Lysaten bestimmt werden konnten. Dazu wurde je 1 µg genomische DNA mit 1 ng, 100 pg, 10 pg und 1 pg +K-Plasmid-DNA versetzt und für die PCR-Amplifikation eingesetzt. 1µg genomische DNA entsprechen $3,4 \times 10^5$ Molekülen Maus-Genom bei einer Größe von $2,7 \times 10^9$ bp. Bei einer Plasmidgröße von 9 kb (pPNT inklusive der +K-Fragmente) entsprechen 1 µg DNA ca. 1×10^{11} Molekülen. Folglich waren in 1 pg Plasmid-DNA 1×10^5 Moleküle enthalten, so dass das Verhältnis von +K-Konstrukt-Molekülen zu Maus-Genom-Molekülen bei 1:3,4 lag. Somit lag es sogar unter dem erwünschten Verhältnis von 1:2, das genügt hätte, um ein heterozygot vorliegendes Merkmal im Genom nachzuweisen.

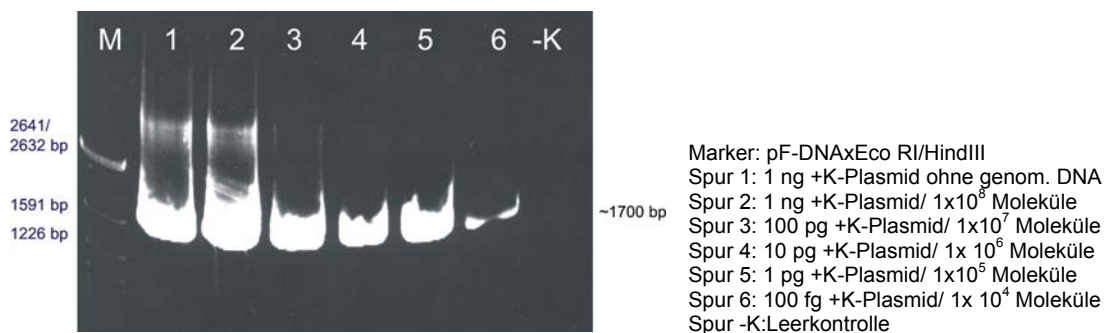


Abbildung 3-44 Etablierung des PCR-Assays für das Konstrukt Ngb-ko1. Die PCR-Ansätze in Spuren 2-6 wurden mit je 1 µg genomischer Maus-DNA versetzt, was einer Anzahl von $3,4 \times 10^5$ Molekülen entspricht.

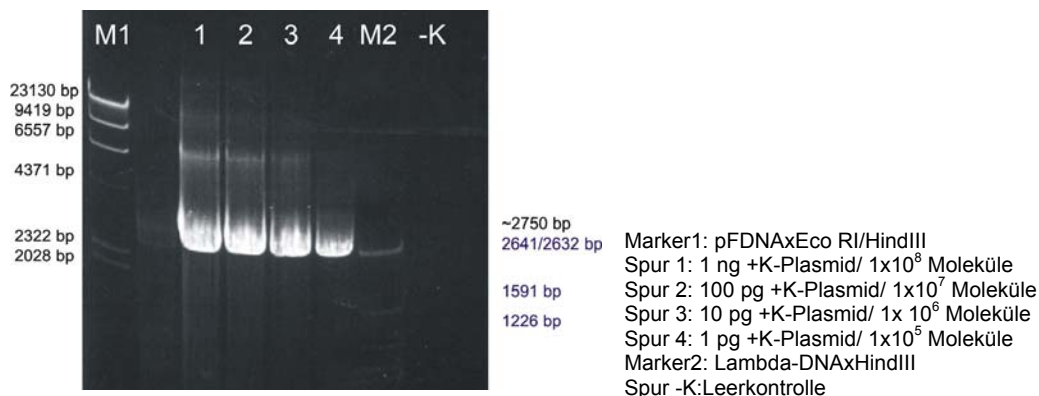


Abbildung 3-45 Etablierung des PCR-Assays für die Konstrukte Ngb-ko3.1 und 3.2. Die PCR-Ansätze wurden mit je 1 µg genomischer ES-Zell-DNA versetzt, was $3,4 \times 10^5$ Molekülen Genom entspricht.

	Ngb-ko1	Ngb-ko3.1 und 3.2
Taq-Polymerase (Sigma)	0,2 µl	0,2 µl
Annealing	62°C	62°C
Elongation	2 min	2 min 30 sec
Anzahl der Zyklen	40	40

Tabelle 3-10 Optimierte PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der ES-Zell-Lysate.

Die ES-Zell-Lysate, die mit dem PCR-Schnelltest analysiert wurden, wiesen meistens sehr unterschiedliche DNA-Konzentrationen auf. Dies eröffnete die Möglichkeit, dass im PCR-Schnelltest nicht ausreichend Amplifikat gebildet wurde, um eine eindeutige Bande auf einem Agarosegel zu sehen. Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit wurden die PCR-Ansätze daher mittels Southern Blot-Transfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde (S1) hybridisiert (Abb. 3-43). Hierfür wurde mit dem Primerpaar „mmu-Ko3-Sonde1-for“ und „mmu-ko3-P4R+Eco“ ein 558 bp langes Amplifikat generiert, das zu Detektion der eventuell auf einem Gel nicht sichtbaren Banden bei 2750 bp verwendet werden sollte.

3.5.5 Etablierung von Southern Blot-Nachweisen zur Detektion von Targeting-Ereignissen

Die PCR-Schnelltests mit Zell-Lysaten aus transformierten ES-Zellen als Ausgangsmaterial stellen eine etablierte Methode zum „screening“ großer Menge von Proben dar (Kim and Smithies, 1988; Ramirez-Solis et al., 1993). Dennoch ersetzen sie nicht den zweifelsfreien Nachweis der homologen Rekombinanten mittels einer genomischen Southern-Hybridisierung. Hierfür wurde aufgereinigte ES-Zell-DNA in größeren Mengen benötigt (ca. 20 µg). Mittels einer spezifischen DNA-Sonde und sorgfältig ausgesuchten Restriktionsenzymen sollte im Wildtyp-*Ngb*-Genlocus ein Fragment bestimmter Größe detektiert werden. Zu beachten war dabei, dass sowohl die Sonde als auch die Restriktionsschnittstellen außerhalb der klonierten „Rekombinationsarme“ lokalisiert waren, denn sonst könnten unspezifisch integrierte Targeting-Vektoren ein Southern-Signal liefern und ein homologes Rekombinationsereignis vortäuschen. Infolge homologer Rekombination würde sich die

Fragmentgröße verändern, denn mit dem aufgenommenen Vektoranteil wäre eine zusätzliche Schnittstelle für das verwendete Enzym im Genom enthalten. Da die Rekombination Heterozygotie erzeugt, sollte bei der anschließenden Detektion zum einen das authentische genomische Fragment und zusätzlich eine zweite, entsprechend kleinere Bande sichtbar werden.

Für das *Ngb*-ko1-Konstrukt wurde die Restriktionsendonuklease *Nco* I zur Etablierung der genomischen Southern Blot-Analysen verwendet. Das Enzym schneidet die genomische Wildtyp-*Ngb*-Sequenz an zwei definierten Stellen, wobei ein 7110 bp langes Fragment entsteht. Eine zusätzliche *Nco* I-Schnittstelle lag im Bereich der Neomycin-Kassette im Targeting-Konstrukt (Abb. 3-46). Nach erfolgter homologer Rekombination am Genort sollten demnach zwei *Nco* I-Restriktionsfragmente von 2720 und 4571 bp entstehen. Um die Restriktionsfragmente am *Ngb*-Genort nachweisen zu können, wurde eine entsprechende DNA-Sonde benötigt. Für das *Ngb*-ko1-Konstrukt wurden zwei Sonden aus verschiedenen Genbereichen hergestellt. Sonde 1 (S1) sollte im 5'-Bereich der *Ngb*-Sequenz außerhalb des Vektorkonstruktes, jedoch innerhalb der *Nco* I-Schnittstellen im Genom binden und gegebenenfalls entweder nur bei 7110 bp oder bei Heterozygotie mit der 7110 und 2720 bp Bande im genomischen Southern Blot hybridisieren. Sonde 2 (S2) stammte aus dem 3'-Bereich der genomischen *Ngb*-Sequenz und sollte ebenfalls mit dem 7110 bp Wildtyp-Fragment hybridisieren sowie im Fall einer heterozygot vorliegenden Rekombination zusätzlich an das 4571 bp lange Restriktionsfragment binden.

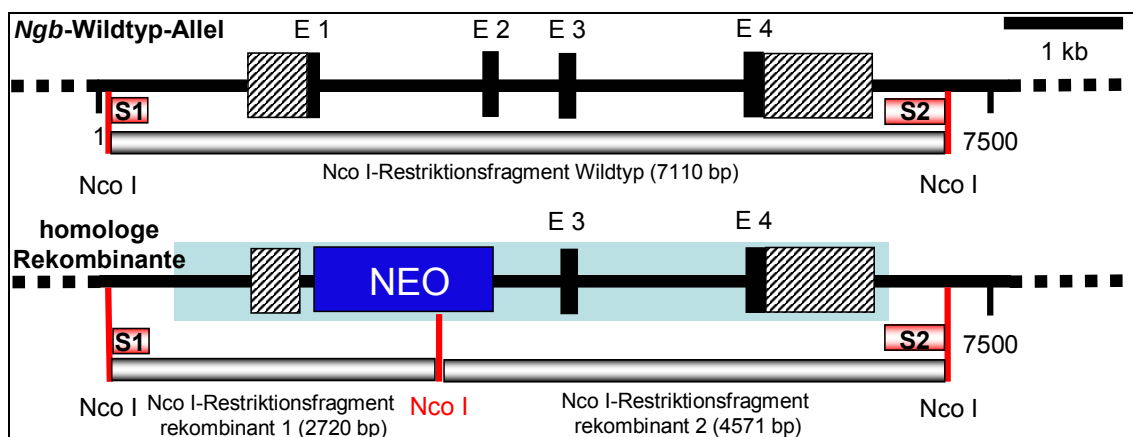


Abbildung 3-46 Strategie zur genomischen Southern Blot-Analyse von rekombinanten ES-Zellen des *Ngb*-ko1-Vektor-Konstruktes. Nach der Restriktion genomischer DNA mit *Nco* I sollte im Wildtyp ein 7110 bp langes Fragment generiert werden, an das beide Sonden (S1 und S2) hybridisieren sollten. Infolge homologer Rekombination, würde eine zusätzliche *Nco* I-Schnittstelle in der Neo-Kassette heterozygot ins *Ngb*-Gen eingefügt werden, so dass zwei Fragmente entstehen müssten von denen das 2720 bp lange mit Sonde 1 und das 4571 bp lange mit Hilfe von Sonde 2 detektiert werden sollte.

	Sonde 1	Sonde 2
Primer 1	mmu_Ngb-ko_5_Sonde 1=1b)	mmuNgb-ko_7_Sonde 2
Primer 2	mmuNgb-ko_6R_Sonde 1	mmuNgb-ko_8R_Sonde 2
Sondenlänge	307 bp	513 bp
Detektierte Fragmentlänge im Wildtyp	7110 bp	7110 bp
Detektierte Fragmentlängen in heterozygoten Rekombinanten	7110 bp + 2720 bp	7110 bp + 4571 bp

Tabelle 3-11 Primerkombination und Länge der Sonden zur Southern Blot-Genotypisierung von Ngb-ko1 rekombinanten ES-Zellen.

Um die Southern Blot-Hybridisierungen mit den transformierten ES-Zell-DNAs durchführen zu können, mussten die Hybridisierungs- und Waschbedingungen in Vorversuchen optimiert werden. Eingesetzt wurde dabei mit Nco I verdaute genomische Maus-DNA aus Leber und embryonalen Stammzellen. Zusätzlich diente Nco I-verdaute PAC-DNA als Positivkontrolle. Nach einer zweitägigen Expositionszeit zeichneten sich auf dem Röntgenfilm die gewünschten Banden in der erwarteten Wildtyp-Größe von 7110 bp ab, die nach 1 ½ Wochen Expositionszeit eindeutig identifiziert werden konnten (Abb. 3-47). Zudem haben beide Sonden gleich gut an die genomische DNA-Bande hybridisiert, so dass beide zum Nachweis von homologen Rekombinationsereignissen in Ngb-ko1-transformierten ES-Zellen gut geeignet waren.

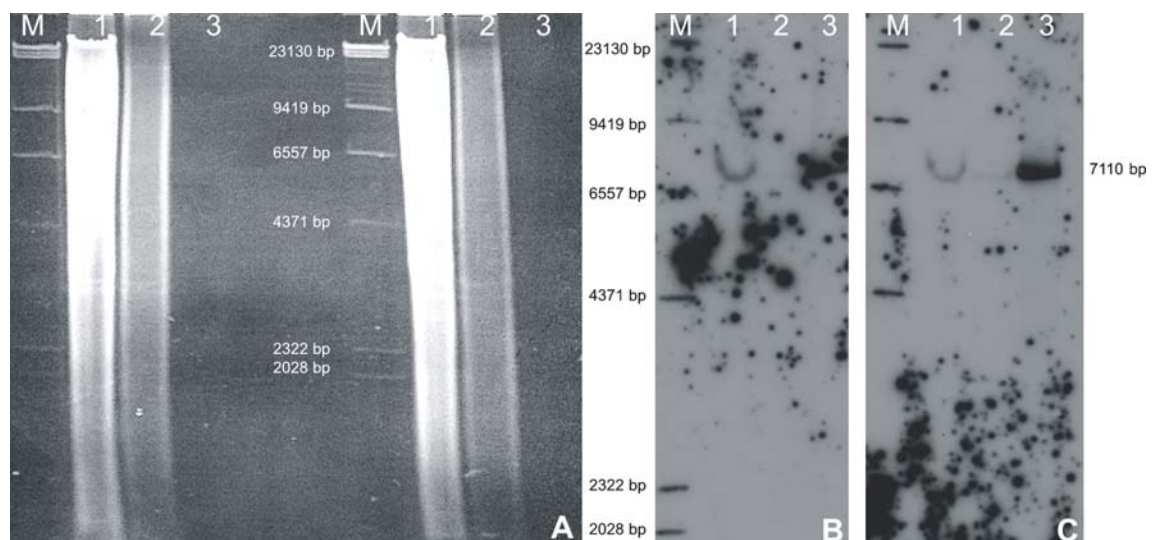


Abbildung 3-47 Genomischer Southern Blot-Vorversuch für das Ngb-ko1-Konstrukt. Aufgetragen wurden je 15 µg Maus-Leber-DNA (Spur 1), 10 µg ES-Zell-DNA (Spur 2) und 100 ng PAC-DNA (Spur 3). Alle DNAs wurden mit Nco I verdaut und durch Fällung aufgereinigt. Nach dem Southern Blot wurde eine Hälfte der Membran mit radioaktiv markierter Sonde 1 (B) und die zweite Hälfte mit radioaktiv markierter Sonde 2 (C) hybridisiert. Die Röntgenfilme in Abb. B und C wurden nach 1 ½ Wochen entwickelt.

Auch zum Nachweis der Ngb-ko3.1 und Ngb-ko3.2-Konstrukte per genomischer Southern Blot-Analyse wurde die Restriktionsendonuklease Nco I ausgewählt, die in Wildtyp-DNA ein 7110 bp langes Fragment erzeugt. Durch die zusätzliche Schnittstelle in der Neo-Kassette sollte in rekombinanter DNA ein Fragment von 4072 bp entstehen (Abb. 3-48). Die hergestellte Sonde (ko3-Sonde2) sollte im Genom 3'-abwärts des kurzen „Rekombinationsarmes“ binden. Da der Hybridisierungsbereich dieser Sonde noch im +K-Kontrollfragment lokalisiert war, konnte das „+K in pPNT“-Plasmid (ca. 9550 bp), nachdem es mit Nco I linearisiert wurde, als Positivkontrolle für die Hybridisierung verwendet werden.

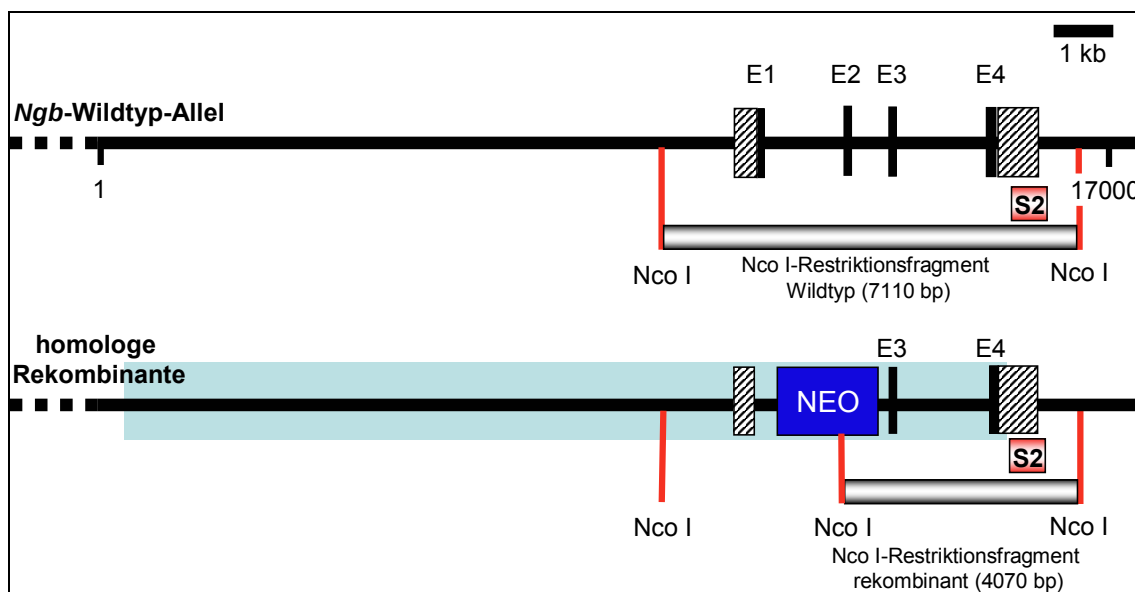


Abbildung 3-48 Strategie zur genomischen Southern Blot-Analyse von rekombinanten ES-Zellen der Ngb-ko3.1 und Ngb-ko3.2-Targeting-Konstrukte. Nach der Restriktion genomischer DNA mit Nco I sollte im Wildtyp ein 7110 bp langes Fragment generiert werden, das mit Hilfe einer spezifischen Sonde (S2) detektiert werden sollte. Infolge homologer Rekombination, würde eine zusätzliche Nco I-Schnittstelle in der Neo-Kassette ins Ngb-Gen eingefügt werden, so dass eine Verkürzung des entsprechenden Fragmentes auf 4070 bp detektiert werden sollte.

	Ko3-Sonde 2
Primer 1	ko3Sonde2for
Primer 2	ko3Sonde2rev
Sondenlänge	369 bp
Detektierte Fragmentlänge im Wildtyp	7110 bp
Detektierte Fragmentlänge in heterozygoten Rekombinanten	7110 bp + 4072 bp

Tabelle 3-12 Primerkombination und Länge der Sonden zur Southern Blot-Genotypisierung von Ngb-ko3.1 und 3.2 rekombinanten ES-Zellen.

Entsprechend mussten auch hier zunächst die Versuchsbedingungen optimiert werden, bevor die eigentlichen Tests der ES-Zell-DNAs durchgeführt werden konnten. Eingesetzt wurde Nco I-verdaute genomische DNA aus Maus-Leber. Wie bereits oben beschrieben wurde das „+K in pPNT“-Konstrukt ebenfalls mit Nco I geschnitten, was die Linearisierung des Plasmids zur Folge hatte, da die genomische Nco I-Schnittstelle außerhalb des 3'-Kontroll-Integrats lag.

Nachdem der Blot über Nacht bei 62 °C mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert und am nächsten Tag entsprechend den Angaben unter 2.13.1 gewaschen wurde, wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach einer Exposition des Röntgenfilms über Nacht war zunächst bei ca. 9550 bp nur die Positivkontrolle zu sehen. Nachdem ein zweiter Film über 1 ½ Wochen exponiert wurde, wurde die erwartete Bande in der genomischen Wildtyp-DNA bei 7110 bp sichtbar (Abb. 3-49).

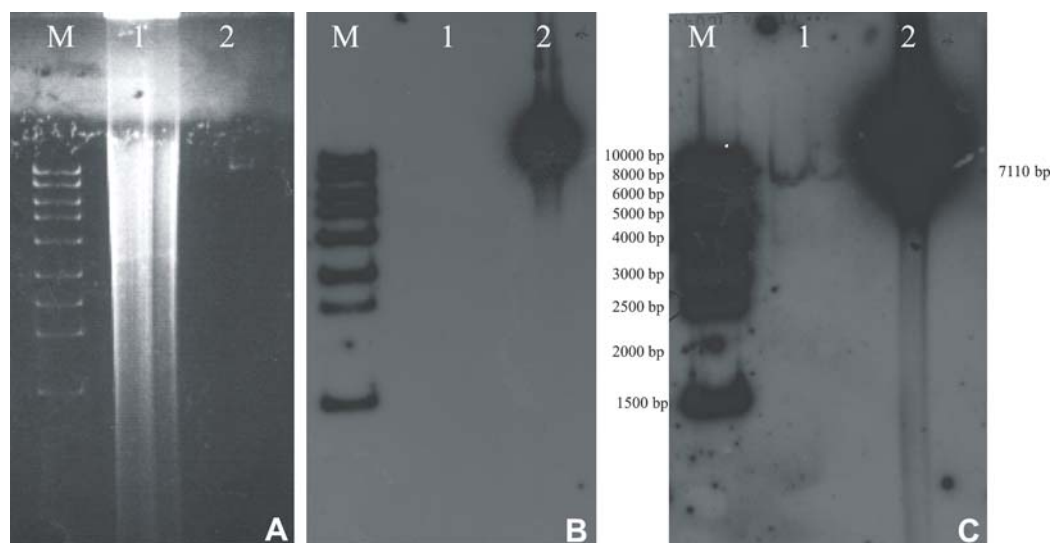


Abbildung 3-49 Southern Blot-Versuch zur Genotypisierung rekombinanter ES-Zellen. 30 µg genomische Mausleber-DNA wurden mit dem Enzym Nco I verdaut und nach der Fällung auf einem großen 1%igen Agarosegel aufgetrennt (A, Spur 1) Als Positivkontrolle wurde das Konstrukt „+K in pPNT“ mit Not I linearisiert und 5 µl aus einer 1:100 Verdünnung aufgetragen (A, Spur 2). Nach der Exposition über Nacht war auf dem Röntgenfilm lediglich die Positivkontrolle zu sehen (B). Nach einer Expositionszeit von 1 ½ Wochen konnte in der genomischen DNA die erwartete Bande bei 7110 bp detektiert werden (C). M=MassRuler™ DNA Ladder High Range (MBI Fermentas).

3.5.6 Genotypisierung von rekombinanten ES-Zell-Klonen

Die Präparationsmethode zur Isolierung der knock out-Plasmide sollte gewährleisten, dass die Plasmid-DNA-Lösung keine bakteriellen Endotoxine enthielt, die sich negativ auf die Transformation eukaryotischer Zellen auswirken könnten (Weber et al., 1995). Dafür eignete sich sowohl der „Concert Rapid Plasmid Preparation Kit“ wie auch der „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen. Für die Transformation der ES-Zellen mit den Ngb-Targeting-Vektoren mussten die Targeting-Konstrukte zunächst mit dem Restriktionsenzym Not I linearisiert werden. Nach anschließender PCI-Extraktion und Fällung mit 3M Natriumacetat wurden schließlich pro Transformation ca. 25 µg in HPLC-Wasser gelösten Vektors, in einer Konzentration zwischen 0,5 und 1 µg/µl, nach Würzburg geschickt. Dort erfolgte die Transformation der embryonalen Stammzellen mittels Elektroporation. Die G-418-Selektion wurde nach 24 h für 6-7 Tage durchgeführt. Danach wurden die resistenten Klone auf 96well-Platten übertragen. Nach der Weiterkultivierung wurde ein Teil der ES-Zellen eingefroren und der andere in Form von Roh-DNA-Lysaten für die Genotypisierung mittels PCR-Schnelltest nach Mainz geschickt. Wurden dabei potentielle positive Klone identifiziert, so wurden in Würzburg die entsprechenden ES-Zell-Klone aufgetaut und für eine „saubere“ DNA-Präparation weiterkultiviert. In Lysispuffer gelöste Zell-Pellets wurden auf Trockeneis nach Mainz verschickt. Die daraus gewonnene DNA wurde für die Genotypisierung mittels PCR-Schnelltest und genomischer Southern Blot-Analyse verwendet.

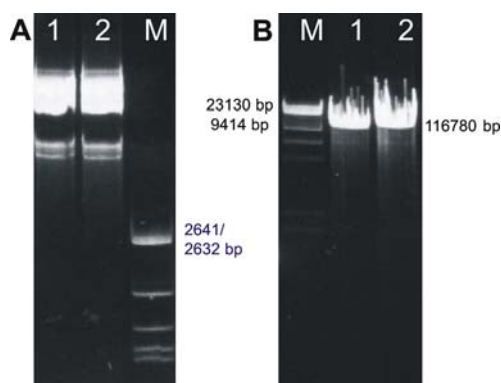


Abbildung 3-50 Ngb-ko1-Targeting-Vektor
Plasmidpräparationen 1 und 2 (A, 0,5 µg)
linearisierte Plasmide (B, 0,5 µg).

Das Ngb-ko1-Targeting-Konstrukt wurde insgesamt vier Mal in embryonale Stammzellen transformiert (Tab. 3-13). Die Analyse der erhaltenen 1344 ES-Zell-Klone per PCR-Schnelltest erbrachte kein positives Ergebnis, d.h. es konnte dabei keine spezifische Rekombination des Vektors mit der genomischen Ngb-Sequenz nachgewiesen werden. Auch die anschließenden Southern Blot-Analysen der PCR-Produkte führten nach der Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten +K-Fragment nicht zur Identifizierung von positiven Klonen.

Transformation Nr.	1	2	3	4
Anzahl der gepickten 96well-Platten	6	3*	5*	6
Anzahl der per PCR-Schnelltest und PCR-Southern Blot-Analyse untersuchten ES-Zell-Lysate	6x96 576	2x96 192	-	576

Tabelle 3-13 Transformationen des Ngb-ko1-Targeting-Vektors. Nach vier Transformationen wurden insgesamt 20x96well-Platten mit ES-Zell-Klonen geerntet und in Form von Roh-DNA-Lysaten nach Mainz geschickt. Davon war eine Platte aus der Transformation 2 und die fünf 96well-Platten aus der Transformation 3 für die Genotypisierung per PCR-Schnelltest ungeeignet (*). Aus der Analyse der übrigen 14x96well-Platten mit transformierten ES-Zell-Klonen ist kein positiver Klon hervorgegangen.

Die Untersuchung auf homologe Rekombination per PCR-Schnelltest erfolgte anhand von Roh-DNA-Präparationen in Form von ES-Zell-Lysaten. Zunächst wurden je 5 µl der Lysate aus je drei 96well-Platten (ggf. zwei 96well-Platten) zu sog. DNA-Pools vereint. Nach Auskunft unseres Ansprechpartners in Würzburg sollten erfahrungsgemäß je 5 µl der DNA-Pools ausreichen, um per PCR-Schnelltest ein homologes Rekombinationsereignis in einem der ES-Zell-Klone nachweisen zu können. Im Fall des Ngb-ko1-Targeting-Konstruktes sollte hierfür mit der Primerkombination „mmuNgb-ko_Test-PCR1“ und „pPNT 5'Neo“ ein 1700 bp langes Fragment amplifiziert werden (Abb. 3-42; Tab. 3-9). Bei jeder analysierten 96well-Platte, wurde eine Positivkontrolle mit verdünnter „+K in pPNT“-Plasmid-DNA, die mit 4 µl ES-Zell-Lysat versetzt wurde, mitgeführt. Diese sog. „spiking“-Kontrolle diente dazu, mögliche inhibitorische Effekte der Roh-DNA-Präparate auf die PCR ausschließen zu können. Mit dieser Methode erwiesen sich die ES-Zell-Lysate von einer 96well-Platte aus der zweiten und aller fünf 96well-Platten aus der dritten Transformation (Tab. 3-13*) als nicht amplifizierbar und konnten somit nicht im PCR-Schnelltest untersucht werden. Der Aufreinigungsversuch dieser Roh-DNA-Lysate über Silica-Säulchen hatte große DNA-Verluste zur Folge, so dass auf diese Vorgehensweise im weiteren Verlauf verzichtet wurde und stattdessen

neue Transformationen durchgeführt wurden. Um zu überprüfen, ob die Roh-DNA-Lysate prinzipiell zur Amplifikation genomischer Fragmente geeignet waren, wurden vorab Test-PCRs an einer Auswahl von mind. 6 ES-Zell-Lysaten pro Platte durchgeführt. Im Rahmen der Ngb-ko3.1-Transformationen wurde dabei mit der Primerkombination „317xl“ und „377xl“ ein rund 2700 bp langes Amplifikat aus dem Maus-STK33-Genbereich (Mujica et al., 2001) generiert. Trotz der schwankenden DNA-Konzentrationen der ES-Zell-Lysate, die sich in den unterschiedlichen Endkonzentrationen der PCR-Produkte widerspiegeln, konnte das entsprechende Fragment, abgesehen von den sechs o.g. Platten, in allen untersuchten ES-Zell-Lysaten amplifiziert werden.

Um eine Erklärung für das Wachstum der ES-Zellen trotz der nicht nachweisbaren homologen Rekombination zu finden, wurden zahlreiche Test-PCRs durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass in den transformierten und G418-resistenten ES-Zell-Klonen die Neo-Box und ein Teil des langen Armes des Ngb-ko1-Targeting-Konstruktes enthalten waren, während der kurze Arm keinesfalls vollständig ins Genom integriert wurde. Offensichtlich wurde der Ngb-ko1-Vektor unvollständig und an falscher Stelle durch illegitime Rekombination ins Genom aufgenommen, so dass die ES-Zellen die Antibiotikaresistenz erlangten.

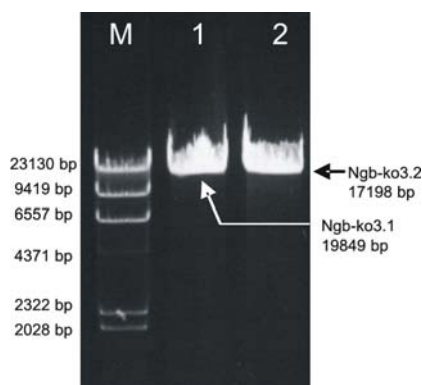


Abbildung 3-51 Linearisierte Ngb-ko3.1 und 3.2-Targeting-Plasmide für die Transformation (je 0,5 µl).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden insgesamt vier Aliquots des linearisierten Ngb-ko3.1-Targeting-Konstruktes und fünf Aliquots des linearisierten Ngb-ko3.2-Vektors zur Transformation in ES-Zellen nach Würzburg geschickt (Tab 3-14). Zudem wurden drei Aliquots des linearisierten Ngb-ko3.2-Vektors bei -20°C eingelagert und können jederzeit für weitere Transformationen verwendet werden. In der folgenden Tabelle sind die Daten der zuletzt durchgeführten Vektorpräparationen zusammengefasst und der Verbleib der Proben notiert (Tab. 3-14).

Name der Probe	Volumen	Konzentration	Menge	Verbleib der Probe
Ngb-ko3.1	29 µl	0,85 µg/µl	25 µg	Würzburg
Ngb-ko3.1 Rest	20 µl	0,85 µg/µl	17 µg	-20°C
Ngb-ko3.2	50 µl	0,9 µg/µl	45 µg	Würzburg
Ngb-ko3.2*	28 µl	0,9 µg/µl	25 µg	-20°C
Ngb-ko3.2* (vom 2.5.)	50 µl	1 µg/µl	50 µg	-20°C
Ngb-ko3.2* (vom 2.5.)	30 µl	1 µg/µl	30 µg	-20°C

Tabelle 3-14 Linearisierte Ngb-ko3.1 und -ko3.2 Plasmide. Mit * markierte Proben können für weitere Transformationen verwendet werden

Die Transformationen der ES-Zell-Lysate mit dem Ngb-ko3.1-Targeting-Konstrukt waren nur bedingt erfolgreich. Es sind jedes Mal nur sehr wenige ES-Zell-Klone gewachsen, so dass das Picken und „screening“ keinen Sinn machte. Mit dem Konstrukt Ngb-ko3.2 wurden deutlich bessere Ergebnisse erzielt, wobei zwei Transformationen der ES-Zellen mit dem Targeting-Vektor aufgrund von technischen Problemen in Würzburg keine zu untersuchenden ES-Zell-Klone hervorbrachten. Folglich wurden für das Konstrukt Ngb-ko3.2 insgesamt 13x96well-Platten mit ES-Zell-Lysaten (1248 Klone) aus drei erfolgreichen Transformationen per PCR-Schnelltest analysiert. Da auf den anschließenden Agarosegelen keine Banden in der erwarteten Höhe sichtbar waren, wurden alle PCR-Ansätze per Southern Blot-Analyse mit radioaktiv markierter Sonde 1 (Abb. 3-43) hybridisiert. Dabei lieferten insgesamt 43 Klone nach 4tägiger bis 1wöchiger Expositionszeit schwache Hybridisierungssignale. Nach „sauberer“ DNA-Präparation und Wiederholung des PCR-Schnelltests sowie Southern Blot-Nachweis von 16 mit Nco I restringierten genomischen DNAs der entsprechenden Stammzell-Klone konnte dieser Befund jedoch nicht verifiziert werden.

Transformation	1	2	3
Anzahl der gepickten 96well Platten	2	6	5
Anzahl der per PCR-Schnelltest und PCR- Southern Blot-Analyse untersuchten ES-Zell-Lysate	192	576	480
Anzahl der per PCR-Schnelltest untersuchten ES-Klone	8	19	16
Anzahl der per genomischen Southern Blot analysierten ES-Klone	-	-	16

Tabelle 3-15 Transformationen des Ngb-ko3.2-Targeting-Vektors. Insgesamt wurden 13x96well-Platten mit ES-Zell-Klonen nach drei erfolgreichen Transformationen geerntet und anhand von Roh-DNA-Lysaten im PCR-Schnelltest analysiert. An insgesamt 43 präparierten DNAs aus vermutlich positiven ES-Zell-Klonen sollten die Ergebnisse anhand eines PCR-Schnelltests an „sauberer“ DNA verifiziert werden, zusätzlich wurden 16 Klone per genomischer Southern Blot-Analyse untersucht.

Um die Sensitivität der PCR-Schnelltests sicherzustellen, wurden diesmal die Roh-DNA-Lysate nicht „gepoolt“ sondern einzeln untersucht. Um die Eignung der ES-Zell-Lysate zur PCR-Amplifikation zu überprüfen, wurde als Positivkontrolle auch hier, wie für den Vektor Ngb-ko1 bereits beschrieben, mit 4 µl ES-Zell-Lysat versetztes „+K in pPNT“-Plasmid eingesetzt. Zusätzlich wurde mit der Primerkombination „mmu-ko3-P3+Bam“ und „mmu-ko3-posK+Eco“ ein genomisches Amplifikat, ungefähr in der Größe des erwarteten Fragmentes nach der homologen Rekombination, amplifiziert. Nach der ersten Transformation wurde auf diese Weise zunächst exemplarisch eine ganze 96well-Platte mit ES-Zell-Lysaten analysiert, nach Transformationen 2 und 3 wurden je 8 Klone pro Platte entsprechend analysiert. Mit diesen Primern, die auch schon zur Amplifikation des +K-Fragmentes für die Targeting-Konstrukte Ngb-ko3.1 und Ngb-ko3.2 eingesetzt wurden, konnte in mehr als 80 % der untersuchten ES-Zell-Lysate das erwartete Fragment nachgewiesen werden, was von einer guten Qualität der DNAs zeugte, die es ermöglichen sollte homolog rekombinante ES-Zell-Klone im PCR-Schnelltest zu identifizieren.

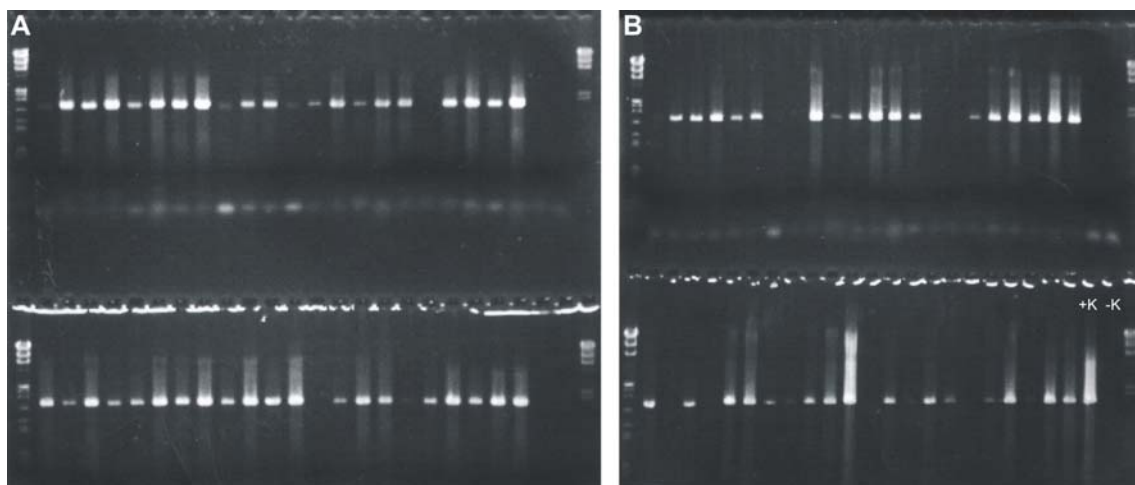


Abbildung 3-52 Test einer 96well Platte mit ES-Zell-Lysaten bezüglich der DNA-Qualität. Mit der Primerkombination „mmu-ko3-P3+Bam“ und „mmu-ko3-posK+Eco“ wurde das entsprechende genomische Ngb-Fragment amplifiziert.

Nach der ersten Transformation wurden 8 Klone und nach der zweiten 20 Klone aufgrund von Southern Blot-Hybridisierungssignalen zur Präparation von genomischer DNA herausgesucht. Nachdem ein Klon nach dem Auftauen nicht mehr gewachsen war, wurden die gereinigten DNAs der übrigen 27 Klone per PCR getestet, wobei für jede DNA die Amplifikation des genomischen +K-Kontrollfragments mitgeführt wurde. Während in allen DNAs das Kontrollfragment einwandfrei generiert wurde, ließ sich das

gewünschte Amplifikat zum Nachweis der homologen Rekombination nicht herstellen (Abb. 3-53A). Auch die Southern Blot-Analyse der PCR-Ansätze führte nicht zum gewünschten Ergebnis. In 16 nach der dritten Transformation identifizierten ES-Zell-Klonen konnte in der gereinigten genomischen DNA ebenfalls nur das Kontrollfragment, jedoch nicht das in homologen Rekombinanten erwartete Amplifikat nachgewiesen werden (Abb. 3-53B). Dennoch wurden diese DNAs mit *Nco* I restringiert und per genomischem Southern Blot analysiert. Auch hierbei wurde lediglich das genomische Ngb-Fragment mit 7110 bp nachgewiesen, während die, für das rekombinante Ngb-ko-Gen bei 4070 bp erwartete Bande fehlte (ohne Abb.).

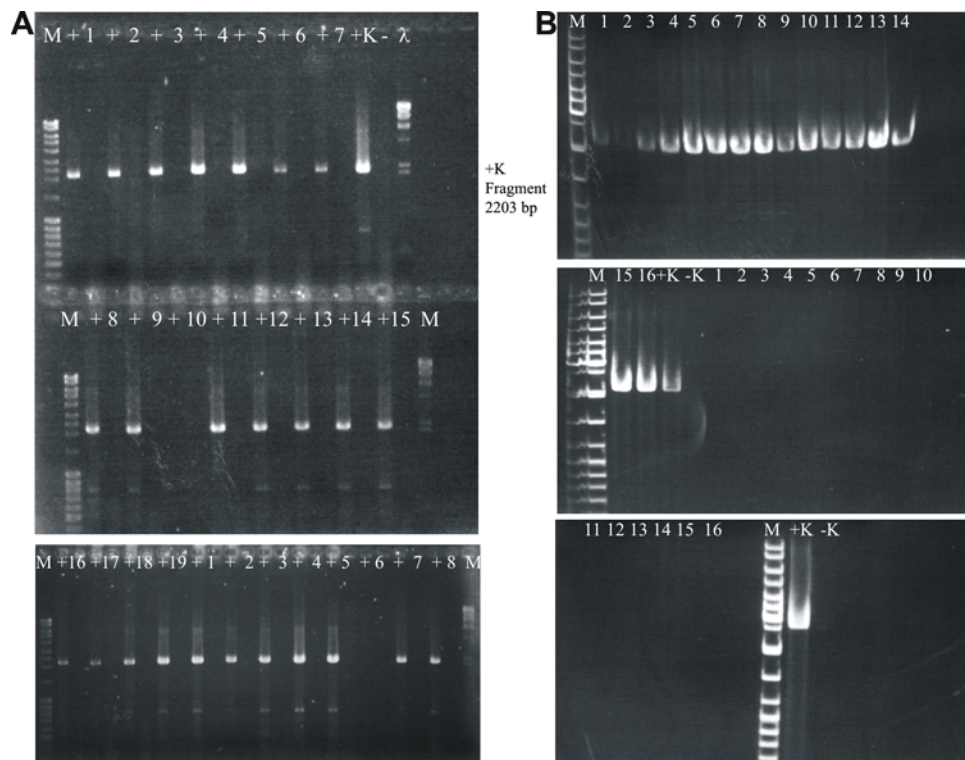


Abbildung 3-53 Test-PCRs und PCR-Schnelltest der gereinigten ES-Zell-DNA, der anhand von ES-Zell-Lysaten aus drei Transformationen des Ngb ko3.2-Vektors identifizierten vermutlich positiven ES-Klone. Nach Transformationen 1 und 2 wurden insgesamt 27 (A) und nach Transformation 3 weitere 16 Klone (B) näher untersucht. In jeder der DNAs ließ sich das genomische +K-Fragment (2203 bp) amplifizieren, während der Nachweis der homologen Rekombination mittels PCR-Schnelltest ohne Erfolg blieb. M=MassRuler™ bzw. GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas).

3.6 Experimente zur Herstellung einer Cytoglobin knock out-Maus

3.6.1 Der Cygb knock out-Vektor

Das Cygb-Targeting-Konstrukt wurde von Ales Obrdlik im Rahmen seiner Diplomarbeit (2003) hergestellt. Die genaue Vorgehensweise bei den Klonierungsarbeiten kann dieser Arbeit entnommen werden. Im Folgenden soll anhand einer Skizze, die ebenfalls der o.g. Arbeit entnommen wurde, das Konstrukt kurz erläutert werden (Abb.3-34).

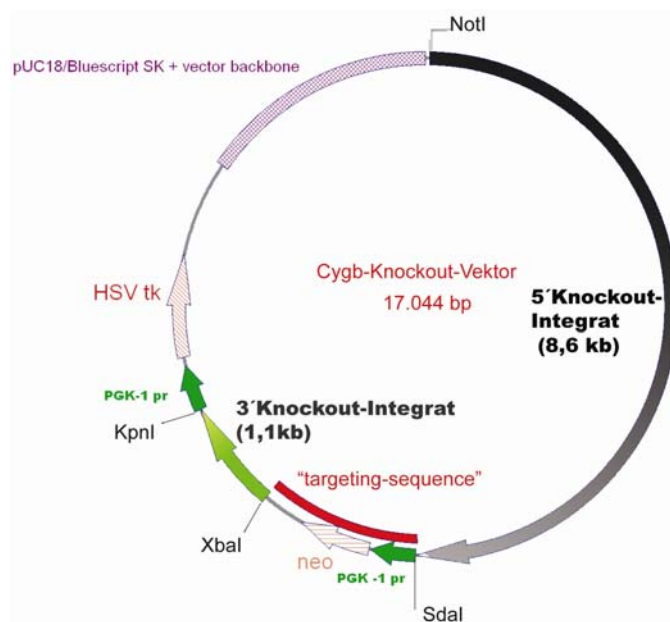


Abbildung 3-54 Übersichtsskizze des Cygb-Vektors. Die homologen Arme des Cygb-knock out-Konstruktes wurden in den pNT-Vektor kloniert. In die Schnittstellen Not I und Sda I der MCS 1 wurde der lange Arm (5'-Knockout-Integrat, 8,6 kb) und in die Schnittstellen Xba I und Kpn I der MCS 2 der kurze Arm (3'-Knockout-Integrat, 1,1 kb) integriert. Die Neo-Kassette ersetzt das zweite Exon des Cygb-Gens, in dem wichtige funktionelle Aminosäuren enthalten sind.

Der lange Arm des Cygb-ko-Vektors erstreckt sich über 8,6 kb aus dem 5'-Bereich der genomischen Cytoglobin-Gensequenz einschließlich Exon 1. Teile des ersten Introns und Exon 2 sind im Konstrukt durch die Neomycin-Kassette ersetzt. Im Exon 2 befinden sich die Kodons für das distale HisE7 und das proximale HisF8, die für die Häm-Bindung und Ligandenbindung essentiell sind, so dass infolge einer Deletion kein funktionsfähiges Protein mehr gebildet werden kann. Die Klonierung des langen Arms erfolgte in die Schnittstellen Not I und Sda I der MCS 1 des pNT-Vektors. Der kurze Arm befindet sich in den Schnittstellen Xba I und Kpn I der MCS 2 und umfasst 1,1 kb, die sich über das Exon 3 und einen Teil des dritten Introns erstrecken.

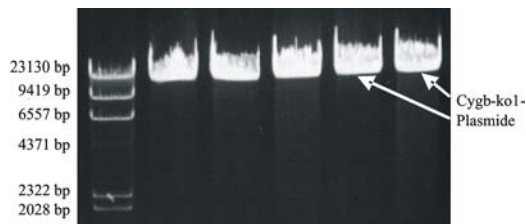


Abbildung 3-55 Cygb- und Ngb-knock out-Plasmide, die im Rahmen meiner Arbeit präpariert und z.T. nach Würzburg geschickt wurden. Spuren 1-3: Ngb-ko-Plasmide, Spuren 4 und 5: Cygb-ko-Plasmid-Präparationen

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde weiterhin die erste Charge des Cygb-knock out-Vektors für Transformationen vorbereitet und 25 µg nach Würzburg geschickt. Die ersten 6x96well-Platten (576 ES-Zell-Klone), die daraus resultierten, wurden noch von Ales Obrdlik bearbeitet, wobei keine positiven ES-Zell-Klone identifiziert werden konnten. Daraufhin wurde das vorbereitete zweite Aliquot mit 25 µg des linearisierten Cygb-ko-Vektors nach Würzburg geschickt. Die folgende Analyse von weiteren 480 ES-Zell-Klonen lieferte ebenfalls kein positives Ergebnis. Aus diesem Grund wurde im Rahmen meiner Arbeit neue Plasmid-DNA mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ präpariert, mit Not I linearisiert und mittels PCI-Extraktion aufgereinigt. Ein Teil des Vektors wurde für erneute Transformationen nach Würzburg geschickt, ein zweites Aliquot bei -20 °C eingefroren und kann jeder Zeit für eine neue Elektroporation von ES-Zellen verwendet werden (Tab. 3-16).

Name der Probe	Volumen	Konzentration	Menge	Verbleib der Probe
Cygb-ko1	50 µl	1 µg/µl	50 µg	Würzburg
Cygb-ko1*	60 µl	0,84 µg/µl	50 µg	-20°C

Tabelle 3-16 Linearisierte Cygb-ko-Plasmide. Mit * markierte Probe kann für weitere Transformationen verwendet werden

Insgesamt wurden folglich für das Cytoglobin 1632 ES-Zell-Lysate per PCR-Schnelltest und 53 DNAs aus ES-Zell-Klonen per Southern Blot-Hybridisierung untersucht.

Transformation Nr.	1	2	3
Anzahl der 96well Platten	6	5	6
Anzahl der per PCR-Schnelltest und anschließender Southern Blot-Analyse untersuchten ES-Zell-Lysate	576	480	576
Anzahl der per genomischen Southern Blot analysierten ES-Klone	10	14	29

Tabelle 3-17 Anzahl der untersuchten ES-Zell-Klone, nach der Transformation mit dem Cygb-Targeting-Vektor.

3.6.2 Analyse von rekombinanten ES-Zell-Klonen mittels PCR-Schnelltest

Die Etablierung des PCR-Schnelltests und der Southern Blot-Analyse zum Nachweis der Rekombination des Maus *Cygb*-Gens mit dem *Cygb*-knock out-Vektor erfolgte ebenfalls im Rahmen der Diplomarbeit vom Ales Obrdlik (2003). Im PCR-Schnelltest an ES-Zell-Lysaten sollte mit der Primerkombination „pPNT3'Neo“ und „3*Cygb*Kontrolle2“ bei einer Annealing-Temperatur von 59,5 °C ein 2086 bp langes Amplifikat aus dem rekombinanten Maus-Genom hergestellt werden. Dabei wurde immer eine Kontroll-PCR mit dem *Cygb*-+K-Konstrukt als Matrize mitgeführt.

Nach der zweiten Transformation des *Cygb*-ko-Vektors konnten in Würzburg 5x96well Platten mit ES-Klonen gepickt werden. Diese wurden in Form von ES-Zell-Lysaten, die direkt als Template für den PCR-Schnelltest eingesetzt werden konnten, nach Mainz geschickt. Zunächst wurde mit je acht willkürlich ausgewählten Zell-Lysaten von jeder Platte eine Test-PCR durchgeführt, in der ein genomischer Abschnitt des *Ngb*-Gens unter Verwendung der Primerkombination „mmu-ko3-P3+Bam“ und „mmu-ko3-posK+Eco“ amplifiziert wurde. Auch hier unterlagen die DNA-Konzentrationen offensichtlich großen Schwankungen, weshalb die Bandenstärken auf einem Agarose-Testgel sehr unterschiedlich ausfallen konnten. Dennoch wurde in fast allen ES-Zell-Lysaten ein entsprechendes Amplifikat von 2215 bp-Länge erfolgreich detektiert. Im PCR-Schnelltest zur Identifizierung von rekombinanten Klonen und anschließender Gelelektrophorese konnte zunächst kein positiver Klon identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden die PCR-Ansätze auf ca. 20 µl eingengt und die Hälfte auf neue Agarosegele aufgetragen, per Southern Blot auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit der radioaktiv markierten *Cygb*-Sonde hybridisiert. Der erste positive Klon konnte bereits anhand des für den Southern Blot verwendeten Agarosegels identifiziert werden (siehe Abb. 3-56; F12 Platte II). Des Weiteren wurde nach einer 16stündigen Expositionszeit des Röntgenfilms eine Reihe weiterer vermutlich positiver Klone mit variierenden Signalstärken detektiert. Insgesamt wurden 18 ES-Zell-Klone, die möglicherweise den *Cygb*-knock-out-Vektor erfolgreich aufgenommen hatten, in Würzburg bestellt. Dort wurden die entsprechenden Klone weiterkultiviert und eine ausreichende ES-Zell-Anzahl zur DNA-Präparation für die Southern Blot-Analysen nach Mainz geschickt. Von den 18 ausgewählten Klonen waren jedoch vier nach dem Auftauen in Würzburg nicht mehr gewachsen. Dabei handelte es sich um den als erstes identifizierten Klon F12 von der Platte II sowie um zwei weitere ES-Zell-Klone,

die in der Southern Blot-Analyse der PCR-Schnelltest-Produkte besonders intensive Signale lieferten. Die anschließenden genomischen Southern Blot-Analysen wurden folglich mit den 14 verbliebenen Klonen durchgeführt.

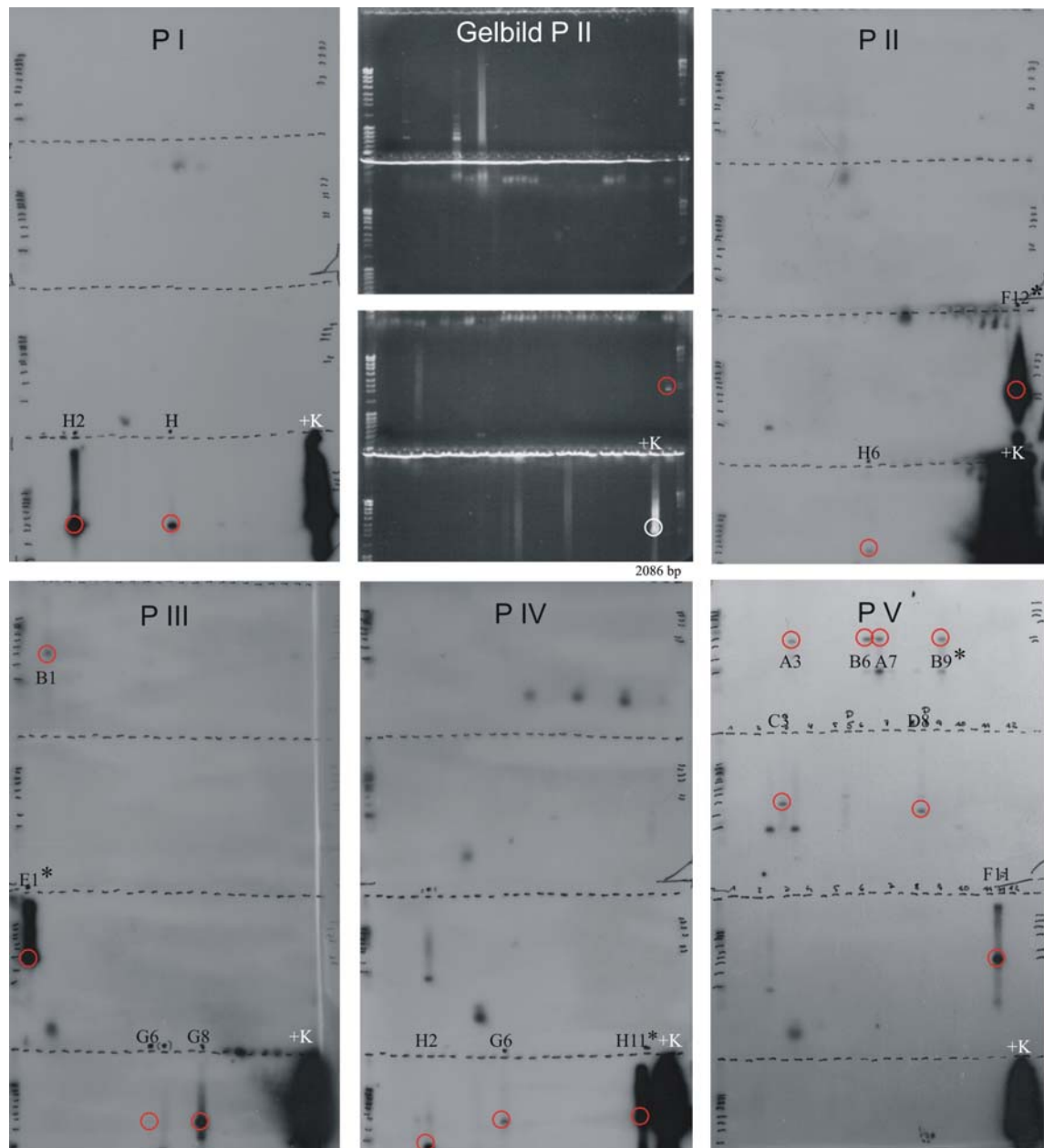


Abbildung 3-56 Cygb-ko PCR-Schnelltest und anschließende Southern Blot-Analyse (A, C-F) der Amplifikate von Platten I (A), II (B, C) III (D) IV (E) und V (F). Es wurden fünf 96well Platten mit ES-Zell-Lysaten (480 Klone) analysiert und dabei 18 vermutlich positive Klone identifiziert. Ein Klon zeigte bereits auf dem für den Blottransfer verwendeten Agarosegel ein Amplifikat in richtiger Größe (B, F12). Die mit * markierten Klone waren bei der Weiterkultivierung nicht mehr gewachsen und standen somit für weitere Analysen nicht zur Verfügung. Als Marker wurde links von den Proben MassRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas) und rechts Hind III verdauete λ-DNA aufgetragen. Als Positivkontrolle diente eine 1:50 Verdünnung des PCR-Produktes mit dem Cygb-+K-Plasmid als Matrize.

3.6.3 Analyse der möglichen positiven ES-Zell-Klone mittels Southern Blot

Für die Southern Blot-Analyse sollte die genomische DNA mit dem Enzym Xmn I (Pdm I) geschnitten und mit der radioaktiv markierten Cygb-Sonde (545 bp) bei 62°C über Nacht hybridisiert werden. In genomischer DNA mit dem Wildtyp-Cygb-Gen wurde dabei die Hybridisierung der Sonde mit einer 5134 bp-Bande erwartet, in genomischer DNA mit erfolgreich rekombiniertem Cygb-Gen sollte zusätzlich die Hybridisierung der Sonde mit einer 2967 bp-Bande erfolgen.

Nachdem die DNA aus den 14 ES-Zell-Klonen mittels der PCI-Extraktionsmethode isoliert wurde, wurden je 15 µg mit dem Enzym Pdm I (Isoschizomer von Xmn I) restringiert. Nachdem die verdauten genomischen ES-Zell-DNAs mittels Southern Blot-Transfer auf Nitrocellulosemembranen übertragen waren, wurden sie mit der radioaktiv markierten Cygb-Sonde hybridisiert. Alle 14 Klone erwiesen sich schließlich als negativ, denn es konnte nur eine Bande bei 5,1 kb identifiziert werden, die aus dem Xmn I-Verdau des Wildtyp-Cygb-Gens stammte (Abb.3-57B). Eine zweite Bande bei 3 kb, die einen Beweis für die erfolgreiche homologe Rekombination des Cygb-ko-Vektors mit dem Cygb-Gen in den transformierten embryonale Stammzellen hätte liefern können, fehlte.

Inzwischen wurde auch die dritte Transformation mit dem Cygb-ko-Vektor in Würzburg durchgeführt und die daraus entstandenen 6x96well-Platten per PCR-Schnelltest analysiert. Daraus ergaben sich 29 möglicherweise positive Klone, aus denen DNA präpariert und per genomischer Southern Blot-Analyse charakterisiert wurde. Diese Analyse führte ebenfalls nicht zur Identifizierung von rekombinanten ES-Zell-Klonen.

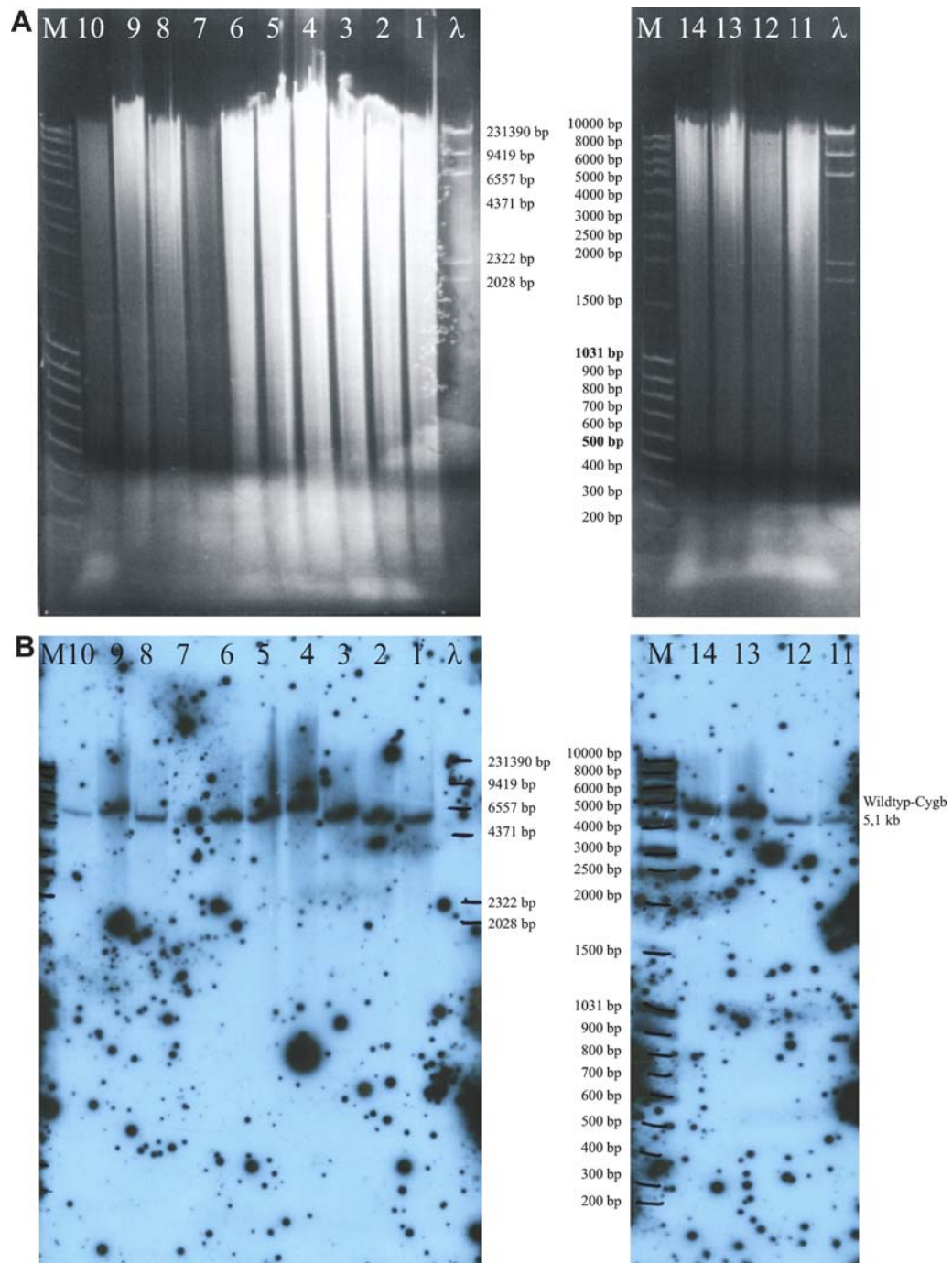


Abbildung 3-57 Southern Blot-Analyse der per PCR ausgewählten 14 möglicherweise positiven ES-Zell-Klone. Die DNA wurde mit dem Enzym Xmn I bzw. Pdm I vollständig verdaut (A) und mit der radioaktiv markierten Cygb-Sonde I hybridisiert. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte über Nacht und ca. eine Woche (B). Das detektierte Signal beschränkt sich lediglich auf die 5.1 kb Bande aus dem genomischen Cygb-Abschnitt, eine zweite Bande bei ca. 3 kb, die eine homologe Rekombination nachweisen würde, ist bei keiner der untersuchten DNAs zu sehen. (M: Mass RulerTM DNA Ladder)

3.6.4 Expression von Neuroglobin und Cytoglobin in embryonalen Stammzellen

Durch die große Anzahl der erfolglos analysierten ES-Zell-Klone, die mit den Ngb- bzw. Cygb-knock out-Plasmiden transformiert wurden, stellte sich die Frage, ob unter Umständen das Neuroglobin bzw. Cytoglobin so essentiell ist, dass ein heterozygoter „knock out“ bereits in den embryonalen Stammzellen letal wirken könnte. Dafür sollte mittels RT-PCR die Ngb- bzw. Cygb-mRNA-Expression untersucht werden. Hierzu wurde aus je 3 µg Gesamt-RNA aus embryonalen Maus-Stammzellen, Maus-Herz und Maus-Gehirn durch reverse Transkription (RT) cDNA hergestellt, die als Matrize für nachfolgende PCR-Analysen verwendet wurde. In Standard-PCR-Ansätzen wurden anschließend mit den in Tab. 3-18 aufgeführten Primerkombinationen Abschnitte bzw. die gesamte CDS von Neuroglobin, Cytoglobin und β -Aktin amplifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass weder Neuroglobin noch Cytoglobin in per RT-PCR detektierbaren Mengen in embryonalen Stammzellen exprimiert wird, so dass die oben vermutete Bedeutung einer Ngb- und Cygb-Expression nicht bestätigt werden konnte.

Gen	Primer 1	Primer 2	Fragmentgröße
Neuroglobin	mmuNgb2FX	mmuNgb4RX	393 bp
Cytoglobin	MMuGlobX NdeI	MMuGlobX Bam HI	590 bp
β -Aktin	Aktin_p2for	Aktin_p3rev	292 bp

Tabelle 3-18 Primerkombination und PCR-Fragmentgrößen zur Analyse der Ngb-, Cygb- und β -Aktin-Expression in ES-Zellen.

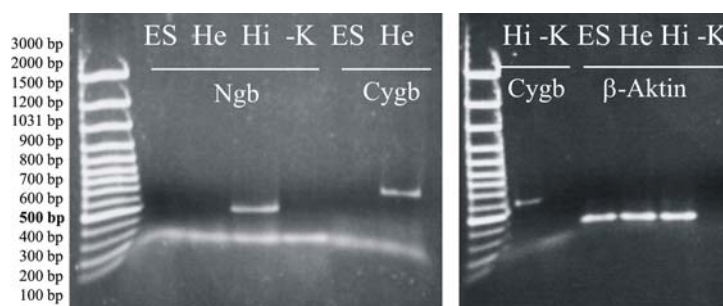


Abbildung 3-58 Expression von Neuroglobin, Cytoglobin und β -Aktin in Maus Leber, Gehirn und in embryonalen Stammzellen. M=GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas).

3.7 Herstellung von induzierbaren Transgen-Konstrukten für Ngb und Cygb

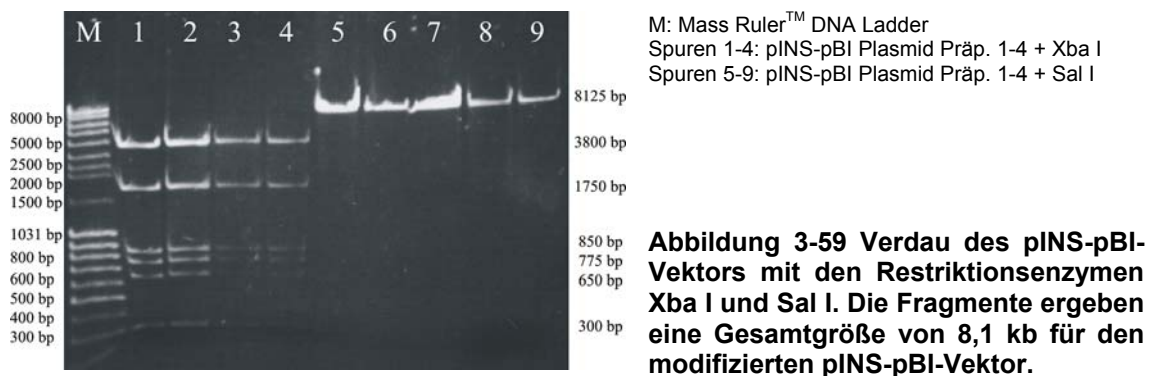
Für die Herstellung von transgenen Mäusen wurde eine modifizierte Version des kommerziell erhältlichen Vektors pBI-EGFP der Firma Clontech verwendet (Anhang Abb. 7-3). Es handelt sich hierbei um ein Plasmid mit einem bidirektionalen minimalen CMV-Promotor, von dem aus die Expression des klonierten Gens sowie die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (enhanced green fluorescent protein; EGFP) reguliert wird. Der Promotor wird in Anhängigkeit von Tetracyclin (Tc) bzw. dem kostengünstigeren Derivat Doxycyclin (Dox) ab- bzw. angeschaltet (siehe Einleitung).

Das modifizierte pINS-pBI-Plasmid wurde von Dr. Bockamp (ZMG, Institut für Toxikologie; Mainz) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Zusätzlich zu den bekannten Eigenschaften enthält dieses Plasmid sog. Insulator-Sequenzen, die an Position 1835 bp und 3810 bp in Form von 1080 bzw. 1985 bp langen Fragmenten in den Originalvektor eingefügt wurden. Die eigentliche Insulator-Sequenz umfasst dabei jeweils 800 bp und stammt aus dem 3' Bereich der humanen β -Globingen-Domäne. Es handelt sich dabei um eine AT-reiche DNase hypersensitive Sequenz, in der Bindestellen für Topoisomerasen II lokalisiert sind, die wichtig für die Entwirrung von supercoiled Chromatin-Loops sind (Fleenor and Kaufman, 1993). Durch die Positionierung solcher Sequenzen flankierend zur multiplen Klonierungsstelle sollen Positionseffekte vermieden werden, die bei der möglichen Integration des transgenen Vektors in heterochromatische Chromosomenbereiche auftreten und die Genexpression negativ beeinflussen können.

3.7.1 Vorbereitung des Vektors pINS-pBI

Das erhaltene Plasmid wurde zunächst in *E.coli* transformiert und mittels Mini-Plasmid-Präparationen (2.3.3) aus ÜN-Kulturen in benötigter Menge gewonnen. Die Identität der Plasmide wurde durch Restriktionen überprüft. Zum einen wurde hierfür ein Enzym gewählt, das nur ein Mal im Plasmid schneidet und es somit linearisiert. Ferner war zu diesem Zeitpunkt die genaue Lage der Insulator-Sequenzen nicht bekannt und sollte zunächst anhand einer Restriktionskartierung bestimmt werden. Hierfür wurde das

Enzym Xba I verwendet, für das im pBI-EGFP-Vektor drei Erkennungssequenzen enthalten sind. Das Plasmid pINS-pBI wurde von diesem Enzym 6 Mal geschnitten, woraus 6 unterschiedliche Fragmentlängen entstanden, die insgesamt eine Vektorgröße von ca. 8100 bp ergaben. Für die Insulatoren wurden anhand dessen die Positionen um die Ase I-Schnittstelle bei Position 1814 bp und zwischen der Ampicillin-Resistenz und dem SV40 poly A-Signal bestimmt.



Die MCS des pBI-EGFP-Vektors enthält u.a. Schnittstellen für die drei Enzyme Pvu II, Mlu I und Nhe I, die jeweils 6er Palindrome erkennen und entsprechend vergleichsweise selten im Genom schneiden. Da in der Cygb-CDS eine Schnittstelle für Pvu II vorhanden war, wurden die Schnittstellen Mlu I und Nhe I für die Integration der Ngb- und Cygb-CDS verwendet. Hierzu wurden zunächst ca. 15 µg des Vektors in einem Doppelverdau mit beiden Enzymen (2.2.3) geschnitten und durch Fällung aufgereinigt. Anschließend wurden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase die 5'Enden des Vektors dephosphoryliert, um die Selbstligation des Vektors zu verhindern (2.2.9.2). Dieser Ansatz war hierbei besonders wichtig, da die beiden Schnittstellen unmittelbar nebeneinander lagen und deshalb die Doppelrestriktionen wahrscheinlich nicht besonders effizient waren. Nach einer Hitzedenaturierung der alkalischen Phosphatase konnte der geschnittene Vektor direkt für die Ligationen mit der Ngb- bzw. Cygb-CDS eingesetzt werden.

3.7.2 Vorbereitung der proteinkodierenden Sequenzen von Ngb und Cygb

Zur Herstellung der PCR-Produkte mussten Primer generiert werden, welche die komplette CDS der beiden Gene einschließlich der Start- und Stopkodons enthielten. Zudem mussten Klonierungs-Schnittstellen in der richtigen Orientierung eingefügt werden, d.h. am 5'-Ende der CDS jeweils eine Mlu I- und am 3'-Ende eine Nhe I-Erkennungssequenz. Weiterhin kann es bisweilen von Vorteil sein, eine Kozak-Sequenz (CACC) (Kozak, 1987) am 5'-Ende des Gens zu platzieren. Diese dient als Erkennungsstelle für die Bindung von Ribosomen und kann die Expressionseffizienz steigern. In Abb. 3-60 ist der oben geschilderte Sachverhalt skizziert, die genauen Primersequenzen können der Tab. 7-6 im Anhang entnommen werden.

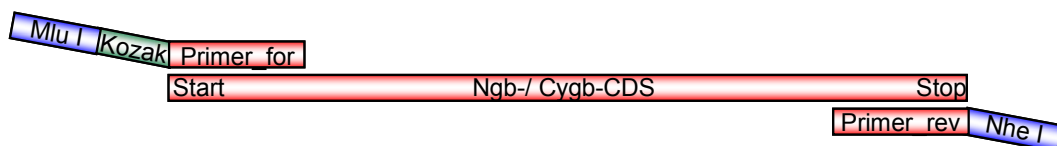


Abbildung 3-60 Die Herstellung der Ngb- bzw. Cygb.CDS zur Klonierung in den transgenen Vektor pINS-pBI erfolgte mit Hilfe der skizzierten Primer und mittels einer „Proofreading“-Taq-Polymerase.

In einer „Proofreading“-PCR (2.2.6) wurden aus Maus-Gehirn cDNA die Neuroglobin-CDS (456 + 30 bp) und aus Maus-Herz cDNA die Cytoglobin-CDS (573 + 30 bp) amplifiziert. Hierbei entstanden neben den benötigten PCR-Produkten auch unspezifische Fragmente, die auch nach Erhöhung der Annealing-Temperatur nicht vollständig verschwanden. Aus diesem Grund wurden die beiden benötigten PCR-Produkte durch Gelextraktion aus einem präparativen Agarosegel aufgereinigt.



Abbildung 3-61 „Proofreading“-PCR-Amplifikation der Ngb- und Cygb-CDS. Aufgrund der unspezifischen Beiprodukte in den PCR-Reaktionen, die auch nach Erhöhung der Annealing-Temperatur nicht verschwanden, mussten die gewünschten Fragmente in den Größen 486 bp für Ngb von und 593 bp für Cygb mittels Gelelution isoliert werden.

Nach der Gelextraktion wurden die PCR-Produkte wiederholt auf einem Agarosegel überprüft und die Konzentrationen photometrisch bestimmt. Anschließend wurden ca. 5 µg des Ngb-CDS PCR-Produktes und ca. 10 µg des Cygb-CDS PCR-Amplifikates in Doppelrestriktionen mit den Enzymen Nhe I und Mlu I behandelt. Nach einer anschließenden Fällung konnten sie für die Ligation in den geschnittenen pINS-pBI-Vektor verwendet werden.

Nachdem der Ligationsansatz übers Wochenende bei 4 °C inkubiert wurde, wurde er nach der Aufreinigung durch Fällung mittels Elektroporation in *E.coli* DH10B transformiert. Da das pINS-pBI-Plasmid kein β-Galactosidase-Gen enthielt, wurden die Bakterien auf lediglich Ampicillin enthaltende Agar-Platten ausgestrichen und die weißen Klone am nächsten Tag zunächst mittels Kolonie PCR-Screening (2.2.7) unter Verwendung des Primerpaares pBI-EGFP-MCSSeqFor und pBI-EGFP-MCSSeqRev auf die Anwesenheit eines Integrats hin überprüft. Es stellte sich heraus, dass die Ligationseffizienz sehr gut war und von 16 untersuchten Ngb-Klonen 12 das gewünschte Insert enthielten, während von 10 analysierten Cygb-Klonen 7 das entsprechende Fragment aufwiesen (Abb. 3-62).

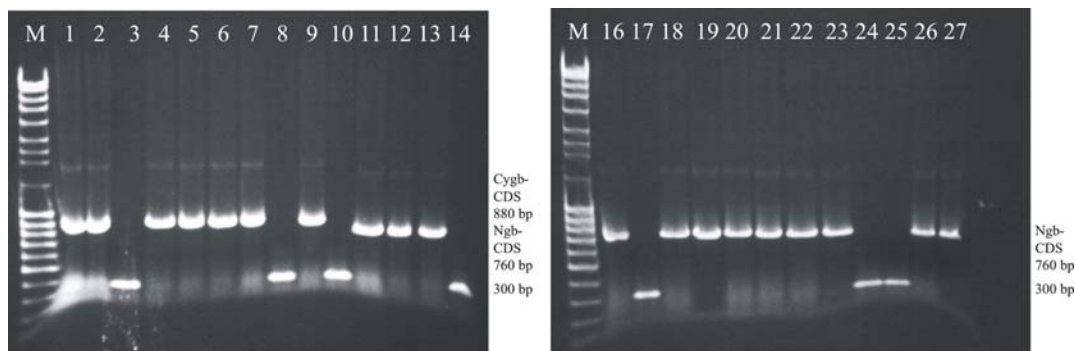
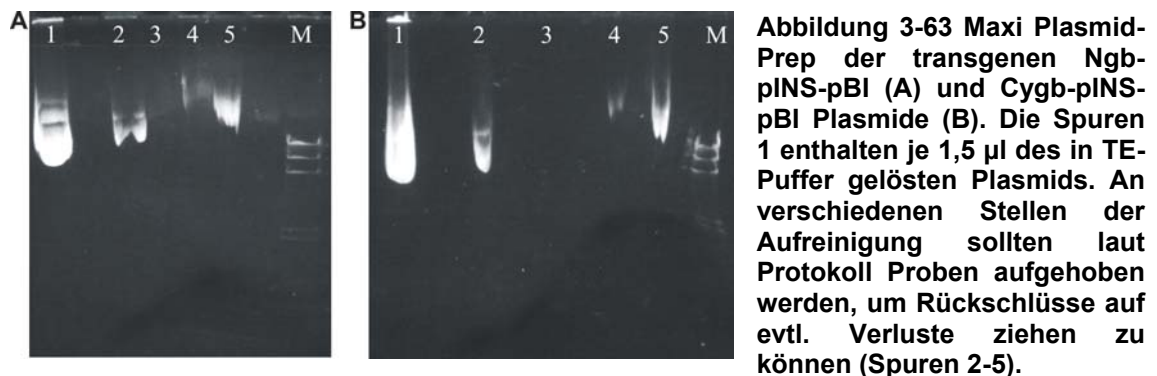


Abbildung 3-62 PCR-Analyse der *E.coli*-Klone nach der Transformation der Ligationen Ngb-CDS bzw. Cygb-CDS in pINS-pBI. Es wurde eine vergleichsweise hohe Effizienz der Ligationen erzielt. Als Marker wurde Mass Ruler™ DNA Ladder™ in Spur 1 aufgetragen. In Spuren 2-11 ist die Kontroll-PCR der klonierten Cygb-CDS und in Spuren 12-27 die PCR-Ergebnisse der Ngb-PCR aufgetragen. 300 bp umfasst das aus pBI-Vektor ohne Insert hergestellte Amplifikat.

Für die Expression eines funktionsfähigen Proteins ist es essentiell, dass die klonierte CDS-Sequenz zu 100 % mit der des gewünschten Gens übereinstimmt. Aus diesem Grund wurden je zwei Klone, die die Ngb- (Ngb-pBI; N1, N2) bzw. Cygb-CDS (Cygb-pBI; C4, C5) enthielten, sequenziert. Hierbei stellte sich heraus, dass der Vektor-Primer „pBI-EGFP-MCSSeqFor“ innerhalb der CMV-Sequenz des minimalen Promotors liegt. Da diese Sequenz im bidirektionalen Promotor doppelt vorkommt,

konnte dieser Primer zwar für die Test-PCRs verwendet werden, war aber für Sequenzierungsreaktionen ungeeignet. Anhand der guten Ergebnisse der Sequenzierungen mit dem pBI-EGFP-MCSeqRev-Primer konnten die Klone als identisch mit den Ausgangssequenzen identifiziert werden und wurden in Form von Glycerin-Kulturen bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Mit Hilfe des „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen wurden nach der beiliegenden Anleitung die Ngb-pBI (N2) und Cygb-pBI-Plasmide (C4) in erforderlicher Menge und Qualität für die Mikroinjektion gewonnen. Gelöst wurde das Plasmidpellet in 300 µl (Ngb) bzw. 250 µl (Cygb) TE-Puffer. Die photometrisch bestimmte Konzentration betrug für das Plasmid Ngb-pBI 2,4 µg/µl und für das Cygb-pBI-Konstrukt 2,5 µg/µl. Somit belief sich die Gesamtausbeute auf 720 bzw. 600 µg, was sehr gut mit den Angaben des Herstellers übereinstimmte.



Für Mikroinjektionen in den ProNucleus von befruchteten Eizellen des Mausstammes FvB, müssen die konstruierten Vektoren linear vorliegen, damit die Integration ins Genom erfolgen kann. Zugleich ist es sinnvoll, so viel wie möglich von der Vektor-DNA dabei herauszuschneiden. Hierfür wurde das Enzym Apa LI bzw. das Isoschizomer Alw 44I gewählt. Im Vektor sind zwei entsprechende Schnittstellen enthalten, so dass nach dem Verdau ein Fragment von ca. 1250 bp aus dem pBI-EGFP-Vektorrückgrat herausgeschnitten wurde. Der Rest des Konstrukts von ca. 6900 bp mit den klonierten Transkriptionseinheiten (Ngb: 465 bp; Cygb: 582 bp) konnte anschließend mittels Gelelution aus einem präparativen Agarosegel wiedergewonnen werden.

Für die Restriktionen wurden insgesamt ca. 500 µg der beiden transgen-Konstrukte eingesetzt, wobei grundsätzlich 60 µg in der Konzentration 1µg/ml ausreichend gewesen wären. Nach mehreren Gelextraktionen wurden die Ansätze vereint, so dass für Ngb-pINS-pBI schließlich ca. 80 µl Plasmidlösung in Injektionspuffer mit der Konzentration 0,5 µg/µl und für das Cygb-Konstrukt ca. 100 µl mit der Konzentration

0,6 µg/µl in der AG. Bockamp zur weiteren Aufreinigung für anschließende Injektionen abgegeben wurden.

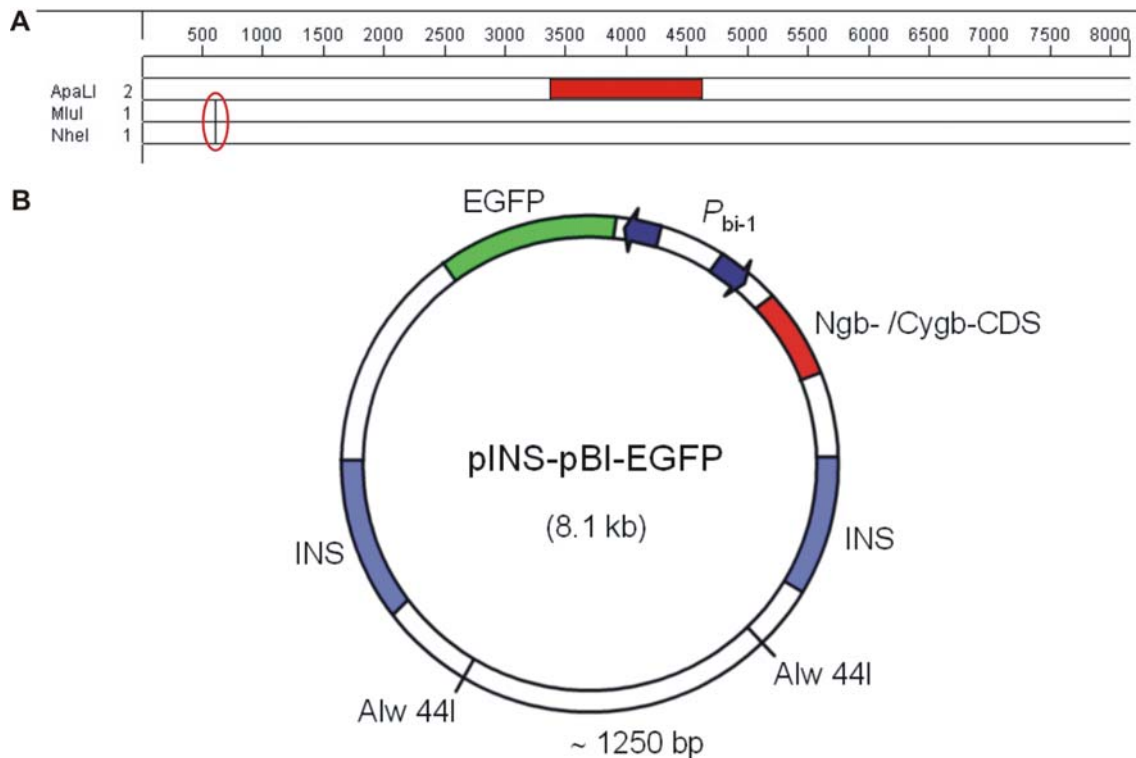


Abbildung 3-64 Skizze zur Linearisierung des pINS-pBI-Vektors. Die Vektorsequenz wurde mit Hilfe des MapDraw-Programmes nach möglichen Enzymen für eine Linearisierung und ein gleichzeitiges Herausschneiden des überflüssigen Vektorrückgrats durchsucht. Mit Hilfe des Enzyms Apa LI (Alw 44I) wurde ein Fragment von ca. 1250 bp aus dem Vektor entfernt (rot). Rot umrandet ist die MCS des Vektors mit den Restriktionsschnittstellen Mlu I bei 609 bp und Nhe I bei 615 bp, in die die Ngb- bzw. Cygb-CDS gerichtet kloniert wurde (A). In B ist eine Übersichtsskizze der pINS-pBI-Vektorkonstrukte dargestellt mit der Position der MCS (rot), den Insulator-Sequenzen (hellblau) und den Apa LI (Alw 44I) Schnittstellen.

Nachdem die linearisierten Plasmide über eine Spezialsäule aufgereinigt wurden, konnten sie für Mikroinjektionen eingesetzt werden, wobei pro Nucleus ca. 2-4 ng Konstrukt-DNA verwendet wurden. Die Injektionsarbeiten wurden von Dr. Leonid Eshkind in der AG Bockamp durchgeführt. Anschließend wurden dort die ersten Tests an Mausschwanzbiopsien zur Identifikation der transgenen Individuen durchgeführt. Hierfür wurde aus den Schwanzspitzen von ca. 2-3 Wochen alten Tieren nach einem etablierten Protokoll DNA präpariert und mittels PCR unter Verwendung EGFP-spezifischer Primer die integrierten Transgen-Konstrukte im Genom der Mäuse nachgewiesen. Dabei wurden acht Ngb-Transgen positive und zwei Cygb-Transgen positive Mäuse identifiziert.

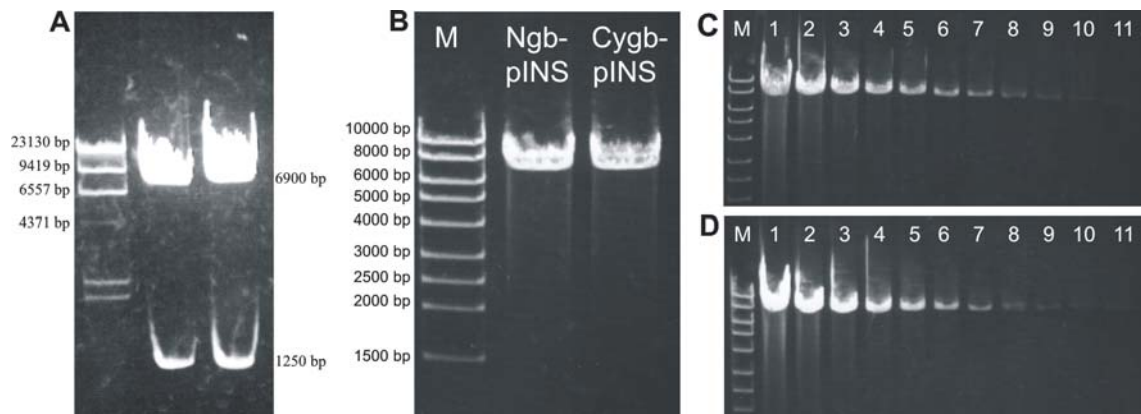


Abbildung 3-65 Ngb- bzw- Cygb-Transgen-Vektoren wurden durch den Verdau mit Apa LI (Alw 44I) für die Mikroinjektionen linearisiert, dabei wurde ein Fragment von ca. 1250 bp aus dem pBI-Vektorrückrad herausgeschnitten (A) Nach der Elution der Vektoren aus einem präparativen Agarosegel wurden 0,25 bzw. 0,3 µg auf einem Agarosegel getestet. (B) Für die Abgabe der Proben sollte ein Testgel mit seriellen 1:1 Verdünnungen der Proben angefertigt werden (C: Ngb; D: Cygb) Anfangen wurde mit 0,75 bzw. 0,9 µg DNA (Spur 1), die nächste Spur enthält 0,375 bzw. 0,45 µg DNA, Spur 3 entsprechend 0,188 bzw. 0,225 µg DNA usw.

4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten detaillierten Analysen der Expressionsmuster von Neuroglobin und Cytoglobin in neuronalen und endokrinen Geweben aus Maus und Ratte liefern eine wichtige Grundlage für die Diskussion der möglichen Funktionen beider Proteine. Ein darüber hinaus angestellter Vergleich der zellulären und subzellulären Lokalisation der untersuchten Globine mit den scheinbar kontroversen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vermittelt einen klaren Überblick über die Verteilung von Neuroglobin und Cytoglobin im murinen Gehirn.

Die evolutionäre Sequenzkonservierung von nicht-kodierenden DNA-Abschnitten im Neuroglobin-Gen gibt Hinweise auf die Lage funktionell wichtiger regulatorischer Elemente, die für eine differentielle Expression des Proteins verantwortlich sein könnten. Dabei steht die komparative Analyse von humanen und murinen Nukleotidsequenzen unter Zuhilfenahme bioinformatischer Methoden im Vordergrund.

Die Quantifizierung der Genexpression von Neuroglobin und Cytoglobin in Gehirnen von seneszenten Hamstern dienen als Grundlage zur Diskussion einer möglichen Rolle dieser Proteine im Alterungsprozess von Säugern.

Die Herstellung von entsprechenden transgenen und knock out-Mäusen ist für die Klärung der Funktionen beider Globine *in vivo* unumgänglich und wird im Anschluss kritisch erörtert.

4.1 Analyse der Ngb-mRNA- und Proteinverteilung in murinen Geweben

Ursprünglich wurde Neuroglobin anhand von cDNA-Datenbankeinträgen aus menschlichem und murinem Gehirn identifiziert. Die anschließende Northern Blot-Analyse bestätigte die prädominante Expression der Ngb-mRNA im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren (Burmester et al., 2000). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde zum ersten Mal die zelluläre und subzelluläre Lokalisation des Neuroglobins in verschiedenen murinen Geweben detailliert untersucht. In murinen Gewebeschnitten wurde zum einen anhand von *in situ*-Hybridisierungen (ISH) mit Ngb-„antisense“-Sonden die Verteilung der Ngb-mRNA untersucht (Reuss et al., 2002), zum anderen das entsprechende Ngb-Proteinmuster mit Hilfe von anti-Ngb-Antikörper-Immunfärbungen (IF) dargestellt (Hankeln et al., 2004; Wystub et al., 2003). Es folgten ähnliche Analysen anderer Arbeitsgruppen, die mit unterschiedlichen Techniken und Antikörpern zunächst scheinbar kontroverse Ergebnisse lieferten.

Analog zu unseren Ergebnissen wiesen Zhang et al. (2002), mit der von uns ebenfalls angewendeten Methode der nicht-radioaktiven ISH eine globale Expression der Ngb-mRNA im Gehirn von Ratten nach. Im Gegensatz dazu wurde anhand von *in situ*-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden eine eher fokale Verteilung des Neuroglobins in bestimmten Hirnregionen von Mäusen beschrieben (Mammen et al., 2002). Die Detektion des Proteins in Antikörper-Immunfärbungen (IF) bestätigte im Wesentlichen die breite Verteilung des Neuroglobins im murinen ZNS und stimmte somit mit den Ergebnissen der nicht-radioaktiven *in situ*-Hybridisierungen überein, wobei die IF-Signale deutliche Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Hirnregionen aufwiesen (Wystub et al., 2003; Zhang et al., 2002). Lediglich Geuens et al. (2003) beschrieben unter Einsatz eines selbst produzierten Antikörpers eine eher distinkte Verteilung des Ngb-Proteins im Maus-Gehirn.

Zur besseren Übersicht der scheinbar abweichenden Ergebnisse zur Lokalisation von Ngb-mRNA und -Protein in murinen Geweben wurden die entsprechenden Publikationen in Form einer Tabelle (4-1) zusammengefasst und miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Expressionsmuster durchaus miteinander vereinbar sind und die *in situ*-Hybridisierungen die ursprünglichen Northern Blot-Analysen bestätigen. Beispielsweise wurde die Ngb-Verteilung im cerebralen Cortex und im Hippocampus in den meisten, jedoch nicht in allen Studien beschrieben. Die Gründe hierfür waren vermutlich rein methodischen Ursprungs.

Radioaktive ISH-Experimente, die anhand von Übersichtsbildern der gesamten Maus-Gehirnschnitte dokumentiert wurden, lenken die Aufmerksamkeit auf bestimmte Regionen mit entweder einer besonders starken Ngb-mRNA-Expression oder einer besonders hohen Neuronendichte und -größe. Die Ergebnisse der nicht-radioaktiven ISH hingegen eignen sich nur bedingt zur Quantifizierung der mRNA-Mengen, liefern allerdings eine bessere Auflösung der Signale auf zellulärer Ebene. Grundsätzlich bestätigen die Daten eine ubiquitäre Verteilung der Ngb-mRNA und des Ngb-Proteins im murinen Gehirn, wobei die Signalstärke abhängig von der Region und selbst von Neuron zu Neuron deutlich unterschiedlich ausfallen kann. Darüber hinaus wurde in allen Studien übereinstimmend eine rein neuronale Expression des Neuroglobins im murinen Gehirn beschrieben (siehe auch Laufs et al., 2004).

Als Bestandteil des ZNS exprimierten auch die Neurone im Rückenmark Neuroglobin. Die positiven Northern Blot-Signale (Burmester et al., 2000) konnten mit entsprechenden nicht-radioaktiven *in situ*-Hybridisierungen (Reuss et al., 2002) und Antikörper-IF bestätigt werden (Wystub et al., 2003). Im Gegensatz dazu detektierten Trent und Hargrove (Trent and Hargrove, 2002) in ähnlichen Northern Blot-Analysen kein Ngb-Signal im Rückenmark. Ferner wurde im Rahmen Ihrer Untersuchung auch im Kleinhirn kein Ngb nachgewiesen. Möglicherweise war die angewendete Hybridisierungsmethode nicht sensitiv genug, um die im Vergleich zu anderen Hirnregionen deutlich schwächeren Signale nachzuweisen.

Des Weiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression des Neuroglobins im peripheren Nervensystem (PNS) und in endokrinen Geweben untersucht. Anhand von ISH und indirekten Antikörper-Immunfärbungen konnten intensive Ngb-Signale in den Ganglien des sensorischen Nervensystems (NS), wie Trigeminal- und Hinterwurzelganglion („*dorsal root ganglion*“; DRG), identifiziert werden. Auch Neurone des vegetativen NS, z. B. solche der intramuralen Ganglien des enterischen Nervensystems in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes, wiesen starke Ngb-Färbung auf. Die Ngb-Expression in Neuronen des autonomen Nervensystems, die die verschiedenen Organe innervieren, erklärt auch den Northern Blot-Nachweis des Neuroglobins in anderen als neuronalen Geweben (Burmester et al., 2000). Ferner wurden in den enteroendokrinen Zellen der Darmschleimhaut und anderen endokrinen Geweben Ngb-mRNA und -Protein beobachtet. Endokrine Organe wie Nebenniere, Hypophyse, Epiphyse und Testis exprimierten beachtliche Mengen Ngb. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der hohen Stoffwechselaktivität dieser Gewebe. Zudem wurde das Ngb in den Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas detektiert (Geuens et al., 2003).

Kapitel 4

Gewebe	Ref. 1 Northern Blot	Ref. 2 Northern Blot	Ref. 3 NR- ISH	Ref. 4 IF	Ref. 5 NR- ISH	Ref. 6 5 IF	Ref. 6 R- ISH	Ref. 7 IF
olfactory bulb			s	+	+			
cerebral cortex (layers II – VI)	++/+++	+++	s	++	+++	+++	-	s
hippocampal formation	+		s	++*	+++	++	-(s)	-
pyramidal cells (CA1-CA4)			s	++*	+++	++	-(s)	-
granule cells (dentate gyrus)			s	++*	+++		-(s)	-
striatum	+		s	+				
thalamus	+++	+++	s	++	++	+++	+++	s
subthalamic nucleus	+++		s	++*				s
hypothalamus			s	++/+++	++	+++	+/+++	
median preoptic nucleus/area			s	+++		+++	+++	
arcuate nucleus			s	+++*			+++	
lateral septal nuclei				++*			+++	
subfornical organ				+++*			+++	
lateral/medial habenula				++*		++	+	
amygdala	+			++*	++	+++	++	
brain stem nuclei			s	++*	+	+	+/+++	
inferior colliculi			s				++	
superior colliculi			s					
reticular nucleus			s	++*	+	+		
locus coeruleus				++*			+++	
lower brain stem			s	++/+++	+	+	+/+++	
sup. olivary complex			s	+++*				+++
facial nucleus			s	++				
lateral reticular nucleus			s	++*	+	+		
pontine nuclei	+++	+++	s	++*	+	+		
inferior olive			s	+++*				
Cerebellum	+	-	s	++	+++	+++		
Purkinje cells			s	++	+++	+++		
cortical granule layer			s	+				
spinal cord	+	-	s	+++*				
dorsal horn			s	+++*				
ventral horn			s	+++				

Tabelle 4-1 Vergleich der Ngb-mRNA und Proteinexpression im ZNS der Säuger. Folgende Analysemethoden wurden in der Gegenüberstellung zusammengefasst: radioaktive mRNA (Northern) Filterhybridisierung („Northern Blot“), nicht-radioaktive und radioaktive in situ-Hybridisierung („NR-ISH“ bzw. „R-ISH“) sowie polyklonale Antikörper-Immunfärbung (IF). „s“ steht für nicht quantifizierbares Signal; „(s)“ kennzeichnet in Original-Publikationen sichtbares, jedoch nicht beschriebenes Signal; „+“ und „-“ bezeichnet die An- bzw. Abwesenheit eines Signals, wobei eine persönliche visuelle Einschätzung der Signalintensität anhand der Original-Abbildungen mit einem bis drei „+“ wiedergegeben wurde; eigene IF-Daten wurden mit bisher unveröffentlichten Ergebnissen ergänzt und mit „*“ markiert.

Datenquellen: Ref. 1. Burmester et al., 2000; Ref. 2. Trent und Hargrove, 2002; Ref. 3. Reuss et al., 2002; Ref. 4. Wystub et al., 2003; Ref. 5. Zhang et al., 2002; Ref. 6. Mammen et al., 2002; Ref. 7. Geuens et al., 2003 (Hankeln et al., 2004)

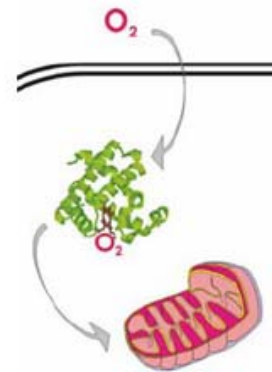
Auch in der neuronalen Retina wurden sowohl Ngb-mRNA als auch das Protein detektiert. Die Verteilung des Proteins unterschied sich jedoch von der der mRNA, was auf einen möglichen Transport des Proteins innerhalb der verschiedenen Zellschichten in der Retina hindeutet. Das Protein wurde verstärkt in den Photorezeptorzellen und in den beiden plexiformen Schichten sowie in Ganglienzellen detektiert (Bentmann et al., 2005; Schmidt et al., 2003).

4.2 Funktionelle Bedeutung des Ngb-Expressionsmusters

Die Expression von Neuroglobin in neuronalem Gewebe sowie in endokrinen Organen ist eindeutig mit den Orten außerordentlicher metabolischer Aktivität im Vertebratenkörper assoziiert. Das menschliche Gehirn macht beispielsweise mit seiner Masse von rund 1,4 kg zwar nur ca. 2 % des gesamten Körpergewichtes aus, verbraucht aber ein Fünftel des gesamten pro Zeiteinheit aufgenommenen Sauerstoffs (Schmidt and Thews, 1997). Diese extrem hohe Stoffwechselrate von 8 bis $10 \times 10^{-2} \text{ ml O}_2 \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bzw. circa $1,5 \text{ } \mu\text{mol} (\text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1})$ entspricht in etwa derjenigen des Herzens bei körperlicher Ruhe. Des Weiteren wiesen die Antikörper-Immunfärbungen regionale Unterschiede der Ngb-Signalintensität innerhalb des murinen Gehirns auf, die offensichtlich mit der erhöhten metabolischen Aktivität bestimmter Hirnbereiche korrelieren. Beispielsweise wurden im oberen Olivenkomplex, einem Teil des auch nachts aktiven auditorischen Systems, besonders hohe Ngb-Konzentrationen detektiert. Versuche an Ratten mit [^{14}C] markierter Deoxyglucose zeigten, dass Bestandteile des auditorischen Systems konstitutiv die höchsten metabolischen Aktivitäten im Gehirn aufweisen (Sokoloff, 1981; Sokoloff et al., 1977). Die Ergebnisse der anti-Ngb-Immunfärbungen konnten für diesen Hirnbereich anhand von quantitativen Realtime RT-PCR-Daten bestätigt werden. Dabei wurde eine etwa um den Faktor 2,3 höhere Ngb-mRNA-Expression im oberen Olivenkomplex von Ratten im Vergleich zum „Resthirn“ nachgewiesen (Hill, 2003). Auch in der Retina, in der das Ngb-Protein verstärkt in Photorezeptorzellen und den beiden plexiformen Schichten sowie in Ganglienzellen beobachtet wurde (Bentmann et al., 2005; Schmidt et al., 2003), handelt es sich durchweg um Zellschichten, für die die höchsten Sauerstoffumsatzraten ermittelt wurden (Crigle et al., 2002). Insgesamt entspricht der Sauerstoffverbrauch von $9,7 \times 10^{-2} \text{ ml O}_2 \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Retina dem des Gehirns. Auf der Basis dieser grundlegenden Erkenntnisse zur Expression müssen nun die möglichen Funktionen von Neuroglobin diskutiert werden.

Ngb als O₂-Speicher, -Transporter, oder -Puffer?

Eine Rolle des Neuroglobins als O₂-Versorger stellt die intuitiv bevorzugte Möglichkeit dar. Dafür spricht die beobachtete Lokalisation von Neuroglobin in metabolisch hochaktiven Geweben wie Gehirn, Retina und endokrine Organe, sowie das anscheinend proportionale Verhältnis der Ngb-Menge zur Aktivität dieser Organe bzw. bestimmter Regionen, wie dem auditorischen System im Gehirn. Analog dem Myoglobin im Muskel könnte das Neuroglobin als spezieller O₂-Speicher in diesen Geweben fungieren.



Ein wichtiger Einwand gegen eine O₂-abhängige Funktion des Neuroglobins entsprechend dem Myoglobin ist die ca. 100fach geringere Ngb-Menge im Gehirn. Lediglich in der Retina entspricht die Ngb-Konzentration von 100 µM in etwa der des Myoglobins im Muskel (Schmidt et al., 2003). Allerdings wurde die Ngb-Konzentration im Gehirn anhand von Western Blot-Analysen an Gesamtproteinextrakten ermittelt und könnte lokal in den besonders aktiven Bereichen deutlich höher liegen. Ferner machen die Gliazellen, die kein Ngb exprimieren, mindestens die Hälfte des menschlichen Hirnvolumens aus (Kimelberg and Norenberg, 1989; O'Kusky and Colonnier, 1982).

Es ist bekannt, dass Anpassung an geringere O₂-Partialdrücke in Höhenlagen oder an die extremen Lebensbedingungen tieftauchender Säuger mit einem erhöhten Myoglobingehalt im Muskel einhergehen (Kanatous et al., 2002; Vogt et al., 2001). Entsprechend wurde für das Neuroglobin im Gehirn der Blindmaus *Spalax ehrenbergi*, die aufgrund ihres O₂-armen unterirdischen Lebensraums dauerhaft einer hypoxischen Umgebung (ca. 7 % O₂) ausgesetzt ist, eine 1,7-2,5-fach höhere mRNA-Konzentration im Vergleich zum Rattenhirn gemessen. Parallel weist auch der Nackenmuskel von *Spalax* eine höhere Myoglobin-Konzentration im Vergleich zum Rattenmuskel auf (Gerlach et al., in Vorbereitung). Somit könnte die konstitutiv höhere Expression beider Speicherproteine einen Anpassungsmechanismus an die dauerhaft reduzierte O₂-Verfügbarkeit darstellen und das Neuroglobin auf diese Weise eine adäquate O₂-Versorgung des *Spalax*-Gehirns gewährleisten.

Zusätzlich zur O₂-Speicherfunktion wäre eine Beteiligung des Neuroglobins am O₂-Transport innerhalb der Ngb-exprimierenden Zellen prinzipiell denkbar. Entsprechend dem Myoglobin im Muskel (Wittenberg and Wittenberg, 1987) könnte das Neuroglobin an der sog. „*facilitated oxygen diffusion*“ von der Zellmembran zu den Mitochondrien

hin beteiligt sein. Dafür spricht u.a. die Lokalisation des Neuroglobins im apikalen Abschnitt der inneren Segmente von retinalen Rezeptorzellen, in denen auch die Mitochondrien akkumulieren (Bentmann et al., 2005; Schmidt et al., 2003). Die langsame Sauerstoffdissoziationskonstante des Neuroglobins könnte diese Funktion unterstützen, denn das oxygenierte Molekül wäre in der Lage, vergleichsweise lange Diffusionsstrecken zurückzulegen (Wittenberg and Wittenberg, 2003). Allerdings ist die Beteiligung des Myoglobins an der Sauerstoffdiffusion innerhalb von Muskelzellen auch nicht unumstritten. Jürgens et al. (2000) räumen der Mb-vermittelten, erleichterten O₂-Diffusion aufgrund des sehr niedrigen Diffusionskoeffizienten des Myoglobins lediglich einen Anteil von ca. 4 % an der gesamten O₂-Diffusion in Muskelzellen ein. Trotzdem beobachtete bereits Lawrie (1953) eine positive Korrelation zwischen der Mb-Konzentration und der Cytochrom-Oxidase-Aktivität im Muskel. Auch die beobachtete Reduktion des freien Sauerstoffs durch Myoglobin in der Nähe des Sarcolemmas würde für eine O₂-Transportfunktion sprechen (Wittenberg and Wittenberg, 2003). Eine entsprechende Funktion des Neuroglobins wurde anhand eines mathematischen Modells der O₂-Versorgung in der Retina widerlegt (Fago et al., 2004b). Vermutlich ist die Ngb-Konzentration mit 100 µM zu gering: erst ab einer ungefähr dreifach höheren Konzentration könnte das Ngb signifikant am O₂-Transport beteiligt sein. Dennoch schlugen die Autoren eine mögliche Rolle des Neuroglobins bei der Bereitstellung ausreichender O₂-Mengen während eines kurzfristig erhöhten Bedarfs, z.B. in kurzzeitigen Dunkelphasen, in der Retina vor.

Analog dazu wäre eine Funktion des Neuroglobins als O₂-Kurzzeitspeicher im Gehirn vorstellbar. Ngb könnte als intrazellulärer O₂-Puffer zum Schutz vor kurzzeitiger mitochondrialer Anoxie fungieren. Die gleichmäßige cytoplasmatische Verteilung von Ngb könnte ein Hinweis dafür sein, dass es innerhalb der Zellen mit besonders hohem Stoffwechsel einen konstanten O₂-Partialdruck aufrechterhält. Ein weiteres Indiz für diese Funktion bietet die in den IF-Analysen oft detektierte erhöhte Ngb-Menge in Neuronen in direkter Nachbarschaft von Kapillaren (Abb. 3-8). Wahrscheinlich puffert das Neuroglobin dort mögliche Schwankungen der O₂-Partialdrücke direkt ab. Für das Myoglobin wurde eine ähnliche Funktion anhand von *in vivo* „magnetic resonance spectroscopy“ (MRS)-Messungen nachgewiesen (Conley et al., 2000).

Eine entsprechende Funktion wird für die Nervenglobine der Invertebraten angenommen, mit denen das Neuroglobin Übereinstimmungen von ca. 30 % in der AS-Sequenz aufzeigt und demnach phylogenetisch verwandt ist (Burmester et al., 2000). Wenngleich diese Nervenglobine im Gegensatz zum Neuroglobin in wesentlich höheren Konzentrationen (mM) und in Gliazellen exprimiert werden (Wittenberg et al.,

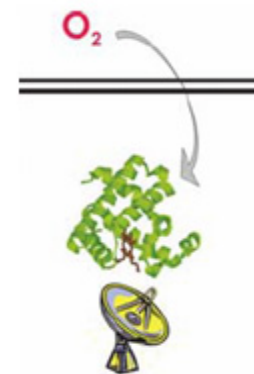
1965), besteht ihre Aufgabe in der Sicherstellung der erforderlichen Sauerstoffmengen als Folge der Anpassung an extreme Lebensbedingungen. Der neurophysiologische Vergleich des Nervenglobin-exprimierenden Gastropoden *Tellina alternata* mit der eng verwandter Spezies *Tagellus plebeius*, in der kein entsprechendes Globin gefunden wurde, zeigte dass das Nervenglobin die Aufrechterhaltung des Aktionspotentials in Neuronen unter anoxischen Bedingungen für mehr als 30 min gewährleistet. Das Neuron von *Tagellus plebeius* konnte hingegen schon ca. 5 min nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr kein Aktionspotential mehr generieren. So wird die Erregungsweiterleitung in *Tellina*-Nerven so lange aufrechterhalten, bis das Nervenglobin den gespeicherten Sauerstoff abgegeben hat. Auf diese Weise kann die Venusmuschel *Tellina* für längere Zeit in sauerstoffarmen Sedimenten nach Nahrung suchen. *Tagellus* lebt hingegen als Filtrierer in ständig gut durchlüfteten Böden und benötigt daher kein spezielles Nervenglobin (Kraus and Colacino, 1986).

Auf den ersten Blick ist das Neuroglobin dem monomeren Myoglobin der Vertebraten sehr ähnlich. Mit nur 25 % sind die Übereinstimmungen in der AS-Sequenz zwar relativ gering, dennoch ist die typische Globinfaltung sowie die Fähigkeit zur reversiblen Sauerstoffbindung im Neuroglobin erhalten (Burmester et al., 2000; Dewilde et al., 2001; Hamdane et al., 2003). Die Auflösung der Kristallstruktur (Pesce et al., 2003a) zeigte allerdings ungewöhnliche Protein-Kavitäten, die weder im Myo- noch im Hämoglobin vorhanden sind und möglicherweise die Einlagerung und Diffusion von Liganden innerhalb des Ngb-Moleküls beeinflussen. Die größte Auffälligkeit des Neuroglobins ist jedoch die Hexakoordination des Häms in der deoxy-Fe(II)- sowie in der Fe(III)-Form. Dabei bestätigte die Röntgenstrukturanalyse endgültig die zahlreichen spektroskopischen Studien (Burmester et al., 2000; Couture et al., 2001; Dewilde et al., 2001; Du et al., 2003; Kriegl et al., 2002; Trent et al., 2001; Uno et al., 2004). Das bedeutet, dass der externe Ligand O₂ mit dem internen Liganden (HisE7) um die Bindung an das Eisenatom konkurriert. Trotz der komplexen biphasischen Bindungskinetik liegt die *in vitro* gemessene O₂-Affinität des Neuroglobins mit 1 Torr im Bereich der des Myoglobins (Burmester et al., 2000; Dewilde et al., 2001; Fago et al., 2004a; Hamdane et al., 2004). Lediglich Fago und Mitarbeiter (2004a) haben unter sog. „physiologischen“ Bedingungen mit entsprechendem pH und Temperatur eine wesentlich niedrigere Affinität des Neuroglobins zum Sauerstoff von 7,5 Torr gemessen. Dem zugrunde liegt die Tatsache, dass im humanen Ngb die Möglichkeit zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke gegeben ist, die zu der hohen O₂-Affinität um 1 Torr führt. Fago et al. nehmen allerdings an, dass natürlichweise in Körperzellen reduzierende Bedingungen vorherrschen, so dass keine Disulfidbrücken ausgebildet werden können. Die daraus resultierende, um den Faktor 7-8 geringere

O_2 -Affinität des Neuroglobins würde nach Meinung der Autoren dazu führen, dass unter den vergleichsweise geringen Sauerstoffpartialdrücken im Gehirn nur ein geringer Teil des Ngb in oxygenierter Form vorliegen würde. Aus der Literatur bekannte Werte dagegen offenbaren zwar enorme Schwankungen der O_2 -Partialdrücke innerhalb des Gehirns mit minimalen Werten von 1-3 Torr, liegen aber in den meisten Regionen im Bereich von 10-20 Torr (Erecinska and Silver, 2001). Damit wäre der größte Teil des Neuroglobins im Gehirn unter physiologischen Bedingungen auf jeden Fall mit Sauerstoff gesättigt und eine mögliche Funktion des Globins im O_2 -Metabolismus nach wie vor aktuell. Ein großes Problem stellt dabei allerdings die hohe Autooxidationsrate des Proteins dar (Dewilde et al., 2001; Fago et al., 2004a). Oxydiertes Ngb kann keinen Sauerstoff mehr binden, und es bedarf einer Reduktaseaktivität um die Fe(II)-Form des Globins wiederherzustellen (Hankeln et al., 2005). Ein entsprechendes Enzym konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden (Fago et al., 2006).

Ngb als O_2 -Sensormolekül?

Bisher wurden nur in Archäen und Bakterien Sauerstoffsensoren mit einer Globindomäne beschrieben, die in der Lage sind, molekularen Sauerstoff zu binden und die Aerotaxis einzuleiten (Hou et al., 2001; Hou et al., 2000). Diese enthalten allerdings eine entsprechende Signaltransduktionsdomäne im funktionsfähigen Molekül, die im Neuroglobin so nicht vorhanden ist. Da die Sauerstoffbindung im hexakoordinierten Neuroglobin strukturelle Veränderungen im Protein zur Folge hat, wäre eine Funktion des Ngb als O_2 -Sensor und Teil einer



Signaltransduktionskette dennoch prinzipiell denkbar (Kriegl et al., 2002). Eine Konformationsänderung dieser Art wurde am Beispiel des nicht-symbiotischen Reis-Hämoglobins riceHb1 beschrieben (Hargrove et al., 2000). Verminderte Sauerstoffzufuhr könnte also die O_2 -Abgabe durch das Neuroglobin und eine damit einhergehende Strukturänderung im Molekül veranlassen, wodurch andere Moleküle, z.B. Bestandteile von Signaltransduktionsketten oder Transkriptionsfaktoren, aktiviert werden könnten. Von Nachteil könnte hierbei die hohe Sauerstoffaffinität des Neuroglobins von 1 Torr sein, denn das Molekül würde selbst unter sehr niedrigen O_2 -

Partialdrücken noch in oxygenierter Form vorliegen. Normalerweise arbeiten solche Sensoren im Bereich der vorhandenen O_2 -Konzentrationen, um auch die kleinsten Schwankungen sofort zu detektieren. Anhand der oben beschriebenen Immunfärbungen sowie weiteren intrazellulären Lokalisationsstudien mit Hilfe von N- und C-terminalen Genfusionskonstrukten von GFP („*green fluorescent protein*“) mit Neuroglobin (bisher unveröffentlicht) lässt sich zudem belegen, dass das Neuroglobin selbst nicht als Transkriptionsfaktor fungiert. Diese Studien zeigten stetig eine gleichmäßige Verteilung des Proteins im Cytoplasma von Neuronen und definitiv keine Signale im Zellkern. Auch fehlen bisher zuverlässige Daten über mögliche Kooperationspartner des Ngbs, die eine Signalweiterleitung bewerkstelligen könnten. Anhand von SPR- („*surface plasmon resonance*“) Messungen und Hefe Two-Hybrid-Assays wurden Interaktionen des Neuroglobins mit den $G\alpha$ -Proteinen der intrazellulären Signaltransduktionssysteme (Wakasugi and Morishima, 2005a; Wakasugi et al., 2003), dem Cystein-Proteinase Inhibitor Cystatin C (Wakasugi et al., 2004b), dem Flotillin-1 (Ding et al., 2005; Wakasugi et al., 2004a) und der $\beta 2$ -Untereinheit der Na^+ , K^+ -ATPase (Xu et al., 2003) beschrieben. Bisher wurde allerdings keine dieser Interaktionen *in vivo* bestätigt. Ferner lassen sich schon aufgrund der deutlichen Unterschiede in der zellulären und subzellulären Verteilung des Neuroglobins und seiner potentiellen Interaktionspartner einige dieser Wechselwirkungen ausschließen. So wird Cystostatin C im Gehirn überwiegend in den Mikrogliazellen exprimiert (Aronica et al., 2001), Neuroglobin wurde aber ausschließlich im Cytoplasma von Neuronen lokalisiert. Des Weiteren kommt Flotillin-1 anders als Ngb im Maus-Gehirn sowohl in Neuronen als auch in Astrogliazellen vor, wobei es dort mit der Plasmamembran und distinkten intrazellulären Kompartimenten assoziiert zu sein scheint (Stuermer et al., 2001) und somit IF-Signale liefert, die der beobachteten Ngb-Verteilung nicht entsprechen. Auch die $\beta 2$ -Untereinheit der Na^+ , K^+ -ATPase wird in adulten Ratten überwiegend in Astrogliazellen exprimiert (daher der Name: AMOG „*adhesion molecule on glia*“), während die neuronale Expression im Gehirn auf die Neurone in der Körnerzellschicht des Cerebellums beschränkt ist (Senner et al., 2003). Die Expression der potentiellen Interaktionspartner im Gehirn stimmt demzufolge kaum mit der des Neuroglobins überein, was eine mögliche Kooperation fraglich erscheinen lässt.

Eine Interaktion des Neuroglobins mit dem G -Protein α ist *in vivo* ebenfalls unwahrscheinlich, da die Sequenzidentitäten zu den Regulatoren der G -protein-vermittelten Signaltransduktion (RGS) bzw. zu den RGS-Domänen in G -Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) vergleichsweise gering sind. Zudem ist die sog.

GDI- („*guanidine nucleotide dissociation inhibitor*“) Funktion des Neuroglobins im Zebrafisch nicht erhalten (Wakasugi and Morishima, 2005b), wenngleich sowohl die Ngb-Sequenz als auch das Expressionsmuster im Zebrafisch sehr gut konserviert sind (Awenius et al., 2001).

Ngb als terminale Oxidase

Für hexakoordinierte, nicht-symbiotische Pflanzenglobine wurde am Beispiel des Gersten-Hämoglobins eine Funktion in der NADH-Oxidation beschrieben. Durch die Regenerierung des NAD^+ aus NADH gewährleistet das Hb die

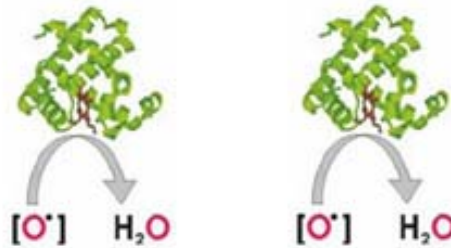


Aufrechterhaltung der glykolytischen ATP-Produktion unter anaeroben Bedingungen (Sowa et al., 1998). Genauere Untersuchungen ergaben inzwischen, dass die Hauptfunktion des Gersten-Hbs eher in der Entgiftung von NO liegt, wobei NADH als Cofaktor fungiert und zu NAD^+ oxidiert wird (Igamberdiev et al., 2004). Auch Flavohämoglobine in Bakterien sind möglicherweise in der Lage, eine Redoxreaktion zu katalysieren, in der sie das H^+ des NADH auf FAD und die zwei resultierenden Elektronen über das Häm auf ein Substrat übertragen (Probst et al., 1979).

Abgesehen von der hohen Autooxidationsrate des Neuroglobins *in vitro* (Dewilde et al., 2001; Fago et al., 2004a) gibt es jedoch keine Anhaltspunkte für diese Theorie. Zum einen läuft der sog. „*Lactat-Shuttle*“-Hypothese zufolge die Glykolyse im Gehirn überwiegend in Astrogliazellen ab (Pellerin and Magistretti, 1994; Pellerin et al., 1998), die in der Maus definitiv kein Neuroglobin exprimieren. Zum anderen wird bei verminderter Sauerstoffzufuhr noch in Gliazellen vermehrt Lactat aus dem Pyruvat gebildet (Magistretti, 1999). Diese Umwandlung wird durch die Lactat-Dehydrogenase₅ unter Verwendung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ katalysiert und führt zur Regenerierung des Reduktionsäquivalenten NAD^+ (Stryer, 1995). Die Gliazellen geben das Lactat in die Umgebung ab, wo es von Neuronen gegenüber Glucose bevorzugt aufgenommen und unter Sauerstoffverbrauch zu CO_2 und H_2O oxidiert wird (Itoh et al., 2003). Ferner wird die Ngb-Expression unter hypoxischen Bedingungen im Gegensatz zum Gersten-Hb nicht heraufreguliert (Taylor et al., 1994), obwohl aufgrund einer gesteigerten Glykolyse der Bedarf zur Regenerierung des NAD^+ höher sein müsste.

Mögliche Funktion des Neuroglobins im ROS und NO-Stoffwechsel?

Flavohämoglobine in Bakterien und Hefen agieren als NO-Dioxygenasen (e) und wandeln das hoch reaktive Stickstoffmonoxid (NO), unter Verwendung von O₂ in harmloses Nitrat um (Gardner et al., 2006; Gardner et al., 2000). Diese Fähigkeit wird inzwischen auch dem



Myoglobin und dem Hämoglobin der Vertebraten zugeschrieben (Flogel et al., 2001; Gardner et al., 2004; Merx et al., 2005; Wunderlich et al., 2003). Eine analoge Funktion wurde für das Ngb in neuronalen und endokrinen Geweben postuliert (Brunori et al., 2005; Fago et al., 2004b; Herold et al., 2004; Kundu et al., 2003). *In vitro* Bindungskinetiken zeigen, dass sowohl oxygeniertes, als auch nitrosyliertes Neuroglobin sehr schnell Redoxreaktionen mit Stickstoffmonoxid (NO) oder Peroxynitrit (ONOO⁻) eingeht und somit möglicherweise eine neuroprotektive Funktion ausübt (Brunori et al., 2005; Herold and Fago, 2005; Herold et al., 2004).

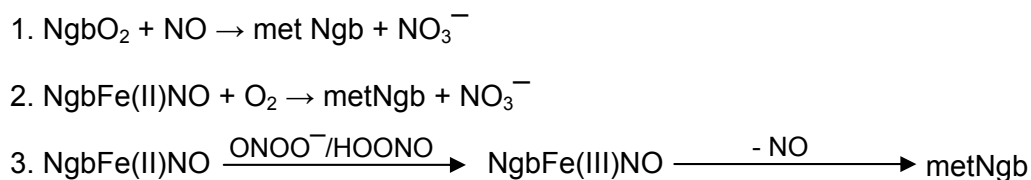


Tabelle 4-2 Mögliche Interaktionen von Neuroglobin mit NO und Peroxynitrit

Eine putative Rolle des Neuroglobins in der Entgiftung von Peroxynitrit, einer hochreaktiven Spezies, die aus NO[•] und Superoxid (O₂^{•-}) entsteht, wurde von Herold und Fago (2005) postuliert. Peroxynitrit bewirkt die Nitrosylierung von aromatischen AS-Resten in Proteinen, was eine Beeinträchtigung oder einen Funktionsverlust zur Folge hat (Thomas et al., 2002). Für intaktes Myoglobin konnte nachgewiesen werden, dass es im Vergleich zum apoMb ohne Häm deutlich weniger nitrosyliert wurde und somit wahrscheinlich in der Lage ist, das Peroxynitrit zu entgiften, um sich so vor Nitrosylierung zu schützen (Herold et al., 2002). Zudem sind sowohl oxy- und metMyoglobin, als auch oxy- und metHämoglobin in der Lage, die Nitrosylierung von extern zugegebenen Tyrosinen zu verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass

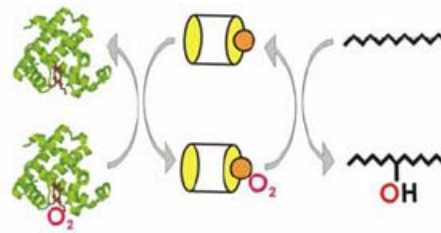
humanes NgbFe(II)NO 100-mal schneller mit Peroxynitrit reagiert als humanes Hämoglobin unter identischen Bedingungen (Herold et al., 2004). Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten und führt zur Freisetzung von NO[•] und metNgb. Inwiefern dieser Mechanismus *in vivo* eine Rolle spielt ist allerdings noch unklar.

Zur Überprüfung der möglichen Funktion des Ngb im NO-Metabolismus wurde die Ngb-Proteinverteilung mit der NO-Synthase- (nNOS)-IF verglichen. Da Neuroglobin in fast allen Neuronen im murinen Gehirn exprimiert wird, findet man dabei zwar eine partielle Überlappung, aber auch viele Zellen, die Ngb aber keine NOS exprimieren und umgekehrt (Abb. 3-13). Des Weiteren wurde in den Ngb-positiven Purkinje-Zellen im Cerebellum weder eine NOS-Aktivität mittels NADPH-Diaphorase-Tests nachgewiesen (Reuss and Riemann, 2000), noch zeigten Immunfärbungen auf nicht-hypoxischen Gehirnschnitten von Ratten in diesen Zellen nNOS- bzw. iNOS-Signale (Rodrigo et al., 2001). Auch in der Retina überlappen die Ngb- und NOS-exprimierenden Zellen nur teilweise und zeigen keine konstante Co-Lokalisation. Hier waren z.B. Zellen der inneren Nuklearschicht, in denen anhand von Immunfärbungen NOS-Expression beobachtet wurde (Neufeld et al., 2000), Ngb-negativ. Andererseits ist das NO ein Signalmolekül, das von den NO-produzierenden Zellen an die Umgebung abgegeben wird und daher wahrscheinlich im gesamten Gehirn zu finden ist. Infolgedessen widerspricht die fehlende Co-Lokalisation keineswegs einer möglichen Funktion des Neuroglobins in der Entgiftung von NO.

In erster Linie jedoch sprechen die Bindungseigenschaften im hexakoordinierten Ngb gegen eine effiziente Bindung von Stickoxid. Ähnlich wie bei der Bindung von O₂ und CO muss dabei zunächst das HisE7 an der sechsten Koordinationsstelle verdrängt werden (Dewilde et al., 2001), was mit einer 1000fachen niedrigeren NO-Affinität des Wildtyp (wt)-Neuroglobins im Vergleich zu pentakoordinierten Mutanten einhergeht (Van Doorslaer et al., 2003). Das bedeutet, dass die Bindung von NO an das Ngb nur unter sehr hohen (~300 µM), für den lebenden Organismus toxischen Konzentrationen erfolgen würde. Darüber hinaus hatte die Zugabe von Ngb „*antisense*“-Oligonukleotiden keine Auswirkung auf den zytotoxischen Effekt von NO-Donatoren in Zellkultur (Sun et al., 2001). Überdies wird unter Hypoxie die NO Produktion im Gehirn, infolge der Aktivierung von neuronalen und induzierbaren NO-Synthasen (Rodrigo et al., 2002) drastisch gesteigert und ein Anstieg von nanomolaren auf mikromolare NO-Konzentrationen verzeichnet (Bolanos and Almeida, 1999; Parmentier et al., 1999). Dies geht mit einem erhöhten Bedarf an Schutzmaßnahmen einher, jedoch konnte eine entsprechend parallel verlaufende Steigerung der Neuroglobinexpression bisher nicht beobachtet werden (Gerlach et al., in Vorbereitung; Fordel et al., 2004).

Ngb als O₂-Lieferant für enzymatische Reaktionen?

Da für viele enzymatische Reaktionen molekularer Sauerstoff benötigt wird, könnte eine Funktion des Neuroglobins in der O₂-Versorgung dieser Enzyme liegen. Bisher sind allerdings keine möglichen Interaktionspartner für das Neuroglobin in dieser Hinsicht bekannt.



Wichtig wäre, dass die Affinität der Enzyme zum Sauerstoff über der des Neuroglobins liegt, denn nur so würde das Ngb den Sauerstoff abgeben. Zudem sind die Cyt P₄₅₀-Enzyme, als Beispiel für sog. Monooxygenasen, unter anderem im endoplasmatischen Reticulum und in den Mitochondrien von steroidhormonproduzierenden Zellen in der Nebennierenrinde lokalisiert (Penzlin, 2005). Eine solche Kompartimentierung stimmt nicht mit dem dortigen cytoplasmatischen Expressionsmuster des Neuroglobins überein. Des Weiteren benötigen alle drei Isoformen der NO-Synthasen für die Herstellung von NO und N-Citrullin aus L-Arginin molekularen Sauerstoff und NADPH (Knowles and Moncada, 1994; Leone et al., 1991; Mayer and Hemmens, 1997). In Co-Lokalisations-Studien konnte allerdings keine entsprechend kongruente Verteilung von Ngb und nNOS im Maus-Gehirn beobachtet werden.

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Ngb-Expression kristallisiert sich also eine favorisierte Möglichkeit zur Funktion des neuentdeckten Globins in der O₂-Versorgung der metabolisch hochaktiver neuronaler und endokriner Gewebe heraus. Aufgrund der differierenden Ngb-Mengen im Gehirn, die mit Regionen mit besonders hohen Grundumsatzraten, wie z.B. dem oberen Olivenkomplex, korrelieren, scheint die Rolle des Neuroglobins mit der basalen Stoffwechselaktivität dieser Gewebe verknüpft zu sein. Die rein neuronale Expression des Neuroglobins korreliert mit den Orten der oxidativen Phosphorylierung im Gehirn, denn ca. 97 % der Mitochondrien sind in Neuronen lokalisiert (Wong-Riley, 1989). Die hohe Autooxidationsrate des Ngbs (Dewilde et al., 2001) würde theoretisch sogar eine Beteiligung am Elektronentransport ermöglichen, jedoch spricht die lediglich annähernd übereinstimmende, aber nicht absolut deckungsgleiche Co-Lokalisation von Ngb und Cytochrom c in der Retina gegen eine solche direkte Aufgabe. (Bentmann et al., 2005).

Kürzlich beschrieben Fago et al. (2006) die Fähigkeit des Neuroglobins Cytochrom c zu reduzieren. Daraus ergibt sich eine mögliche Rolle des Neuroglobins im Schutz der Zellen vor einer Mitochondrien-vermittelten Apoptose, die durch die Freisetzung des

Cyt c eingeleitet wird. Eine schnelle Reduktion des freigesetzten Cyt c durch das Neuroglobin würde die Induktion der Apoptose verhindern. Dieses Szenario stellt eine durchaus denkbare Alternative im Hinblick auf eine Schutzfunktion des Neuroglobins an Orten mit besonders hohen Stoffwechselaktivitäten und infolgedessen erhöhter Mitochondriendichte dar.

4.3 Analyse der Cygb-Proteinverteilung in murinen Geweben

Anhand von Northern Blot-Analysen wurde Cygb-mRNA ursprünglich in fast allen Geweben von Säugern nachgewiesen, was zunächst auf eine ubiquitäre Expression des Genproduktes hindeutete (Burmester et al., 2002; Trent and Hargrove, 2002). Relativ intensive Signale wurden dabei im Herzen, in der Lunge, im Magen und Darm, aber auch im Gehirn detektiert. Detaillierte Analysen der Cygb-Proteinverteilung anhand von indirekten Antikörper-Immunfärbungen zeigten jedoch eine zelltypspezifische Expression des Cytoglobins. In zwei unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass Cytoglobin rein cytoplasmatisch in Fibroblasten des Bindegewebes und ontogenetisch verwandten Zellen zahlreicher inneren Organe wie Leber, Herz, Muskel, Niere, Darm, Lunge und Pankreas exprimiert wird (Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004). Zusätzlich wurde Cygb-Expression in Osteoblasten des Knochens und Chondroblasten des Knorpels detektiert (Schmidt et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde speziell die neuronale Expression des Cytoglobins anhand von Antikörper-IF analysiert. Die distinkten Expressionsmuster des Cytoglobins deuten auf unterschiedliche Funktionen des neuentdeckten Globins in Fibroblasten und Neuronen hin. Aus diesem Grund werden im Folgenden zunächst die bisherigen Erkenntnisse zur möglichen Funktion des Cytoglobins in Fibroblasten vorgestellt, bevor im nächsten Kapitel das neuronale Cygb-Expressionsmuster und dessen mögliche funktionelle Bedeutung analysiert werden.

Das orthologe Cytoglobin aus Ratte wurde zur gleichen Zeit im Rahmen einer Proteom-Analyse in aktivierten Sternzellen fibrotischer Leber identifiziert und entsprechend als „*stellate cell activation-associated protein*“ STAP benannt (Kawada et al., 2001). Kawada und Mitarbeiter (2001) konnten anhand von Western Blot-Analysen zeigen, dass STAP während der Fibrosierung der Sternzellen in gleicher Weise wie PDGF-Rezeptor- β , N-CAM und α -Aktin in der Expression heraufreguliert wird und deshalb möglicherweise eine wichtige Rolle in diesem Prozeß spielt. Die Lokalisation des Cytoglobins bzw. STAP in den Fibroblasten-ähnlichen Lebersternzellen konnte von

Schmidt et al. (2004) anhand der durchgeführten IF-Analysen bestätigt werden. Ferner konnte nach einer *in vitro*-Aktivierung von Lebersternzellen in Zellkultur mit den Wachstumsfaktoren PDGF und TGF β eine erhöhte Cygb-Expression detektiert werden (Nakatani et al., 2004). In der gleichen Studie zeigten Nakatani und Mitarbeiter (2004), dass alle Cygb-positiven Zellen auch das kollagenspezifische Chaperon Hsp47 exprimieren. Die einzige Ausnahme bildeten die Zellen der Haut. Das spezifische Vorkommen des Cygb im Cytoplasma von Bindegewebszellen, die aktiv an der Produktion der extrazellulären Matrix beteiligt sind, deutet möglicherweise auf eine kollagenabhängige Funktion des Cytoglobins hin. In Übereinstimmung dazu werden beispielsweise in den aktiven Kollagen-sezernierenden Chondroblasten und Osteoblasten große Mengen an Cygb exprimiert, wohingegen in den reifen Chondrocyten und Osteocyten, die weitaus weniger Kollagen synthetisieren, Cygb signifikant schwächer exprimiert wird (Schmidt et al., 2004).

So wird auch die Fibrotisierung der Leber durch verstärkte Kollagenproduktion in aktivierten Sternzellen eingeleitet (Friedman, 2000; Gressner, 1996). Ferner wurde in Cytoglobin-überexprimierenden 3T3-Zellen nach Zugabe des Wachstumsfaktors TGF β eine gesteigerte Produktion des Kollagens $\alpha 1(I)$ im Vergleich zu Wildtyp-Zellen beobachtet (Nakatani et al., 2004). Aufgrund dieser Daten erscheint eine mögliche Rolle des Cytoglobins im Rahmen der Kollagensynthese naheliegend.

Bei der Synthese des Kollagens wird molekularer Sauerstoff zur Hydroxylierung des Prokollagens durch die Prolyl-4-Hydroxylase benötigt (Kivirikko and Pihlajaniemi, 1998; Myllyharju, 2003; Myllyharju and Kivirikko, 2004; Pihlajaniemi et al., 1991), wodurch die charakteristische Triple-Helix-Struktur der Kollagenfasern stabilisiert wird (Mizuno et al., 2003). Dabei ist der Grad der Hydroxylierung mit der Menge des verfügbaren Sauerstoffs gekoppelt (Yen et al., 1979). Cygb könnte also den Sauerstoff an die Prolyl-4-Hydroxylase liefern, um die Kollagensynthese unter hypoxischen Bedingungen zu gewährleisten. In Übereinstimmung hierzu wurde eine um den Faktor 2 bis 3 heraufregulierte Cytoglobin-Expression in Ratten Herz und Leber festgestellt, nachdem die Tiere für 22 bzw. 44 Stunden einer auf 9 % reduzierten Sauerstoffzufuhr ausgesetzt wurden (Schmidt et al., 2004). Die Expression des Cygbs könnte dabei über den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert sein, denn in der Gensequenz befinden sich mehrere entsprechende konservierte Bindestellen (HREs) (Wystub et al., 2004). Einen weiteren Hinweis auf die HIF-1-abhängige Expression von Cygb stellt die deutlich geringere Heraufregulation der Cygb-mRNA-Menge in hypoxischen heterozygoten HIF-1-knock out-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen dar (Fordel et al., 2004). Akute Hypoxie kennzeichnet Prozesse wie Osteogenese, Chondrogenese und Wundheilung

(Nakatani et al., 2004; Schipani et al., 2001; Tandara and Mustoe, 2004). Bekanntermaßen wird die Kollagensynthese unter diesen Bedingungen induziert (Agocha et al., 1997; Falanga et al., 1993; Horino et al., 2002). Auch die Expression der Prolyl-4-Hydroxylase wird unter O₂-Mangel sowohl auf mRNA- (Takahashi et al., 2000), als auch auf Proteinebene (Hofbauer et al., 2003) heraufreguliert. Eine direkte „Übergabe“ des O₂ an die Prolyl-4-Hydroxylase durch das Cytoglobin erscheint allerdings aufgrund der deutlich geringeren O₂-Affinität der P-4-H eher unwahrscheinlich (Hirsila et al., 2003).

4.3.1 Welche Nervenzellpopulationen im Gehirn exprimieren Cygb?

Cytoglobin konnte im Säugergehirn bereits in vorangegangenen Northern Blot und Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (Burmester et al., 2002; Schmidt et al., 2004; Trent and Hargrove, 2002). Die Expression des Cytoglobins in neuronalen Geweben wurde außerdem am Beispiel der Neuronen in der Ganglienzellschicht und der inneren nukleären Schicht der Retina (Schmidt et al., 2005) sowie in Nervenzellen des Plexus myentericus (Auerbach Plexus) im Darm (Schmidt et al., 2004) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von indirekten Antikörper-Immunfärbungen die Verteilung des Cygb-Proteins im murinen Gehirn systematisch untersucht. Die durchgeführten Immunfärbungen an Gehirnschnitten von Mäusen wurden mit drei unterschiedlichen Antikörpern, die gegen drei verschiedene Peptidregionen des Cygb-Proteins gerichtet waren, angefertigt und zeigten kontinuierlich deckungsgleiche Expressionsmuster des Cytoglobins im Maus-Gehirn. Zusätzlich zeigte der anti-Cygb-Antikörper von Geuens und Mitarbeitern in von mir selbst durchgeführten Experimenten eine identische Cygb-Verteilung. Diese unterschied sich deutlich von der bei Geuens et al. (2003) beschriebenen ubiquitären Verteilung des Cytoglobins in Zellkernen, aber nicht im Cytoplasma, der meisten Neurone. Unter Umständen lassen sich die Ergebnisse der Arbeitsgruppe aus Antwerpen auf methodisch bedingte Artefakte zurückführen.

Die spezifische Expression des Cytoglobins im Säugergehirn unterschied sich deutlich von der eher globalen Ngb-Verteilung. Distinkte Cygb-immunreaktive Zellpopulationen wurden in verschiedenen Gehirnbereichen detektiert. Die intensiven IF-Signale hoben sich deutlich vom Hintergrund ab und konnten sowohl im Soma als auch in Fortsätzen der Neurone identifiziert werden. Beispielsweise wurden im cerebralen Cortex gefärbte Neurone in allen Zellschichten (Laminae II-VI) gefunden, ihre Anzahl belief sich jedoch

auf weniger als zehn Prozent der gesamten dort vorhandenen Nervenzellen. Eine ähnliche Situation wurde im Striatum beobachtet, wo lediglich eine Subpopulation von Neuronen Cygb in großen Mengen exprimiert (Schmidt et al., 2004). Ähnlich intensive Signale wurden auch in den vereinzelt gefärbten Pyramidenzellen der Hippocampalformation und in den tegmentalaren Kernen im Bereich des Hirnstamms detektiert. Die Färbungen in anderen Gehirnbereichen, wie beispielsweise in den periglomerulären Zellen des Bulbus olfactorius oder im paraventricularen Nucleus (PVN) und der Eminentia mediana des Hypothalamus waren hingegen deutlich schwächer. Auch im Hirnstamm exprimierten manche Kerne, wie beispielsweise der *Nucleus olivaris superior* oder die sog. Raphekerne deutlich weniger Cytoglobin. Nicht nur die Signalintensitäten sondern auch die Morphologie der Cygb-exprimierenden Zellen variierte stark, was darauf hindeutet, dass unterschiedliche Neuronen-Typen Cytoglobin exprimierten.

Diese detaillierte Analyse der Cygb-Expression im Gehirn legt die Vermutung nahe, dass das Cygb in den distinkten Nervenzellpopulationen im Gehirn eine andere Funktion ausübt als in den Fibroblasten im Bindegewebe der inneren Organe. Gestützt wird diese Hypothese durch die Entdeckung von zwei paralogenen Cygb-Genen in Fischen, wovon eins überwiegend im Gehirn exprimiert wird (Fuchs et al., 2005).

4.3.2 Cygb-Protein im Cytoplasma und Zellkern von Neuronen

Während die rein cytoplasmatische Lokalisation des Neuroglobins unumstritten ist, lieferten die Cygb-Immunfärbungen teilweise überraschende Ergebnisse. Mehrere Studien, in denen die präferentielle Expression des Cytoglobins in Fibroblasten und ontogenetisch verwandten Zellen untersucht wurden, zeigten übereinstimmend eine rein cytoplasmatische Lokalisation des Proteins in diesen Geweben (Nakatani et al., 2004; Schmidt et al., 2004; Tateaki et al., 2004). Weiterhin ergaben bioinformatische Kalkulationen nach dem Reinhardts-Modell (Reinhardt and Hubbard, 1998) mit 94%iger Wahrscheinlichkeit, dass es sich beim Cytoglobin um ein cytoplasmatisches Protein handelt (Burmester et al., 2002; Kawada et al., 2001). Dieser Wert entspricht dem des Myoglobins, dessen Lokalisation im Cytoplasma von Muskelzellen unumstritten ist. Bis dato wurde kein Kernimportsignal in der Cygb-AS-Sequenz identifiziert. Überdies konnte in kultivierten Hela und Vero-Zellen, die mit einem Cygb-GFP-Vektorkonstrukt transfiziert wurden, kein gezielter Transport des Cygb-GFP-Fusionsproteins in die Zellkerne beobachtet werden (Schmidt et al., 2004).

Dagegen wurde in neuronalen Zellen das Cytoglobin sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern detektiert, während der Nucleolus sichtlich keine Färbung zeigte (diese Arbeit; Schmidt et al., 2004; Schmidt et al., 2005). Diese Proteinverteilung konnte durch Western Blot-Analysen (Abb. 3-23) und anhand von konfokalen Mikroskopieaufnahmen (Abb. 3-24) zweifelsfrei bestätigt werden. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes von 21 kDa wäre es prinzipiell möglich, dass Cygb in den Zellkern diffundiert, da normalerweise Moleküle mit einer Molekulargröße um 20 kDa die Zellkernporen ungehindert passieren können (Quadrini and Bieker, 2002). Zudem wurde beispielsweise für das Aktin nachgewiesen, dass es mit Hilfe entsprechender Bindeproteine zwischen Cytoplasma und Zellkern hin und her transportiert werden kann (De Ganck et al., 2005). Eine ähnlich vermittelte Translokation des Cytoglobins innerhalb von neuronalen Zellen wäre prinzipiell denkbar, jedoch ist bisher kein entsprechender Interaktionspartner für das Cytoglobin bekannt.

Die Lokalisation eines Globins im Zellkern ist dennoch keineswegs ein Ausnahmefall. Cianciarullo und Mitarbeiter (1999) zeigten anhand von Immunfärbungen die Lokalisation des Hämoglobins der Amphibienspezies *Odontophrynus americanus* und *Bufo ictericus* in den euchromatischen Regionen im Nucleus deren zellkernhaltiger Erythrocyten nach. Die Autoren haben zunächst angenommen, dass das vorwiegend cytoplasmatische Globin im Verlauf zahlreicher mitotischer Zellteilungen in den Zellkern eingeschlossen wurde. Eine Diffusion oder ein zielgerichteter Transport über die Zellkernmembran wurde aufgrund des hohen Molekulargewichtes des Hämoglobins ausgeschlossen.

Auch in kultivierten Alfalfa-Zellen wurde nach immunocytoologischer Markierung ein prädominant im Zellkern lokalisiertes Hämoglobin detektiert (Seregelyes et al., 2000). Es kommt nur zu einem geringen Teil cytoplasmatisch vor, obwohl die Proteinsequenz kein nukleäres Transportsignal aufweist. Auch hier könnte die Diffusion des Hämoglobins in den Zellkern aufgrund der geringen Molekulargröße von 18 kDa die treibende Kraft sein (Quadrini and Bieker, 2002). Aufgrund der Co-Lokalisation des Alfalfa-Hämoglobins (Mhb1) in den Nuklei der Elongationszellen mit einer in Maiswurzeln ansässigen NO-Synthase (Ribeiro et al., 1999) und der Tatsache, dass Häm als Substrat für dieses Enzym fungieren kann (Hausladen and Stamler, 1998), schlugen Seregelyes und Mitarbeiter (2000) eine mutmaßliche Rolle des kernlokalisierten Hämoglobins in der NO-Signaltransduktionskaskade vor. Inzwischen wurde zudem gezeigt, dass das Alfalfa-Hämoglobin, ähnlich wie das Gersten-Globin, in der Lage ist, schädliche Mengen NO unter Verwendung von NAD(P)H abzubauen (Seregelyes et al., 2004).

4.3.3 Funktionelle Bedeutung des Expressionsmusters von Cygb

Während die Ngb-Expression augenfällig mit den Orten besonders hoher oxidativer Stoffwechselraten korreliert, konnte für das Cytoglobin im Rahmen dieser Arbeit und auch in anderen Studien ein solcher Zusammenhang nicht beobachtet werden. Auch in der Retina wurde das Cytoglobin teilweise in anderen Zellschichten als das Neuroglobin detektiert. Andererseits wurden in der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht beide Globine detektiert, was ein Indiz für die unterschiedlichen Funktionen dieser Proteine sein könnte (Schmidt et al., 2005). Aufgrund der exklusiven Expression des Cytoglobins in distinkten Zelltypen erscheint eine allgemeine Funktion des Proteins als O₂-Speicher und -Transporter eher unwahrscheinlich. Stattdessen könnte Cytoglobin im Gehirn (wie zuvor in Fibroblasten postuliert) spezifische Enzyme mit Sauerstoff versorgen. Ein solches Enzym könnte beispielsweise die neuronale NO-Synthase sein, die ein ähnlich charakteristisches Expressionsmuster im Gehirn aufweist (Gotti et al., 2005). Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Co-Lokalisation des Cytoglobins mit der neuronalen NO-Synthase (nNOS) im Gehirn anhand von Doppelimmunfärbungen untersucht. Die Ergebnisse werden im nächsten Kapitel diskutiert.

Über die mögliche Funktion von Cytoglobin im Zellkern kann bisher nur spekuliert werden. Geuens et al. (2003) schlugen eine regulatorische Funktion des Cytoglobins analog zu anderen Häm-tragenden hexakoordinierten Sensorproteinen vor, die durch die Bindung von diatomaren Gasmolekülen wie NO, O₂ oder CO in der Lage sind, entsprechende Signaltransduktionswege zu aktivieren. Dazu gehört z.B. das O₂-Sensorprotein Dos in *E.coli* (Delgado-Nixon et al., 2000), der Transkriptionsfaktor CooA aus *Rhodospirillum rubrum* (Shelver et al., 1997) und die lösliche Form der Guanylcyclase („soluble guanyl cyclase“, sGC) (Burstyn et al., 1995). Im Dos-Protein ist die PAS-Sensordomäne kovalent an eine Phosphodiesterase-Domäne gebunden. CooA ist ein Homodimer, das aus einer Häm-enthaltenden regulatorischen Domäne und einem DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-Motiv besteht (Lanzilotta et al., 2000). Auf diese Weise regulieren das Dos-Protein die aerobe Atmung in *E.coli* und CooA, ein bakterieller CO-Sensor, die Transkription zweier Operons, die für ein CO-Oxidationssystem kodieren.

Weder eine enzymatische noch eine DNA-bindende Domäne ist im Cygb-Protein enthalten. Dennoch wäre es möglich, dass die charakteristischen Eigenschaften des Cytoglobins, wie die Hexakoordination, die redoxabhängige O₂-Affinität und die

intramolekularen Kavitäten einen Einfluss auf die Diffusion und die Bindung von Liganden im Molekül nehmen, der von der äußeren Umgebung abhängig ist. Dies würde bedingt für eine mögliche Funktion des Cytoglobins als Sensormolekül sprechen. Weiterhin könnten die N- und C-terminalen Verlängerungen des Proteins in bisher unbekannte Protein-Protein-Interaktionen involviert sein, die dem Cytoglobin eine Rolle als Sensorprotein in Signaltransduktionsketten oder in der Transkriptionsregulation gewähren würden.

4.3.4 Cygb und NO-Stoffwechsel im Maus-Gehirn: eine funktionelle Beziehung?

Die neuronale NO-Synthase (nNOS) spielt nicht nur bei zahlreichen physiologischen Funktionen im Gehirn, wie der Freisetzung von Neurotransmittern, der neuronalen Entwicklung, Regeneration, synaptischen Plastizität und Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle, sondern ist auch in eine Reihe von neurodegenerativen Prozessen involviert, die mit einer erhöhten NO-Produktion einhergehen (Yun et al., 1997).

Interessanterweise stimmt die Expression des Cytoglobins in den analysierten Regionen des Maus-Gehirns exakt mit der dortigen nNOS-Verteilung überein. Die Expression der nNOS in Cortex und Striatum eines gesunden Gehirns beschränkt sich vor allem auf wohldefinierte Interneurone in beiden Gehirnbereichen (Gotti et al., 2005). Hier konnte eine Co-Lokalisation des Enzyms mit Cytoglobin beobachtet werden. Am auffälligsten sind hier große multipolare Neurone, in denen sehr intensive Signale für nNOS und Cytoglobin detektiert wurden. Die Färbung war in den neuronalen Zellkörpern und ihren Fortsätzen sehr deutlich zu erkennen. Gleichwohl beschränkte sich die Lokalisation beider Proteine ausschließlich auf Neurone, in Gliazellen wurden keine entsprechenden Signale detektiert. Auch im medialen vestibulären Nucleus exprimierten große Nervenzellen mit langen Fortsätzen beachtliche Mengen Cytoglobin. Ebenso intensive Signale lieferte die nNOS-Immunfärbung in diesen Zellen. Ein Vergleich der von Gotti et al. (2005) beschriebenen nNOS-Verteilung im Maus-Gehirn mit dem im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Cygb-Expressionsmuster zeigte, dass beide Proteine in zahlreichen weiteren Hirnstrukturen, wie beispielsweise im Hypothalamus, den lateralen Habenularkernen sowie zahlreichen Kerngebieten im Bereich des Hirnstamms exprimiert werden. Ob es sich dabei auch tatsächlich um dieselben Zellen handelt muss allerdings noch nachgeprüft werden. Ein weiteres Charakteristikum beider Proteine ist ihre Abwesenheit in den

Purkinje-Zellen des Kleinhirns. Überdies variiert sowohl die Morphologie als auch die Signalintensitäten der NOS-exprimierenden Zellen, ähnlich wie beim Cytoglobin beobachtet (Gotti et al., 2005).

Eine weitere mögliche Parallele ist die Lokalisation beider Proteine im Zellkern. So wurde anhand von Western Blot-Analysen an Gehirnpoteinextrakten die nNOS zwar überwiegend in der Cytoplasma- gleichzeitig aber auch in der Zellkernfraktion detektiert (Riefler and Firestein, 2001). Die Lokalisation der NO-Synthesen in Zellkernen von Adipozyten und Neutrophilen wurde außerdem bereits beschrieben (Giordano et al., 2002; Saini et al., 2006). Darüberhinaus scheint die Expression des Cytoglobins in Neuronen des periphären Nervensystems (Schmidt et al., 2004) mit der dort ebenfalls anwesenden nNOS zu korrelieren (Kavdia and Popel, 2004).

Verschiedene Varianten der möglichen NO-abhängigen Funktionen von Cytoglobin sind vorstellbar. Zum einen könnte das Cytoglobin in neuronalen Zellen, analog der postulierten Cygb-Funktion in Fibroblasten, als Sauerstofflieferant für die nNOS fungieren. Andererseits könnte das Cytoglobin als NO-Dioxygenase ähnlich zum Myoglobin schädliche Mengen NO in Nitrit umwandeln. Auch eine Beteiligung des Cytoglobins an der Entgiftung von ROS, z.B. Peroxynitrit wäre denkbar. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Expression der nNOS im zentralen und peripheren NS sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene heraufreguliert (Prabhakar et al., 1996; Ward et al., 2005), was mit einer verstärkten Bildung von NO einhergeht. In Übereinstimmung dazu wurde auch ein 2 bis 3facher Anstieg der Cygb-Expression im Maus-Gehirn infolge von Hypoxie verzeichnet (Fordel et al., 2004). Einerseits könnte das Cytoglobin auf diese Weise den erhöhten Sauerstoffbedarf zur NO-Produktion saturieren, andererseits könnte eine größere Menge Cygb zur adäquaten Entgiftung von NO und Peroxynitrit unter diesen Umständen erforderlich sein, um den Schutz der Zellen zu gewährleisten. Allerdings konnte eine entsprechende Regulation des Cytoglobins im Gehirn von Schmidt et al. (Schmidt et al., 2004) nicht bestätigt werden.

4.4 Analyse der Sequenzevolution von Neuroglobin

Für die eingehende Erforschung der Funktion unbekannter Gene ist die Kenntnis der möglichen transkriptionellen Regulationsmechanismen von enormer Bedeutung. Die Identifizierung putativer regulatorischer Elemente in Gensequenzen ist dabei essentiell für weitere Studien wie z.B. der Generierung von transgenen und knock-out-Mäusen. Die Ermittlung funktionell relevanter Genregionen anhand der Sequenzkonservierung zwischen verschiedenen Spezies stellt ein etabliertes *in silico*-Verfahren dar, das sowohl für die Vorhersagen neuer Gene und Genstrukturen (Guigo et al., 2003) als auch zur Detektion regulatorischer Gensequenzen (Hardison et al., 1997; Loots et al., 2000; Oeltjen et al., 1997; Wasserman et al., 2000) erfolgreich angewendet wird. Prinzipiell geht man davon aus, dass der Grad an Konservierung von Sequenzen mit deren funktioneller Bedeutung korreliert (Ellsworth et al., 2000; Hardison, 2000; Hardison et al., 1997). Eine Vielzahl von Studien bestätigt die Konservierung wichtiger genregulatorischer Abschnitte in verschiedenen Säugerspezies (Loots et al., 2000). Außerdem wurde die Konservierung regulatorischer Elemente sogar zwischen Säugern und weiter entfernten Vertebraten, wie Huhn und Fisch beschrieben (Abrahams et al., 2002; Aparicio et al., 1995; Gottgens et al., 2002; Santini et al., 2003).

Die komparative Sequenzanalyse der Neuroglobin-Genregion wurde aus diesem Grund taxaübergreifend durchgeführt und umfasste sowohl Säuger als auch Fische. Die humane Neuroglobin-Genregion wurde dabei primär mit den orthologen Genabschnitten aus Maus und Ratte verglichen. Des Weiteren wurden die Ngb-Gensequenzen aus dem Zebrafisch *D. rerio* und den Pufferfischen *T. nigroviridis* und *F. rubripes* mit einbezogen. Die Übereinstimmungen in den Ngb-Gensequenzen der Säuger und der Fische beschränkten sich allerdings nur auf die kodierenden Regionen. Darüber hinaus konnten keine bei allen Vertebraten konservierten nicht-kodierenden Sequenzabschnitte detektiert werden.

Ein Vergleich der Nukleotid-Substitutionsraten in den kodierenden Sequenzen der Hämo-, Myo- und Neuroglobine in Säugern und Fischen ist in der Tabelle 4-3 zusammengefasst. Die errechneten Raten der synonymen (ds) und nicht-synonymen (dn) Nukleotidaustausche für die α - und β -Hämoglobinketten sowie für das Myoglobin stimmen dabei sehr gut mit den Literaturwerten überein (Li, 1997). Im Vergleich dazu sind die entsprechenden Evolutionsraten für das Neuroglobin signifikant geringer und betragen lediglich einen Drittel der Austauschraten der orthologen Hämo- und Myoglobine. Die Aminosäuresequenz-Identität der Neuroglobine aus Maus und

Mensch beträgt 94 % und übersteigt deutlich die Konservierung der Häm- und Myoglobine, deren Aminosäuresequenzen zwischen 77 und 85 % identisch sind. Damit liegt die Aminosäure-Übereinstimmung im Neuroglobin deutlich oberhalb des von Waterston et al. (2002) beschriebenen Durchschnittswertes von 78,5 %, der anhand von 12845 verglichenen orthologen Genen aus Mensch und Maus ermittelt wurde. Die geringere Evolutionsrate des Neuroglobins lässt sich ausschließlich auf die deutlich reduzierte Anzahl der nicht-synonymen Substitutionen zurückführen, denn die synonymen Substitutionsraten unterscheiden sich nicht signifikant von denen anderer Globine.

Globine		Substitutionsrate ($\times 10^{-9}$)			
		Aminosäuren	dn	ds	ds/dn
Hämoglobin α	Säuger	1.03 $\pm$ 0.36	0.55 $\pm$ 0.11	4.61 $\pm$ 0.18	8.71
	Fische	4.02	2.13	6.00	2.84
Hämoglobin β	Säuger	1.17 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.04	2.47 $\pm$ 0.04	3.76
	Fische	2.12	1.29	4.95	3.86
Myoglobin	Säuger	0.97 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.00	3.51 $\pm$ 0.01	7.29
	Fische	1.55 $\pm$ 0.06	0.75	5.25	7.00
Neuroglobin	Säuger	0.32 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.00	3.02 $\pm$ 0.44	19.44
	Fische	0.95 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.00	9.69 $\pm$ 1.09	21.33

Tabelle 4-3 AS- und Nukleotidsubstitutionen in Vertebratenglobinen. Für die Vergleiche zwischen Säugern wurden humane und murine (meistens Maus) Sequenzen verwendet. Für die Evolution in Fischen wurden entsprechende Sequenzen aus Zebrafisch (*D. rerio*) und zwei Pufferfischen (*T. nigroviridis*, *F. rubripes*) analysiert. Die Divergenz zwischen Mensch und Nagern (Maus/Ratte) wurde auf 96 Mio. Jahre und zwischen Zebrafisch und den Pufferfischen auf 120 Mio. Jahre festgelegt. Soweit möglich wurden Standardfehler mit angegeben. Die Evolution der Aminosäuren wurde anhand einer modellierten PAM-Matrix berechnet (Dayhoff et al., 1978). Die korrigierten Werte für die nicht-synonymen (dn) und synonymen (ds) Nukleotidaustausche wurden nach der Methode von Ota and Nei (1994) berechnet und sind als Änderungen pro Kodonposition pro Jahr angegeben.

Der Quotient von synonymen zu nicht-synonymen Nukleotidaustauschen (ds/dn) liegt im Neuroglobin der Säuger bei 19,44 und somit weit oberhalb von 4,7, einem Durchschnittswert, der aus einem Vergleich von 47 menschlichen und murinen proteinkodierenden Gensequenzen errechnet wurde (Li, 1997). Dies deutet darauf hin, dass das Neuroglobin während der divergenten Evolution in Säugern einer starken „reinigenden“ Selektion unterworfen war (Graur and Li, 2000; Kimura, 1980). Analog beschrieben Waterston et al. (2002) die Kehrwerte (dn/ds) mit 0,115 im

Durchschnitt, wobei Ngb auch hier mit 0,05 deutlich oberhalb liegt und ebenfalls in die Kategorie der Gene, die einer stark „reinigenden“ Selektion unterworfen waren, fällt. Das ist ein Hinweis darauf, dass das Neuroglobin eine sehr wichtige Funktion im tierischen Metabolismus ausübt, für die in der Regel die Konservierung ganzer Proteindomänen nötig ist. Für die O₂-Bindung müssen lediglich einige wichtige Schlüsselpositionen im Protein konserviert sein (Wilson et al., 1977), weshalb wohl die meisten Austausche an der Oberfläche der Häm- und Myoglobine akzeptiert werden (Dickerson and Geis, 1983). Die deutlich geringere Anzahl der AS-Austausche im Neuroglobin könnte folglich auf eine funktionelle Relevanz der gesamten Proteinstruktur hinweisen. Möglicherweise ist sie für den komplizierten Vorgang der Sauerstoffbindung, wie er für hexakoordinierte Hämproteine charakteristisch ist, von Bedeutung oder an bisher unbekannten Protein-Protein Interaktionen des Neuroglobins beteiligt.

Sowohl die AS-Austausche als auch die Nukleotidsubstitutionen in den Globinen der Fische zeugen von einer circa doppelt so schnellen Evolution im Vergleich zu den orthologen Globingenen der Säuger. Diese Ergebnisse stimmen gut mit der hypothetischen Verlangsamung der molekularen Uhr in Säugern überein (Ayala, 1997). Andererseits wäre es möglich, dass die für die Berechnungen im Rahmen dieser Arbeit eingerechnete Divergenzzeit zwischen dem Zebrafisch und den Pufferfischen von ca. 120 Mio. Jahren (Benton, 1990; Wittbrodt et al., 2002) zu kurz gewählt wurde und eigentlich bei 256-312 Mio. Jahren hätte angesiedelt werden müssen (Thomas and Touchman, 2002). Ein früher gesetzter Zeitpunkt der Divergenz würde die Substitutionsraten in Fischen entsprechend herabsetzen.

4.4.1 Konservierte regulatorische Elemente im Ngb-Gen und deren mögliche funktionelle Bedeutung

Nach Loots et al. (2000) findet man genregulatorische Sequenzen bevorzugt in konservierten nicht-kodierenden Regionen, die auf einem mind. 100 bp langem Abschnitt mehr als 70 % Übereinstimmung zwischen Mensch und Maus aufweisen. In der Ngb-Genregion konnten allerdings keine konservierten Abschnitte von entsprechender Länge detektiert werden, was die allgemeine Gültigkeit der von Loots et al. (2000) aufgestellten Kriterien in Frage stellt. Anhand dieser Kriterien wurden im α -Globin Genclusters zwar zwei potentiell funktionelle Bereiche identifiziert, diese enthielten jedoch keines der bis dahin charakterisierten regulatorischen Elemente (Flint

et al., 2001). Dies veranlasste die Autoren schließlich zur genaueren Untersuchung auch kürzerer konservierter Sequenzabschnitte in dieser Region. Aus diesem Grund wurden für unsere Analysen alle zwischen Mensch und Maus konservierten nicht-kodierenden Sequenzen im Bereich des Neuroglobins, bis hin zu den flankierenden Genen POMT2 und DKFZp43P011 (DUF221) in Betracht gezogen, auch wenn sie mit maximalen Ausdehnungen von 50 bp vergleichsweise kurz waren. Die dort identifizierten putativ regulatorischen Elemente werden in den folgenden zwei Abschnitten näher charakterisiert. Darüber hinaus führte der Interspeziesvergleich zur Identifizierung einer relativ gut konservierten Region von ca. 500 bp im 5'-Bereich des NGB/Ngb-Gens, die wahrscheinlich den minimalen Promotor darstellt. In diesem Bereich wurden außerdem anhand der PIP-Analysen (Abb. 3-1) sog. CpG-Inseln identifiziert. Bei den CpG-Inseln handelt es sich um nicht-methylierte, mehrere hundert Basenpaare lange Sequenzbereiche im Säugergenom, die einen hohen Anteil an CpG-Dinukleotiden und damit einen überdurchschnittlich hohen GC-Gehalt von mindestens 60 % aufweisen (Bird et al., 1987). CpG-Inseln sind oft mit Promotorregionen differentiell exprimierter Gene in Eukaryoten assoziiert und könnten als Angriffspunkte für Cytosin-Methylierung eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Gene spielen.

4.4.2 Mögliches Signal für eine neuronenspezifische Expression von Ngb

Im Gegensatz zu den Nervenglobinen der Invertebraten, die meistens in hohen Konzentrationen in Gliazellen exprimiert werden (Wittenberg et al., 1965), wurde das Neuroglobin im Nervensystem der Vertebraten ausschließlich im Cytoplasma von Neuronen detektiert (Laufs et al., 2004; Sun et al., 2001; Wystub et al., 2003; Zhang et al., 2002). Um diese zelltypspezifische Expression erklären zu können, wurde im Rahmen der vergleichenden Sequenzanalyse die Suche nach einem potentiell verantwortlichen DNA-Motiv durchgeführt. Das NRSE („*neuron-restrictive silencer element*“) vermittelt eine vorwiegend neuronenspezifische Expression einiger Säugergene (Schoenherr et al., 1996). Es handelt sich dabei um ein 21 bp langes Sequenzmotiv, das entweder 5'-aufwärts, 3'-abwärts oder auch in Intron- und Exon-Bereichen dieser Gene lokalisiert und in beiden Orientierungen funktionell sein kann (Schoenherr and Anderson, 1995; Thiel et al., 1998). Das passende Bindeprotein NRSF („*neuron-restrictive silencer factor*“) wird fast ausschließlich in nicht-neuronalen Zellen gebildet, bindet dort an die Erkennungssequenz und inhibiert auf diese Weise

die Expression von NRSE-haltigen Genen (Schoenherr et al., 1996; Shimojo et al., 2001). Insgesamt 36 aus der Literatur bekannte NRSE-Motive (Lietz et al., 2003; Schoch et al., 1996; Schoenherr et al., 1996) wurden im Rahmen dieser Arbeit zu einer sog. „*positional frequency matrix*“ (PFM) zusammengestellt (Abb. 4-1B). Das Online-Programm MSCAN wandelt die PFM in eine „*positional weight matrix*“ (PWM) um und veranschaulicht die darin enthaltene Information in Form eines Sequenzlogos (Abb. 4-1A). Mit Hilfe der PWM durchsuchte das Programm die genomischen Mensch- und Maus-Ngb-Sequenzen.

Ein geeignetes Motiv mit einer sehr guten Übereinstimmung konnte dabei in der humanen Sequenz 5'aufwärts des Ngb-Gens identifiziert werden (Abb. 4-1C). Das entsprechende Motiv im korrespondierenden Maus-Sequenzabschnitt zeigte hingegen eine relativ geringe Übereinstimmung und konnte mit dem verwendeten Suchalgorithmus nicht identifiziert werden. Experimentelle Daten bestätigen jedoch die Funktionalität einer ähnlich schwach konservierten NRSF-Bindestelle im Vassopressin-Gen (Coulson et al., 1999). Daneben konnte ein konserviertes NRSE-Motiv im Bereich des zweiten Exons in der Neuroglobin-Sequenz von Mensch und Maus detektiert werden, allerdings ist hier die Übereinstimmung zur verwendeten Matrix etwa 100mal geringer als beim ersten, in der humanen Sequenz identifizierten Motiv. Diese NRSE-ähnlichen Sequenzen im Neuroglobingen könnten die Expression des Proteins in nicht-neuronalen Geweben durch die Bindung des NRSF-Proteins inhibieren. Inwiefern sie jedoch funktionell sind und ob sie für die Regulation der Ngb-Expression *in vivo* relevant sind, muss anhand von entsprechenden experimentellen Analysen verifiziert werden.

Es ist bekannt, dass das NRSF teilweise auch in neuronalen Zellen gebildet wird und dort ebenfalls die Transkription NRSE-haltiger Gene inhibieren kann, wie das z.B. beim Gen des „*type II sodium channel*“ (Nall) in reifen peripheren Neuronen der Fall ist (Chong et al., 1995). Daneben wurden durch Datenbanksuchen NRSE-Sequenzmotive auch in nicht-neuronalen Gensequenzen identifiziert wie z.B. im Cytochrom P₄₅₀-11 β - und Aktin-Gen, was die Vermutung nahe legt, dass NRSF nicht ausschließlich die Expression neuronaler Gene reguliert, sondern auch eine Funktion bei der Regulation nicht-neuronaler Gene erfüllt (Garcia-Sanchez et al., 2003; Schoenherr et al., 1996). Daneben wurde auch in nicht-neuronalen Geweben teilweise kein NRSF-Protein nachgewiesen, z.B. in manchen Gliazelltypen und in embryonalem Herz- und Lebergewebe (Schoenherr and Anderson, 1995). Darüber hinaus wurde die Rolle des REST/NRSF-Systems in der Genexpression von Tumorzellen mehrmals beschrieben (Coulson et al., 2000; Lawinger et al., 2000; Palm et al., 1999).

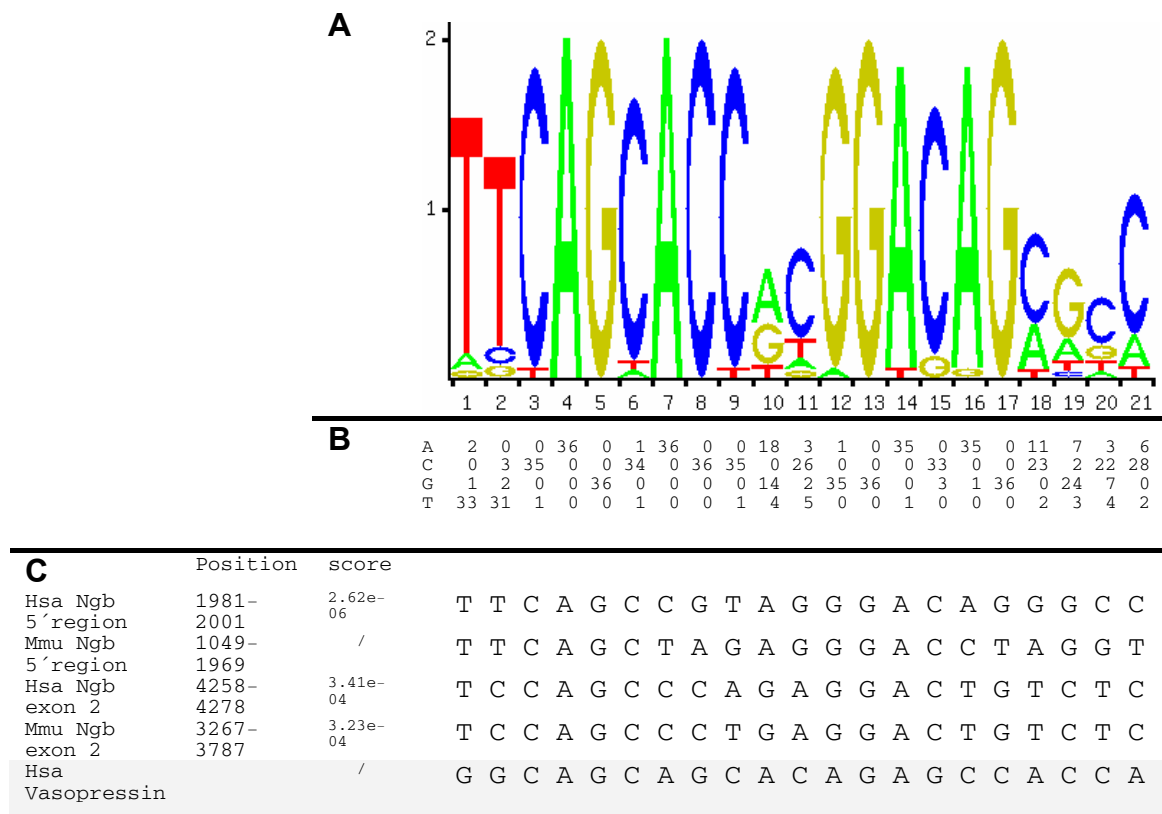


Abbildung 4-1 Quantitative Darstellung des NRSE Sequenz-Motivs (A), das aus der in (B) abgebildeten Positionsfrequenz-Matrix („position weight matrix“) mit Hilfe der www-Programmooption MSCAN abgeleitet wurde. MSCAN identifizierte putative NRSE-Motive in der humanen (Hsa) und Maus- (Mmu) Ngb-Sequenz mit den angegebenen Wahrscheinlichkeiten. Ein aberrantes, aber funktionelles NRSE-Motiv aus dem Vassopressin-Gen ist zum Vergleich mit aufgeführt (C).

Der oben beschriebene Mechanismus der negativen Kontrolle und somit einer neuronenspezifischen Expression bestimmter Gene stellt nur einen Teil einer komplexen Regulationsmaschinerie dar, die eine gewebespezifische Verteilung von Proteinen vermittelt. In der neuronalen Genexpression spielen auch aktivierende Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle (He and Rosenfeld, 1991). Die enorme Diversität der zelltypspezifischen Expressionsmuster im Gehirn resultiert folglich aus dem Zusammenspiel von zahlreichen positiv- und negativ-agierenden Faktoren (Struhl, 1991)). Das NRSE/NRSF-System kann in eine solche Regulation involviert sein, ist dafür aber nicht zwingend erforderlich.

Würde das NRSE allerdings eine Rolle bei der Regulation der Ngb-Expression in Neuronen spielen, wäre die zusätzliche Expression des Ngb-Proteins in endokrinen Geweben nicht ungewöhnlich, denn auch das primär in Neuronen lokalisierte Synaptophysin wird in neuroendokrinen Zellen exprimiert (Navone et al., 1986).

Synaptophysin wird zusätzlich wie Ngb global im Gehirn exprimiert. Es enthält eine funktionelle konservierte NRSE-Erkennungssequenz innerhalb des ersten Introns in der Mensch- und Maus-Gensequenz (Schoenherr et al., 1996). Auf ähnliche Weise ist der durch das NRSE/NRSF-System kontrollierte Transkriptionsfaktor *P-Lim* in die Regulation der Genexpression in der Hypophyse (Pit) involviert (Schoenherr et al., 1996).

4.4.3 Wird Neuroglobin durch HIF-1 reguliert?

Eine Unterversorgung mit Sauerstoff infolge von Hypoxie oder Ischämie induziert eine Vielzahl von adaptiven Zellantworten. So werden beispielsweise Gene stimuliert, die den glykolytischen Stoffwechsel (Graven et al., 1999; Graven et al., 1993; Greijer et al., 2005; Lu et al., 2002; Semenza et al., 1996), die Vaskularisierung (Goldberg and Schneider, 1994; Levy et al., 1995; Levy et al., 1997) sowie die Produktion von roten Blutzellen steigern (Goldberg et al., 1991; Ratcliffe et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor „*hypoxia inducible factor*“ HIF-1 wurde ursprünglich als der kritische Faktor bei der durch hypoxischen Stress ausgelösten Expressionssteigerung von Erythropoietin (EPO) entdeckt (Wang et al., 1995). Inzwischen ist klar, dass die Induktion der meisten hypoxieregulierten Gene durch HIF-1 vermittelt wird (Ratcliffe et al., 1998; Semenza, 2000; Semenza, 2001; Wenger, 2002). Anhand von Microarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass die hypoxieabhängige Heraufregulation von 40 aus 45 detektierten Genen (ca. 89%) durch HIF-1 vermittelt werde (Greijer et al., 2005). Das funktionelle HIF-1 ist ein Heterodimer aus zwei basischen Helix-Loop-Helix-PAS-Proteinen, zum einen aus der hypoxieregulierten Untereinheit HIF-1 α und einer O₂-unabhängigen Untereinheit HIF-1 β , auch unter dem Namen ARNT („*aryl hydrocarbon receptor translocator*“) bekannt (Semenza, 2000; Semenza, 2001). Unter normoxischen Bedingungen wird die konstitutiv transkribierte HIF-1 α -Untereinheit schnell degradiert (Yu et al., 1998). Dieser Abbau wird unter hypoxischen Bedingungen inhibiert und HIF-1 α wandert in den Zellkern. Dort lagert es sich mit der HIF-1 β -Untereinheit zum vollständigen HIF-1 Protein zusammen, das an konservierte DNA-Erkennungssequenzen entsprechender hypoxieregulierter Gene bindet (Wenger, 2002). Durch die Bindung des HIF-1 wird meistens eine drastisch gesteigerte Transkription dieser Gene initiiert. Die *cis*-Bindedomänen für HIF-1 sind gut definiert (Camenisch et al., 2001; Semenza et al., 1996) und bestehen aus mindestens zwei „*hypoxia responsive element*“ (HRE) „*core*“-Erkennungssequenzen (Camenisch et al.,

2001) oder alternativ aus einer HRE- und einer zweiten Hilfssequenz (z.B. EPO-Box, (Semenza and Wang, 1992) oder „*HIF ancillary sequence*“ HAS, (Kimura et al., 2001), die innerhalb eines Abschnitts von ca. 50 bp, in der gleichen oder invertierten Orientierung angeordnet sein können (Tab. 3-2). Solche kombinierten HREs sind meistens in den 5'-Regionen von hypoxieregulierten Genen zu finden, können aber auch in den 3'-UTRs lokalisiert sein, wie das beim Epo-Gen der Fall ist (Ebert and Bunn, 1999).

Die Funktion des Neuroglobins im O₂-Metabolismus könnte mit einer sauerstoffabhängigen Regulation der Genexpression einhergehen. Aus diesem Grund lag das besondere Augenmerk der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Promotoranalysen auf der Identifizierung von *cis*-regulatorischen „*hypoxia responsive elements*“ (HREs) in der Ngb-Gensequenz. Im Prinzip sollten die zwischen Mensch und Maus konservierten Bindestellen herausselektiert werden, da es sich dabei um die mit höchster Wahrscheinlichkeit funktionellen DNA-Bindemotive handeln sollte. Um diesen analytischen Ansatz zu überprüfen wurden aus der Literatur bekannte funktionelle Motive herangezogen. Mit der angewendeten Methode konnte bestätigt werden, dass in etlichen hypoxieregulierten Genen die experimentell abgesicherten Bindestellen in der Tat interspezifische Konservierung aufzeigen, während die nicht konservierten auch nicht funktionell waren.

In der Neuroglobin-Genregion konnten im Rahmen dieser Analysen keine konservierten HRE's identifiziert werden. Aus diesem Grund erscheint eine hypoxie-abhängige Regulation der Ngb-Genexpression eher unwahrscheinlich. Dennoch wäre es theoretisch möglich, dass auch in Abwesenheit konservierter HREs, einzelne, nicht-konservierte HIF-core Elemente an unterschiedlichen Positionen im Mensch- und Maus-Ngb-Genpromotor mit *cis*-Elementen anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NFκB, und NF-1 interagieren und eine Hypoxie-Antwort vermitteln könnten. Eine stimulierende Interaktion zwischen AP-1, NF-1 und HIF-1 wurde bereits für das hypoxieregulierte Endothelin-1-Gen beschrieben (Yamashita et al., 2001). Sowohl AP-1 als auch NFκB werden zudem bei Hypoxie aktiviert (Glasgow et al., 2001; Lutz et al., 2003; Michiels et al., 2001; Minet et al., 2001; Salnikow et al., 2002). Entsprechende Bindestellen konnten im konservierten putativen Promotorbereich der Ngb-Gensequenz identifiziert werden (Abb. 4-2A). Zusätzlich könnten die detektierten konservierten hypoxieinduzierbaren mRNA-Stabilisierungssequenzen („*hypoxia-inducible protein binding site*“, HIPBS) im 3'UTR des Neuroglobins (Abb. 4-2B) in den Anstieg der Proteinmenge durch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen involviert sein.

181

B

```

Hsa4370 AGGCCATGAGTCGAGGCTGGGATGGCGAGTAAGAGGCGACCCCGCCCGGC
      |:|||||:|||||:|||||:|||||:|:| | | :-----
Mmu3818 AAGCCATGAGCCGAGGCTGGGATGGGGAGTAAGAGACGAGCCAGT

4420 AGCCCCATCCATCTGTGTCTGTCTGTTGGCCTGTATCTGTTGTAGCCCA
      -|||||:|:|:| | | | | | | | | | | :||| |--:| | | | | | :|:
3863  GCCCTATCTATGTGTGTCTGTCTGTTGATCTG  CCTGTTGTAGTCTT
      HIPBS →

4470 GG      CTCCCCAAGCTTCCCTGCATCTTGGTCCTTGTCCCCTTGGCCA
      :|-----|:| | | :|:|:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3910 AGCCTCTCCCCCAGGGTCTCTCTATACCTTGGTCCTCATCCCCTTGGCCA
      HIPBS →

4515 CACTGGAGAGGTGATGGGGCAGGGCTGGGTCTCAGTATCCTAGAGTCCAG
      : | |:|||||:| | | | | | | | | | | :|:-----| :| | |
3960 TCCTAGAGAGGTGATGGGAGAGGGCTCTGTCTCAGCTTCT      GGTCAG

4565 CTGCAGAAGGAGTGGCTTTTCCCTCCAGGAAGGGGCTTCTGGGTGTCCCCT
      | | | | | -:|:|:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4006 CTGCAG GGAGGTGGATTTC      TTCCCT
      HIPBS →

4615 CATCCCCAGTAGCCTCTTTCTTGCGTTTCTTTTACCTT
      | | | | | | | -| | | : : : | :| | :| :| | | | | :
4032 CATCCCCA TAGATGTCCTGCTGCATGCCTGGTTAGCTC ...

5363 A CCCCAGCCATCTGCACTTGTACCATTGCTCTGTGCTGACTGTGGTCC
      | -| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4652 ATCCCCAGCCACCCACACTTT      CTGCTCTGTG      CTGTGGCTC

5412 TATAAATTCATGAGAAATAAACTGGTTCTGTGCCTCTCTGACCCT CG
      | | | | | :| | | :| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4693 TATAAACTCACAAGAAATAAACATGTTCTGTGTG      CTGACCCTCCA
      NM_021257 ↘
      NM-022414 ↗

```

Abbildung 4-2 Lokale Sequenzalignments der 5'- (A) und 3'-UTR (B) des Ngb-Gens in Mensch und Maus. Die Identität der beiden Sequenzen liegt im 5'-Bereich bei ca. 69 % (A) und im 3'-UTR bei ca. 56 % (B). Mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind mit Pfeilen eingezeichnet. Dabei stellen die dicken Pfeile die zwischen Mensch und Maus konservierten Sequenzmotive dar. Es konnten keine konservierten HIF-1-Bindestellen identifiziert werden, aber es befinden sich konservierte HIPBS im 3'-UTR. Darüber hinaus findet man eine Reihe von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die bei der Regulation bekannter Hypoxie-induzierter Gene eine Rolle spielen, wie z.B. AP-1, Sp1 (GC-Boxen) und NF6B. (Bildquelle: Wystub et al. 2004)

Bisherige Hypoxie-Experimente für Ngb lieferten kontroverse Ergebnisse (zur Übersicht siehe Tabelle 4-4) Zunächst wurde in kortikaler und hippocampaler Zellkultur eine Heraufregulation des Ngbs nach 24 h Hypoxie/Reperfusion und bei Zugabe von Chemikalien (CoCl_2 und Dfx), die die Expression hypoxieregulierter Gene beeinflussen, um den Faktor 2,4 beobachtet (Sun et al., 2001).

Im Gegensatz dazu war infolge chronischer Hypoxie (10 % O_2) nach 3 Tagen bzw. einer und zwei Wochen keine gesteigerte Ngb-mRNA-Expression in Maus-Gehirnen zu verzeichnen (Mammen et al., 2002). In teilweiser Übereinstimmung hierzu zeigten Hypoxieversuche an Ratten einen signifikanten ca. 2fachen Anstieg sowohl der Ngb-mRNA als auch der Proteinmenge im cerebralen Cortex nach nur einem bis drei Tagen, während nach sieben bzw. vierzehn Tagen keine weitere Zunahme der Ngb-Expression, sondern vielmehr ein Rückgang in Richtung Ausgangsmenge zu verzeichnen war (Li et al., 2006).

Diese Beobachtungen legten zunächst die Vermutung nahe, dass Ngb primär in die akute Hypoxie-Antwort involviert sei, was jedoch nicht mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe übereinstimmt. So konnten Gerlach et al. (in Vorbereitung) nach 3-5 h, 9-10 h, 22 und 44 h Hypoxie (6 % O_2) keine signifikante Heraufregulation des Neuroglobins in Rattengehirnen beobachten. Vielmehr war nach ca. 10-22 h eine Herunterregulation der Ngb-Expression um etwa die Hälfte zu verzeichnen. Interessanterweise konnte für das Myoglobin im Nackenmuskel der Ratten in parallel durchgeführten Untersuchungen ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Auch das Myoglobin wurde nach akuter Hypoxie (10-22 h; 6 % O_2) etwa um den Faktor 2 herunterreguliert. Dieser Befund passt gut zu den Resultaten unserer Promotor-Analysen, in denen auch im Myoglobin-Genabschnitt keine konservierten HREs identifiziert werden konnten (Wystub et al., 2004).

In Übereinstimmung mit unseren Daten konnten Fordel et al. (2004) ebenfalls keine signifikante Heraufregulation der Ngb-mRNA-Expression nachweisen, weder in HN33-Zellkulturen, die für 2, 4, 8, 16, 24, 48 und 56 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden (1 % O_2), noch in Gehirnen von Mäusen, die für 48 Stunden unter Hypoxie (7 % oder 12 % O_2) gehalten wurden.

Ferner konnten Schmidt-Kastner et al. (2006) anhand von *in situ*-Hybridisierungen ebenfalls keine signifikante Steigerung in der Ngb-mRNA-Menge im Rattengehirn infolge von Ischämie nachweisen, während die Expression der Kontrollgene Vegf und Glut1 deutlich erhöht war. Dabei wurde insbesondere der Hippocampus, als die am wenigsten hypoxieresistente Hirnregion (Schmidt-Kastner and Freund, 1991), in Augenschein genommen. Im Gegensatz dazu war die Ngb-Expression in Zellkultur

(PC12 und HN33) nach 24 Stunden Hypoxie signifikant erhöht, mit Maximalwerten um den Faktor 2,3, wie sie von Sun et al. (2003) bereits beschrieben wurden.

Im Rahmen einer anderen Studie wurden nach künstlich erzeugtem Schlaganfall die Gehirne von 46 mongolischen Rennmäusen mit Hilfe von Antikörper-Immunfärbungen analysiert (Shang et al., 2006). Konform mit der o.g. Veröffentlichung wurde beobachtet, dass die Ngb-Expression im Hippocampus nach 16 und 24 h Reperfusion abnahm, während andererseits im Cortex eine signifikante Zunahme der Ngb-Immunfärbung beschrieben wurde. Die Autoren brachten die erhöhte Ngb-Expression in Zusammenhang mit der höheren Toleranz der kortikalen Neurone gegenüber ischämischen Schäden.

Weiterhin untersuchten Hundahl et al. (2005) anhand von Antikörper-Immunfärbungen und quantitativen Realtime RT-PCR-Analysen die Ngb-Expression in Gehirn und Retina von Mäusen, die einer zweistündigen Hypoxie (7,6 % O₂) ausgesetzt wurden. Auch hier konnte keine signifikante Heraufregulation des Neuroglobins als Antwort auf die akut verminderte Sauerstoffzufuhr nachgewiesen werden. Tendenziell war auch hier anhand der veröffentlichten Daten eher ein Rückgang der Ngb-mRNA-Menge zu verzeichnen. Um eine mögliche neuroprotektive Rolle des Neuroglobins nach Ischämie/Reperfusion zu bestätigen, analysierten Hundahl et al. (2006), ebenfalls mit Hilfe von Realtime Q-PCR und Immunohistochemie die Gehirne von Ratten nach einem künstlich beigeführtem Schlaganfall. Dabei wurde ein signifikanter Rückgang in der Ngb-mRNA-Menge nach 24 Stunden Ischämie/Reperfusion gemessen und eine starke Verminderung in der Anzahl der Ngb-exprimierenden Neurone nach 1 Woche verzeichnet. Diese Ergebnisse zusammen mit der Beobachtung, dass die Verteilung des Ngb-Proteins im Gehirn sowohl in ischämischen als auch in nicht-ischämischen Hirnbereichen gleich war, stellen eine adaptive Schutzfunktion des Neuroglobins nach Ischämie/Reperfusion in Frage.

Die Mehrheit der bisher experimentell erhobenen Daten spricht also gegen eine Heraufregulation der Ngb-Expression infolge von Hypoxie bzw. Ischämie. Die Tatsache, dass in kultivierten Zellen nach Hypoxiebehandlung von verschiedenen Arbeitsgruppen eine erhöhte Ngb-Menge detektiert werden konnte, ließ sich durch *in vivo*-Versuche an Ratten und Mäusen nicht bestätigen. Diese Versuchsergebnisse stimmen mit den anhand der vergleichenden Gensequenzanalysen des Mensch- und Maus-Neuroglobins erhobenen Vorhersagen überein, dass aufgrund der fehlenden konservierten Erkennungssequenzen eine prominente Regulation des Neuroglobins durch HIF-1 unwahrscheinlich ist.

Publikation	Zellkultur	Tiere	Hypoxie/Dauer	Ischämie/Reperfusion (I/R)	Ngb-Regulation
Sun et al., 2001	HN33	Maus Gehirn	0 % O ₂ / 24 Std.	90 min/ 24 Std.	Protein: Heraufregulation nach 8 Std. um Faktor 2,3 Immunfärbung: Heraufregulation nach 24 Std.
Mammen et al., 2002		Maus Gehirn	10 % O ₂ / 14 Tage		mRNA: keine Regulation
Fordel et al., 2004	HN33	Maus Gehirn	1 % O ₂ / 54 Std. 7 bzw. 12 % O ₂ / 48 Std.		mRNA: Heraufregulation max. um Faktor 4,1 mRNA: keine Regulation
Hundahl et al., 2005		Maus Gehirn und Retina	7,6 % O ₂ / ½ bzw. 2 Std.		mRNA und Immunfärbung: keine Regulation
Hundahl et al., 2006		Ratte Gehirn		90 min/ 24 Std. bzw. 1 Woche	Immunfärbung: keine Regulation
Schmidt-Kastner et al., 2006	HN33, PC12	Ratte Gehirn	0-1 % O ₂ / 24 Std.	12,5 min/ 48 bzw. 72 Std.	mRNA: Heraufregulation max. um Faktor 2,3 mRNA: keine Regulation
Li et al., 2006		Ratte Gehirn	10 % O ₂ / 1,3,7 und 14 Tage 10 und 21 % O ₂ alternierend/ 1,3,7 und 14 Tage		mRNA und Protein: Heraufregulation um Faktor 1,8 bzw. 1,7 nach 1 Tag mRNA und Protein: Heraufregulation um Faktor 2,5 bzw. 1,9 nach 3 Tagen
Shang et al., 2006		Maus Gehirn (Mongolische Rennmaus)		20 min/ 2, 8, 16, 24, 48 und 72 Std.	Immunfärbung Cortex: Heraufregulation nach 16-24 Std. um 46-70 % Immunfärbung Hippocampus: Herunterregulation nach 24 Std. um 35-79 %
Gerlach et al., 2007 (in Vorbereitung)		Ratte Gehirn	6% O ₂ / 5 Std. 10 % O ₂ / 22 und 40 Std.		mRNA: keine Heraufregulation (evtl. Faktor 2 runter) mRNA: keine Heraufregulation

Tabelle 4-4 Ngb-Regulation bei bei Hypoxie und I/R. Zusammenfassung der bisher veröffentlichten Daten zur Regulation der Ngb-Expression unter reduzierter Sauerstoffzufuhr *in vitro* und *in vivo*. Während in Zellkultur eine Heraufregulation der Ngb-Expression unter hypoxischen Bedingungen zu verzeichnen ist, spricht die Mehrheit der bisherigen Ergebnisse deutlich gegen eine sauerstoffabhängige Regulation der Ngb-Expression *in vivo*.

Im Allgemeinen zieht eine Unterversorgung des Säugergehirns mit Sauerstoff innerhalb kürzester Zeit schwerwiegende Folgen nach sich: bereits 10 sec nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr verliert der Mensch das Bewusstsein und nach 10 min treten irreversible Gehirnschäden auf (Wehner and Gehring, 1995). Falls die Funktion des Neuroglobins in der direkten Sauerstoffversorgung der Zellen liegt, so wären die experimentell gewählten Hypoxie-Bedingungen prinzipiell zu lang und zu weit vom Zeitpunkt der irreversiblen Schädigung der Neurone entfernt. Eine Heraufregulation der Neuroglobin-Expression nach fortgeschrittener Hypoxie wäre in diesem Fall sinnlos oder sogar kontraproduktiv. Die neuroprotektive Rolle des Ngbs könnte unter diesen Bedingungen eher in der Freisetzung des gebundenen Sauerstoffs liegen, so dass kein zusätzliches Neuroglobin in der Zelle benötigt würde. Dazu würden auch die Beobachtungen passen, dass durch die Überexpression von Ngb eine Verminderung der Gehirnschäden infolge von Ischämie erzielt werden kann (Khan et al., 2006; Sun et al., 2003).

Die oft postulierte Schutzfunktion des Neuroglobins in der Entsorgung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die infolge von Hypoxie und Ischämie vermehrt anfallen (Jezek and Hlavata, 2005; Wenger, 2006), sollte eher mit einer erhöhten Ngb-Menge nach analoger Behandlung einhergehen. Eine entsprechende Heraufregulation der Ngb-Menge lässt sich jedoch anhand der vorgestellten Daten nicht belegen, so dass es sich auch bei dieser möglichen Funktion nicht um eine adaptive Antwort handelt, sondern bestenfalls um einen dauerhaften „low-level“-Schutz.

Abschließend lässt sich sagen, dass Neuroglobin offensichtlich weder in hypoxie- noch in ischämieinduzierte Stressantworten *in vivo* aktiv durch Hochregulation involviert ist. Da das Gehirn erwachsener Säuger in der Natur so gut wie nie hypoxischen Bedingungen ausgesetzt ist, ist auch eine entsprechende Adaptation an eine solche verminderte Sauerstoffzufuhr nicht zu erwarten (Lutz et al., 2003). Anders ist dies bei Fischen, die vergleichsweise niedrigen bzw. wechselnden Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt sind und infolgedessen verschiedene Anpassungsmechanismen entwickelt haben (Cossins and Crawford, 2005; Nilsson and Renshaw, 2004). So konnten z. B. beim Zebrafisch *D. rerio* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant höhere Ngb-Mengen nach 24 bzw. 48 h Hypoxie detektiert werden. Die Ngb-mRNA-Menge stieg ungefähr um den Faktor 3 an, während die Proteinmenge sogar um den Faktor 5,7 höher lag als in normoxischen Tieren (Roesner et al., 2006). Zudem wurde kürzlich die Expression eines speziellen Myoglobins Myg-2 in Gehirnen von Karpfen beschrieben (Fraser et al., 2006). Da es dort mit dem Neuroglobin co-exprimiert wird gehen die Autoren davon aus, dass es seine Funktion unterstützt.

4.5 Ngb- und Cygb-Expression im alternden Säugergehirn

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Neuroglobin und Cytoglobin im Gehirn von jungen und seneszenten Säugern der Spezies *Phodopus sungorus* mittels quantitativer Realtime RT-PCR-Analysen untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob die hypothetische Beteiligung dieser Proteine am oxidativen Stoffwechsel der Neurone oder die möglichen Funktionen von Ngb und Cygb in der Entgiftung von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) mit einer differentiellen Regulation der Genexpression im Alter einhergehen. Als Kontrollen wurden zwei bekannte Gene mitgeführt, deren differentielle Expression im Alter bereits beschrieben wurde. Zum einen handelte es sich dabei um einen Bestandteil des Immunsystems, das Complement C4, dessen Heraufregulation (Lee et al., 2000) bestätigt werden sollte. Zum anderen galt es, die Herunterregulation des Calmodulin1-Gens während der Gehirn-Alterung nachzuweisen (Lu et al., 2004).

C4 gehört zu den Komplementkaskade-Genen der humoralen Zellantwort, die in Inflammation und Zytolyse involviert sind. Die vermehrte Produktion von Proteinen des Komplementsystems im Gehirn, die zur Generierung von proinflammatorischen Peptidfragmenten führt, trägt zu neuronalen Schäden z.B. nach Ischämie bei (Huang et al., 1999) und wurde auch in alternden humanen Gehirnen beobachtet (Loeffler et al., 2004). Im Rahmen der Analyse der Q-PCR-Daten zur C4-mRNA-Expression in jungen und alten *Phodopus sungorus* konnte festgestellt werden, dass die Heraufregulation der C4-mRNA im Alter offensichtlich geschlechtsspezifisch verläuft. Während in jungen Individuen die C4-mRNA-Mengen ähnlich waren, war ein Anstieg der C4-Expression lediglich in alten weiblichen Individuen zu verzeichnen, während die mRNA-Menge in den untersuchten männlichen Vertretern der der jungen Tiere entsprach. Erst nach Ausschluss der alten männlichen Tiere konnte ein signifikanter Anstieg (Student's t-Test: $p < 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$) der C4-mRNA-Mengen um den Faktor 3,7 bzw. 3,6 im Kleinhirn und im „Resthirn“ der alten Tiere festgestellt werden. Diese Daten stimmen sehr gut mit den Literaturwerten überein (Lee et al., 2000) und liefern einen Hinweis darauf, dass die Q-PCR-Analyse prinzipiell auch in *Phodopus* zur Detektion altersabhängiger Unterschiede in mRNA-Mengen geeignet ist.

Die Herunterregulation der Calmodulin1-Expression konnte dagegen im Rahmen dieser Studien nicht bestätigt werden. Die Calm1-mRNA-Menge im *Phodopus*-Gehirn schien im Alter unverändert. Deutlich zu erkennen war dagegen, dass die Calm1-Expression im Kleinhirn ca. um den Faktor 3-4 geringer war als im Hippocampus und

cerebralen Cortex. Diese Beobachtung stimmt sehr gut mit den Daten einer Publikation überein, in der anhand von [³⁵S]cRNA-*in situ*-Hybridisierungen die Expression der CaM1 (Calm1)-mRNA im Ratten-Gehirn sehr ausführlich untersucht und quantifiziert wurde (Kortvely et al., 2002). Die Autoren detektierten eine ebenfalls um den Faktor 3-4 reduzierte Calm1-mRNA-Menge im Kleinhirn im Vergleich zum Hippocampus und Cortex, die ähnliche Mengen Calm1 enthielten. Möglicherweise lassen sich die Abweichungen zu publizierten Daten, die anhand von Microarray-Hybridisierungen, Q-PCR- und Western Blot-Analysen mit humanen Proben eine Herunterregulation des Calm1 im Alter gezeigt haben, auf speziesspezifische Unterschiede der Genexpression zurückführen.

Die Analysen der Gesamt-RNA-Präparationen aus insgesamt 6 jungen und 6 alten Individuen der Spezies *Phodopus sungorus* ergaben weder für Neuroglobin noch für Cytoglobin eine signifikante Veränderung der mRNA-Mengen in den verschiedenen Hirnregionen von alten im Vergleich zu jungen Tieren. Bei einer direkten Beteiligung der Proteine am O₂-abhängigen Stoffwechsel in neuronalen Zellen wäre u. U. analog zu den Enzymen der Atmungskette im Maus-Gehirn eine Abnahme der Genprodukte im Alter zu erwarten (Blalock et al., 2003; Lu et al., 2004; Manczak et al., 2005). Eine entsprechende Herunterregulation der Ngb- und Cygb-mRNA ließ sich anhand der *Phodopus* Q-PCR-Daten nicht bestätigen. Dennoch wäre es möglich, dass in anderen Säugetieren ein Zusammenhang zwischen den Enzymen der Atmungskette und Ngb- bzw. Cygb-Expression besteht, da Genexpressionsanalysen in alternden Individuen vier verschiedener Maus-Stämme sehr spezifische Muster mit geringen Übereinstimmungen zeigten. Anhand von Microarray-Hybridisierungen wurde dabei nur ein einziges von 115 im Alter differentiell regulierten Genen detektiert, das im Hippocampus aller untersuchten alten Tiere um den Faktor 2,2-3,7 heraufreguliert war. Es handelte sich dabei um das Complement C4 (Carter et al., 2005).

Eine mögliche Beteiligung von Ngb und Cygb an der Entgiftung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies könnte eine Zunahme der Expression der Globine im Alter aufgrund des erhöhten oxidativen Stresses erfordern, wie das beispielsweise bei SOD2 im Kleinhirn der Fall ist (Colombrita et al., 2003). In der gleichen Studie wurde jedoch im Hippocampus, als einer der gegenüber oxidativem Stress empfindlichsten Hirnregionen (Candelario-Jalil et al., 2001), ein signifikanter Rückgang der SOD2-Expression im Alter beobachtet. Dies würde zu der konträren Hypothese passen, dass die Zunahme der ROS- und RNS-Konzentrationen und der Folgeschäden in alternden Zellen auf einen Rückgang des endogenen antioxidativen Potentials der Zellen zurückzuführen ist, welcher mit einer herabgesetzter Expression entsprechender

protektiver Gene einhergeht. Dies wurde auch von Sun et al. (2005) postuliert, die anhand von Western Blot-Analysen eine Abnahme der Ngb-Menge in jungen (6-8 Monate), adulten (12 Monate) und alternden (24 Monate) Mäusen dokumentierten, die je nach Gehirnregion zwischen 10 und 80 % betrug. Allerdings gibt es auch Publikationen, in denen der Antioxidantien-Gehalt in verschiedenen alternden Geweben, unter anderem auch im Gehirn, als konstant beschrieben wird (Barja, 2004; Benzi and Moretti, 1995). Beispielsweise konnten anhand von Western Blot-Analysen unveränderte Mengen der SOD1 und 2 in jungen und in alten Rattenherzen detektiert werden. Während die Proteinmengen in den Herzen der alten Tiere denen der jungen Tiere entsprachen, waren die SOD-Aktivitäten in alten Tieren deutlich herabgesetzt (van der Loo et al., 2005). Ebenso wies die Glutathion-Expression in diesen Studien keine altersabhängige Regulation auf. Insbesondere wurden die Unterschiede in den Enzymaktivitäten zwischen jungen und alten Tieren nach Stresseinwirkung, wie beispielsweise Ischämie/Reperfusion, sichtbar. Ein Vergleich der vier Hirnbereiche Hippocampus, cerebraler Cortex, Striatum und Cerebellum bezüglich ihrer Antioxidantien-Aktivität ergab differierende Ergebnisse. Während im Cerebellum die Zunahme der SOD-Aktivität mit ca. 35 % am höchsten war, war eine signifikante Abnahme der Katalase-Aktivität im Striatum und Cerebellum von seneszenten Ratten zu verzeichnen (Siqueira et al., 2005). Woźniak et al. (2004) beschreiben in Übereinstimmung mit der o.g. Studie eine Erhöhung der SOD- und Katalase-Aktivitäten im Gehirn von alten Mäusen, während sich in der Leber keine erhöhte SOD-Aktivität, aber erhöhte Katalase- und Glutathionperoxidase (GPx)-Aktivitäten abzeichneten.

Anscheinend sind die altersbedingten Veränderungen der Aktivität der antioxidanten Enzyme nicht nur gewebespezifisch, sondern variieren auch innerhalb einzelner Hirnregionen (Hussain et al., 1995). Diese Daten deuten darauf hin, dass auch wenn für Neuroglobin und Cytochrom c keine signifikante Regulation der Genexpression auf mRNA-Ebene detektiert werden konnte, die Aktivität dieser Proteine möglicherweise mit dem Alter variiert und beide Proteine dennoch zur Entgiftung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies beitragen könnten. Ferner müssen die mRNA-Daten auch auf Proteinebene überprüft werden. Möglicherweise wird dabei eine Herunterregulation der Ngb-Produktion in alten Individuen sichtbar, wie sie von Sun et al. (2005) beschrieben wurde. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Studie, in der junge und alte Tiere akuten Stressbedingungen, wie z.B. Hypoxie oder Ischämie/Reperfusion ausgesetzt würden, um danach die Expression von Ngb und Cygb in den verschiedenen Altersgruppen miteinander zu vergleichen. Die grundsätzlich höheren SOD-Aktivitäten im Alter gehen nämlich mit einer deutlich reduzierten Antwort auf die erhöhte ROS-Entstehung nach Hypoxie/Reperfusion einher

(Martinez-Romero et al., 2006). Ähnliches konnte auch für Hitzeschockproteine (Hsp) beobachtet werden, deren Induktion eine erhöhte Toleranz und Schutz gegenüber oxidativem Stress und den molekularen Folgeschäden bietet (Calabrese et al., 2000). Obwohl die basale Hsp-Expression im Alter erhöht ist (Calabrese et al., 2004; Lee et al., 2000), fällt die Induktion der Genexpression nach Einwirkung von oxidativem Stress, insbesondere bei Hsp70 in alten Tieren, deutlich schwächer aus (Finkel and Holbrook, 2000).

Oxidativer Stress und ROS induzieren zudem die Expression und Aktivitäten der beiden Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF6B (Allen and Tresini, 2000). Obwohl Neuroglobin und Cytooglobin konservierte Bindestellen für AP-1 und weitere NF6B-Erkennungsmotive in ihren Promotersequenzen enthalten (Wystub et al., 2004), wird ihre Expression unter zunehmendem oxidativen Stress im Alter nicht verändert. Trotzdem könnten die Transkriptionsfaktoren an einer durch akuten oxidativen Stress ausgelösten Veränderung der Genexpression beteiligt sein.

Bemerkenswert sind die enormen individuellen Unterschiede der Expression, vor allem des Neuroglobins, die möglicherweise altersabhängige Veränderungen überlagern. Insbesondere im Hippocampus machten sich die großen Schwankungen maximal um den Faktor 20 bemerkbar. Da der Hippocampus u.a. ein wichtiges Zentrum für die Steuerung des Lern- und Erinnerungsvermögens sowie diverser Stressantworten darstellt und diese Eigenschaften sehr individuell ausgeprägt sind und mit differierenden mRNA-Mengen einhergehen, überrascht dieser Sachverhalt nicht. Eine Realtime Q-PCR-Studie, in der die Expression von 37 Genen im Hippocampus von 20 adulten Ratten analysiert wurde, bestätigte eine generelle individuelle Variabilität um den Faktor 2-3 in der basalen Expression dieser Gene, wobei es durchaus auch Gene gab, die 20fache Unterschiede in den mRNA-Mengen aufzeigten (Alfonso et al., 2002).

Insgesamt passt die Stärke der Ngb-Expression in den einzelnen Hirnbereichen gut zu den immunohistochemischen Daten, anhand derer eine differentielle Expression in verschiedenen Hirnbereichen festgestellt wurde. Der höchste Ngb-mRNA-Gehalt wurde dabei im „Resthirn“ detektiert, der die besonders stoffwechselaktiven Bereiche z.B. den Olivenkomplex enthält. Auch im Hippocampus und im Cortex cerebri wurden entsprechend hohe Ngb-mRNA-Mengen nachgewiesen, während die Ngb-Konzentration im Kleinhirn um den Faktor 10-15 geringer war, was sich darauf zurückführen lässt, dass dort die Ngb-Expression weitgehend auf die Purkinje-Zellen beschränkt ist (Reuss et al., 2002; Wystub et al., 2003). Die Funktion des Neuroglobins in der O₂-Versorgung stoffwechselaktiver Gewebe ist nach wie vor naheliegend. Auch wenn das direkte Zusammenspiel zwischen Neuroglobin und den Enzymen der

Atmungskette eher unwahrscheinlich ist, könnte es als intrazellulärer O₂-Speicher und Puffer den erforderlichen O₂-Partialdruck in der Nähe der neuronalen Mitochondrien, analog dem Myoglobin im Muskel, gewährleisten. Die Myoglobin-Konzentrationen im Skelettmuskel von jungen und alten Ratten unterliegen ebenfalls keiner altersabhängigen Veränderung (Beyer and Fattore, 1984).

Auch die Cygb-Expression, die laut der Q-PCR-Daten in den verschiedenen Hirnregionen von jungen und alten Phodopus ungefähr gleich ist, entspricht der immunohistochemischen Analyse. Die IF-Signale waren zwar auf einzelne Neurone beschränkt, jedoch schien die Anzahl der intensiv gefärbten Zellen innerhalb der Hirnbereiche konstant zu bleiben. Im Allgemeinen unterlagen die Cygb-mRNA-Mengen im Vergleich zum Neuroglobin weniger starken Schwankungen, sowohl zwischen den Individuen, als auch zwischen den einzelnen Hirnregionen. Die höchste Abweichung um den Faktor 2 war auch für das Cytoglobin im Hippocampus zu verzeichnen.

Die Co-Lokalisation des Cytoglobins mit der neuronalen NO-Synthase (Abb. 3-26) legte die Vermutung nahe, dass das Cygb am NO-Stoffwechsel beteiligt ist, möglicherweise indem es den von der NOS zur NO-Synthese benötigten Sauerstoff anliefert. Offensichtlich ist der Anstieg der NO-vermittelten Zellschäden im Alter (Law et al., 2001; McCann, 1997; McCann et al., 1998; McCann et al., 2005) fast ausschließlich auf eine erhöhte Expression der induzierbaren NO-Synthase zurückzuführen, während die Mengen der neuronalen und endothelialen NO-Synthasen im Hippocampus und im Cortex von 24 Monate alten Ratten im Vergleich zu 4 Monate alten Individuen unverändert bleiben (Law et al., 2002; Liu et al., 2003; Liu et al., 2004). Folglich wäre auch eine Veränderung der Cygb-Expression im Alter nicht unbedingt zu erwarten.

4.6 Bedeutung von transgenen und knock out-Mäusen für die Funktionsanalyse unbekannter Gene

Tiermodelle bieten die Möglichkeit bestimmte Fragestellungen der Entwicklung, des Verhaltens, der Physiologie und der Pathogenese an lebenden Organismen zu untersuchen. Durch gezieltes Ausschalten oder Überexprimieren von Genen kann deren Rolle direkt charakterisiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen geschaffen, eine konventionelle knock out-Maus für das *Ngb*-Gen, sowie induzierbare transgene Mausmodelle für *Ngb* und *Cygb* herzustellen.

Zur Herstellung der Targeting-Konstrukte für eine *Ngb* knock out-Maus wurde der pPNT-Vektor verwendet (Tybulewicz et al., 1991). Darin enthalten waren bereits eine Neomycinresistenz-Kassette zur positiven Selektion von rekombinanten ES-Zellklonen sowie ein Thymidinkinase-Gen für die negative Selektion von unspezifischen Rekombinationsereignissen. Durch das „*gene targeting*“-Ereignis sollte ein „*loss of function*“ des *Ngb*-Gens bewirkt werden. Infolge der Deletion der Exons 1 und 2 würden das Start-Kodon sowie die konservierten Positionen HisE7 und PheCD1 fehlen. Der Austausch dieser Exons durch die Neo-Kassette des Vektors sollte zur fehlerhaften Translation und zum Verlust der Fähigkeit des Proteins zur Bindung des Häms führen. Ohne die prosthetische Hämgruppe verliert das Globin nicht nur die O₂-Bindungseigenschaften, sondern auch die typische Tertiärstruktur. Für ein erfolgreiches „*gene targeting*“ sollte beim Design des Vektors primär darauf geachtet werden, dass der Rekombinationsbereich nicht unter 5 kb liegt (Capecchi, 2000) und möglichst wenig repetitive Elemente enthält. Beide Voraussetzungen sind in den aktuellen *Ngb*-Targeting-Konstrukten (*Ngb*-ko3.1 und -ko3.2) erfüllt (3.5.3). Die Länge des gesamten Rekombinationsbereichs beträgt 12,5 (*Ngb*-ko3.1) bzw. 9,8 kb (*Ngb*-ko3.2) und der Anteil an repetitiven Elementen ist mit 15,5 % deutlich niedriger als der durchschnittliche Wert von 38,5 % für das gesamte Maus-Genom (Waterston et al., 2002). Die Länge der Homologiearme erhöht die Rekombinationsfrequenz (Deng and Capecchi, 1992; Thomas et al., 1992), ebenso wie der Einsatz isogener DNA bei ihrer Herstellung (Schenkel et al., 1995; te Riele et al., 1992). Aus diesem Grund wurden die langen Arme der aktuellen *Ngb*-ko-Targeting-Vektorkonstrukte aus genomischer DNA der R1-ES-Zelllinie (Hybrid aus 129/Svcp x 129/SvJ) hergestellt, wodurch Probleme bei der Rekombination aufgrund von stammspezifischen „*single nucleotide polymorphisms*“ (SNP) vermieden werden sollten. Dennoch ist die homologe Rekombination am gewünschten Ziellokus ein seltenes Ereignis, das etwa 10⁴-10⁵-mal

seltener auftritt als eine zufällige Integration der transformierten DNA. Die Verwendung einer negativen Selektionskassette wie der HSV-Thymidinkinase kann dabei die Anzahl der positiven Klone um fast das 20fache erhöhen (Doetschman, 1991; Schenkel et al., 1995). Somit sollte im Idealfall unter 500 getesteten Klonen mindestens ein positiver zu finden sein. In unserem Fall wurde jedoch auf die negative Selektion verzichtet, da nach mündlicher Auskunft unseres Kooperationspartners Dr. Stefan Wiese die ES-Zellklone unter Einwirkung von Gangcyclovir bedeutend schlechter wachsen und die unspezifische Rekombination oft die *TK*-Kassette nicht einschließt. In Übereinstimmung hierzu konnte in ES-Zellklonen, die das *Ngb-ko1*-Konstrukt unspezifisch aufgenommen hatten, lediglich der 5'-Bereich des langen Arms und die Neo-Kassette nachgewiesen werden, während das *TK*-Gen scheinbar nicht ins Genom aufgenommen wurde. Da aber offensichtlich unter 1344 getesteten Klonen für das *Ngb-ko1*-Konstrukt sowie 1248 analysierten Klonen für das *Ngb-ko3.2*-Konstrukt im Rahmen dieser Arbeit kein positiver Klon identifiziert werden konnte, sollte im weiteren Verlauf gegebenenfalls eine Gegenselektion der transformierten ES-Zellen durchgeführt werden. Das *Cygb*-Targeting-Konstrukt wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Ales Obrdlik (2003) hergestellt. Die Analyse von 1614 ES-Zellklonen führte auch hier nicht zum gewünschten Ergebnis. Dabei konnte jedoch zumindest ein eindeutig positiver Klon im Rahmen des PCR-Schnelltests nachgewiesen werden. Leider ist dieser nach dem Wiederauftauen nicht mehr gewachsen. Hierbei könnte die Ursache des Problems darin gelegen haben, dass zwischen der Transformation, der Genotypisierung und dem Auftauen mehrere Wochen verstrichen sind, der ideale Zeitraum jedoch nicht mehr als 14 Tage betragen sollte. Die große Anzahl der erfolglos analysierten ES-Zellklone warf die Frage auf, ob das Neuroglobin bzw. Cytoglobin in ES-Zellen so essentiell ist, dass bereits eine heterozygote Deletion letal wirken könnte. Da in embryonalen Stammzellen jedoch weder eine *Ngb*- noch eine *Cygb*-Expression nachgewiesen werden konnte, erscheint diese Hypothese als widerlegt (3.6.4).

Das Myoglobin knock out-Modell (Garry et al., 1998; Godecke et al., 1999) zeigt, dass ein fehlendes Protein, das zuvor als unerlässlich angesehen wurde, sehr effizient durch Kompensationsmechanismen ersetzt werden kann (Godecke and Schrader, 2000; Merx et al., 2001). Dabei werden sowohl anatomische Auffälligkeiten sichtbar, wie die Verkleinerung des Herzmuskeldurchmessers und eine erhöhte Kapillarendichte, als auch molekulare Anpassungsmechanismen, wie die Transformation von langsam zu schnell kontrahierenden Muskelfasern durch erhöhte Bildung von TypII-Muskelfibrillen, sowie gesteigerte Expression hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktoren, z.B. HIF-1 α und VEGF (Grange et al., 2001; Meeson et al., 2001). Inwieweit sich dieses Ergebnis

auf das Neuroglobin übertragen lässt, ist nur schwer abzuschätzen, da die möglichen Funktionen von Ngb nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussionen sind. Die Fragen, ob die Ngb knock out-Mäuse ebenfalls überlebens- und reproduktionsfähig sein werden und entsprechende Kompensationsmechanismen Ihnen ein weitgehend normales Leben ermöglichen werden, können letztendlich erst anhand von homozygoten knock out-Tieren geklärt werden.

Die konventionelle Herstellung von transgenen Tiermodellen hat den Nachteil, dass die Expression des Transgens stark von Positionseffekten sowie der Natur der gewählten regulatorischen Elemente abhängt. Zudem ist die konstitutive Expression oft nicht geeignet, um spezielle Fragestellungen klären zu können. Zu frühe oder unspezifische Expression des Transgens kann zu phänotypischen und physiologischen Aberrationen führen, die sekundäre pleiotrope Antworten infolge der genetischen Veränderung nach sich ziehen. Die Aufschlüsselung der resultierenden Phänotypen in zellautonome und nicht-autonome Effekte gestaltet sich schwierig und kompensatorische systematische Veränderungen bleiben oft verborgen (Bockamp et al., 2002). Darüber hinaus erfordern experimentelle Fragestellungen häufig die Analyse eines Transgens zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung oder in distinkten Zellpopulationen. Die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Khan et al. (2006), in der transgene Mäuse für das Neuroglobin vorgestellt wurden, scheint diese Anforderungen nicht zu berücksichtigen. Offensichtlich wurden dort Mäuse generiert, die in verschiedenen Geweben Ngb überexprimieren, wobei im Rahmen dieser Veröffentlichung lediglich das Gehirn und das Herz näher charakterisiert wurden. Dabei fehlen genaue Angaben sowohl zur Regulation als auch zum Grad der Überexpression. Im Gehirn stieg zwar die Anzahl der Ngb-haltigen Neuronen deutlich an, daneben wurde das Ngb aber auch in Astrozyten detektiert. Ähnlich wie bei den Ngb-exprimierenden Endothelzellen im Herzen handelt es sich dabei um Zellen, in denen natürlicherweise in der Maus kein Ngb vorkommt, was die Aussagekraft der durchgeführten Ischämie-Experimente in Frage stellt.

Um solche Probleme zu umgehen, wurde für die Herstellung der transgenen Ngb- und Cygb-Vektorkonstrukte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der modifizierte Vektor pBI-EGFP verwendet, der sog. Insulator-Sequenzen enthält, die vor Positionseffekten schützen sollten. Es handelt sich dabei um Sequenzabschnitte aus dem humanen β -Globin-Lokus, die ursprünglich von Fleenor und Kaufman (1993) charakterisiert wurden und helfen sollten, den Effekt des „*silencing*“ in der Maus zu minimieren bzw. zu unterbinden (Bell and Felsenfeld, 1999; Bell et al., 2001). Anhand entsprechender Sequenzen aus dem Huhn konnte das Potential der β -Globin-Insulatoren demonstriert

werden (Recillas-Targa et al., 1999). Weitere Experimente an transgenen Zellkulturen zeigten, dass die durchschnittliche Stilllegung eines Transgens nach 80-100 Tagen durch das Einfügen von Insulatoren unterbunden werden konnte. Sie dienen als Blockade gegen Enhancer- und Silencer-Elemente und verhindern die Kondensation des Chromatins (Burgess-Beusse et al., 2002). Transgene ohne Insulatoren hingegen zeigen häufig den Verlust eindeutiger Eigenschaften des aktiven Chromatins, wie Nuklease-Zugänglichkeit, DNA-Hypomethylierung und Histon-Acetylierung.

Der Tetracyclin-abhängige Promotor im Vektor pBI-EGFP, der die Expression des transgenen Neuroglobins bzw. Cytoglobins reguliert, enthält das „*tetracycline responsive element*“ (TRE), das aus sieben Kopien der „*tetracycline operator sequence*“ (*tetO*) besteht und sowohl tTA als auch rtTA binden kann (siehe Einleitung 1.3.2). Eine zelltyp- bzw. entwicklungsspezifische Expression des Transgens wird durch die Kreuzung der hergestellten „*responder*“ Mäuse mit den „*effektor*“ Mäusen, die das tTA bzw. rtTA unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimieren, erreicht. Im Tet-off-System (tTA) wird die konstitutive Expression des Transgens durch die Zugabe von Tetracyclin (Tc) bzw. dem kostengünstigeren und in viel geringerer Dosierung einsetzbaren Analogon Doxycyclin (Dox) unterbunden (Gossen and Bujard, 1992). Wird Tetracyclin bzw. Doxycyclin nicht mehr verabreicht, wird die Expression des Transgens induziert. Der Erfolg dieses Systems wurde vielfach experimentell bestätigt und beeindruckende Induktionsraten von mehreren Tausend gemessen (Furth et al., 1994; Hasan et al., 2001). Dennoch tauchten auch zahlreiche Probleme auf, die eine Optimierung des Systems erforderten, wie z.B. die basale Aktivität des minimalen Promotors, Toxizität des Transaktivators, geringe Sensitivität mancher Gewebe gegenüber Dox (Bockamp et al., 2002), sowie die zeitliche Verzögerung der Induktion nach dem Absetzen des Dox. Die Entwicklung des reversen Tet-on Tetracyclin-kontrollierten Transaktivators (rtTA) in Kombination mit einem minimalen CMV-Promotor, in dem das Enhancer-Element des kompletten CMV-Promotors fehlt, brachte in dieser Hinsicht entscheidende Vorteile. Im Tet-on-System wird die Expression durch die Zugabe von Dox angeschaltet (Gossen et al., 1995). Die Verwendung des rtTA-Systems zur Herstellung von transgenen Mäusen hebt die Geschwindigkeit der Expression des Transgens erheblich an. In manchen Fällen wird die komplette Aktivierung innerhalb einer Stunde erreicht, im Gegensatz zu der langsamen Aktivierungskinetik im Tet-Off-System, die bis zu einer Woche in Anspruch nehmen kann (Hasan et al., 2001; Kistner et al., 1996). Aus diesen Gründen sollten für die Generierung der Ngb- bzw. Cygb-Transgenen die „*responder*“ Mäuse bevorzugt mit rtTA-exprimierenden „*responser*“ Mäusen gekreuzt werden.

4.7 Ausblick

Diese Arbeit stellt eine wichtige Grundlage für weiterführende experimentelle Analysen zur Charakterisierung der Funktionen von Neuroglobin und Cytoglobin in Vertebraten dar. Im Folgenden sollen einige dieser Möglichkeiten vorgestellt werden.

- o In Anbetracht der großen individuellen Schwankungen, insbesondere der Ngb-mRNA-Mengen, die sich im Rahmen der durchgeführten Realtime RT-PCR-Analysen offenbarten, könnten die Expressionsanalysen von Ngb und Cygb mit Hilfe der Immunofluoreszenz (IF) auf den Vergleich bestimmter Hirnregionen zwischen einzelnen Individuen erweitert werden. Bisher wurden zwar jeweils mehrere Individuen untersucht, jedoch konzentrierte sich die Auswertung hauptsächlich auf die Deckungsgleichheit der Signale und nicht unbedingt auf etwaige Unterschiede in den Signalintensitäten. Des Weiteren könnte die Auswirkung weiterer Faktoren wie Stress, Halterungsbedingungen, Tages- und Jahreszeit auf die Ngb- und Cygb-Expression im Gehirn mittels IF und Q-PCR untersucht werden.
- o Grundlagen für die Charakterisierung der Regulation der Ngb-Expression wurden anhand von vergleichenden Sequenzanalysen ermittelt. Die Promotoraktivität sollte nun in Zellkultur mit Hilfe eines Reportergens untersucht werden. Die Funktionsfähigkeit des minimalen Promotors und der identifizierten Bindestellen für zahlreiche Transkriptionsfaktoren sowie die mögliche Steigerung der Promotoraktivität durch verschiedene äußere Einflüsse (z.B. Hypoxie oder Zugabe von ROS- und RNS-freisetzenden Agenzien) sollte experimentell nachgeprüft werden. Analysen von mutierten Bindestellen könnten die Versuche ergänzen.
- o Eine denkbare Interaktion von Cytoglobin mit der neuronalen NO-Synthase könnte z.B. in „pull down“-Experimenten näher untersucht werden. Auch eine Analyse der Cygb-Expression in nNOS-knock out-Mäusen wäre interessant (Salchner et al., 2004). Ferner müsste die Expression der nNOS in alternden *Phodopus sungorus* zum Vergleich noch analysiert werden. Des Weiteren könnte eine mögliche Rolle des Cytoglobins im NO-Stoffwechsel anhand von Expressionsanalysen des Globins in neurodegenerativen Krankheiten, wie Chorea Huntington, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, die bekanntermaßen mit einer erhöhten NO-Produktion einhergehen, untersucht werden (Law et al., 2001; Liu et al., 2003; McCann et al., 2005).

-
- o Nicht zuletzt werden die transgenen und knock out-Tiere eine wichtige Basis für funktionelle Analysen von Neuroglobin und Cytoglobin liefern. Zum einen könnten anhand der Ngb- und Cygb-überexprimierenden Tiere mögliche, damit einhergehende Überlebensvorteile *in vivo* untersucht werden, zum anderen könnten entsprechende Nachteile beim Fehlen eines dieser Gene und die notwendigen Kompensationsmechanismen in knock out-Tieren untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen schließlich helfen, mögliche Krankheitsbilder, die mit Defekten im Neuroglobin- bzw. Cytoglobin-Gen einhergehen können, zu identifizieren und zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Untersuchungen zur Expression und Funktion der respiratorischen Proteine Neuroglobin und Cytoglobin in Vertebraten durchgeführt. Beide Globine wurden erst kürzlich entdeckt, und ihre Funktionen konnten trotz vorliegender Daten zur Struktur und biochemischen Eigenschaften dieser Proteine bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre und subzelluläre Lokalisation von Neuroglobin und Cytoglobin in murinen Gewebeschnitten untersucht. Die Expression von Neuroglobin in neuronalen und endokrinen Geweben hängt offensichtlich mit den hohen metabolischen Aktivitäten dieser Organe zusammen. Insbesondere im Gehirn konnten regionale Unterschiede in der Neuroglobin-Expression beobachtet werden. Dabei korrelierte eine besonders starke Neuroglobin-Expression mit Gehirnbereichen, die bekanntermaßen die höchsten Grundaktivitäten aufweisen. In Anbetracht dessen liegt die Funktion des Neuroglobins möglicherweise im basalen O₂-Metabolismus dieser Gewebe, wobei Neuroglobin als O₂-Lieferant und kurzfristiger O₂-Speicher den vergleichsweise hohen Sauerstoffbedarf vor Ort sicherstellen könnte. Weitere Funktionen in der Entgiftung von ROS bzw. RNS oder die kürzlich publizierte mögliche Rolle des Ngb bei der Verhinderung der Mitochondrien-vermittelten Apoptose durch eine Reduktion des freigesetzten Cytochrom c wären darüberhinaus denkbar.

Die Cytoglobin-Expression im Gehirn beschränkte sich auf relativ wenige Neurone in verschiedenen Gehirnbereichen und zeigte dort vorwiegend eine Co-Lokalisation mit der neuronalen NO-Synthase. Dieser Befund legt eine Funktion des Cytoglobins im NO-Metabolismus nahe, wobei Cytoglobin beispielsweise den zur NO-Synthese benötigten Sauerstoff an die NO-Synthase liefern könnte.

Quantitative RT-PCR-Experimente zur mRNA-Expression von Neuroglobin und Cytoglobin in alternden Säugern am Beispiel der Hamsterspezies *Phodopus sungorus* zeigten keine signifikanten Änderungen der mRNA-Mengen beider Globine in alten im Vergleich zu jungen Tieren. Dies widerspricht publizierten Daten, in denen bei der Maus anhand von Western Blot-Analysen eine Abnahme der Neuroglobin-Menge im Alter gezeigt wurde. Möglicherweise handelt es sich hierbei um speziesspezifische Differenzen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Sequenzanalyse der humanen und murinen *NGB/Ngb*-Genregion liefert zum einen Hinweise auf die mögliche Regulation der Neuroglobin-Expression und zum anderen eine wichtige Grundlage für die funktionellen Analysen dieses Gens. Es konnte ein minimaler Promotorbereich definiert werden, der zusammen mit einigen konservierten regulatorischen Elementen als Basis für experimentelle Untersuchungen der Promotoraktivität in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen dienen wird. Bioinformatische Analysen führten zur Identifizierung des sog. „*neuron restrictive silencer element*“ (NRSE) im Neuroglobin-Promotor, das vermutlich für die vorwiegend neuronale Expression des Proteins verantwortlich ist. Die kontrovers diskutierte O₂-abhängige Regulation der Neuroglobin-Expression konnte hingegen anhand der durchgeführten komparativen Sequenzanalysen nicht bestätigt werden. Es wurden keine zwischen Mensch und Maus konservierten Bindestellen für den Transkriptionsfaktor „*hypoxia inducible factor*“ HIF-1 identifiziert, der bekanntlich die Expression zahlreicher hypoxieregulierter Gene wie z.B. Epo und VEGF vermittelt. Zusammen mit den *in vivo*-Daten spricht dies eher gegen eine Regulation der Neuroglobin-Expression bei verminderter Verfügbarkeit von Sauerstoff.

Die offensichtliche Komplexität der Funktionen von Neuroglobin und Cytoglobin im O₂-Stoffwechsel der Vertebraten macht den Einsatz muriner Modellsysteme unerlässlich, die eine sukzessive Aufklärung der Funktionen beider Proteine erlauben. Die vorliegende Arbeit liefert auch dazu einen wichtigen Beitrag. Die hergestellten „*gene-targeting*“-Vektorkonstrukte liefern in Verbindung mit den etablierten Nachweisverfahren zur Genotypisierung von embryonalen Stammzellen die Grundlage zur erfolgreichen Generierung von Neuroglobin-knock out sowie Neuroglobin- und Cytoglobin-überexprimierenden transgenen Tieren. Diese werden für die endgültige Entschlüsselung funktionell relevanter Fragestellungen von enormer Bedeutung sein.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahams, B. S., Mak, G. M., Berry, M. L., Palmquist, D. L., Saionz, J. R., Tay, A., Tan, Y. H., Brenner, S., Simpson, E. M. and Venkatesh, B.** (2002). Novel vertebrate genes and putative regulatory elements identified at kidney disease and NR2E1/fierce loci. *Genomics* **80**, 45-53.
- Agocha, A., Lee, H. W. and Eghbali-Webb, M.** (1997). Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 2233-44.
- Alayash, A. I., Patel, R. P. and Cashion, R. E.** (2001). Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. *Antioxid Redox Signal* **3**, 313-27.
- Albitar, M., Care, A., Peschle, C. and Liebhaber, S. A.** (1992). Developmental switching of messenger RNA expression from the human alpha-globin cluster: fetal/adult pattern of theta-globin gene expression. *Blood* **80**, 1586-91.
- Alfonso, J., Pollevick, G. D., Castensson, A., Jazin, E. and Frasch, A. C.** (2002). Analysis of gene expression in the rat hippocampus using Real Time PCR reveals high inter-individual variation in mRNA expression levels. *J Neurosci Res* **67**, 225-34.
- Allen, R. G. and Tresini, M.** (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* **28**, 463-99.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- Anderson, C. R., Jensen, E. O., DJ, L. L., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.** (1996). A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5682-7.
- Andrews, A. T.** (1986). Electrophoresis; theory, techniques and biochemical and clinical applications. Oxford: Clarendon Press.
- Anton, B., Vitetta, L., Cortizo, F. and Sali, A.** (2005). Can we delay aging? The biology and science of aging. *Ann N Y Acad Sci* **1057**, 525-35.
- Antunes, F., Boveris, A. and Cadenas, E.** (2004). On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16774-9.
- Aparicio, S., Morrison, A., Gould, A., Gilthorpe, J., Chaudhuri, C., Rigby, P., Krumlauf, R. and Brenner, S.** (1995). Detecting conserved regulatory elements with the model genome of the Japanese puffer fish, *Fugu rubripes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1684-8.
- Appleby, C. A., Turner, G. L. and Macnicol, P. K.** (1975). Involvement of oxyleghaemoglobin and cytochrome P-450 in an efficient oxidative phosphorylation pathway which supports nitrogen fixation in *Rhizobium*. *Biochim Biophys Acta* **387**, 461-74.

- Aronica, E., van Vliet, E. A., Hendriksen, E., Troost, D., Lopes da Silva, F. H. and Gorter, J. A.** (2001). Cystatin C, a cysteine protease inhibitor, is persistently up-regulated in neurons and glia in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* **14**, 1485-91.
- Arredondo-Peter, R., Hargrove, M. S., Moran, J. F., Sarath, G. and Klucas, R. V.** (1998). Plant hemoglobins. *Plant Physiol* **118**, 1121-5.
- Awenius, C., Hankeln, T. and Burmester, T.** (2001). Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 418-21.
- Ayala, F. J.** (1997). Vagaries of the molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7776-83.
- Azarov, I., Huang, K. T., Basu, S., Gladwin, M. T., Hogg, N. and Kim-Shapiro, D. B.** (2005). Nitric oxide scavenging by red blood cells as a function of hematocrit and oxygenation. *J Biol Chem* **280**, 39024-32.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-95.
- Barja, G.** (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci* **27**, 595-600.
- Barvitenko, N. N., Adragna, N. C. and Weber, R. E.** (2005). Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* **15**, 1-18.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N.** (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**, 547-81.
- Bell, A. C. and Felsenfeld, G.** (1999). Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 191-8.
- Bell, A. C., West, A. G. and Felsenfeld, G.** (2001). Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic. *Science* **291**, 447-50.
- Benesch, R. and Benesch, R. E.** (1967). The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* **26**, 162-7.
- Bentmann, A., Schmidt, M., Reuss, S., Wolfrum, U., Hankeln, T. and Burmester, T.** (2005). Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinas links neuroglobin to cellular respiration. *J Biol Chem* **280**, 20660-5.
- Benton, M. J.** (1990). Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates. *J Mol Evol* **30**, 409-24.
- Benzi, G. and Moretti, A.** (1995). Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* **19**, 77-101.
- Beyer, R. E. and Fattore, J. E.** (1984). The influence of age and endurance exercise on the myoglobin concentration of skeletal muscle of the rat. *J Gerontol* **39**, 525-30.
- Bird, A. P., Taggart, M. H., Nicholls, R. D. and Higgs, D. R.** (1987). Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene. *Embo J* **6**, 999-1004.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Blalock, E. M., Chen, K. C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C. and Landfield, P. W.** (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* **23**, 3807-19.
- Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F. and Zabel, B.** (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* **11**, 115-32.
- Bogue, C. W.** (2003a). Genetic Models in Applied Physiology. Functional genomics in the mouse: powerful techniques for unraveling the basis of human development and disease. *J Appl Physiol* **94**, 2502-9.

- Bogue, M.** (2003b). Mouse Phenome Project: understanding human biology through mouse genetics and genomics. *J Appl Physiol* **95**, 1335-7.
- Bolanos, J. P. and Almeida, A.** (1999). Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 415-36.
- Bonaventura, C., Fago, A., Henkens, R. and Crumbliss, A. L.** (2004). Critical redox and allosteric aspects of nitric oxide interactions with hemoglobin. *Antioxid Redox Signal* **6**, 979-91.
- Boveris, A.** (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* **105**, 429-35.
- Boveris, A. and Cadenas, E.** (2000). Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone. *IUBMB Life* **50**, 245-50.
- Boveris, A., Cadenas, E. and Stoppani, A. O.** (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* **156**, 435-44.
- Boyd, C. S. and Cadenas, E.** (2002). Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol Chem* **383**, 411-23.
- Brown, G. C.** (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 46-57.
- Brunori, M.** (2001). Nitric oxide, cytochrome-c oxidase and myoglobin. *Trends Biochem Sci* **26**, 21-3.
- Brunori, M., Giuffre, 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 U S A* **102**, 8483-8.
- Brunori, M. and Vallone, B.** (2006). A globin for the brain. *Faseb J* **20**, 2192-7.
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A. and Felsenfeld, G.** (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**, 16433-7.
- Burmester, T.** (2001). Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol Biol Evol* **18**, 184-95.
- Burmester, T., Ebner, B., Weich, B. and Hankeln, T.** (2002). Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* **19**, 416-21.
- Burmester, T. and Hankeln, T.** (1999). A globin gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* **16**, 1809-11.
- Burmester, T. and Hankeln, T.** (2004). Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *News Physiol Sci* **19**, 110-3.
- Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S. and Hankeln, T.** (2000). A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**, 520-3.
- Burnette, W. N.** (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Burstyn, J. N., Yu, A. E., Dierks, E. A., Hawkins, B. K. and Dawson, J. H.** (1995). Studies of the heme coordination and ligand binding properties of soluble guanylyl cyclase (sGC): characterization of Fe(II)sGC and Fe(II)sGC(CO) by electronic absorption and magnetic circular dichroism spectroscopies and failure of CO to activate the enzyme. *Biochemistry* **34**, 5896-903.
- Cadenas, E.** (2004). Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* **25**, 17-26.
- Calabrese, V., Copani, A., Testa, D., Ravagna, A., Spadaro, F., Tendi, E., Nicoletti, V. G. and Giuffrida Stella, A. M.** (2000). Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance. *J Neurosci Res* **60**, 613-22.

- Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Colombrita, C., Spadaro, F., Butterfield, D. A. and Giuffrida Stella, A. M.** (2004). Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech Ageing Dev* **125**, 325-35.
- Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C.** (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**, 2796-801.
- Camenisch, G., Stroka, D. M., Gassmann, M. and Wenger, R. H.** (2001). Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch* **443**, 240-9.
- Candelario-Jalil, E., Al-Dalain, S. M., Castillo, R., Martinez, G. and Fernandez, O. S.** (2001). Selective vulnerability to kainate-induced oxidative damage in different rat brain regions. *J Appl Toxicol* **21**, 403-7.
- Capecchi, M. R.** (1989a). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-92.
- Capecchi, M. R.** (1989b). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* **5**, 70-6.
- Capecchi, M. R.** (2000). Choose your target. *Nat Genet* **26**, 159-61.
- Carothers, A. M., Urlaub, G., Mucha, J., Grunberger, D. and Chasin, L. A.** (1989). Amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. *Biotechniques* **7**, 494-496, 498-499.
- Carter, T. A., Greenhall, J. A., Yoshida, S., Fuchs, S., Helton, R., Swaroop, A., Lockhart, D. J. and Barlow, C.** (2005). Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice. *Genome Biol* **6**, R48.
- Chadwick, R. B., Conrad, M. P., McGinnis, M. D., Johnston-Dow, L., Spurgeon, S. L. and Kronick, M. N.** (1996). Heterozygote and Mutation Detection by Direct Automated Fluorescent DNA Sequencing Using a Mutant Taq DNA Polymerase. *Biotechniques* **20**, 676-683.
- Chong, J. A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J. J., Zheng, Y., Boutros, M. C., Altshuller, Y. M., Frohman, M. A., Kraner, S. D. and Mandel, G.** (1995). REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* **80**, 949-57.
- Cianciarullo, A. M., Becak, W. and Soares, M. J.** (1999). Immunocytochemical mapping of the hemoglobin biosynthesis site in amphibian erythroid cells. *Tissue Cell* **31**, 342-8.
- Clegg, J. B.** (1987). Can the product of the theta gene be a real globin? *Nature* **329**, 465-6.
- Colombrita, C., Calabrese, V., Stella, A. M., Mattei, F., Alkon, D. L. and Scapagnini, G.** (2003). Regional rat brain distribution of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase mRNA: relevance of redox homeostasis in the aging processes. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 517-24.
- Comfort, A., Youhotsky-Gore, I. and Pathmanathan, K.** (1971). Effect of ethoxyquin on the longevity of C3H mice. *Nature* **229**, 254-5.
- Conley, K. E., Ordway, G. A. and Richardson, R. S.** (2000). Deciphering the mysteries of myoglobin in striated muscle. *Acta Physiol Scand* **168**, 623-34.
- Cooper, C. E., Jurd, M., Nicholls, P., Wankasi, M. M., Svistunenko, D. A., Reeder, B. J. and Wilson, M. T.** (2005). On the formation, nature, stability and biological relevance of the primary reaction intermediates of myoglobins with hydrogen peroxide. *Dalton Trans*, 3483-8.
- Cosby, K., Partovi, K. S., Crawford, J. H., Patel, R. P., Reiter, C. D., Martyr, S., Yang, B. K., Wacławiw, M. A., Zalos, G., Xu, X. et al.** (2003). Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* **9**, 1498-505.
- Cossins, A. R. and Crawford, D. L.** (2005). Fish as models for environmental genomics. *Nat Rev Genet* **6**, 324-33.
- Coulson, J. M., Edgson, J. L., Woll, P. J. and Quinn, J. P.** (2000). A splice variant of the neuron-restrictive silencer factor repressor is expressed in small cell lung cancer: a potential role in derepression of neuroendocrine genes and a useful clinical marker. *Cancer Res* **60**, 1840-4.

- Coulson, J. M., Fiskerstrand, C. E., Woll, P. J. and Quinn, J. P.** (1999). Arginine vasopressin promoter regulation is mediated by a neuron-restrictive silencer element in small cell lung cancer. *Cancer Res* **59**, 5123-7.
- Couture, M., Burmester, T., Hankeln, T. and Rousseau, D. L.** (2001). The heme environment of mouse neuroglobin. Evidence for the presence of two conformations of the heme pocket. *J Biol Chem* **276**, 36377-82.
- Couture, M., Chamberland, H., St-Pierre, B., Lafontaine, J. and Guertin, M.** (1994). Nuclear genes encoding chloroplast hemoglobins in the unicellular green alga *Chlamydomonas eugametos*. *Mol Gen Genet* **243**, 185-97.
- Couture, M., Das, T. K., Lee, H. C., Peisach, J., Rousseau, D. L., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B. and Guertin, M.** (1999a). *Chlamydomonas* chloroplast ferrous hemoglobin. Heme pocket structure and reactions with ligands. *J Biol Chem* **274**, 6898-910.
- Couture, M., Das, T. K., Savard, P. Y., Ouellet, Y., Wittenberg, J. B., Wittenberg, B. A., Rousseau, D. L. and Guertin, M.** (2000). Structural investigations of the hemoglobin of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 reveal a unique distal heme pocket. *Eur J Biochem* **267**, 4770-80.
- Couture, M., Yeh, S. R., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B., Ouellet, Y., Rousseau, D. L. and Guertin, M.** (1999b). A cooperative oxygen-binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11223-8.
- Crawford, J. H., Isbell, T. S., Huang, Z., Shiva, S., Chacko, B. K., Schechter, A. N., Darley-Usmar, V. M., Kerby, J. D., Lang, J. D., Jr., Kraus, D. et al.** (2006). Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood* **107**, 566-74.
- Cringle, S. J., Yu, D. Y., Yu, P. K. and Su, E. N.** (2002). Intraretinal oxygen consumption in the rat in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1922-7.
- Czyzyk-Krzeska, M. F. and Beresh, J. E.** (1996). Characterization of the hypoxia-inducible protein binding site within the pyrimidine-rich tract in the 3'-untranslated region of the tyrosine hydroxylase mRNA. *J Biol Chem* **271**, 3293-9.
- Davis, R. W. and Kanatous, S. B.** (1999). Convective oxygen transport and tissue oxygen consumption in Weddell seals during aerobic dives. *J Exp Biol* **202**, 1091-113.
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. and Orcutt, B. C.** (1978). A model of evolutionary change in Proteins. *Atlas of Protein Sequence Structure* **5**, 345-352.
- De Ganck, A., Hubert, T., Van Impe, K., Geelen, D., Vandekerckhove, J., De Corte, V. and Gettemans, J.** (2005). A monopartite nuclear localization sequence regulates nuclear targeting of the actin binding protein myopodin. *FEBS Lett* **579**, 6673-80.
- de Magalhaes, J. P. and Church, G. M.** (2006). Cells discover fire: employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. *Exp Gerontol* **41**, 1-10.
- 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**, 917-27.
- de Sanctis, D., Dewilde, S., Vonnrhein, C., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., Ponassi, M., Nardini, M. et al.** (2005). Bishistidyl heme hexacoordination, a key structural property in *Drosophila melanogaster* hemoglobin. *J Biol Chem* **280**, 27222-9.
- Dejam, A., Hunter, C. J., Pelletier, M. M., Hsu, L. L., Machado, R. F., Shiva, S., Power, G. G., Kelm, M., Gladwin, M. T. and Schechter, A. N.** (2005). Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* **106**, 734-9.
- Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G. and Gilles-Gonzalez, M. A.** (2000). Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry* **39**, 2685-91.
- Deng, C. and Capecchi, M. R.** (1992). Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* **12**, 3365-71.

- Denhardt, D. T.** (1966). A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys. Res. Comm.* **23**, 641-645.
- Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, M. L., Vanfleteren, J., Esmans, E. L., Marden, M., Griffon, N. and Moens, L.** (1996). Globin and globin gene structure of the nerve myoglobin of *Aphrodite aculeata*. *J Biol Chem* **271**, 19865-70.
- 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**, 38949-55.
- Dickerson, R. E. and Geis, I.** (1983). Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. Menlo Park: Benjamin/Cummings.
- Dikshit, R. P., Dikshit, K. L., Liu, Y. X. and Webster, D. A.** (1992). The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases. *Arch Biochem Biophys* **293**, 241-5.
- Ding, Y., Jiang, M., Jiang, W., Su, Y., Zhou, H., Hu, X. and Zhang, Z.** (2005). Expression, purification, and characterization of recombinant human flotillin-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **42**, 137-45.
- Doctor, A., Platt, R., Sheram, M. L., Eischeid, A., McMahon, T., Maxey, T., Doherty, J., Axelrod, M., Kline, J., Gurka, M. et al.** (2005). Hemoglobin conformation couples erythrocyte S-nitrosothiol content to O₂ gradients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5709-14.
- Doetschman, T. C.** (1991). Gene targeting in embryonic stem cells. *Biotechnology* **16**, 89-101.
- Du, W., Syvitski, R., Dewilde, S., Moens, L. and La Mar, G. N.** (2003). Solution 1h NMR characterization of equilibrium heme orientational disorder with functional consequences in mouse neuroglobin. *J Am Chem Soc* **125**, 8080-1.
- Ebert, B. L. and Bunn, H. F.** (1999). Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* **94**, 1864-77.
- Ebner, B., Burmester, T. and Hankeln, T.** (2003). Globin genes are present in *Ciona intestinalis*. *Mol Biol Evol* **20**, 1521-5.
- Ellsworth, R. E., Jamison, D. C., Touchman, J. W., Chisoe, S. L., Braden Maduro, V. V., Bouffard, G. G., Dietrich, N. L., Beckstrom-Sternberg, S. M., Iyer, L. M., Weintraub, L. A. et al.** (2000). Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1172-7.
- Erecinska, M. and Silver, I. A.** (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* **128**, 263-76.
- Ermler, U., Siddiqui, R. A., Cramm, R. and Friedrich, B.** (1995). Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution. *Embo J* **14**, 6067-77.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6.
- Fago, A., Hundahl, C., Dewilde, S., Gilany, K., Moens, L. and Weber, R. E.** (2004a). Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *J Biol Chem* **279**, 44417-26.
- Fago, A., Hundahl, C., Malte, H. and Weber, R. E.** (2004b). Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins. *IUBMB Life* **56**, 689-96.
- Fago, A., Mathews, A. J., Moens, L., Dewilde, S. and Brittain, T.** (2006). The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c. *FEBS Lett* **580**, 4884-8.
- Falanga, V., Martin, T. A., Takagi, H., Kirsner, R. S., Helfman, T., Pardes, J. and Ochoa, M. S.** (1993). Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* **157**, 408-12.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem* **132**, 6-13.

- Fink, T., Kazlauskas, A., Poellinger, L., Ebbesen, P. and Zachar, V.** (2002). Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1. *Blood* **99**, 2077-83.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J.** (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-47.
- Fleenor, D. E. and Kaufman, R. E.** (1993). Characterization of the DNase I hypersensitive site 3' of the human beta globin gene domain. *Blood* **81**, 2781-90.
- Flint, J., Tufarelli, C., Peden, J., Clark, K., Daniels, R. J., Hardison, R., Miller, W., Philipsen, S., Tan-Un, K. C., McMorro, T. et al.** (2001). Comparative genome analysis delimits a chromosomal domain and identifies key regulatory elements in the alpha globin cluster. *Hum Mol Genet* **10**, 371-82.
- Flogel, U., Godecke, A., Klotz, L. O. and Schrader, J.** (2004). Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *Faseb J* **18**, 1156-8.
- Flogel, U., Merx, M. W., Godecke, A., Decking, U. K. and Schrader, J.** (2001). Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 735-40.
- Fordel, E., Geuens, E., Dewilde, S., De Coen, W. and Moens, L.** (2004). Hypoxia/ischemia and the regulation of neuroglobin and cytoglobin expression. *IUBMB Life* **56**, 681-7.
- Fraser, J., de Mello, L. V., Ward, D., Rees, H. H., Williams, D. R., Fang, Y., Brass, A., Gracey, A. Y. and Cossins, A. R.** (2006). Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2977-81.
- Frazer, K. A., Elnitski, L., Church, D. M., Dubchak, I. and Hardison, R. C.** (2003). Cross-species sequence comparisons: a review of methods and available resources. *Genome Res* **13**, 1-12.
- Freitas, I., Griffini, P., Bertone, V., Bertone, R., Fenoglio, C., Milliery, R. and Vairetti, M.** (2002). In situ detection of reactive oxygen species and nitric oxide production in normal and pathological tissues: improvement by differential interference contrast. *Exp Gerontol* **37**, 591-602.
- Freitas, T. A., Hou, S. and Alam, M.** (2003). The diversity of globin-coupled sensors. *FEBS Lett* **552**, 99-104.
- 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 U S A* **101**, 6675-80.
- Frey, A. D. and Kallio, P. T.** (2003). Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 525-45.
- Friedman, S. L.** (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* **275**, 2247-50.
- 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**, 24116-22.
- Fuchs, C., Luckhardt, A., Gerlach, F., Burmester, T. and Hankeln, T.** (2005). Duplicated cytoglobin genes in teleost fishes. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 216-23.
- Furth, P. A., St Onge, L., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H. and Hennighausen, L.** (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9302-6.
- Garcia-Sanchez, R., Ayala-Lujan, J., Hernandez-Perez, A., Mendoza-Figueroa, T. and Tapia-Ramirez, J.** (2003). Identification of repressor element 1 in cytochrome P450 genes and their negative regulation by RE1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor. *Biochim Biophys Acta* **1620**, 39-46.
- Gardner, P. R.** (2005). Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *J Inorg Biochem* **99**, 247-66.

- Gardner, P. R., Gardner, A. M., Brashear, W. T., Suzuki, T., Hvitved, A. N., Setchell, K. D. and Olson, J. S.** (2006). Hemoglobins dioxygenate nitric oxide with high fidelity. *J Inorg Biochem* **100**, 542-50.
- Gardner, P. R., Gardner, A. M. and Hallstrom, C. K.** (2004). Dioxygen-dependent metabolism of nitric oxide. *Methods Mol Biol* **279**, 133-50.
- Gardner, P. R., Gardner, A. M., Martin, L. A., Dou, Y., Li, T., Olson, J. S., Zhu, H. and Riggs, A. F.** (2000). Nitric-oxide dioxygenase activity and function of flavohemoglobins. sensitivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition. *J Biol Chem* **275**, 31581-7.
- Garry, D. J., Ordway, G. A., Lorenz, J. N., Radford, N. B., Chin, E. R., Grange, R. W., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S.** (1998). Mice without myoglobin. *Nature* **395**, 905-8.
- Gayeski, T. E. and Honig, C. R.** (1986). O₂ gradients from sarcolemma to cell interior in red muscle at maximal VO₂. *Am J Physiol* **251**, H789-99.
- Genova, M. L., Pich, M. M., Bernacchia, A., Bianchi, C., Biondi, A., Bovina, C., Falasca, A. I., Formiggini, G., Castelli, G. P. and Lenaz, G.** (2004). The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci* **1011**, 86-100.
- Geuens, E., Brouns, I., Flamez, D., Dewilde, S., Timmermans, J. P. and Moens, L.** (2003). A globin in the nucleus! *J Biol Chem* **278**, 30417-20.
- Ghafourifar, P. and Cadenas, E.** (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 190-5.
- Giordano, A., Tonello, C., Bulbarelli, A., Cozzi, V., Cinti, S., Carruba, M. O. and Nisoli, E.** (2002). Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett* **514**, 135-40.
- Giulivi, C. and Davies, K. J.** (1990). A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. *J Biol Chem* **265**, 19453-60.
- Gladwin, M. T., Lancaster, J. R., Jr., Freeman, B. A. and Schechter, A. N.** (2003). Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* **9**, 496-500.
- Gladwin, M. T., Ognibene, F. P., Pannell, L. K., Nichols, J. S., Pease-Fye, M. E., Shelhamer, J. H. and Schechter, A. N.** (2000). Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9943-8.
- Glasgow, J. N., Qiu, J., Rassin, D., Grafe, M., Wood, T. and Perez-Pol, J. R.** (2001). Transcriptional regulation of the BCL-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain. *Neurochem Res* **26**, 647-59.
- Godecke, A., Fogel, U., Zanger, K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Decking, U. K. and Schrader, J.** (1999). Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10495-500.
- Godecke, A. and Schrader, J.** (2000). Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice--lessons from eNOS and myoglobin knockout mice. *Basic Res Cardiol* **95**, 492-8.
- Goh, S. H., Lee, Y. T., Bhanu, N. V., Cam, M. C., Desper, R., Martin, B. M., Moharram, R., Gherman, R. B. and Miller, J. L.** (2005). A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood* **106**, 1466-72.
- Goldberg, M. A., Gaut, C. C. and Bunn, H. F.** (1991). Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events. *Blood* **77**, 271-7.
- Goldberg, M. A. and Schneider, T. J.** (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* **269**, 4355-9.
- Goodman, M., Czelusniak, J., Koop, B. F., Tagle, D. A. and Slightom, J. L.** (1987). Globins: a case study in molecular phylogeny. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 875-90.
- Gossen, M. and Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51.

- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H.** (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-9.
- Gottgens, B., Barton, L. M., Chapman, M. A., Sinclair, A. M., Knudsen, B., Grafham, D., Gilbert, J. G., Rogers, J., Bentley, D. R. and Green, A. R.** (2002). Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene (SCL)—comparative analysis of five vertebrate SCL loci. *Genome Res* **12**, 749-59.
- Gotti, S., Sica, M., Viglietti-Panzica, C. and Panzica, G.** (2005). Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech* **68**, 13-35.
- Grange, R. W., Meeson, A., Chin, E., Lau, K. S., Stull, J. T., Shelton, J. M., Williams, R. S. and Garry, D. J.** (2001). Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1487-94.
- Graur, D. and Li, W. L.** (2000). Fundamentals of Molecular Evolution. *Sinauer Associates, Inc. Publishers (Sundeland, M.A.)*.
- Graven, K. K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J. S. and Farber, H. W.** (1999). Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 208-18.
- Graven, K. K., Zimmerman, L. H., Dickson, E. W., Weinhouse, G. L. and Farber, H. W.** (1993). Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific. *J Cell Physiol* **157**, 544-54.
- Greijer, A. E., van der Groep, P., Kemming, D., Shvarts, A., Semenza, G. L., Meijer, G. A., van de Wiel, M. A., Belien, J. A., van Diest, P. J. and van der Wall, E.** (2005). Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol* **206**, 291-304.
- Gressner, A. M.** (1996). Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* **54**, S39-45.
- Grunstein, M. and Hogeness, D. S.** (1975). Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNA s that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961-3965.
- Guigo, R., Dermitzakis, E. T., Agarwal, P., Ponting, C. P., Parra, G., Reymond, A., Abril, J. F., Keibler, E., Lyle, R., Ucla, C. et al.** (2003). Comparison of mouse and human genomes followed by experimental verification yields an estimated 1,019 additional genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1140-5.
- Guillemin, I., Becker, M., Ociepka, K., Friauf, E. and Nothwang, H. G.** (2005). A subcellular prefractionation protocol for minute amounts of mammalian cell cultures and tissue. *Proteomics* **5**, 35-45.
- Gupta, M., Mungai, P. T. and Goldwasser, E.** (2000). A new transacting factor that modulates hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene. *Blood* **96**, 491-7.
- Hagen, T. M., Liu, J., Lykkesfeldt, J., Wehr, C. M., Ingersoll, R. T., Vinarsky, V., Bartholomew, J. C. and Ames, B. N.** (2002). Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1870-5.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L. et al.** (2003). The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. *J Biol Chem* **278**, 51713-21.
- Hamdane, D., Kiger, L., Dewilde, S., Green, B. N., Pesce, A., Uzan, J., Burmester, T., Hankeln, T., Bolognesi, M., Moens, L. et al.** (2004). Coupling of the heme and an internal disulfide bond in human neuroglobin. *Micron* **35**, 59-62.
- Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T. L., 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**, 110-9.
- Hankeln, T., Jaenicke, V., Kiger, L., Dewilde, S., Ungerechts, G., Schmidt, M., Urban, J., Marden, M. C., Moens, L. and Burmester, T.** (2002). Characterization of Drosophila hemoglobin. Evidence for hemoglobin-mediated respiration in insects. *J Biol Chem* **277**, 29012-7.

- Hankeln, T., Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Gerlach, F., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S. and Burmester, T.** (2004). The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function? *IUBMB Life* **56**, 671-9.
- Hardison, R.** (1998). Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J Exp Biol* **201**, 1099-117.
- Hardison, R. C.** (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5675-9.
- Hardison, R. C.** (2000). Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. *Trends Genet* **16**, 369-72.
- Hardison, R. C., Oeltjen, J. and Miller, W.** (1997). Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome. *Genome Res* **7**, 959-66.
- Hardison, R. C., Sawada, I., Cheng, J. F., Shen, C. K. and Schmid, C. W.** (1986). A previously undetected pseudogene in the human alpha globin gene cluster. *Nucleic Acids Res* **14**, 1903-11.
- Hargrove, M. S., Brucker, E. A., Stec, B., Sarath, G., Arredondo-Peter, R., Klucas, R. V., Olson, J. S. and Phillips, G. N., Jr.** (2000). Crystal structure of a nonsymbiotic plant hemoglobin. *Structure* **8**, 1005-14.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W.** (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60.
- Harman, D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Harman, D.** (1981). The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7124-8.
- Hasan, M. T., Schonig, K., Berger, S., Graewe, W. and Bujard, H.** (2001). Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis* **29**, 116-22.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J. and Bradley, A.** (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **11**, 5586-91.
- Hausladen, A. and Stamler, J. S.** (1998). Nitric oxide in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10345-7.
- He, X. and Rosenfeld, M. G.** (1991). Mechanisms of complex transcriptional regulation: implications for brain development. *Neuron* **7**, 183-96.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M.** (1996). Real time quantitative PCR. *6*, 986-994.
- Heidrick, M. L., Hendricks, L. C. and Cook, D. E.** (1984). Effect of dietary 2-mercaptoethanol on the life span, immune system, tumor incidence and lipid peroxidation damage in spleen lymphocytes of aging BC3F1 mice. *Mech Ageing Dev* **27**, 341-58.
- Herold, S.** (2004). Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. *Free Radic Biol Med* **36**, 565-79.
- Herold, S. and Fago, A.** (2005). Reactions of peroxynitrite with globin proteins and their possible physiological role. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **142**, 124-9.
- Herold, S., Fago, A., Weber, R. E., Dewilde, S. 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**, 22841-7.
- Herold, S. and Shivashankar, K.** (2003). Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate. *Biochemistry* **42**, 14036-46.
- Herold, S., Shivashankar, K. and Mehl, M.** (2002). Myoglobin scavenges peroxynitrite without being significantly nitrated. *Biochemistry* **41**, 13460-72.
- Hill, A. V.** (1913). The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. I. *Biochem J* **7**, 471-80.

- Hill, M.** (2003). Neuroglobin-Expressionsanalyse im oberen Olivenkomplex des Rattengehirns. *Diplomarbeit*.
- Hirsila, M., Koivunen, P., Gunzler, V., Kivirikko, K. I. and Myllyharju, J.** (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* **278**, 30772-80.
- Hochachka, P. W.** (1999). The metabolic implications of intracellular circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12233-9.
- Hofbauer, K. H., Gess, B., Lohaus, C., Meyer, H. E., Katschinski, D. and Kurtz, A.** (2003). Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur J Biochem* **270**, 4515-22.
- Hoogewijs, D., Geuens, E., Dewilde, S., Moens, L., Vierstraete, A., Vinogradov, S. and Vanfleteren, J.** (2004). Genome-wide analysis of the globin gene family of *C. elegans*. *IUBMB Life* **56**, 697-702.
- Hoppeler, H., Mathieu, O., Krauer, R., Claassen, H., Armstrong, R. B. and Weibel, E. R.** (1981). Design of the mammalian respiratory system. VI Distribution of mitochondria and capillaries in various muscles. *Respir Physiol* **44**, 87-111.
- Hoppeler, H. and Vogt, M.** (2001). Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* **204**, 3133-9.
- Horino, Y., Takahashi, S., Miura, T. and Takahashi, Y.** (2002). Prolonged hypoxia accelerates the posttranscriptional process of collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Life Sci* **71**, 3031-45.
- Hou, S., Freitas, T., Larsen, R. W., Piatibratov, M., Sivozhelezov, V., Yamamoto, A., Meleshkevitch, E. A., Zimmer, M., Ordal, G. W. and Alam, M.** (2001). Globin-coupled sensors: a class of heme-containing sensors in Archaea and Bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9353-8.
- Hou, S., Larsen, R. W., Boudko, D., Riley, C. W., Karatan, E., Zimmer, M., Ordal, G. W. and Alam, M.** (2000). Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria. *Nature* **403**, 540-4.
- Huang, J., Kim, L. J., Mealey, R., Marsh, H. C., Jr., Zhang, Y., Tenner, A. J., Connolly, E. S., Jr. and Pinsky, D. J.** (1999). Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science* **285**, 595-9.
- Huang, T. T., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Shi, Y. and Epstein, C. J.** (2000). Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, B5-9.
- Huang, Z., Shiva, S., Kim-Shapiro, D. B., Patel, R. P., Ringwood, L. A., Irby, C. E., Huang, K. T., Ho, C., Hogg, N., Schechter, A. N. et al.** (2005). Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest* **115**, 2099-107.
- Hundahl, C., Kelsen, J., Kjaer, K., Ronn, L. C., Weber, R. E., Geuens, E., Hay-Schmidt, A. and Nyengaard, J. R.** (2006). 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.
- Hundahl, C., Stoltenberg, M., Fago, A., Weber, R. E., Dewilde, S., Fordel, E. and Danscher, G.** (2005). Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues. *Neuropathol Appl Neurobiol* **31**, 610-7.
- Hunt, P. W., Watts, R. A., Trevaskis, B., Llewelyn, D. J., Burnell, J., Dennis, E. S. and Peacock, W. J.** (2001). Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* **47**, 677-92.
- Hussain, S., Slikker, W., Jr. and Ali, S. F.** (1995). Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Dev Neurosci* **13**, 811-7.
- Hvitved, A. N., Trent, J. T., 3rd, Premer, S. A. and Hargrove, M. S.** (2001). Ligand binding and hexacoordination in synechocystis hemoglobin. *J Biol Chem* **276**, 34714-21.

- Igamberdiev, A. U., Seregelyes, C., Manac'h, N. and Hill, R. D.** (2004). NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta* **219**, 95-102.
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E. and Sokoloff, L.** (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4879-84.
- Jezek, P. and Hlavata, L.** (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2478-503.
- Johnson, G. D. and Nogueira Araujo, G. M.** (1981). A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J Immunol Methods*. **43**, 349-50.
- Johnson, R. M., Goyette, G., Jr., Ravindranath, Y. and Ho, Y. S.** (2005). Hemoglobin autooxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* **39**, 1407-17.
- Jurgens, K. D., Papadopoulos, S., Peters, T. and Gros, G.** (2000). Myoglobin: Just an Oxygen Store or Also an Oxygen Transporter? *News Physiol Sci* **15**, 269-274.
- Jurgens, K. D., Peters, T. and Gros, G.** (1994). Diffusivity of myoglobin in intact skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3829-33.
- Kanatous, S. B., Davis, R. W., Watson, R., Polasek, L., Williams, T. M. and Mathieu-Costello, O.** (2002). Aerobic capacities in the skeletal muscles of Weddell seals: key to longer dive durations? *J Exp Biol* **205**, 3601-8.
- Kanatous, S. B., DiMichele, L. V., Cowan, D. F. and Davis, R. W.** (1999). High aerobic capacities in the skeletal muscles of pinnipeds: adaptations to diving hypoxia. *J Appl Physiol* **86**, 1247-56.
- Kanatous, S. B. and Garry, D. J.** (2006). Gene deletional strategies reveal novel physiological roles for myoglobin in striated muscle. *Respir Physiol Neurobiol* **151**, 151-8.
- Kavdia, M. and Popel, A. S.** (2004). Contribution of nNOS- and eNOS-derived NO to microvascular smooth muscle NO exposure. *J Appl Physiol* **97**, 293-301.
- 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**, 25318-23.
- Keilin, D.** (1966). The history of cell respiration and cytochromes. *Cambridge Univ. Press*.
- Kendrew, J. C.** (1961). The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci Am* **205**, 96-110.
- Kerr, R. A.** (2005). Earth science. The story of O₂. *Science* **308**, 1730-2.
- Khan, A. A., Wang, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., Miles, E., Graboski, J., Chen, S., Ellerby, L. M., Jin, K. et al.** (2006). Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17944-8.
- Kim, H. S. and Smithies, O.** (1988). Recombinant fragment assay for gene targeting based on the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **16**, 8887-903.
- Kimelberg, H. K. and Norenberg, M. D.** (1989). Astrocytes. *Sci Am* **260**, 66-72, 74, 76.
- Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. and Esumi, H.** (2001). Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* **276**, 2292-8.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-20.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. and Bujard, H.** (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10933-8.
- Kivirikko, K. I. and Pihlajaniemi, T.** (1998). Collagen hydroxylases and the protein disulfide

isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **72**, 325-98.

Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298** (Pt 2), 249-58.

Kobert, R. (1900). Beiträge zur Kenntniss der Methemoglobine. *Pflügers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* **82**, 603-630.

Kooyman, G. L. and Ponganis, P. J. (1998). The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annu Rev Physiol* **60**, 19-32.

Kortvely, E., Palfi, A., Bakota, L. and Gulya, K. (2002). Ontogeny of calmodulin gene expression in rat brain. *Neuroscience* **114**, 301-16.

Kowaltowski, A. J. and Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **26**, 463-71.

Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**, 947-50.

Kraus, D. W. and Colacino, J. M. (1986). Extended oxygen delivery from the nerve hemoglobin of *Tellina alternata* (Bivalvia). *Science* **232**, 90-02.

Kriegl, J. M., Bhattacharyya, A. J., Nienhaus, K., Deng, P., Minkow, O. and Nienhaus, G. U. (2002). Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7992-7.

Kundu, S., Trent, J. T., 3rd and Hargrove, M. S. (2003). Plants, humans and hemoglobins. *Trends Plant Sci* **8**, 387-93.

Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A. et al. (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* **28**, 655-661.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6232-6.

Lanzilotta, W. N., Schuller, D. J., Thorsteinsson, M. V., Kerby, R. L., Roberts, G. P. and Poulos, T. L. (2000). Structure of the CO sensing transcription activator CooA. *Nat Struct Biol* **7**, 876-80.

Laufs, T. L., Wystub, S., Reuss, S., Burmester, T., Saaler-Reinhardt, S. and Hankeln, T. (2004). Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neurosci Lett* **362**, 83-6.

Law, A., Gauthier, S. and Quirion, R. (2001). Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Brain Res Rev* **35**, 73-96.

Law, A., O'Donnell, J., Gauthier, S. and Quirion, R. (2002). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience* **112**, 267-75.

Lawinger, P., Venugopal, R., Guo, Z. S., Immaneni, A., Sengupta, D., Lu, W., Rastelli, L., Marin Dias Carneiro, A., Levin, V., Fuller, G. N. et al. (2000). The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells. *Nat Med* **6**, 826-31.

Lawrie, R. A. (1953). The activity of the cytochrome system in muscle and its relation to myoglobin. *Biochem J* **55**, 298-305.

Lee, C. K., Weindruch, R. and Prolla, T. A. (2000). Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* **25**, 294-7.

Lee, L. G., Connel, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. D., Halloran, N. D. and Wilson, R. K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effects of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and propability

analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Research* **20**, 2471-2483.

Leone, A. M., Palmer, R. M., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S. and Moncada, S. (1991). Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* **266**, 23790-5.

Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. and Goldberg, M. A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* **270**, 13333-40.

Levy, N. S., Goldberg, M. A. and Levy, A. P. (1997). Sequencing of the human vascular endothelial growth factor (VEGF) 3' untranslated region (UTR): conservation of five hypoxia-inducible RNA-protein binding sites. *Biochim Biophys Acta* **1352**, 167-73.

Li, R. C., Lee, S. K., Pouranfar, F., Brittian, K. R., Clair, H. B., Row, B. W., Wang, Y. and Gozal, D. (2006). Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain. *Brain Res* **1096**, 173-9.

Li, W. H. (1997). *Molecular Evolution* (Sinauer Associates, Southerland). 180-181.

Lieb, B., Dimitrova, K., Kang, H. S., Braun, S., Gebauer, W., Martin, A., Hanelt, B., Saenz, S. A., Adema, C. M. and Markl, J. (2006). Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12011-6.

Lietz, M., Hohl, M. and Thiel, G. (2003). RE-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Eur J Biochem* **270**, 2-9.

Liu, P., Smith, P. F., Appleton, I., Darlington, C. L. and Bilkey, D. K. (2003). Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience* **119**, 679-87.

Liu, P., Smith, P. F., Appleton, I., Darlington, C. L. and Bilkey, D. K. (2004). Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiol Aging* **25**, 547-52.

Livak, K. J., Flood, S. A. J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe

system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* **4**, 357-362.

Loeffler, D. A., Camp, D. M., Schonberger, M. B., Singer, D. J. and LeWitt, P. A. (2004). Early complement activation increases in the brain in some aged normal subjects. *Neurobiol Aging* **25**, 1001-7.

Loots, G. G., Locksley, R. M., Blankespoor, C. M., Wang, Z. E., Miller, W., Rubin, E. M. and Frazer, K. A. (2000). Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* **288**, 136-40.

Loots, G. G., Ovcharenko, I., Pachter, L., Dubchak, I. and Rubin, E. M. (2002). rVista for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. *Genome Res* **12**, 832-9.

Lu, S., Gu, X., Hoestje, S. and Epner, D. E. (2002). Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Biochim Biophys Acta* **1574**, 152-6.

Lu, T., Pan, Y., Kao, S. Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J. and Yankner, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* **429**, 883-91.

Lutz, P. L., Nilsson, G. E. and Prentice, H. M. (2003). *The Brain without Oxygen*. 3rd Edition. *Kluwer Academic Publishers (Dordrecht)*.

Magistretti, P. J. (1999). *Brain Energy Metabolism*: Academic Press.

Makino, M., Sugimoto, H., Sawai, H., Kawada, N., Yoshizato, K. and Shiro, Y. (2006). High-resolution structure of human cytoglobin: identification of extra N- and C-termini and a new dimerization mode. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 671-7.

- Mammen, P. P., Shelton, J. M., Goetsch, S. C., Williams, S. C., Richardson, J. A., Garry, M. G. and Garry, D. J.** (2002). Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J Histochem Cytochem* **50**, 1591-8.
- Manczak, M., Jung, Y., Park, B. S., Partovi, D. and Reddy, P. H.** (2005). Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem* **92**, 494-504.
- Mangum, C. P.** (1992). Physiological function of hemerythrin. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **13**, 173-192.
- Martin, G. R.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634-8.
- Martindale, J. L. and Holbrook, N. J.** (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**, 1-15.
- Martinez-Romero, R., Canuelo, A., Martinez-Lara, E., Hernandez, R., Del Moral, M. L., Pedrosa, J. A., Peinado, M. A. and Siles, E.** (2006). Aging affects but does not eliminate the enzymatic antioxidative response to hypoxia/reoxygenation in cerebral cortex. *Exp Gerontol* **41**, 25-31.
- Mayer, B. and Hemmens, B.** (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* **22**, 477-81.
- McCann, S. M.** (1997). The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Exp Gerontol* **32**, 431-40.
- McCann, S. M., Licinio, J., Wong, M. L., Yu, W. H., Karanth, S. and Rettorri, V.** (1998). The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp Gerontol* **33**, 813-26.
- McCann, S. M., Mastronardi, C., de Laurentiis, A. and Rettori, V.** (2005). The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci* **1057**, 64-84.
- McClung, J. P., Roneker, C. A., Mu, W., Lisk, D. J., Langlais, P., Liu, F. and Lei, X. G.** (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8852-7.
- McGuire, B. J. and Secomb, T. W.** (2001). A theoretical model for oxygen transport in skeletal muscle under conditions of high oxygen demand. *J Appl Physiol* **91**, 2255-65.
- McLean, I. W. and Nakane, P. K.** (1974). Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* **22**, 1077-1083.
- McMahon, T. J., Moon, R. E., Luschinger, B. P., Carraway, M. S., Stone, A. E., Stolp, B. W., Gow, A. J., Pawloski, J. R., Watke, P., Singel, D. J. et al.** (2002). Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* **8**, 711-7.
- McNeill, L. A., Hewitson, K. S., Gleadle, J. M., Horsfall, L. E., Oldham, N. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. and Schofield, C. J.** (2002). The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 1547-50.
- Meeson, A. P., Radford, N., Shelton, J. M., Mammen, P. P., DiMaio, J. M., Hutcheson, K., Kong, Y., Elterman, J., Williams, R. S. and Garry, D. J.** (2001). Adaptive mechanisms that preserve cardiac function in mice without myoglobin. *Circ Res* **88**, 713-20.
- Melov, S.** (2002). Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 330-40.
- Merx, M. W., Flögel, U., Stumpe, T., Godecke, A., Decking, U. K. and Schrader, J.** (2001). Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *Faseb J* **15**, 1077-9.
- Merx, M. W., Godecke, A., Flögel, U. and Schrader, J.** (2005). Oxygen supply and nitric oxide scavenging by myoglobin contribute to exercise endurance and cardiac function. *Faseb J* **19**, 1015-7.
- Michiels, C., Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Piret, J. P. and Raes, M.** (2001). HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life* **52**, 49-53.

- Milani, M., Pesce, A., Ouellet, Y., Ascenzi, P., Guertin, M. and Bolognesi, M.** (2001). Mycobacterium tuberculosis hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O₂ diffusion to the heme. *Embo J* **20**, 3902-9.
- Milani, M., Savard, P. Y., Ouellet, H., Ascenzi, P., Guertin, M. and Bolognesi, M.** (2003). A TyrCD1/TrpG8 hydrogen bond network and a TyrB10TyrCD1 covalent link shape the heme distal site of Mycobacterium tuberculosis hemoglobin O. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5766-71.
- Miller, S. L.** (1953). A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* **117**, 528-9.
- Millikan, G. A.** (1937). Experiments on muscle hemoglobin in vivo; the instantaneous measurement of muscle metabolism. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **123**, 218-241.
- Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Piret, J. P., Barbieux, A., Raes, M. and Michiels, C.** (2001). c-JUN gene induction and AP-1 activity is regulated by a JNK-dependent pathway in hypoxic HepG2 cells. *Exp Cell Res* **265**, 114-24.
- Misra, H. P. and Fridovich, I.** (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* **247**, 6960-2.
- Miyazaki, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Nishiyama, M., Honda, H. and Kato, Y.** (2002). Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J Biol Chem* **277**, 47014-21.
- Mizuno, K., Hayashi, T. and Bachinger, H. P.** (2003). Hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix. Further characterization of peptides with 4(R)-hydroxyproline in the Xaa position. *J Biol Chem* **278**, 32373-9.
- Morrison, T. B., Weiss, J. J. and Wittwer, C. T.** (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**, 585-588.
- Mujica, A. O., Hankeln, T. and Schmidt, E. R.** (2001). A novel serine/threonine kinase gene, STK33, on human chromosome 11p15.3. *Gene* **280**, 175-81.
- Myllyharju, J.** (2003). Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol* **22**, 15-24.
- Myllyharju, J. and Kivirikko, K. I.** (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* **20**, 33-43.
- Nagababu, E., Ramasamy, S., Abernethy, D. R. and Rifkind, J. M.** (2003). Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J Biol Chem* **278**, 46349-56.
- Nagababu, E. and Rifkind, J. M.** (2000). Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry* **39**, 12503-11.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J. C.** (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8424-8.
- Nakatani, K., Okuyama, H., Shimahara, Y., Saeki, S., Kim, D. H., Nakajima, Y., Seki, S., Kawada, N. and Yoshizato, K.** (2004). Cytooglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest* **84**, 91-101.
- Navone, F., Jahn, R., Di Gioia, G., Stukenbrok, H., Greengard, P. and De Camilli, P.** (1986). Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol* **103**, 2511-27.
- Neufeld, A. H., Shareef, S. and Pena, J.** (2000). Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina. *J Comp Neurol* **416**, 269-75.
- Nilsson, G. E. and Renshaw, G. M.** (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**, 3131-9.
- Nishiyama, J., Yi, X., Venkatachalam, M. A. and Dong, Z.** (2001). cDNA cloning and promoter analysis of rat caspase-9. *Biochem J* **360**, 49-56.

- O'Kusky, J. and Colonnier, M.** (1982). A laminar analysis of the number of neurons, glia, and synapses in the adult cortex (area 17) of adult macaque monkeys. *J Comp Neurol* **210**, 278-90.
- Obrdlik, A.** (2003). Konstruktion eines Knock-Out Vektors für das Cytoglobingen in *Mus musculus*. Diplomarbeit.
- Oeltjen, J. C., Malley, T. M., Muzny, D. M., Miller, W., Gibbs, R. A. and Belmont, J. W.** (1997). Large-scale comparative sequence analysis of the human and murine Bruton's tyrosine kinase loci reveals conserved regulatory domains. *Genome Res* **7**, 315-29.
- Orban, P. C., Chui, D. and Marth, J. D.** (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6861-5.
- Ordway, G. A. and Garry, D. J.** (2004). Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* **207**, 3441-6.
- Ornstein, L. and Davis, B. J.** (1964). Disc electrophoresis-background and theory. *Anal. NY Acad. Sci.* **121**, 321-349.
- Orr, W. C. and Sohal, R. S.** (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**, 1128-30.
- Ota, T. and Nei, M.** (1994). Variance and covariances of the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions per site. *Mol Biol Evol* **11**, 613-9.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P. and Udvardi, M. K.** (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**, 531-5.
- Palm, K., Metsis, M. and Timmusk, T.** (1999). Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Brain Res Mol Brain Res* **72**, 30-9.
- Palmer, L. A. and Johns, R. A.** (1998). Hypoxia upregulates inducible (Type II) nitric oxide synthase in an HIF-1 dependent manner in rat pulmonary microvascular but not aortic smooth muscle cells. *Chest* **114**, 33S-34S.
- Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P. and Boulianne, G. L.** (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* **19**, 171-4.
- Parmentier, S., Bohme, G. A., Lerouet, D., Damour, D., Stutzmann, J. M., Margaill, I. and Plotkine, M.** (1999). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol* **127**, 546-52.
- Pellerin, L. and Magistretti, P. J.** (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10625-9.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P. G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J. L., Stella, N. and Magistretti, P. J.** (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* **20**, 291-9.
- Penzlin, H.** (2005). Lehrbuch der Tierphysiologie: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- Perutz, M. F.** (1964). The hemoglobin molecule. *Sci. Am.* **211**, 64-76.
- Perutz, M. F., Fermi, G., Luisi, B., Shaanan, B. and Liddington, R. C.** (1987). Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 555-65.
- Pesce, A., Couture, M., Dewilde, S., Guertin, M., Yamauchi, K., Ascenzi, P., Moens, L. and Bolognesi, M.** (2000). A novel two-over-two alpha-helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family. *Embo J* **19**, 2424-34.
- Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. and Bolognesi, M.** (2003a). Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure (Camb)* **11**, 1087-95.

Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T. and Bolognesi, M. (2003b). Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure* **11**, 1087-95.

Pesce, A., Nardini, M., Dewilde, S., Ascenzi, P., Burmester, T., Hankeln, T., Moens, L. and Bolognesi, M. (2002). Human neuroglobin: crystals and preliminary X-ray diffraction analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1848-50.

Pihlajaniemi, T., Myllyla, R. and Kivirikko, K. I. (1991). Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis. *J Hepatol* **13 Suppl 3**, S2-7.

Poole, R. K. and Hughes, M. N. (2000). New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol Microbiol* **36**, 775-83.

Potts, M., Angeloni, S. V., Ebel, R. E. and Bassam, D. (1992). Myoglobin in a cyanobacterium. *Science* **256**, 1690-1.

Prabhakar, N. R., Pieramici, S. F., Premkumar, D. R., Kumar, G. K. and Kalaria, R. N. (1996). Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **43**, 341-6.

Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertsob, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. and Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**, 336-341.

Probst, I., Wolf, G. and Schlegel, H. G. (1979). An oxygen-binding flavohemoprotein from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim Biophys Acta* **576**, 471-8.

Qiu, Y., Sutton, L. and Riggs, A. F. (1998). Identification of myoglobin in human smooth muscle. *J Biol Chem* **273**, 23426-32.

Quadrini, K. J. and Bieker, J. J. (2002). Kruppel-like zinc fingers bind to nuclear import proteins and are required for efficient nuclear localization of erythroid Kruppel-like factor. *J Biol Chem* **277**, 32243-52.

Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4003-8.

Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. and Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* **30**, 463-88.

Ramirez-Solis, R., Davis, A. C. and Bradley, A. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* **225**, 855-78.

Ratcliffe, P. J., O'Rourke, J. F., Maxwell, P. H. and Pugh, C. W. (1998). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* **201**, 1153-62.

Raymond, S. and Weintraub, L. (1959). Acrylamid gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**, 711.

Recillas-Targa, F., Bell, A. C. and Felsenfeld, G. (1999). Positional enhancer-blocking activity of the chicken beta-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14354-9.

Reeder, B. J., Svistunenko, D. A., Cooper, C. E. and Wilson, M. T. (2004). The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology. *Antioxid Redox Signal* **6**, 954-66.

Reinhardt, A. and Hubbard, T. (1998). Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res* **26**, 2230-6.

Reuss, S. and Riemann, R. (2000). Distribution and projections of nitric oxide synthase neurons in the rodent superior olivary complex. *Microsc Res Tech* **51**, 318-29.

Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T. and Hankeln, T. (2002). Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience* **115**, 645-56.

- Ribeiro, E. A., Jr., Cunha, F. Q., Tamashiro, W. M. and Martins, I. S.** (1999). Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* **445**, 283-6.
- Richter, G.** (1988). Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Riefler, G. M. and Firestein, B. L.** (2001). Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS. *J Biol Chem* **276**, 48262-8.
- Riggs, A.** (1991). Aspects of the origin and evolution of non vertebrate hemoglobins. *Am. Zool.* **31**, 535-545.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. and Wittwer, C. T.** (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**, 154-160.
- Robinson, J. M. and Lancaster, J. R., Jr.** (2005). Hemoglobin-mediated, hypoxia-induced vasodilation via nitric oxide: mechanism(s) and physiologic versus pathophysiologic relevance. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 257-61.
- Rodrigo, J., Alonso, D., Bentura, M. L., Castro-Blanco, S., Encinas, J. M., Fernandez, A. P., Fernandez-Vizarra, P., Richart, A., Santacana, M., Serrano, J. et al.** (2002). Physiology and pathophysiology of nitric oxide in the nervous system, with special mention of the islands of Calleja and the circumventricular organs. *Histol Histopathol* **17**, 973-1003.
- Rodrigo, J., Alonso, D., Fernandez, A. P., Serrano, J., Richart, A., Lopez, J. C., Santacana, M., Martinez-Murillo, R., Bentura, M. L., Ghiglione, M. et al.** (2001). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* **909**, 20-45.
- 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.
- Roesner, A., Hankeln, T. and Burmester, T.** (2006). Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol* **209**, 2129-37.
- Romero, N., Radi, R., Linares, E., Augusto, O., Detweiler, C. D., Mason, R. P. and Denicola, A.** (2003). Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *J Biol Chem* **278**, 44049-57.
- Roswell, D. F. and White, E. H.** (1978). The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* **57**, 409-423.
- Rüther, U.** (1982). pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. *Nucl. Acids Res.* **10**, 348-353.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Saini, R., Patel, S., Saluja, R., Sahasrabudhe, A. A., Singh, M. P., Habib, S., Bajpai, V. K. and Dikshit, M.** (2006). Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. *J Leukoc Biol* **79**, 519-28.
- Salchner, P., Lubec, G., Engelmann, M., Orlando, G. F., Wolf, G., Sartori, S. B., Hoeger, H. and Singewald, N.** (2004). Genetic functional inactivation of neuronal nitric oxide synthase affects stress-related Fos expression in specific brain regions. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1498-506.
- Salnikow, K., Kluz, T., Costa, M., Piquemal, D., Demidenko, Z. N., Xie, K. and Blagosklonny, M. V.** (2002). The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol* **22**, 1734-41.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain determining inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santini, S., Boore, J. L. and Meyer, A.** (2003). Evolutionary conservation of regulatory elements in vertebrate Hox gene clusters. *Genome Res* **13**, 1111-22.
- Scandurro, A. B. and Beckman, B. S.** (1998). Common proteins bind mRNAs encoding erythropoietin, tyrosine hydroxylase, and vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 436-40.
- Schenkel, J., Zwacka, R. M., Rutenberg, C., Reuter, A., Waldherr, R. and Weiher, H.** (1995). Functional rescue of the glomerulosclerosis phenotype in Mpv17 mice by transgenesis with the human Mpv17 homologue. *Kidney Int* **48**, 80-4.
- Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M. and Johnson, R. S.** (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* **15**, 2865-76.
- Schipper, H. M.** (2004). Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res Rev* **3**, 265-301.
- Schlegel, H. G.** (1992). Allgemeine Mikrobiologie: Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Schmidt-Kastner, R. and Freund, T. F.** (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* **40**, 599-636.
- Schmidt-Kastner, R., Haberkamp, M., Schmitz, C., Hankeln, T. and Burmester, T.** (2006). Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture. *Brain Res* **1103**, 173-80.
- Schmidt, E. R., Vistorin, G. and Keyl, H.-G.** (1980). An AT-rich DNA Component in the Genomes of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. *Chromosoma* **76**, 35-45.
- 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 in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **279**, 8063-9.
- Schmidt, M., Giessl, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U. and Burmester, T.** (2003). How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem* **278**, 1932-5.
- Schmidt, M., Laufs, T., Reuss, S., Hankeln, T. and Burmester, T.** (2005). Divergent distribution of cytoglobin and neuroglobin in the murine eye. *Neurosci Lett* **374**, 207-11.
- Schmidt, R. F. and Thews, G.** (1997). Physiologie des Menschen: Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R. and Kessler, C.** (1991). Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* **192**, 222-31.
- Schoch, S., Cibelli, G. and Thiel, G.** (1996). Neuron-specific gene expression of synapsin I. Major role of a negative regulatory mechanism. *J Biol Chem* **271**, 3317-23.
- Schoenherr, C. J. and Anderson, D. J.** (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* **267**, 1360-3.
- Schoenherr, C. J., Paquette, A. J. and Anderson, D. J.** (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9881-6.
- Schriner, S. E., Ogburn, C. E., Smith, A. C., Newcomb, T. G., Ladiges, W. C., Dolle, M. E., Vijg, J., Fukuchi, K. and Martin, G. M.** (2000). Levels of dna damage are unaltered in mice overexpressing human catalase in nuclei. *Free Radic Biol Med* **29**, 664-73.
- Scott, N. L., Falzone, C. J., Vuletich, D. A., Zhao, J., Bryant, D. A. and Lecomte, J. T.** (2002). Truncated hemoglobin from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002: evidence for hexacoordination and covalent adduct formation in the ferric recombinant protein. *Biochemistry* **41**, 6902-10.

- Scott, N. L. and Lecomte, J. T.** (2000). Cloning, expression, purification, and preliminary characterization of a putative hemoglobin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Protein Sci* **9**, 587-97.
- Semenza, G. L.** (2000). Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* **1**, 159-62.
- Semenza, G. L.** (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 167-71.
- Semenza, G. L.** (2002). Physiology meets biophysics: visualizing the interaction of hypoxia-inducible factor 1 alpha with p300 and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11570-2.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. and 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**, 32529-37.
- Semenza, G. L. and Wang, G. L.** (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**, 5447-54.
- Sen, C. K. and Packer, L.** (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* **10**, 709-20.
- Senner, V., Schmidtpeter, S., Braune, S., Puttmann, S., Thanos, S., Bartsch, U., Schachner, M. and Paulus, W.** (2003). AMOG/beta2 and glioma invasion: does loss of AMOG make tumour cells run amok? *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**, 370-7.
- Seregelyes, C., Igamberdiev, A. U., Maassen, A., Hennig, J., Dudits, D. and Hill, R. D.** (2004). NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants. *FEBS Lett* **571**, 61-6.
- Seregelyes, C., Mustardy, L., Ayaydin, F., Sass, L., Kovacs, L., Endre, G., Lukacs, N., Kovacs, I., Vass, I., Kiss, G. B. et al.** (2000). Nuclear localization of a hypoxia-inducible novel non-symbiotic hemoglobin in cultured alfalfa cells. *FEBS Lett* **482**, 125-30.
- Shang, A., Zhou, D., Wang, L., Gao, Y., Fan, M., Wang, X., Zhou, R. and Zhang, C.** (2006). Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults. *Brain Res* **1078**, 219-26.
- Shelver, D., Kerby, R. L., He, Y. and Roberts, G. P.** (1997). CooA, a CO-sensing transcription factor from *Rhodospirillum rubrum*, is a CO-binding heme protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11216-20.
- Shikama, K.** (2006). Nature of the FeO₂ bonding in myoglobin and hemoglobin: A new molecular paradigm. *Prog Biophys Mol Biol* **91**, 83-162.
- Shimojo, M., Lee, J. H. and Hersh, L. B.** (2001). Role of zinc finger domains of the transcription factor neuron-restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor in DNA binding and nuclear localization. *J Biol Chem* **276**, 13121-6.
- Siqueira, I. R., Fochesatto, C., de Andrade, A., Santos, M., Hagen, M., Bello-Klein, A. and Netto, C. A.** (2005). Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci* **23**, 663-71.
- Skulachev, V. P.** (2000). Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". *IUBMB Life* **49**, 365-73.
- Sokoloff, L.** (1981). The deoxyglucose method for the measurement of local glucose utilization and the mapping of local functional activity in the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* **22**, 287-333.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K. D., Sakurada, O. and Shinohara, M.** (1977). The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* **28**, 897-916.

- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Sowa, A. W., Duff, S. M. G., Guy, P. A. and Hill, R. D.** (1998). Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10317-21.
- Stamler, J. S., Jia, L., Eu, J. P., McMahon, T. J., Demchenko, I. T., Bonaventura, J., Gernert, K. and Piantadosi, C. A.** (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* **276**, 2034-7.
- Strachan, T. and Read, A. P.** (2005). Molekulare Humangenetik 3. Auflage. *Elsevier Spektrum Akademischer Verlag*.
- Struhl, K.** (1991). Mechanisms for diversity in gene expression patterns. *Neuron* **7**, 177-81.
- Stryer, L.** (1995). Biochemie: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Stuermer, C. A., Lang, D. M., Kirsch, F., Wiechers, M., Deininger, S. O. and Plattner, H.** (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell* **12**, 3031-45.
- Sun, J., Folk, D., Bradley, T. J. and Tower, J.** (2002). Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **161**, 661-72.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Xie, L., Peel, A., Childs, J. T., Logvinova, A., Wang, X. and Greenberg, D. A.** (2005). Effect of aging on neuroglobin expression in rodent brain. *Neurobiol Aging* **26**, 275-8.
- Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y. and Greenberg, D. A.** (2001). Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15306-11.
- Sun, Y., Jin, K., Peel, A., Mao, X. O., Xie, L. and Greenberg, D. A.** (2003). Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3497-500.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J. and Sevanian, A.** (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* **22**, 269-85.
- Svistunenko, D. A.** (2005). Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: the radical view. *Biochim Biophys Acta* **1707**, 127-55.
- Svistunenko, D. A. and Cooper, C. E.** (2004). A new method of identifying the site of tyrosyl radicals in proteins. *Biophys J* **87**, 582-95.
- Takagi, T., Iwaasa, H., Yuasa, H., Shikama, K., Takemasa, T. and Watanabe, Y.** (1993). Primary structure of Tetrahymena hemoglobins. *Biochim Biophys Acta* **1173**, 75-8.
- Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T. and Miura, T.** (2000). Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem* **275**, 14139-46.
- Tandara, A. A. and Mustoe, T. A.** (2004). Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg* **28**, 294-300.
- Tateaki, Y., Ogawa, T., Kawada, N., Kohashi, T., Arihiro, K., Tateno, C., Obara, M. and Yoshizato, K.** (2004). Typing of hepatic nonparenchymal cells using fibulin-2 and cytoglobin/STAP as liver fibrogenesis-related markers. *Histochem Cell Biol* **122**, 41-9.
- Taylor, E. R., Nie, X. Z., MacGregor, A. W. and Hill, R. D.** (1994). A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* **24**, 853-62.
- te Riele, H., Maandag, E. R. and Berns, A.** (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5128-32.
- Thiel, G., Lietz, M. and Cramer, M.** (1998). Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J Biol Chem* **273**, 26891-9.
- Thomas, D. D., Espey, M. G., Vitek, M. P., Miranda, K. M. and Wink, D. A.** (2002). Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: an alternative to the NO/O₂- reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12691-6.

- Thomas, J. W. and Touchman, J. W.** (2002). Vertebrate genome sequencing: building a backbone for comparative genomics. *Trends Genet* **18**, 104-8.
- Thomas, K. R., Deng, C. and Capecchi, M. R.** (1992). High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol* **12**, 2919-23.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Trent, J. T., 3rd and Hargrove, M. S.** (2002). A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem* **277**, 19538-45.
- Trent, J. T., 3rd, Watts, R. A. and Hargrove, M. S.** (2001). Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen. *J Biol Chem* **276**, 30106-10.
- Tsay, H. J., Wang, P., Wang, S. L. and Ku, H. H.** (2000). Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. *J Biomed Sci* **7**, 466-74.
- Tsuruga, M., Matsuoka, A., Hachimori, A., Sugawara, Y. and Shikama, K.** (1998). The molecular mechanism of autoxidation for human oxyhemoglobin. Tilting of the distal histidine causes nonequivalent oxidation in the beta chain. *J Biol Chem* **273**, 8607-15.
- Tybulewicz, V. L., Crawford, C. E., Jackson, P. K., Bronson, R. T. and Mulligan, R. C.** (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* **65**, 1153-63.
- Uno, T., Ryu, D., Tsutsumi, H., Tomisugi, Y., Ishikawa, Y., Wilkinson, A. J., Sato, H. and Hayashi, T.** (2004). Residues in the distal heme pocket of neuroglobin. Implications for the multiple ligand binding steps. *J Biol Chem* **279**, 5886-93.
- van der Loo, B., Bachschmid, M., Labugger, R., Schildknecht, S., Kilo, J., Hahn, R., Palacios-Callender, M. and Luscher, T. F.** (2005). Expression and activity patterns of nitric oxide synthases and antioxidant enzymes reveal a substantial heterogeneity between cardiac and vascular aging in the rat. *Biogerontology* **6**, 325-34.
- Van Doorslaer, S., Dewilde, S., Kiger, L., Nistor, S. V., Goovaerts, E., Marden, M. C. and Moens, L.** (2003). Nitric oxide binding properties of neuroglobin. A characterization by EPR and flash photolysis. *J Biol Chem* **278**, 4919-25.
- van Holde, K. E. and Miller, K. I.** (1995). Hemocyanins. *Adv Protein Chem* **47**, 1-81.
- Vaughn, M. W., Huang, K. T., Kuo, L. and Liao, J. C.** (2000). Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem* **275**, 2342-8.
- Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L. and Vanfleteren, J. R.** (2006). A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol Biol* **6**, 31.
- Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Guertin, M., Gough, J., Dewilde, S., Moens, L. and Vanfleteren, J. R.** (2005). Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11385-9.
- Vogt, M., Puntschart, A., Geiser, J., Zuleger, C., Billeter, R. and Hoppeler, H.** (2001). Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* **91**, 173-82.
- Waggoner, S. A. and Liebhaber, S. A.** (2003). Regulation of alpha-globin mRNA stability. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 387-95.
- Wakasugi, K. and Morishima, I.** (2005a). Identification of residues in human neuroglobin crucial for Guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochemistry* **44**, 2943-8.
- Wakasugi, K. and Morishima, I.** (2005b). Preparation and characterization of a chimeric zebrafish-human neuroglobin engineered by module substitution. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 591-7.

- Wakasugi, K., Nakano, T., Kitatsuji, C. and Morishima, I.** (2004a). Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 453-60.
- Wakasugi, K., Nakano, T. and Morishima, I.** (2003). Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem* **278**, 36505-12.
- Wakasugi, K., Nakano, T. and Morishima, I.** (2004b). Association of human neuroglobin with cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor. *Biochemistry* **43**, 5119-25.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L.** (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-4.
- Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y. and Holbrook, N. J.** (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* **333** (Pt 2), 291-300.
- Ward, M. E., Toporsian, M., Scott, J. A., Teoh, H., Govindaraju, V., Quan, A., Wener, A. D., Wang, G., Bevan, S. C., Newton, D. C. et al.** (2005). Hypoxia induces a functionally significant and translationally efficient neuronal NO synthase mRNA variant. *J Clin Invest* **115**, 3128-39.
- Wasserman, W. W., Palumbo, M., Thompson, W., Fickett, J. W. and Lawrence, C. E.** (2000). Human-mouse genome comparisons to locate regulatory sites. *Nat Genet* **26**, 225-8.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P. et al.** (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-62.
- Weber, M., Moller, K., Welzeck, M. and Schorr, J.** (1995). Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells. *Biotechniques* **19**, 930-40.
- Weber, R. E. and Vinogradov, S. N.** (2001). Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* **81**, 569-628.
- Wehner, R. and Gehring, W.** (1995). Zoologie. **23. Auflage.**
- Wenger, R. H.** (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* **16**, 1151-62.
- Wenger, R. H.** (2006). Mitochondria: oxygen sinks rather than sensors? *Med Hypotheses* **66**, 380-3.
- Wilson, A. C., Carlson, S. S. and White, T. J.** (1977). Biochemical evolution. *Annu Rev Biochem* **46**, 573-639.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I. and Schacherer, F.** (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* **21**, 316-319.
- Wittbrodt, J., Shima, A. and Schartl, M.** (2002). Medaka--a model organism from the far East. *Nat Rev Genet* **3**, 53-64.
- Wittenberg, B. A., Briehl, R. W. and Wittenberg, J. B.** (1965). Haemoglobins of invertebrate tissues. Nerve haemoglobins of *Aphrodite*, *Aplysia* and *Halosydna*. *Biochem J* **96**, 363-71.
- Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B.** (1987). Myoglobin-mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7503-7.
- Wittenberg, B. A. and Wittenberg, J. B.** (1989). Transport of oxygen in muscle. *Annu Rev Physiol* **51**, 857-78.
- Wittenberg, J. B., Bolognesi, M., Wittenberg, B. A. and Guertin, M.** (2002). Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* **277**, 871-4.
- Wittenberg, J. B. and Wittenberg, B. A.** (2003). Myoglobin function reassessed. *J Exp Biol* **206**, 2011-20.

- Wong-Riley, M. T.** (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* **12**, 94-101.
- Wozniak, A., Drewa, G., Wozniak, B. and Schachtschabel, D. O.** (2004). Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of different ages, both healthy and melanoma-bearing. *Z Gerontol Geriatr* **37**, 184-9.
- Wu, G., Wainwright, L. M. and Poole, R. K.** (2003). Microbial globins. *Adv Microb Physiol* **47**, 255-310.
- Wu, H.** (1923). Studies on hemoglobin. III. An ultra-micro-method for the determination of hemoglobin as peroxidase. *J. Biochem.* **2**, 189-194.
- Wunderlich, C., Flogel, U., Godecke, A., Heger, J. and Schrader, J.** (2003). Acute inhibition of myoglobin impairs contractility and energy state of iNOS-overexpressing hearts. *Circ Res* **92**, 1352-8.
- Wystub, S.** (2000). Molekularbiologische Charakterisierung des Neuroglobins in der Maus und vergleichende Analyse im Menschen. *Diplomarbeit*.
- Wystub, S., Ebner, B., Fuchs, C., Weich, B., Burmester, T. and Hankeln, T.** (2004). Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet Genome Res* **105**, 65-78.
- Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T. and Reuss, S.** (2003). Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci Lett* **346**, 114-6.
- Xu, W. L., Wang, C. L., Liao, Z. Y., Zhang, Y. L., Yu, L. H., Meng, F. W., Wang, X. X., Meng, F. W., Yin, Z. Y., Qian, L. J. et al.** (2003). [Identification of interaction and interaction domains between neuroglobin and Na(+), K(+)-ATPase beta2 subunit]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **35**, 823-8.
- Yamashita, K., Discher, D. J., Hu, J., Bishopric, N. H. and Webster, K. A.** (2001). Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem* **276**, 12645-53.
- Yen, E. H., Sodek, J. and Melcher, A. H.** (1979). The effect of oxygen partial pressure on protein synthesis and collagen hydroxylation by mature periodontal tissues maintained in organ cultures. *Biochem J* **178**, 605-12.
- Yu, A. Y., Frid, M. G., Shimoda, L. A., Wiener, C. M., Stenmark, K. and Semenza, G. L.** (1998). Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* **275**, L818-26.
- Yu, H. S., Saw, J. H., Hou, S., Larsen, R. W., Watts, K. J., Johnson, M. S., Zimmer, M. A., Ordal, G. W., Taylor, B. L. and Alam, M.** (2002). Aerotactic responses in bacteria to photoreleased oxygen. *FEMS Microbiol Lett* **217**, 237-42.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M.** (1997). Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* **2**, 300-10.
- Zarchin, N., Meilin, S., Rifkind, J. and Mayevsky, A.** (2002). Effect of aging on brain energy-metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **132**, 117-20.
- 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**, 1411-9.
- Zhu, H. and Riggs, A. F.** (1992). Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5015-9.

6.1 Veröffentlichungen

The cellular and subcellular localization of neuroglobin and cytoglobin -- a clue to their function?

Hankeln T, Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Gerlach F, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Burmester T.

IUBMB Life. 2004 Nov-Dec;56(11-12):671-9.

Neuroglobin and cytoglobin are recently discovered respiratory proteins of vertebrates with yet ill-defined physiological functions. Neuroglobin is widely expressed in neurons, but not glia, in the vertebrate central and peripheral nervous systems. Other major expression sites are the retina and endocrine tissues. This distribution is indicative of a function of neuroglobin in metabolically most active, oxygen-consuming cell types, but does not yet allow to safely distinguish between different cellular roles, such as oxygen homeostasis, scavenging of reactive oxygen species or sustaining energy metabolism. Cytoglobin is predominantly expressed in connective tissue fibroblasts and related cell types in the body organs. Its main function may therefore be related to the specific amounts of extracellular matrix. Cytoglobin may hypothetically be involved in the oxygen-consuming maturation of collagen proteins. Cytoglobin is also expressed in distinct cell types of brain and retina. Its distribution strikingly differs from neuroglobin, suggesting an independent, yet unknown function.

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

Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, 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.

J Inorg Biochem. 2005 Jan;99(1):110-9.

Neuroglobin and cytoglobin are two recent additions to the family of heme-containing respiratory proteins of man and other vertebrates. Here, we review the present state of knowledge of the structures, ligand binding kinetics, evolution and expression patterns of these two proteins. These data provide a first glimpse into the possible physiological roles of these globins in the animal's metabolism. Both, neuroglobin and cytoglobin are structurally similar to myoglobin, although they contain distinct cavities that may be instrumental in ligand binding. Kinetic and structural studies show that neuroglobin and cytoglobin belong to the class of hexa-coordinated globins with a 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.

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

Wystub S, Ebner B, Fuchs C, Weich B, Burmester T, Hankeln T.

Cytogenet Genome Res. 2004;105(1):65-78.

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

Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals.

Laufs TL, Wystub S, Reuss S, Burmester T, Saaler-Reinhardt S, Hankeln T.

Neurosci Lett. 2004 May 20;362(2):83-6.

Neuroglobin, a vertebrate oxygen-binding protein, is expressed in many regions of the adult brain. We examined the cell type-specific expression of neuroglobin in neurons and astroglial cells in primary cultures of fetal hippocampal cells and sections of the adult mouse brain using neuroglobin-specific polyclonal antibodies and cell type-specific markers NeuN and GFAP to differentiate between neurons and glial cells. Neuroglobin is exclusively expressed in neurons, but not in astroglial cells. Accordingly, neuroglobin was detected in two neuroblastoma cell lines (N2a, SH-SY5Y) and the pheochromocytoma cell line PC-12, but not in glioblastoma cell lines (DKMG, GAMG) or other, non-neural cells (HeLa, Vero). Analysis of the neuroglobin genomic sequence from man and mouse identifies sequence motifs with similarity to the neuron-restrictive silencer element, possibly explaining a neuron-specific expression of neuroglobin.

Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia.

Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, Nevo E, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Hankeln T, Burmester T.

J Biol Chem. 2004 Feb 27;279(9):8063-9.

Cytoglobin is a recently discovered vertebrate globin distantly related to myoglobin, and its function is unknown. Here we present the first detailed analysis of the distribution and expression of cytoglobin. Northern and Western blotting experiments show the presence of cytoglobin mRNA and protein in a broad range of tissues. Quantitative PCR demonstrates an up-regulation of cytoglobin mRNA levels in rat heart and liver under hypoxic conditions (22 and 44 h of 9% oxygen). Immunofluorescence studies with three antibodies directed against different epitopes of the protein consistently show cytoglobin in connective tissue fibroblasts as

well as in hepatic stellate cells. Cytoglobin is also present in chondroblasts and osteoblasts and shows a decreased level of expression upon differentiation to chondrocytes and osteocytes. Cytoglobin is located in the cytoplasm of these cell types. Evidence against an exclusively nuclear localization of cytoglobin, as recently proposed, is also provided by transfection assays with green fluorescent protein fusion constructs, which demonstrates the absence of an active nuclear import. The differential expression of cytoglobin argues against a general respiratory function of this molecule, but rather indicates a connective tissue-specific function. We hypothesize that cytoglobin may be involved in collagen synthesis. Cytoglobin expression was also observed in some neuronal subpopulations of the central and the peripheral nervous systems. Surprisingly, cytoglobin is localized in both the cytoplasm and nucleus of neurons, indicating a possible additional role of this protein in neuronal tissues.

Localization of neuroglobin protein in the mouse brain.

Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Burmester T, Maas U, Saaler-Reinhardt S, Hankeln T, Reuss S. *Neurosci Lett*. 2003 Jul 31;346(1-2):114-6.

Neuroglobin is a recently discovered vertebrate oxygen-binding respiratory protein. In situ hybridization data demonstrated that neuroglobin-mRNA is widely expressed in neuronal cells of the central and peripheral nervous systems as well as in endocrine cells. The present study was conducted to investigate the presence of neuroglobin protein in neurons of the mouse brain. A polyclonal antibody directed against a synthetic peptide of neuroglobin was raised in rabbits and affinity-purified. The specificity of the antibody was demonstrated by ELISA and preabsorption tests. We report here for the first time that neuroglobin is expressed on the protein level in many brain sites including cerebral cortical regions, subcortical structures such as thalamus and hypothalamus, nuclei of cranial nerves in the brainstem and cerebellum. Thus, the widespread distribution of neuroglobin protein is in good agreement with its mRNA localization. Regionally differing intensities of immunostaining suggest different levels of neuroglobin protein expression, in line with the idea that brain regions show variation in their tolerance towards hypoxic conditions.

Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues.

Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss MH, Burmester T, Hankeln T. *Neuroscience*. 2002;115(3):645-56.

Neuroglobin is a respiratory protein which was reported to be preferentially expressed in the vertebrate brain. Here we present the first detailed analysis of the expression of neuroglobin in mouse and rat tissues. Neuroglobin mRNA was detected in all brain areas studied. Most, but not all, nerve cells were labeled, suggesting differential expression of Ngb. Neuroglobin mRNA was detected in the peripheral nervous system, explaining previous northern hybridization signals in organs other than the brain. Substantial neuroglobin expression was also found in metabolically active endocrine tissues such as the adrenal and pituitary glands. The granule localization of neuroglobin transcripts in various neuronal extensions let us speculate that peripheral translation of neuroglobin protein occurs. This could have important functional consequences for synaptic plasticity, an active metabolic process that needs large amounts of oxygen. The hybridization signals suggest that the local concentration of neuroglobin is sufficient for its putative primary function as an oxygen-supplying protein.

7 Anhang

1- und 3- Buchstabencode der Aminosäuren

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

7.1 Verwendete Oligonukleotide

MmuCyGBinsfor	TGGAGATAGAGCGTAGGGAGAG
MmuCyGBinsfor+T7	CAGAGATGCATAATACGACTCACTATAGGGAGATGGAGATAGAGCGTAGGGAGAG
MmuCyGBinsrev	CCTGAAGAGGGCAGAGTGG
MmuCyGBinsrev+T7	CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTGAAGAGGGCAGAGTGG
mmuCygb-ISH-as1	GAGGATACCTTGTCTGGGTCATGCAGGTTCTCCACGACAG
mmuCygb-ISH-as2	ACTTCCTTGTAGGCTGCGGTCACGTGGCTGTAGATGAGAC
mmuCygb-ISH-sense2	GTCTCATCTACAGCCACGTGACCGCAGCCTACAAGGAAGT
mmuMyoCDSfor	CAGCTGGTGCTGAATGTCTG
mmuMyoCDSfor+T7	CAGAGATGCATAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCTGGTGCTGAATGTCTG
mmuMyoCDSrev	CTGGAAGCCTAGCTCCTTGT
mmuMyoCDSrev+T7	CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGAAGCCTAGCTCCTTGT
mmuMyoEx2for	CTCACCTGAGACCCTGGAT
mmuMyoEx2for+T7	CAGAGATGCATAATACGACTCACTATAGGGAGACTCACCTGAGACCCTGGAT
mmuMyoEx2rev	GGTACTTGACCGGATCTTG
mmuMyoEx2rev+T7	CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTACTTGACCGGATCTTG
mmuNgb2FX	TGGAACATGGCACTGTCCTGTT
mmuNgb5R-SP6	CCAAGCCTTCATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCTGCTCTACATGCTGGAGA
NgbISHdegF	GAGCTGATCCGGCAGAGCTGG
NgbISHdegF+T7	CAGAGATGCAATAACGACTCACTATAGGGAGAGAGCTGATCCGGCAGAGCTGG
NgbISHdegR	ACTGTCGAGAAGGAGCTGAGCC
NgbISHdegR+SP6	CCAAGCCTTCATTTAGGTGACACTATAGAAGAGACTGTCGAGAAGGAGCTGAGCC

Tabelle 7-1 Sonden für *in situ*-Hybridisierungen

Actin_p2for	CCAGACAGCACTGTGTTG
Actin_p3rev	CTGAGAGGGAAATCGTGC
ARPfor	AATCCCTGACGCACCG
ARPrev	AGCTGCACATCACTCAG
Calm1CDSfor	ATGGCTGATCAGCTGAC
Calm1CDSrev	TCATTTTGCAGTCATCATC
C4CDSfor	ATGMGGCTSCTCTGGGG
C4CDSfor2	TCCTTCGTACCTACAATG
C4CDSrev	TCACACCTGGCACCC
C4CDSrev1	TGAGATCTTCCAGGTCC
C4CDSrev2	TTCCCATAGATGTACCTG
CygbCDSfor	ATGGAGAAAGTGCCAGGCGAGATG
CygbCDSrev	GTCGGCCCCGAAGAGGGCAGTGTG
MMuGlobXBam HI	TCGCGGATCCTTACGGCCCTGAAGAGGGCAGA
MMuGlobXNdel	TCGCCATATGGAGAAAGTGCCGGGCGACATG
GAPDH_CDS_for_deg	AWGGTGAAGGTCGGWGTG
GAPDH_CDS_rev	TTACTCCTTGGAGGCCATG
NgbCDSfor	ATGGAGCGCCCGGAGCCGAGCTG
NgbCDSrev	CGCTCGCCATCCAGCCTCGACT
mmuNgb2FX	TGGAACATGGCACTGTCCTGTT
mmuNgb4RX	TCGCCTCTTACTCGCCATCCAGCCTCG
mmuNgb4R	AGCCGAGGCTGGGATGGGGAGT
NSEfor	ATGCAGGAGTTCATGATC
NSErev	GCRCCAGTCTTGATCTG

Tabelle 7-2 RT-PCT

Pho5'RACE	AAGGAGCTGAGCCTCAC
Pho5'RACE_Nested	CCTTCCTAATGTGGTC
Pho3'RACE	TTCCAGTACAATGGCCG
Pho3'RACE_Nested	TTCCTGGACCACATTAGG
PhoCygb5'RACEnested	TCGGACAGCTCCTCGCTC
mmuCgb1	CAAGCAGTACTTCAGCCAGT

Tabelle 7-3 *Phodopus sungorus* RACE

PhoQ-PCRActinfor	CAGGTCATCACTATTGGCAATG
PhoQ-PCRActinrev	TGTAGTTTCGTGGATGCCACAG
Q-PCR_ARP_for	AGGGCGACCTGGAAGTCC
Q-PCR_ARP_rev	GCATCTGCTTGGAGCCCA
PhoQ-PCRARPrev	GCATCTGCTTCGAGCCCA
PhoQ-PCRCalm1for	TCATGAGGTCACTGGGTGAG
PhoQ-PCRCalm1rev	TGGGAAGTCAATGGTGCCG
PhoQ-PCRC4for_nest	AAGCCCAGGCTGCTCCTG
PhoQ-PCRC4rev	TGTCCTGGAGGGGCATCC
Q-PCR_Cygb_for	CCAACTGCGAGGACGTGG
Q-PCR_Cygb_rev	ACTGGCTGAAGTACTGCTTGGC
PhoQ-PCR_Cygb_rev2	ACCTTGCTCTGGGTGATGAG
Cygb-Sonde-VIC	VIC-CTGGTGAGGTTCTTTGTG-Dark Quencher
GapDhμus for	CCATCACCATCTTCCAGGAG
GapDhμus rev	TTTCTCGTGGTTCACACCC
PhoGAPDHQ-PCRfor	TGCACTACCAACTGCTTAGC
PhoGAPDHQ-PCRrev	TGATGGCATGGACGGTGG
Q-PCR_Ngb_for_deg	GAAGCAYCGGGCAGTG
Q-PCR_Ngb_rev_deg	AGRCACYTCTCCAGCATGTASAG
PhoQ-PCR_Ngb_for	GAAGCACCGGGTTGTGG
PhoQ-PCR_Ngb_for2	CCTGGACCACATTAGGAAGG
Q-PCR_NSE_for	ACAAGGCTGGCTACACGG
Q-PCR_NSE_rev	ATGGGTCTTCAATGGAGACC

Tabelle 7-4 Realtime Q-PCR

T7	TAATACGACTCACTATAGGG
sp6	ACCTTATGTATCATACACAT

Tabelle 7-5 Standard Primer

pBI-EGFP-MCS_SeqFor2	TCGAGTAGGCGTGTACGG
pBI-EGFP-MCS_SeqRev	GGTGATACAAGGGACATC
transgen_mmuCygbfor	TACGACGCGTCGACCATGGAGAAAGTGCCGGGCGAC
transgen_mmuCygbrev	GCTAGCTAGCTAGTTACGGCCCTGAAGAGGGCAG
transgen_mmuNgbfor	TACGACGCGTCGACCATGGAGCGCCCGGAGTCAGAG
transgen_mmuNgbrev	GCTAGCTAGCTAGTTACTCCCCATCCCAGCCTCG
EGFP-Primer 1	CTCAAGTTCATCTGCACCACC
EGFP-Primer 2	CGTTCTTCTGCTTGTGCGCC

Tabelle 7-6 Neuroglobin und Cytoglobin transgen-Konstrukte

pPNT	
pPNT5'Neo	AGCCGATTGTCTGTTGTGCCC
pPNT5'Neo-Nested	AGTCATAGCCGAATAGCCTC
pPNT3'Neo	GATTCGACGCGCATCGCCTT
pPNTrev	CCCCATCCCGGTAGAATTC
5'Neofor	ATCGGCCATTGAACAAGATG
3'Neorev	AATATCACGGGTAGCCAACG
Ngb-ko-Konstrukt 1	
mmuNgb-ko_1a)Kontrolle (NotI)	AGTGCGGCCGCTGCTCAGATGTCATTGAGGAGAG
mmuNgb-ko/1b)Kontrolle (NotI)	AGTGCGGCCGCTCTGTGTACTCTACATCTAACATG
mmuNgb-ko_1 kurzer Arm (NotI)	AGTGCGGCCGCCACTACTCCAGCTCTGTGTATGTG
mmuNgb-ko_2R kurzer Arm	ACAGGACAGTGCCATGTTCCAGAG
mmuNgb-ko_3 langer Arm (Bam HI)	AGTGGATCCCAGATCTGCAGATCATTGTCTTAG
mmuNgb-ko_4R neu	CATGTGGCTATCCTGAGATCCGTG
mmuNgb-ko_5_Sonde 1=1b)Kontrolle	TCTGTGTACTCTACATCTAACATG
mmuNgb-ko_6R_Sonde 1	ACGTAGTTCAGGTAGGTCCTGTGT
mmuNgb-ko_7_Sonde 2	AGATCCAGTTTTCTCTGGGCACAC
mmuNgb-ko_8R_Sonde 2	GTACGTGTCATGGTGCTTCTTCAT
mmuNgb-ko_Test-PCR1	CTCCTCAGTACTGGGATTAGAC
mmuNgb-ko_SeqF1.1	TCTAGCTGAACTCTAGAG
mmuNgb-SeqF2.1	ATGCTGAACCAAGAGCAC
mmuNgb-SeqF2.2	TGACAGGTGATGCTAGTG
mmuNgb-SeqF2.3	TACTTGTGACCACCTCAG
Ngb-ko-Konstrukt 2	
Ngbko2-P1+Eco	GAATTCTGCATGTGCGTTGACTGCAC
Ngbko2-P2R+Bam	GGATCCAGTGGGTATCAGAATCTGG
Ngbko2-P3	TTGGCATCAGTTGGTTTGGTCAGC
Ngbko2-P4.1R+Not	GCGGCCGACAAACGTGCAGTCCAGCATCACTC
Ngbko2-P4.2R+Not	GCGGCCGAGTGCCTATCAACAGCATTGCATC
Ngbko2-P4.3R+Not	GCGGCCGAGTGGTATCTAAAGCCCAGGACAC
Ngbko2-P4.4R+Not	GCGGCCGAATAGGATCGCTCTCGCTGCTAGG
Ngb-ko-Konstrukt 3	
mmu-ko3-Test_PCR	TTACTCCTTGGAGGCCATG
mmu-ko3-posK+Eco	√GAATTCTGCCCAATGCCACTGAAGAATGCC
mmu-ko3-P1.1+Not	ATAAGAATGCGGCCGCAAGAGCAACCCATTGCCCATCTG
mmu-ko3-P1.2+Not	ATAAGAATGCGGCCGCTTCCACCACTACTTCCCAGCCATG
mmu-ko3-P1.3+Not	√GCGGCCGCTTACAGAGCCACTGAGTCAGAGC
mmu-ko3-P2R	TCTGCCGGATCAGCTCTGACTC
mmu-ko3-P3+Bam	√GGATCCTAGTAAGCAGGTAGGACTGTGC
mmu-ko3-P4R+Eco	√GAATTCGGCTAAGACTACAACAGGCAGATC
mmu-ko3-F2+F3Sonde	TTCTGCCTCTCAAGGCTG
mmu-ko3-F2-Sonderev	AGCCTTGCCACTGCTGACG
mmu-ko3-F3-Sonderev	TTCCACCGCATGTATCC
mmu-ko3-Sonde1-for	TAACTCACACCTAGTGG
ko3Sonde2for	ATACCTTGGTCTCATCC
ko3Sonde2rev	ATGCCACTGAAGAATGCC
317xl	CAAGTTGGTACACACTAAGTCCTCTTCCTG
377xl	TTAGTTCTGGTTGTGGAGATGCTTCCTTC
√ Basen zur Stabilisierung der Schnittstellen fehlen!	

Tabelle 7-7 Neuroglobin-knock out-Konstrukte

7.2 Verwendete Antikörper

Antikörper	gegen	Firma	Immunfluoreszenzen	Western Blot
anti-Ngb-N-Antikörper TB1 polyklonal aus Kaninchen	Mmu Peptid 55-70	Eurogentec, Belgien	1:50 über Nacht RT	1:500 über Nacht 4°C
Anti-Ngb-Antikörper TB5a polyklonal aus Kaninchen	Mmu Peptid 46-61	SeqLab Göttingen	1:50 über Nacht RT	
Anti-Ngb-Antikörper TB5b polyklonal aus Kaninchen	Mmu Peptid 93-107	SeqLab Göttingen	1:50 über Nacht RT	
Anti-Ngb-Antikörper TB7 polyklonal aus Kaninchen	Mmu Peptid 55-70	Eurogentec, Belgien	1:50 über Nacht RT	
anti-Cygb1-N-Antikörper polyklonal aus Kaninchen	Hsa Peptid 2-16	Eurogentec, Belgien	1:200 über Nacht RT	1:500 über Nacht 4°C
anti-Cygb2-M-BC-Antikörper polyklonal aus Kaninchen	Hsa Peptid 66-80	Eurogentec, Belgien	1:200 über Nacht RT	
anti-Cygb3-V-CD-Antikörper polyklonal aus Kaninchen	Hsa Peptid 92-106	Eurogentec, Belgien	1:200 über Nacht RT	
anti-Cygb4-C-Antikörper polyklonal aus Kaninchen	Hsa Peptid 175-190	Eurogentec, Belgien	-	
Anti-nNOS Antikörper polyklonal aus Schaf	Rno Peptid 1409-1429	Chemicon	1:500 über Nacht RT	
Anti-nNOS Antikörper polyklonal aus Kaninchen	Rno Peptid C-terminal	Progen Biotechnik	1:500 über Nacht RT	
Anti-NPY Antikörper polyklonal aus Kaninchen	Peptid	Amarsham, UK	1:1000 über Nacht RT	
Anti-Actin-Antikörper monoklonal aus Kaninchen	C11 Peptid	Sigma, USA		1:1000 1Std. RT

Tabelle 7-8 Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Immunfluoreszenzen	Western Blot
Cy3-markierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg	1:100 1,5 Std. RT	
Cy2-markierter anti-Schaf-IgG-Antikörper	Jackson ImmunoResearch, PA	1:100 1,5 Std. RT	
FITC-markierter anti-Kaninchen IgG-Antikörper	Dianova, Hamburg	1:200 6 Std. RT	
Unmarkierter anti-Kaninchen AK IgG	Dianova, Hamburg	1:100 2 Std. RT	
HRP konjugierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Amersham Biosciences, Freiburg		1:3000 1Std. RT
HRP konjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper	Amersham Biosciences, Freiburg		1:5000 1Std. RT
AP-konjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper	Sigma, USA		1:10000 1Std. RT

Tabelle 7-9 Sekundäre Antikörper

7.3 Verwendete Plasmidvektoren

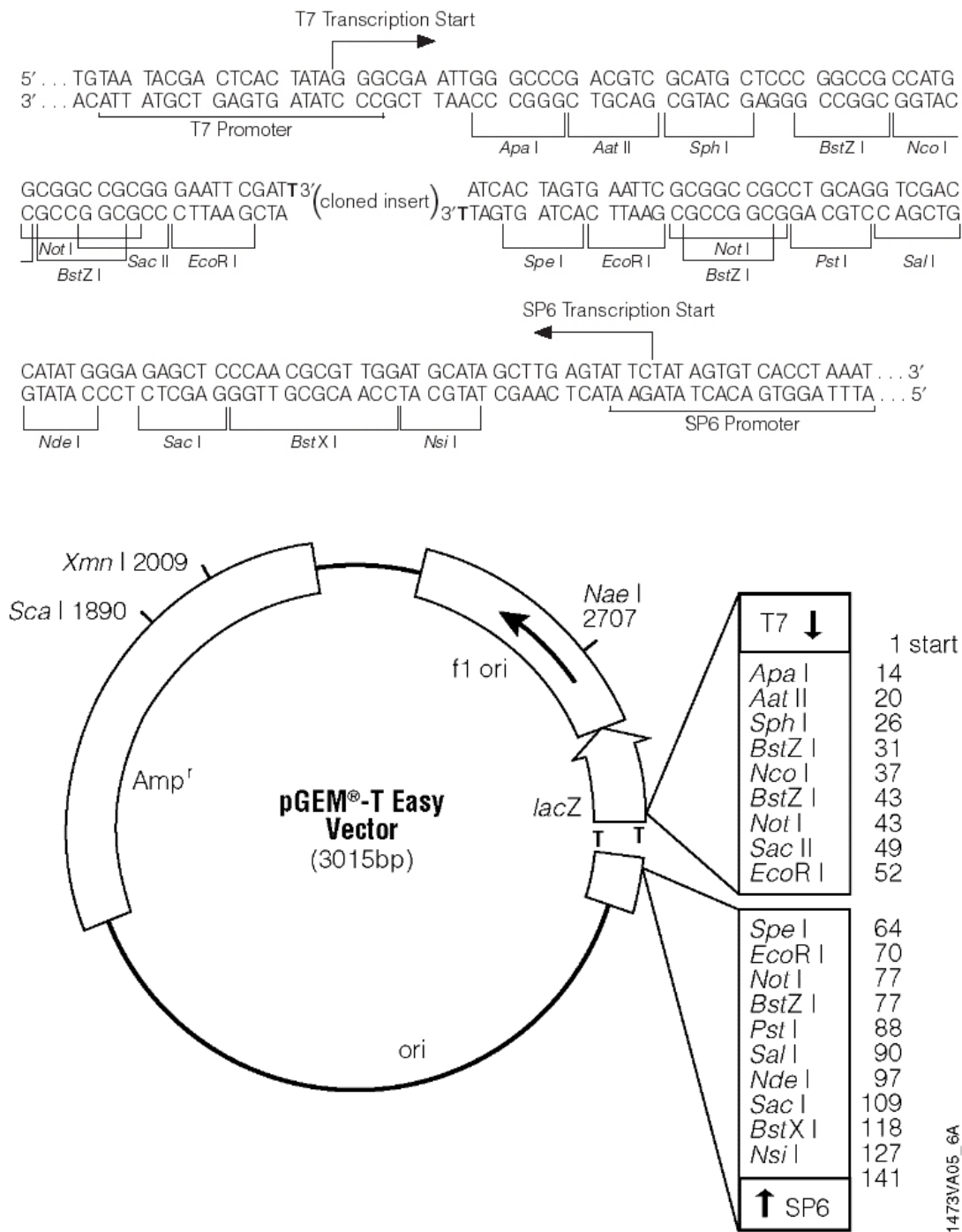


Abbildung 7-1 pGEM[®]-T Easy-Plasmidvektor (Promega, Mannheim)

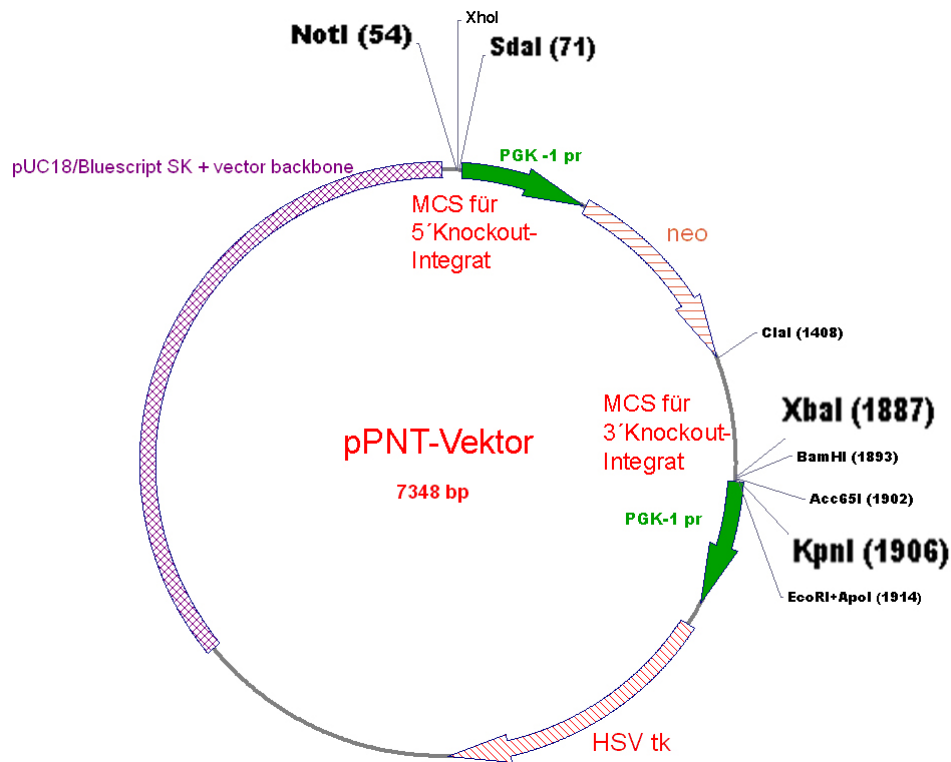


Abbildung 7-2 pPNT-Plasmidvektor (Tybulewicz et al. 1991)

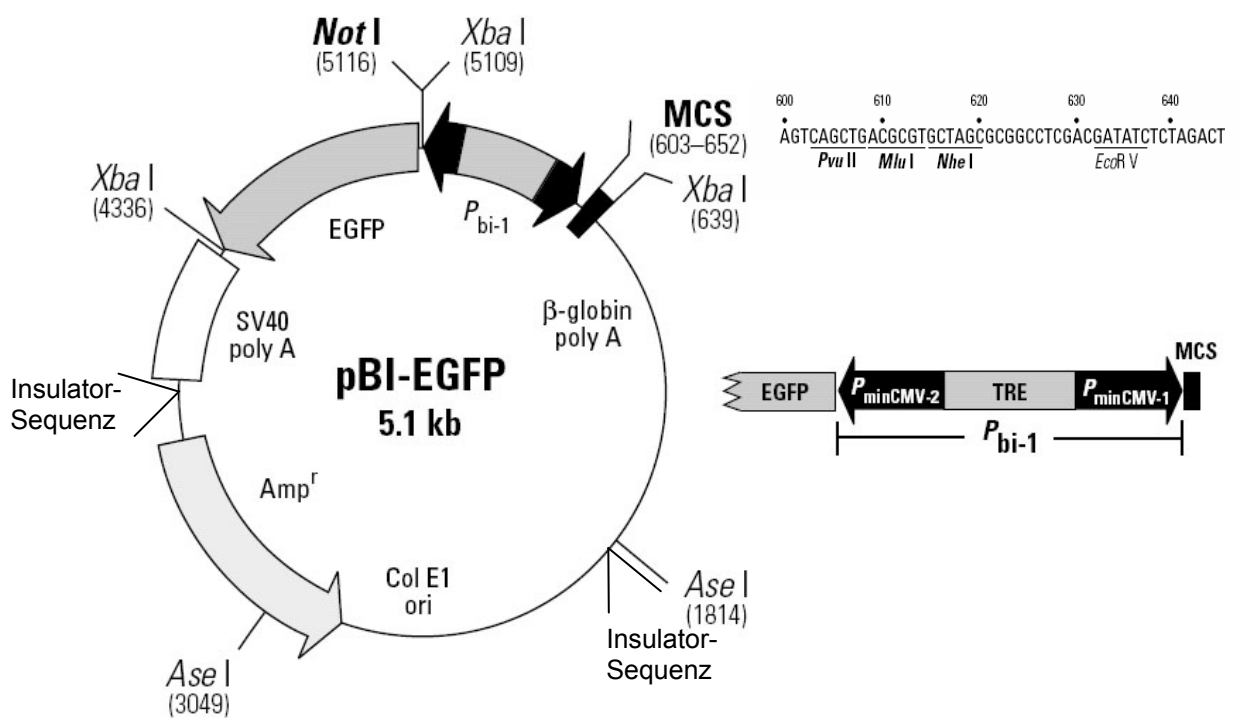


Abbildung 7-3 pBI-EGFP-Plasmidvektor (BD Biosciences Clontech, Pharmingen)

AGATGTGACCGTGAACCTGAGAACTCTACTCTAATGTACACACGAACTTCACCTTTGAGAAAGTTGTGATAT
 TCGAGGACTTGAGATGAGGTACAGTTATTAGTGCTCTATTTATAAACATTAATTTTTTCACCTGACGCGC
 CCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
 CCTAGCGCCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCT
 CTAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATT
 AGGGTGATGGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAC
 GTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGAT
 TTATAAGGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGA
 ATTTTAACAAAAATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
 TCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGG
 TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATA
 GGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTATGCTAATTAGCTTGATAGACTCTCTCTACAATGTATATATAGAT
 CAAACATCACATTGTATCCCATACATATTATATATATTATATATTTATATTATATATTATTATTGTATC
 CATTAAATATACACTTATAATTTCCAGGCAATAAAAAATGTTTTTAAAAATATAAAATTTATTTGTAACT
 CCTTTTACTTTTCTGCTTGGTTTTCTTCTTTCATTTCAGTGTTTACCAGTTTCTTATAGTTAATTTTATTT
 TAAGCTGTCTCACATTTTCTGAAGAAAAGGGAACATATTAAGCCAACAAAACAAATACACTATCTTGCA
 TGAGATGATTTATGTCATGGTACAATCAAATGCTATAAATCTTATAAAAACTTCTCAAATGGTTAGATGG
 CTACAGTTGAACAGATGGACCATGTATATATTTTTTATAATGCTTCTAAGGTATGGCTAATTTTTTAAAA
 AATATTTTAGTAATGATGGGAATATTATTTATAGAAATCTTATAAAAAATATAATGAAATATGTAATAAA
 GTCTAGATAAATGTGTATATACATAATATATATTTATTACATAATATATAATATATAATGTATATTTATA
 TATTACATGCATTATATATTAATATAATACATTTTATATATTATATATTTAAAAATATGTAATATGTTATT
 AAATATATACAATAATCTATTACATTTTATGCTTATATAATATATAATAAATATATAGTATATAATAAAT
 ATACACTATATATTTGTATCTATATATGTTTATAAAGTCATTCTCTAATTAAGCGGCGCTCTAGAACT
 AGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCCAGC
 GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTT
 GAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA
 CATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCT
 GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC
 TTCACTCGACGCTGGTCGAGCTGATACTTCCCGTCCGCCAGGGGACATGCCGGCGATGCTGAAGGTCGCG
 CGCATTTCCCGATGAAGAGGCCGTTACCGCCTGTTGACCTGGTGGGACGGGCAGGGCGCCGCCGAGTCT
 TGCCTCGGCGGCGGGCGCTCTGCTCATGGAGCGCGCGTCCGGGGACCTTGACAGATAGCGTGGTCCGGC
 CAGACGACGAGGCTTGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAA
 CCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCA
 GCTTATAATGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATT
 CTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCTCTAGAACTAGGTCGACAA
 GCTTGATATCGAATTTTACTTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGTACGAACTC
 CAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGG
 TTGTGCGGCGAGCAGCAGGGGCGCTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGAGCTGCACGC
 TGCCGTCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGAT
 ATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCTCTCTGAAAGTCG
 ATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTTACCAGGGTGTGCGCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGT
 TGCCGTCTGCTTGAAGAAGATGGTGCCTCTGGACGTGACCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTC
 GTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTAGCGGCTGAAGCATGCACGCGTAGGTCAGGGTGCTCAGGAGGTTG
 GGCCAGGGCACGGGCGAGCTTGCCGGTGGTGAGATGAACCTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGC
 CCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACCTTGTTGGCGTTTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCAC
 CACCCCGGTGAACAGCTCTCGCCCTTGCTCACCATCCGCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCT
 GCAGGAATTCGGGGCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGCTTCTATGGAGGTCAAAACAGCGTGGATG
 GCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGTGAGTTTACCCTCCCTAT
 CAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTCGAGTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTCGAGT
 TTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTCGAGTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAA
 AGTGAAGTCGAGTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTCGAGTTTACCCTCCCTAT
 CAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTCGAGTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTCGAGC
 TCGGTACCCGGGTCGAGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAACCGTC
 AGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCG
 CGGCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGTCAGCTGACGCGT-Ngb bzw. CygbCDS-
 GCTAGCGCGGCTCGACGATATCTCTAGACTGAGAACTTCAGGGTGAGTTTGGGGACCTTGATTGTTCT
 TTCTTTTTTCGCTATTGAAAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTTGTTTGAATGG
 GAAGATGTCCCTTGATCACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCATTTCTACTCTGTTGACA
 ACCATTGTCTCTCTTATTTTCTTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCAATTTGTA
 ACGAATTTTTAAATTCATTTTCTTTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCACTTTTTTTCAA
 GGCAATCAGGGTAATTATATTGACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGG

TAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAATATTCTTATTGGTAGAAACAACCTACATCCTG
 GTAATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACTCTG
 AGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGT
 GCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATTTTTGGCAAAGAATTCACCTCCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGAAG
 GTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATT
 ATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGGTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAAT
 AGTGTGTGGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAG
 AATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAA
 AGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTGCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAG
 GTTAGATTTTTTTATATTTTGTGTGTTATTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGT
 TTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAACT
 CGACTGCATTAACTAAGCTTATCGATACCGTCGCGGTATGCTAATTAGCTTGATAGACTCTCTCTACAAT
 GTATATATAGATCAAACATCACATTGTATCCCATACATATTATATATATTATATATTATATATAT
 TATTATTGTATCCATTAATATATACATTATAATTTCCAGGCAAATAAAAAATGTTTTTAAATATAAATT
 TATTTGTAACCTCCTTTTACTTTTCTGCTTGGTTTTCTTCTTTTATTTCAGTGTTTACCAGTTTCTTATAG
 TTAATTTTATTTTAAAGCTGTCTCACATTTTCTGAAGAAAAGGGAACATATTAAGCCAACAAAACAAATA
 CACTATCTTGATGAGATGATTTATGTCATGGTACAATCAAATGCTATAAATCTTATAAAAACTTCTCAA
 ATGGTTAGATGGCTACAGTTGAACAGATGGACCATGTCATATATTTTTTATAATGCTTCTAAGGTATGGC
 TAATTTTTTAAAAAATATTTTAGTAATGATGGGAATATTATTTATAGAAATCTTATAAAATATATAATGAA
 ATATGTAATAAAGCTAGATAAATGTGTATATACATAATATATATTTATTACATAATATATAATATATAA
 TGTATATTTATATATTACATGCATTATATATTAATATAATACATTTTATATATTATATATATAAATATG
 TAATATGTTATTAATATATACAATAATCTATTACATTTTATGCTTATATAATATATAATAAATATATAG
 TATATAATAAATATACACTATATATTTGTATCTATATATGTTTATAAAGTCATTCTCTAATTAGGCGGC
 CGACCTCGAGGGGGGGCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTTTCAGCTTGGCGTA
 ATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATCCACACACATACAGAGCCGGA
 AGCATAAAGTGAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGTCAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC
 CCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGG
 TTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTGGCTGCGGCGA
 GCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
 TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT
 CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA
 AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGAT
 ACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC
 GGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGT**GTGCAC**GAACCCCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTA
 TCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTA
 ACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTA
 CACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
 TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCA
 GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTC
 ACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGA
 AGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGG
 CACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTAC
 GATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACGGGCTCCA
 GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTC
 CCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTT**TGCGCAACGT**
TGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGTTCC
 CAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCT**CGA**
TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTAC
 TGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGT
 ATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
 AA**GTGC**TCATCATTTGGAA**AACGTT**CTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAG
 TTCGATGTAACCCACT**GTGCAC**CAACTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGA
 GCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATAC
 TCTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATG
 TATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCTTTTGTAAAAGTAGTGT
 TAACTAAGAATXACCGGTGATTGTGATTAATTTTTCTGAGGGAAG

Abbildung 7-4 Sequenz des modifizierten pBI-EGFP-Ins-Vektors. EGFP (bp 2467-3186);
MCS; bidirektionaler Promoter; Insulatorsequenzen; Schnittstellen: AclI; ApaL1
entspricht Alw 44 I (GTGCAC); PvuI; FspI

7.4 *Phodopus sungorus* RNA und cDNA-Präparationen

Tier	Hirnbereich			
1	1-1	1-2	1-3	1-4
RNA	0,12 µg/µl	0,04 µg/µl	0,096 µg/µl	0,136 µg/µl
cDNA RT1/RT2	153/202	83/-	93/90	86/88
2	2-1	2-2	2-3	2-4
RNA	0,08 µg/µl	0,04 µg/µl	0,168 µg/µl	0,192 µg/µl
cDNA RT1/RT2	142/141	75/83	93/88	94/97
3	3-1	3-2	3-3	3-4
RNA	0,296 µg/µl	0,176 µg/µl	0,192 µg/µl	0,144 µg/µl
cDNA RT1/RT2	149/187	64/84	65/84	70/107
4	4-1	4-2	4-3	4-4
RNA	0,112 µg/µl	0,104 µg/µl	0,104 µg/µl	0,104 µg/µl
cDNA RT1/RT2	101/146	92/99	72/93	81/79
5	5-1	5-2	5-3	5-4
RNA	0,056 µg/µl	0,168 µg/µl	0,1 µg/µl	0,072 µg/µl
cDNA RT1/RT2	161/180	128/82	89/80	95/90
6	6-1	6-2	6-3	6-4
RNA	0,152 µg/µl	0,096 µg/µl	0,16 µg/µl	0,104 µg/µl
cDNA RT1/RT2	80/96	56/65	65/81	60/69
7	7-1	7-2	7-3	7-4
RNA	0,106 µg/µl	0,09 µg/µl	0,112 µg/µl	0,084 µg/µl
cDNA	193	89	83	81
8	8-1	8-2	8-3	8-4
RNA	0,162 µg/µl	0,08 µg/µl	0,212 µg/µl	0,124 µg/µl
cDNA	123	111	83	87
9	9-1	9-2	9-3	9-4
RNA	0,086 µg/µl	0,07 µg/µl	0,158 µg/µl	0,064 µg/µl
cDNA	167	103	81	109
10	10-1	10-2	10-3	10-4
RNA	0,123 µg/µl	0,114 µg/µl	0,12 µg/µl	0,112 µg/µl
cDNA	273	97	80	94
11	11-1	11-2	11-3	11-4
RNA	0,13 µg/µl	0,123 µg/µl	0,142 µg/µl	0,096 µg/µl
cDNA	236	96	87	96
12	12-1	12-2	12-3	12-4
RNA	0,232 µg/µl	0,123 µg/µl	0,114 µg/µl	0,088 µg/µl
cDNA	112	112	77	91

Tabelle 7-10 Gesamt-RNA- und cDNA-Konzentrationen der *Phodopus sungorus*-Proben

7.5 *Phodopus sungorus* Gensequenzen für die Q-PCR

```

1 CCGTGATGCC CAGGGAAGAC AGGGCGACCT GGAAGTCCAA CTACTTCCTG AAGATCATCC
61 AACTTTTGGG TGATTACCCA AAATGCTTCA TCGTGGGAGC CGACAACGTG GGCTCGAAGC
121 AGATGCAGCA GATCCGCATG TCCCTTCGAG GGAAGGCCGT GGTGTTGATG GGCAAGAACA
181 CGATGATGCG CAAGGCCATC CGGGGCCACC TGGAGAACAA CCCCTCGCTG GAGAAGCTGC
241 TGCCGCACAT CCGCGGCAAC GTGGGCTTCG TGTTACCAA GGAGGCCCTC ACTGAGATTA
301 GGGACATGCT GCTGGCCAAT AAGGTGCCGG CTGCCGCCCG TGCTGGTGCC ATCGCCCCAT
361 GTGAGGTCAC TGTGCCAGCC CAGAACACTG GCCTGGGGCC GGAGAAGACC TCTTTCTTCC
421 AGGCTCTAGG CATCACCACG AAAATCTCCA GGGGCACCAT TGAAATT

```

Abbildung 7-5 ARP-CDS-Ausschnitt

```

1 CTGAGAGGGA AATCGTGCGT GACATCAAAG AGAAGCTGTG CTACGTTGCC CTGGACTTCG
61 AGCAAGAGAT GGCCACTGCT GCATCCTCTT CTTCCCTGGA GAAGAGCTAT GAGCTGCCTG
121 ATGGCCAGGT CATCACTATT GGCAATGAGC GGTTCGTTG CCCTGAGGCT CTTTTCCAGC
181 CTTCTTCTT GGGTATGGAG TCCTGTGGCA TCCACGAAAC TACATTCAAT TCCATCATGA
241 AGTGTGACGT TGACATCCGC AAAGACCTCT ATGCCAACAC AGTGCTGTCT GG

```

Abbildung 7-6 β -Aktin-CDS-Ausschnitt

```

1 AACCCAACAG AAGCTGAACT GCAGGATATG ATCAACGAAG TGGATGCTGA CGGGAACGGC
61 ACCATTGACT TCCCAGAGTT CTTGACCATG ATGGCTAGAA AAATGAAAGA TACAGATAGT
121 GAAGAAGAAA TCCGCGAGGC ATTCCGAGTG TTTGACAAGG ACGGAAATGG TTACATCAGT
181 GCAGCAGAGC TGCGCCACGT CATGACAAAC TTAGGAGAAA AACTAACAGA TGAAGAAGTA
241 GATGAAATGA TCAGAGAAGC AGATATTGAT GGAGATGGAC AAGTCAACTA TGAAGAATTC
301 GTACA

```

Abbildung 7-7 Calmodulin 1-CDS-Ausschnitt

```

1 GCTGCTCTGG GTGTTACAGC TCTTTCCTT GTCCCTGCAG AAGCCCAGGC TGCTCCTGTT
61 TTCCCCCTCG GTGGTTAATT TGGGGGTTCC TCTGTCACTG GGGGTGCAGC TCCAGGATGC
121 CCCTCCAGGA CAGCAAGTAA AAGGATCCGT GCACCTGAGA AACCCGAATG GCGGCTCTTG
181 CTCCCCAAG ATGGATTTTG TCCTCAGTTC AGGAAATGAT TTTGTTCTTC TCAACCTCGA
241 GGTTCATTG GAAGATGTGA GGAAGTGTG CCTCTTTAAC CTGCGTAGAG CTCCCCATGT
301 CCAGCTGATG GTTCAGTCTC CGTGGCTAAA GAAAATGATG TCCAAAGCTA CAGATACTCA
361 AGGAGTCAAC CTAAGTGTCT CTTCTCGCCG TGGACACATC TTTGTGCAGA CTGATCAGCC
421 AATTTATAAC CCTGGCCAGC GGGTTCGTTA CCGGGTCTTT GCACTGGATC ACAAGATGCG
481 CCCATCCACT GACACTCTCA CAGTCACAGT GGAGAAGTCT GATGGCCTTC GTGTACGAAA
541 GAAGGAAGTA TTTGCTCCCA CGTCCATCTT CCAAGATGAC TTCATGATCC CAGACATCTC
601 AGAGCCAG

```

Abbildung 7-8 Complement 4-CDS-Ausschnitt

```

1 ACAAGGCTGG CTACACGGAA AAGATCGTGA TTGGCATGGA CGTTGCTGCC TCTGAGTTTT
61 ATCGTGATGG CAAATATGAC TTGGATTTCA AGTCTCCCGC TGACCCTTCC CGATACATCA
121 GTGGGGACCA GCTGGGGGCA CTGTACCAGG ATTTTGTTCG GAACTATCCT GTGGTCTCCA
181 TTGAAGACCC AT

```

Abbildung 7-9 NSE Q-PCR-Fragment

```

1  AGGGTGAAGG TCGGAGTGAA CGGATTTGGC CGTATTGGAC GCCTGGTTAC CAGGGCTGCC
61 ATCAATTCTG GCAAAGTGGA CATTGTTGCC ATCAATGACC CCTTCATTGA CCCCAACTAC
121 ATGGTCTATA TGTTCCAGTA TGA CTCTACC CACGGCAAGT TCAAGGGCGC AGTCAAGGCT
181 GAGAATGGGA AGCTCGTCAT CAACGGGAAG GCTATCACCA TCTTCCAGGA GCGAGACCCC
241 GCCAACATCA AATGGGGTGA TGCTGGCGCC GAGTATGTTG TGGAGTCCAC TGGCGTCTTC
301 ACCACCATGG AGAAGGCTGG GGCCCACTTG AAGGGTGGGG CCAAGAGGGT CATCATCTCC
361 GCCCCTTCTG CTGATGCCCC CATGTTCTGT ATGGGTGTGA ACCATGAGAA ATATGACAAC
421 TCCCTCAAGA TTGTCAGCAA TGCTTCCTGC ACTACCAACT GCTTAGCCCC CCTGGCCAAG
481 GTCATCCATG ACAACTTTGG CATTGTGGAA GGACTCATGA CCACCGTCCA TGCCATCACC
541 GCCACCCAGA AGACTGTGGA TGGCCCCTCT GGGAAAGCTGT GCGGTGATGG GCGTGGGGCT
601 GCCCAGAACA TCATCCCTGC ATCCACTGGT GCTGCCAAGG CTGTGGGCAA GGT CATCCCA
661 GAGCTGAACG GGAAGCTCAC TGGCATGGCC TTCCGTGTTC CTACCCCCAA TGTGTCCGTC
721 GTGGATCTGA CGTGCCGCCT GGAGAAAGCT GCCAAGTATG ATGACATCAA GAAGGTGGTG
781 AAGCAGGCGT CCGAGGGCCC GCTGAAGGGC ATCCTGGGCT AACTGAGGA CCAGGTTGTC
841 TCCTGCGACT TCAACAGTGA CTCCCACTCT TCCACCTTTG ACGCTGGGGC TGGCATCGCT
901 CTCAATGACA ACTTCGTAAA GCTCATTTCC TGGTATGACA ATGAATTCGG CTACAGCAAC
961 AGGGTGGTGG ACCTCATGGC CTACATGGCC TCCAAGGAGT AA

```

Abbildung 7-10 GAPDH-CDS-Ausschnitt

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

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Des weiteren versichere ich, dass ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht habe.

Mainz, Februar 2007

Sylvia Wystub